

# **Murines GBP7 und interagierende Proteine in der Wirtsabwehr**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Larissa Legewie**

aus Münster

Düsseldorf, März 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

Berichtersteller:

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

Tag der mündlichen Prüfung:



# Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
TABELLENVERZEICHNIS .....	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	VII
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 DAS IMMUNSYSTEM: EIN SCHUTZMECHANISMUS GEGEN PATHOGENE .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 <i>Der Parasit Toxoplasma gondii</i> .....	3
1.1.2 <i>Der Lebenszyklus von T. gondii</i> .....	4
1.1.3 <i>T. gondii Genom und Morphologie</i> .....	6
1.1.4 <i>Invasion in Wirtszellen und Bildung der PV</i> .....	7
1.1.5 <i>Immunantwort bei Infektion mit T. gondii</i> .....	9
<b>1.2 GUANYLAT-BINDEnde PROTEINE .....</b>	<b>14</b>
1.2.1 <i>Struktur und biochemische Eigenschaften von GBPs</i> .....	15
1.2.2 <i>Physiologische Funktion von GBPs</i> .....	19
1.2.3 <i>Rolle von mGBP7 in der Immunabwehr gegen T. gondii</i> .....	24
<b>1.3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>25</b>
<b>2 MATERIAL .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 BEZUGSQUELLEN .....</b>	<b>27</b>
2.1.1 <i>Chemikalien</i> .....	27
2.1.2 <i>Kits und andere Reagenzien</i> .....	28
<b>2.2 NUKLEINSÄUREN .....</b>	<b>29</b>
2.2.1 <i>Plasmide</i> .....	29
2.2.2 <i>Oligonukleotide</i> .....	30
<b>2.3 PROTEINE .....</b>	<b>31</b>
2.3.1 <i>Enzyme</i> .....	31
2.3.2 <i>Restriktionsenzyme</i> .....	32
2.3.3 <i>Antikörper</i> .....	32
2.3.4 <i>Sekundärantikörper</i> .....	33
<b>2.4 ZELLEN .....</b>	<b>33</b>
2.4.1 <i>Zelllinien</i> .....	33
2.4.2 <i>Bakterien- und Parasitenstämme</i> .....	33
<b>2.5 PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN .....</b>	<b>34</b>
2.5.1 <i>Stammlösungen und Puffer</i> .....	34
2.5.2 <i>Medien für die Zellkultur</i> .....	36
<b>2.6 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....</b>	<b>36</b>
<b>2.7 TECHNISCHE AUSSTATTUNG .....</b>	<b>37</b>
<b>2.8 SOFTWARE.....</b>	<b>38</b>
<b>3 METHODEN.....</b>	<b>39</b>

<b>3.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN .....</b>	<b>39</b>
3.1.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	39
3.1.2 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen.....	39
3.1.3 Lentivirale Transduktion zur Herstellung stabiler Zelllinien .....	39
3.1.4 Kultivierung von <i>T. gondii</i> .....	40
3.1.5 <i>In vitro</i> -Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	40
3.1.6 Immunfluoreszenz-Färbung für konfokalmikroskopische Analysen und Airyscan .....	40
3.1.7 DNA-Transfer in <i>T. gondii</i> .....	41
3.1.8 Ko-Immunpräzipitation .....	41
<b>3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....</b>	<b>42</b>
3.2.1 Isolierung gesamtzellulärer-RNA aus eukaryotischen Zellen und <i>T. gondii</i> .....	42
3.2.2 cDNA-Synthese aus gesamtzellulärer RNA.....	42
3.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	42
3.2.4 Mutagenese-PCR.....	43
3.2.5 Restriktionsverdau von DNA .....	44
3.2.6 Dephosphorylierung von DNA.....	44
3.2.7 Ligation von DNA .....	44
3.2.8 Transformation in <i>E. coli</i> .....	44
3.2.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	45
3.2.10 Agarose-Gelelektrophorese.....	45
3.2.11 Kryokonservierung von Bakterien .....	45
3.2.12 Sanger-Sequenzierung.....	45
<b>3.3 PROTEINANALYTISCHE METHODEN .....</b>	<b>46</b>
3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen .....	46
3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test.....	46
3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	46
3.3.4 Western Blot (semidry) .....	46
3.3.5 Coomassie G250-Färbung .....	47
3.3.6 Proteinexpression und Aufreinigung.....	47
3.3.7 Malachitgrün GTPase-Aktivitäts-Test .....	48
3.3.8 SEC-MALS (Multi-angle light scattering).....	49
3.3.9 Native Gelelektrophorese (Native PAGE).....	50
3.3.10 Fluoreszenztitration.....	50
3.3.11 MALDI-TOF .....	51
3.3.12 Kristallographie .....	51
3.3.13 SAXS-Analysen.....	51
3.3.14 Massenspektrometrie .....	51
<b>4 ERGEBNISSE.....</b>	<b>53</b>
<b>4.1 BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG VON MGBP7 .....</b>	<b>53</b>
4.1.1 Expression und Aufreinigung von mGBP7 .....	53
4.1.2 Analyse der GTPase-Aktivität von WT und K51A mGBP7.....	55
4.1.3 GTP-Bindungsaffinität von WT und K51A mGBP7.....	57
4.1.4 mGBP7 hydrolysiert GTP zu GDP und GMP.....	58

4.1.5	<i>mGBP7 bildet einen transienten Dimer</i> .....	60
4.1.6	<i>Inhibierung der mGBP7 GTPase-Aktivität durch GTP-Analoga</i> .....	61
4.1.7	<i>Initiale Kristallisationsversuche von mGBP7</i> .....	64
4.1.8	<i>Strukturaufklärung von mGBP7 mittels SAXS</i> .....	65
<b>4.2</b>	<b>INTERAKTIONSPARTNER VON MGBP7</b> .....	<b>66</b>
4.2.1	<i>Ubiquitinierung von mGBP7</i> .....	66
4.2.2	<i>ISGylierung von mGBP7</i> .....	69
4.2.3	<i>Optimierung der Ko-Immunpräzipitationsbedingungen</i> .....	70
4.2.4	<i>Identifikation von mGBP7-Interaktionspartnern</i> .....	71
4.2.5	<i>Validierung von mGBP7-Interaktionspartnern mittels Ko-IP und WB</i> .....	74
4.2.6	<i>Validierung der mGBP7-Interaktionspartner mittels GFP/mCherry-Fusionskonstrukten</i> .....	78
4.2.7	<i>Detaillierte Analyse der Interaktion von mGBP7 mit Tom1</i> .....	85
4.2.8	<i>Generierung von SRS29C-mCherry exprimierenden T. gondii</i> .....	88
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>91</b>
5.1	<b>BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG VON MGBP7</b> .....	<b>91</b>
5.2	<b>STRUKTURELLE CHARAKTERISIERUNG VON MGBP7</b> .....	<b>94</b>
5.3	<b>POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN VON MGBP7</b> .....	<b>97</b>
5.4	<b>INTERAKTIONSPARTNER VON MGBP7: CLCA1, JUP, RFTN1 UND SYTL2</b> .....	<b>100</b>
5.5	<b>FUNKTIONEN VON TOM1 UND CLATHRIN IN DER MGBP7-VERMITTELTEN IMMUNABWEHR</b> .....	<b>105</b>
5.6	<b>FUNKTION VON SRS29C IN DER MGBP7-VERMITTELTEN IMMUNABWEHR</b> .....	<b>112</b>
5.7	<b>AUSBLICK</b> .....	<b>114</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>117</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>121</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>141</b>
<b>10</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b> .....	<b>151</b>
<b>11</b>	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</b> .....	<b>152</b>
<b>12</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>153</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Lebenszyklus von <i>T. gondii</i> .....	5
Abb. 1.2: Struktur eines <i>T. gondii</i> Tachyzoiten.....	7
Abb. 1.3: Modell der Wirtszellinvasion von <i>T. gondii</i> .....	9
Abb. 1.4: Immunantwort auf eine Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	13
Abb. 1.5: Genomische und phylogenetische Organisation von GBPs.....	15
Abb. 1.6: Struktur und Oligomerisierung von humanem GBP1.....	18
Abb. 1.7: Intrazelluläre Lokalisation und Dynamik von mGBPs bei Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	22
Abb. 1.8: Infektion von mGBP7-defizienten Mäusen mit <i>T. gondii</i> .....	25
Abb. 4.1: Strukturvergleich der GBP-Domänen von mGBP7, hGBP1 und mGBP2.....	53
Abb. 4.2: Profile der Größenausschlusschromatographie von WT und K51A mGBP7.....	54
Abb. 4.3: Reinheit und Identifikation von WT und K51A mGBP7.....	54
Abb. 4.4: GTPase-Aktivität von WT und K51A mGBP7.....	56
Abb. 4.5: GTP-Bindungsaffinität von WT und K51A mGBP7.....	58
Abb. 4.6: Identifikation von Reaktionsprodukten der mGBP7-vermittelten GTP-Hydrolyse.....	59
Abb. 4.7: SEC-MALS: Konzentrationsabhängige Dimerisierung von mGBP7.....	61
Abb. 4.8: Inhibierung von mGBP7 durch $\gamma$ -Phosphatanaloga.....	62
Abb. 4.9: Native Gelelektrophorese mit WT und K51A mGBP7.....	63
Abb. 4.10: Proteinkristalle von K51A mGBP7.....	64
Abb. 4.11: Kleinwinkelröntgenstreuungsanalysen von mGBP7.....	65
Abb. 4.12: Analyse der ersten Ko-Immünpräzipitation.....	67
Abb. 4.13: Ubiquitinierung von mGBP7.....	68
Abb. 4.14: ISGylierung von mGBP7.....	70
Abb. 4.15: Biologische Ko-IP-Replikate für die MS-Analysen.....	72
Abb. 4.16: <i>Volcano Plots</i> der MS-Daten.....	73
Abb. 4.17: Validierung von mGBP7-Interaktionspartnern mittels Ko-IP und Western Blot (1).....	76
Abb. 4.18: Validierung von mGBP7-Interaktionspartnern mittels Ko-IP und Western Blot (2).....	77
Abb. 4.19: Subzelluläre Lokalisation von mCherry-mGBP7 und Clca1-GFP.....	80
Abb. 4.20: Subzelluläre Lokalisation von mCherry-mGBP7 und GFP-Jup.....	81
Abb. 4.21: Subzelluläre Lokalisation von mCherry-mGBP7 und GFP-Rftn1.....	82
Abb. 4.22: Subzelluläre Lokalisation von mCherry-mGBP7 und Sytl2-GFP.....	83
Abb. 4.23: Subzelluläre Lokalisation von mCherry-mGBP7 und Tom1-GFP.....	84
Abb. 4.24: Western Blot-Analysen der mit Sytl2, Tom1 und/oder mGBP7 rekonstituierten mGBP7 <sup>-/-</sup> -Zellen.....	85
Abb. 4.25: Subzelluläre Lokalisation von mCherry-mGBP7, Tom1-GFP und Clathrin bei einer Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	87
Abb. 4.26: Subzelluläre Lokalisation von Tom1-GFP und Clathrin in mGBP7 <sup>-/-</sup> -Zellen bei einer Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	88

---

Abb. 4.27: Generierung von SRS29C-mCherry exprimierenden <i>T. gondii</i> .....	89
Abb. 5.1: Homologiemodell für mGBP7 und ein Modell für den in die Membran inserierten CT-Part.....	95
Abb. 5.2: Modell zur IFN $\gamma$ -induzierten Ubiquitinierung der <i>T. gondii</i> PV in Mäusen.....	98
Abb. 5.3: (De)Ubiquitinierung und (De)ISGylierung.....	99
Abb. 5.4: Weitere potentielle Interaktionspartner von mGBP7.....	107
Abb. 5.5: Tom1-Domänenstruktur.....	109
Abb. 5.6: Myosin 6-Domänenstruktur.....	110
Abb. 5.7: Modell zur Funktion von Tom1 und Myosin 6 in der Reifung von Autophagosomen.....	110
Abb. 5.8: Hypothese zur Funktion von mGBP7 und Tom1 in der Immunabwehr gegen <i>T. gondii</i> .....	111
Abb. 5.9: Überexpression von SRS29C in <i>T. gondii</i> und Infektion von CD-1-Mäusen .....	113
Abb. S1: SDS-PAGE-Analysen von WT und K51A mGBP7.....	141
Abb. S2: Inhibierung von mGBP7 durch GDP-Inhibitor Komplexe.....	141
Abb. S3: Western Blot Analyse von HA-mGBP rekonstituierten Zelllinien.....	142
Abb. S4: Normalisierte Intensitäten von ISG15, Ubiquitin und dem Peptid EAIAVFMEHSFKDENQQFQK.....	143
Abb. S5: Optimierung der Ko-IP-Konditionen.....	144
Abb. S6: <i>Heatmap</i> Darstellung der MS-Daten.....	145
Abb. S7: Hauptkomponentenanalyse.....	146
Abb. S8: Western Blot Analyse von mit GFP-Fusionskonstrukten rekonstituierten Zelllinien.....	147
Abb. S9: Subzelluläre Lokalisation von mCherry-mGBP7, Tom1-GFP und Clathrin.....	148
Abb. S10: Subzelluläre Lokalisation von Tom1-GFP und Clathrin in mGBP7 <sup>-/-</sup> MEFs bei einer Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	149
Abb. S11: Western Blot Analyse von <i>T. gondii</i> - und Zelllysaten.....	150

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Aufbau des Immunsystems.....	2
Tab. 4.1: Übersicht über die ermittelten, kinetischen Parameter der mGBP7 GTPase-Aktivität in der Gegenwart verschiedener Nukleotide.....	57
Tab. 4.2: Übersicht über die berechneten $IC_{50}$ -Werte für die verschiedenen $\gamma$ -Phosphatanaloga.....	63
Tab. 4.3: Massenspektrometrie Ergebnisse.....	68
Tab. 4.4: Potentielle mGBP7-Interaktionspartner.....	74

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AK</b>	Antikörper
<b>AS</b>	Aminosäure(n)
<b>bp</b>	Basenpaar(e)
<b>cDNA</b>	DNA-Kopie der mRNA (komplementäre DNA)
<b>CT</b>	C-terminal
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dpi</b>	Tage nach der Infektion (engl.: <i>days post infection</i> )
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>F</b>	Farad
<b>GBP</b>	Guanylat-bindendes Protein
<b>GFP</b>	grün fluoreszierendes Protein
<b>h</b>	Stunde(n)
<b>HIV</b>	humanes Immundefizienz-Virus
<b>HPLC</b>	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleukin
<b>ISG15</b>	Interferon-stimuliertes Gen 15
<b>kB</b>	Kilobasenpaare
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>Ko-IP</b>	Ko-Immunpräzipitation
<b>kV</b>	Kilovolt
<b>M</b>	Molar
<b>Mbp</b>	Megabasenpaare
<b>MEF</b>	murine embryonale Fibroblasten
<b>min</b>	Minute(n)
<b>M-MLV</b>	Moloney-Maus-Leukemia-Virus
<b>mRNA</b>	Boten (engl.: <i>messenger</i> )-RNA
<b>NADPH</b>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
<b>ORF</b>	offener Leserahmen (engl.: <i>open reading frame</i> )
<b>p. c.</b>	post coitum
<b>p. i.</b>	nach Infektion (engl.: <i>post infection</i> )
<b>PTM</b>	posttranslationale Modifikation
<b>PV</b>	parasitophore Vakuole
<b>PVM</b>	parasitophore Vakuolen-Membran

<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>rotations per minute</i> )
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>S. D.</b>	Standardabweichung (engl.: <i>standard deviation</i> )
<b>TAE</b>	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
<b>U</b>	Enzymeinheit(en) (engl.: <i>enzyme unit</i> )
<b>ü. N.</b>	über Nacht
<b>(v/v)</b>	Volumen/Volumen
<b>VLS</b>	Vesikel-ähnliche Strukturen (engl.: <i>vesicle-like structures</i> )
<b>WB</b>	Western Blot
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>(w/v)</b>	Gewicht (engl.: <i>weight</i> )/Volumen

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem: Ein Schutzmechanismus gegen Pathogene

Das Immunsystem der Mammalia verfügt über eine Reihe an biologischen und biochemischen Abwehrmechanismen, um den Körper vor Infektionen zu schützen. Erst im späten 19. Jahrhundert konnte bewiesen werden, dass Infektionskrankheiten durch Mikroorganismen, die jeweils spezifische Krankheiten verursachen, ausgelöst werden [1]. Die krankheitsverursachenden Mikroorganismen oder Pathogene lassen sich in vier große Gruppen einteilen: Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten [1]. Die Reaktion, die ein Organismus bei einer Infektion mit diesen potentiellen Pathogenen entwickelt, wird als Immunantwort oder Immunreaktion bezeichnet [1]. Bei der Immunantwort wird zwischen einer unspezifischen und einer spezifischen Komponente unterschieden. Die unspezifische Immunantwort, auch als angeborene Immunität bezeichnet, ist entsprechend ihrer Bezeichnung von Geburt an vorhanden [2]. Als erste Verteidigungslinie zählen zu dieser die anatomischen und physiologischen Barrieren, z. B. die Epithelzellen der Haut, die bereits ein Eindringen vieler Pathogene in den Körper verhindern [2]. Die zellulären Bestandteile des angeborenen Immunsystems bilden hauptsächlich die Phagozyten (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen) und die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) [2]. Die Zellen des angeborenen Immunsystems tragen nach dem Eindringen eines Pathogens durch diverse antimikrobielle Effektormechanismen, wie u. a. der Freisetzung zytotoxischer Sauerstoffradikale, zur Eliminierung des Pathogens oder zur Verzögerung der Infektionsausbreitung bei [2]. Insbesondere Makrophagen dienen im Rahmen der angeborenen Immunabwehr zur Eliminierung eingedrungener Mikroorganismen durch Phagozytose [1]. Dieser Prozess des Aufnehmens und der Abtötung von Erregern bewegt diese Zellen zur Sezernierung von Signalproteinen, den Chemokinen und Zytokinen, die weitere Immunzellen aktivieren und zu einer Immunantwort mobilisieren [1]. Die Chemokine und Zytokine gehören zu den humoralen Faktoren des unspezifischen Immunsystems, zu denen weiterhin die Akute-Phase-Proteine (APPs) und das Komplementsystem zählen [2]. Die APPs dienen unter anderem der Aktivierung der Komplement-Proteine, wodurch es zu einer weiteren Rekrutierung inflammatorischer Zellen (Chemotaxis), der Abtötung des Erregers durch die Bildung eines lytischen Komplexes (Membranangriffskomplex) und einer verstärkten Eliminierung durch Phagozytose kommt [1]. Diese schnelle, jedoch unspezifische Abwehr wird vor allem durch Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, engl.: *pattern recognition receptors*) der Körperzellen und insbesondere der Zellen des angeborenen Immunsystems ermöglicht. Die PRRs sind bereits im Genom des Organismus festgelegt, d. h. sie sind Keimbahn-kodiert. Sie erkennen konservierte Muster von molekularen Strukturen, die als Pathogen-assoziierte Muster (PAMPs, engl.: *pathogen-associated molecular patterns*) bezeichnet werden [1]. Diese Strukturen befinden sich auf vielen Mikroorganismen, nicht jedoch auf den körpereigenen Zellen und ermöglichen somit die Fähigkeit zur Diskriminierung zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ [2]. Durch die Gesamtheit der Abwehrmechanismen der angeborenen Immunabwehr kann ein breites Spektrum an Erregern bekämpft werden, jedoch keine dauerhafte Immunität generiert werden. Hier kommt die spezifische Komponente der Immunantwort, die sogenannte adaptive oder erworbene Immunität, ins Spiel. Die adaptive Immunität entwickelt sich im Laufe des Lebens als Anpassung an Infektionen mit bestimmten

Krankheitserregern [1]. Sie benötigt etwas mehr Zeit nach Pathogenkontakt und richtet sich gezielt gegen spezifische Antigene des Erregers, d. h. jede Substanz, die durch Antikörper oder T-Zellen erkannt werden kann und auf die eine immunologische Reaktion erfolgt [1]. Ermöglicht wird diese spezifische Immunantwort vor allem durch die somatische Rekombination, einem Prozess der durch die Umlagerung von Gensegmenten für eine große Variabilität der B-Zell- (BCR) sowie der T-Zell-Rezeptoren (TCR) sorgt [1]. Das Auslösen der adaptiven Immunantwort beginnt, wenn spezialisierte Phagozyten (unreife dendritische Zellen) in einem Gewebe Krankheitserreger und deren Antigene aufnehmen [1]. Nach Aufnahme und Prozessierung des Pathogens wandern diese Zellen in die peripheren lymphatischen Gewebe, wo sie zu hochspezifischen Antigen präsentierenden Zellen (APCs) heranreifen [1]. Die herangereiften APCs präsentieren daraufhin das fremde Antigen im Kontext von MHC-Molekülen sowie weiteren kostimulierenden Molekülen den T-Zellen, wodurch diese angeregt werden sich zu vermehren und in ihre endgültige, vollständig funktionsfähige Form ausdifferenzieren [1]. Erkennen B-Zellen über ihren BCR dasselbe Antigen, können diese nach Internalisierung, Prozessierung und Präsentation von Fragmenten des Antigens an ihrer Oberfläche durch die T-Zellen (T-Helferzellen) aktiviert werden. Neben der Erkennung über den BCR ist hierfür, ähnlich wie bei den T-Zellen, eine zusätzliche Aktivierung über kostimulierende Moleküle und sezernierte Zytokine erforderlich [1]. Durch diese Aktivierung kommt es zur Vermehrung der B-Zellen (klonale Expansion) und deren Differenzierung zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen [1]. Weitere von den APCs aktivierte T-Zellen (Zytotoxische T-Zellen) sind zudem in der Lage nach weiterer Stimulation infizierte Zellen durch Freisetzung zytotoxischer Moleküle zu eliminieren [1]. Einige dieser aktivierten antigenspezifischen B- und T-Zellen, die so genannten Gedächtniszellen, bleiben auch nach der Beseitigung der Infektion erhalten. Sie bilden die Grundlage für die Bildung eines „immunologischen Gedächtnisses“, welches bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen eine schnellere und effektivere Immunantwort ermöglicht [1]. Diese Adaption an Antigene macht die hohe Spezifität der adaptiven Immunantwort aus und ermöglicht es dem Körper auch, jene Pathogene zu eliminieren, die die angeborene Immunantwort umgangen oder überwunden haben.

**Tab. 1.1: Aufbau des Immunsystems.** Übersicht über die Eigenschaften und vielfältigen Komponenten der angeborenen und adaptiven Immunität (modifiziert nach Löffler et al., 2019, [2]).

	<b>Angeborene Immunität</b>	<b>Adaptive Immunität</b>
Zelluläre Komponenten	Phagozyten Natürliche Killerzellen	T-Zellen B-Zellen Antigen präsentierende Zellen
Humorale Komponenten	Chemokine Zytokine Sauerstoffspezies Komplement Akute-Phase-Proteine	Zytokine Antikörper
Diversität	limitiert; Keimbahn-kodierte Mustererkennungsrezeptoren	unbegrenzte Vielfalt; Antigen- Rezeptoren gebildet durch somatische Rekombination
Gedächtnis	nein	ja
Kinetik	sofort, wenige Tage	Tage bis Wochen

Das Immunsystem kann aus evolutionärer Sicht als genetische Anpassung der Wirtsorganismen auf sich ständig verändernde Krankheitserreger betrachtet werden. Während die Pathogene versuchen durch eine hohe genetische Diversität der Immunantwort zu entkommen, sind die Wirte das Produkt einer langen Evolutionsgeschichte hin zu weitreichender Resistenz gegen diverse Mikroorganismen [1]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die komplexe Wirt-Pathogen-Wechselbeziehung auf molekularer Ebene am Beispiel einer parasitären Infektion untersucht. Im Folgenden soll deshalb der Modellorganismus *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) sowie die mit diesem Parasiten assoziierte Immunantwort erläutert werden.

### 1.1.1 Der Parasit *Toxoplasma gondii*

*T. gondii* ist ein obligat intrazellulärer Parasit, der dem Stamm der Apicomplexa angehört [3]. Die Apicomplexa sind einzellige Parasiten, für deren Vermehrung ein Wechsel zwischen geschlechtlicher und ungeschlechtlicher Fortpflanzung, der in der Regel auch mit einem Wirtswechsel verbunden ist, charakteristisch ist [3]. Weiterhin sind die Apicomplexa durch den namensgebenden Apikalkomplex, der ihnen in bestimmten Phasen ihres Lebenszyklus für die Wirtszellinvasion dient, gekennzeichnet [4]. Der Parasit *T. gondii* wurde erstmalig 1908 von Charles Nicolle und Louis Manceaux aus dem afrikanischen Nager *Ctenodactylus gundi* isoliert und entsprechend ihrer Form als Toxoplasma (griechisch *toxos*, Bogen) benannt [3]. Durch phylogenetische Analysen erfolgte die Einordnung in die drei klonalen Linien (Typ-I – III) [5]. Der Großteil der Infektionen erfolgt beim Menschen durch Typ-II *T. gondii* [5]. Für die einzelnen Stammtypen ist insbesondere ihre unterschiedliche Virulenz im Mausmodell charakteristisch. Während bereits eine Zyste der Typ-I *T. gondii*-Stämme im Mausmodell letal wirkt, sind die Typ-II und Typ-III *T. gondii*-Stämme deutlich weniger virulent [6]. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten, intermediär virulenten Typ-II ME49 Toxoplasmen zeigen im Mausmodell eine mittlere letale Dosis von  $\geq 10^3$  Parasiten [7, 8]. Gründe für die Unterschiede in der Pathogenität rühren u. a. von Proteinen, die aus spezialisierten Organellen, den Rhoptrien und den Dichten Granula, sekretiert werden und von verschiedenen Varianten von Virulenzfaktoren, her [8-10]. Weiterhin charakteristisch für *T. gondii* ist sein breites Wirtsspektrum [11]. Nahezu alle warmblütigen Vertebraten können von dem Parasiten als Zwischenwirt infiziert werden. Als Endwirt für die sexuelle Vermehrung sind dagegen nur Katzenartige beschrieben [12-15]. Insgesamt wird angenommen, dass ungefähr ein Drittel der Weltbevölkerung mit *T. gondii* infiziert ist [16]. Ein besonders hohes Risiko stellt mitunter die Erstinfektion während einer Schwangerschaft dar, da es bei dieser zu einer transplazentalen Übertragung des Parasiten von der Mutter auf den Fötus kommen kann. Eine solche kongenitale Infektion kann im schlimmsten Fall zu Fehlgeburten oder schwerwiegenden Missbildungen des Ungeborenen führen [17, 18]. Zudem kann die Toxoplasmen-Infektion bei immunkompromittierten Individuen, wie beispielsweise bei HIV/AIDS (engl.: *acquired immunodeficiency syndrome*)-Patienten oder Patienten mit schwerer Immunsuppression nach einer Stammzell- oder Organtransplantation, zu gravierenden Komplikationen führen. Nicht selten kommt es zu einer lebensgefährlichen zerebralen Toxoplasmose, die sich klinisch als Enzephalitis manifestiert [19]. Bei gesunden immunkompetenten Individuen verläuft eine Infektion mit *T. gondii* hingegen

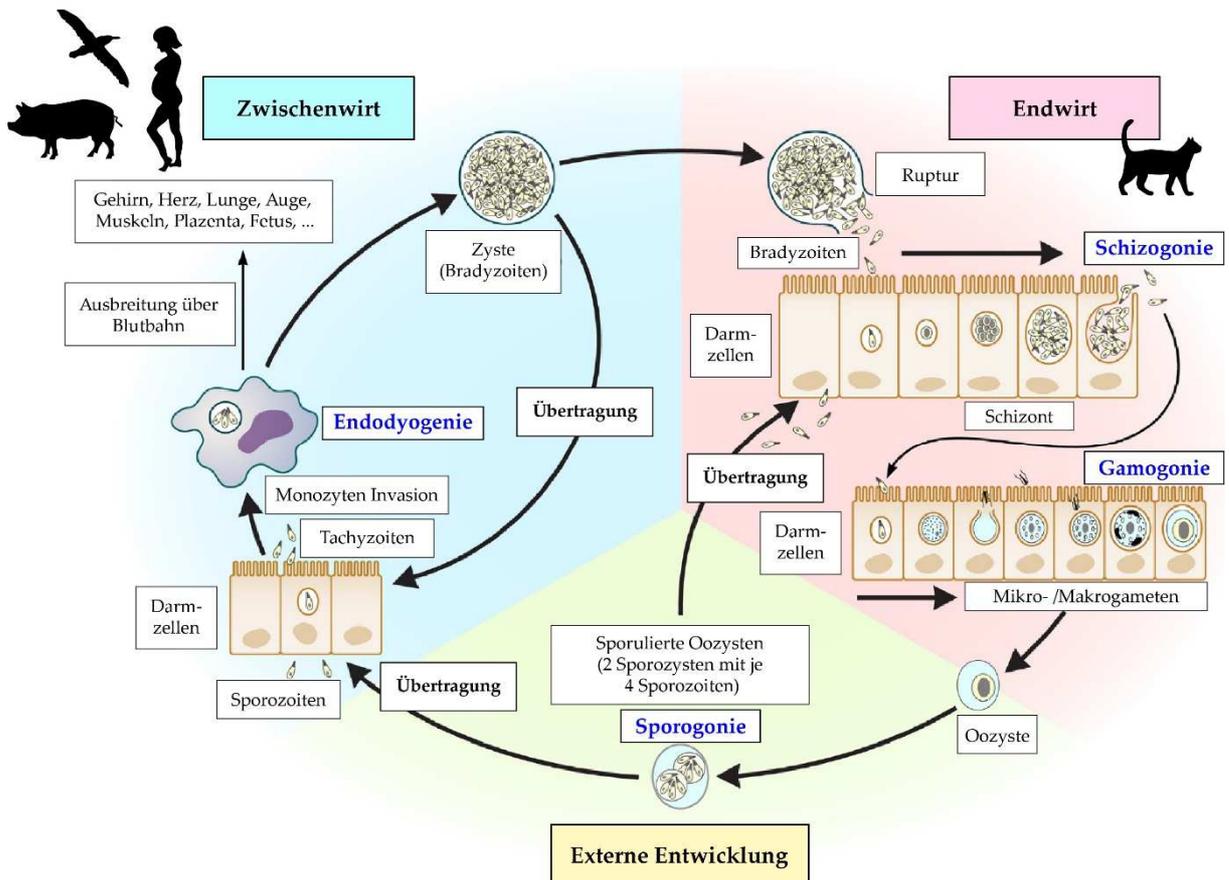
überwiegend asymptomatisch und äußert sich nur selten mit leichten Grippe-ähnlichen Symptomen [16].

Aufgrund der hohen Risiken bei einer kongenitalen Toxoplasmose sowie dem schwerwiegenden Erkrankungsausmaß bei einer Infektion von immunsupprimierten Individuen, hat die *T. gondii* Forschung in den letzten Jahren an wissenschaftlicher und klinischer Relevanz gewonnen. Des Weiteren konnte sich Toxoplasma als Modellorganismus etablieren, da neue Techniken entwickelt wurden mit denen sich der Parasit im Vergleich zu anderen Apicomplexa genetisch leichter manipulieren lässt. Vorteilhaft ist zudem, dass die ungeschlechtliche Vermehrung von *T. gondii* in Zwischenwirtszellen in Zellkultur erfolgen kann [20].

### 1.1.2 Der Lebenszyklus von *T. gondii*

*T. gondii* zählt im Stamm der Apicomplexa zur Untergruppe der *Coccidia*. *Coccidia* befallen vorwiegend den Magen-Darm-Trakt und besitzen einen komplexen Lebenszyklus, bestehend aus einer sexuellen (Endwirt) und einer asexuellen (Zwischenwirte) Vermehrungsphase. *T. gondii* ist innerhalb dieser Gruppe einzigartig, da der Parasit nicht nur zwischen End- und Zwischenwirten, sondern auch von Zwischenwirt auf Zwischenwirt und von Endwirt auf Endwirt übertragen werden kann (Abb. 1.1). Die sexuelle Vermehrung von *T. gondii* erfolgt im Darmepithel von Katzenartigen (*Feloidea*). Nach der Ingestion von Gewebezysten eines Zwischenwirtes wird die Zystenwand durch gastrische Enzyme zerstört. Die freigesetzten Bradyzoiten differenzieren in Tachyzoiten und dringen in die Epithelzellen des Darms ein, wo sie eine selbst-limitierende Anzahl an Zellteilungen vollführen [21]. Aus dem entstandenen Schizont bilden sich wiederum mehrere tausend Merozoiten (ungeschlechtliche Tochterzellen) [22]. Diese Phase der ungeschlechtlichen Vermehrung wird als Schizogonie bezeichnet. Nach der Schizogonie erfolgt die sexuelle Entwicklung, die durch die Bildung von männlichen (Mikro-) und weiblichen (Makro-)Gameten (Gamogonie) charakterisiert ist [23, 24]. Nach der Befruchtung eines Makrogameten durch einen Mikrogameten kommt es zur Bildung einer Zygote (diploid), welche dann zu einer unsporlierten Oozyste heranreift. Diese wird dann mit dem Katzenkot ausgeschieden und reift innerhalb weniger Tage in der externen Umwelt (Sporogonie) zu einer infektiösen sporulierten Oozyste, bestehend aus je zwei Sporozysten mit je vier Sporozoiten (haploid), heran. Das Ausscheiden von Oozysten beginnt ca. 3 bis 7 Tage nach der Ingestion von Gewebezysten und kann bis zu 20 Tage andauern. Die Oozysten bleiben bis zu fünf Jahre infektiös und können ein breites Spektrum an Zwischenwirten, nahezu alle warmblütigen Vertebraten, infizieren. Oozysten sind auch für Katzen infektiös, allerdings in einem geringeren Ausmaß [21]. In den Zwischenwirten erfolgt nach der Ingestion die asexuelle Vermehrungsphase. Nach Aufnahme von Oozysten, beispielsweise mit der Nahrung oder Wasser [15, 25], werden die Sporozoiten freigesetzt und dringen in das Dünndarmepithel des Wirtes ein. Dort differenzieren sie in Tachyzoiten, welche sich schnell über Endodyogenie replizieren und im Organismus verbreiten können. Die einsetzende Immunantwort des Wirtes führt innerhalb einer Woche zur Konversion der sich schnell replizierenden Tachyzoiten in die sich nur langsam teilenden Bradyzoiten [3]. Diese Stadien sind am Aufbau einer 2 – 3 µm dicken Zystenwand beteiligt, in der sie vor immunologischen und physiologischen Wirtseinflüssen geschützt

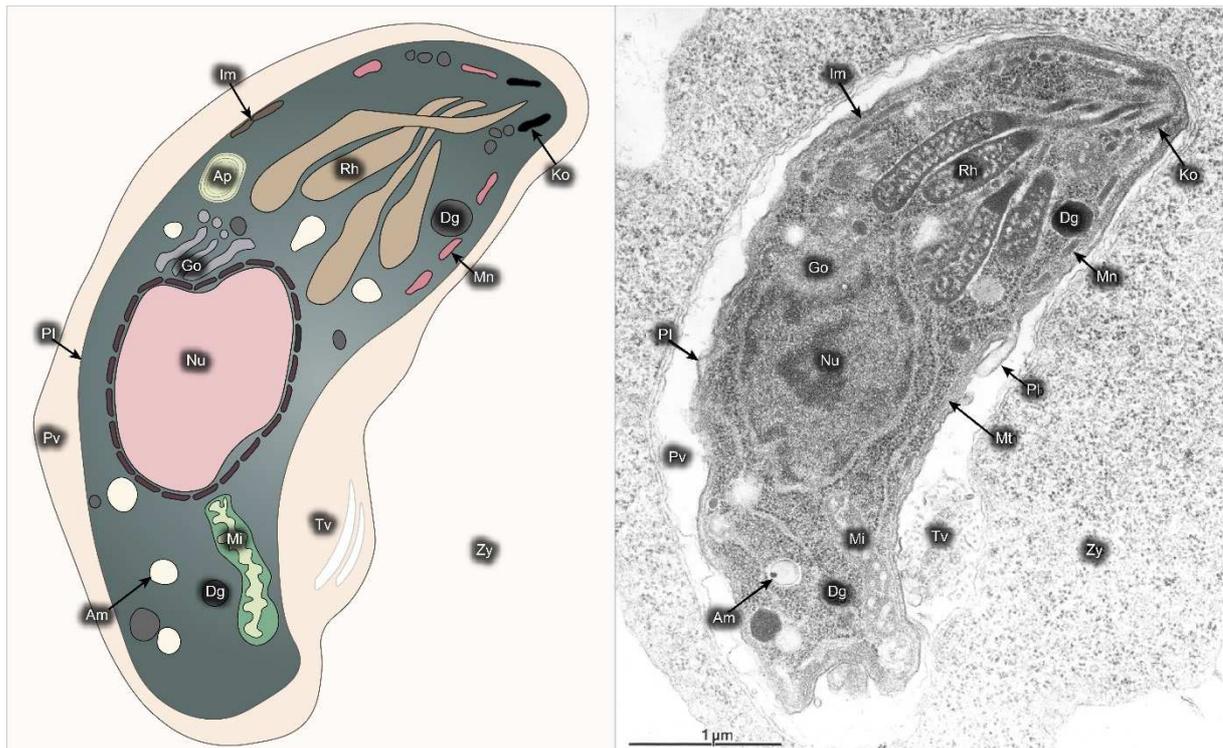
sind. Diese Zysten manifestieren sich vor allem im Gehirn sowie der Herz- und Skelettmuskulatur [26]. Nach der Ingestion dieser Gewebezysten durch andere Zwischenwirte, z. B. durch rohes oder nicht durchgegartes Fleisch, erfolgt die Ruptur der Zysten im Magen-Darm-Trakt und die freigesetzten Bradyzoiten differenzieren wiederum in Tachyzoiten. Durch die sich schnell teilenden Tachyzoiten erfolgt dann auch im neu infizierten Wirt eine schnelle Ausbreitung des Parasiten im gesamten Organismus [11].



**Abb. 1.1: Lebenszyklus von *T. gondii*.** Übersicht über die Biologie, Infektion und Replikation der drei infektiösen Stadien des Parasiten in ihren entsprechenden Wirtsorganismen (modifiziert nach Robert-Gagneux et al., 2012, [21]).

### 1.1.3 *T. gondii* Genom und Morphologie

Das Genom von *T. gondii* ist auf 14 Chromosomen verteilt und umfasst je nach Stamm ca. 63 – 70 Mbp [27]. Zusätzlich besitzt der Parasit ein episomales 35 kB plastidenähnliches Genom in einem für Apicomplexa typischen Organell, dem Apicoplasten. Dieses Organell besitzt im Gegensatz zu den photosynthetisch aktiven Plastiden der höheren Pflanzen und Algen nicht zwei, sondern vier Hüllmembranen. Zusammen mit phylogenetischen Untersuchungen verschiedener Plastidengenome deuten die vier Hüllmembranen auf einen Ursprung dieses Organells durch sekundäre Endosymbiose einer Rotalge hin [28, 29]. Interessanterweise konnten pharmakologische Studien und genetische Modifikationen zeigen, dass ein funktionaler Apicoplast für das Überleben von *T. gondii* essentiell ist [30, 31]. Zu den Aufgaben des Apicoplasten zählen u. a. die Synthese von Isoprenoiden, Hämen und Fettsäuren [32-34]. Die vier invasiven Stadien von *T. gondii* (Tachyzoiten, Bradyzoiten, Merozoiten und Sporozoiten) unterscheiden sich in ihrer Struktur nur geringfügig [35]. Tachyzoiten (Abb. 1.2) und Bradyzoiten haben eine gebogene Form und sind ca. 2x6 µm groß, wobei Bradyzoiten etwas schmaler sind [36]. Sporozoiten sind mit einer Größe von 2x10 µm hingegen geringfügig größer und Merozoiten stellen mit ca. 1 µm Länge das im Vergleich kleinste Stadium dar [37, 38]. Alle Stadien besitzen an ihrem vorderen Pol den für Apicomplexa charakteristischen Apikalkomplex, der beim Eindringen des Parasiten in eine Wirtszelle eine wichtige Rolle spielt [39]. Dieser apikale Komplex besteht aus Zytoskelett-Komponenten (Konoid, Mikrotubuli, Polring) sowie spezialisierten sekretorischen Organellen (Rhoptrien, Mikronemen) [36]. Die Dichten Granula, eine weitere Art von sekretorischen Organellen, sind im gesamten Zytoplasma des Parasiten vorzufinden. Darüber hinaus verfügt *T. gondii* über spezifische Organellen der eukaryotischen Zelle (Nukleus, Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat) und besitzt interessanterweise, wie die meisten Vertreter der Apicomplexa, nur über ein einzelnes längliches, häufig am Nukleus lokalisiertes Mitochondrium [40]. Einen Hauptunterschied zwischen Tachyzoiten, Bradyzoiten und Sporozoiten definiert sich in der Abundanz von Mikronemen, Amylopektin-haltigen und Dichten Granula. Beispielsweise verfügen Tachyzoiten über vergleichbar wenig Mikronemen und Amylopektin-haltige Granula, während Bradyzoiten weniger Dichte Granula besitzen [36]. Alle infektiösen Stadien von *T. gondii* sind von einem charakteristischen Membrankomplex, dem Pellikel, umschlossen. Dieser setzt sich aus der äußeren Plasmamembran und zwei eng aneinander liegenden Membranen, die den inneren Membrankomplex bilden, zusammen [36]. Bei der Wirtszellinvasion kommt es darüber hinaus zur Bildung einer parasitophoren Vakuole (PV), welche es dem Parasit ermöglicht physikalisch abgetrennt vom Zytoplasma der Wirtszelle eine replikative Nische auszubilden [41].



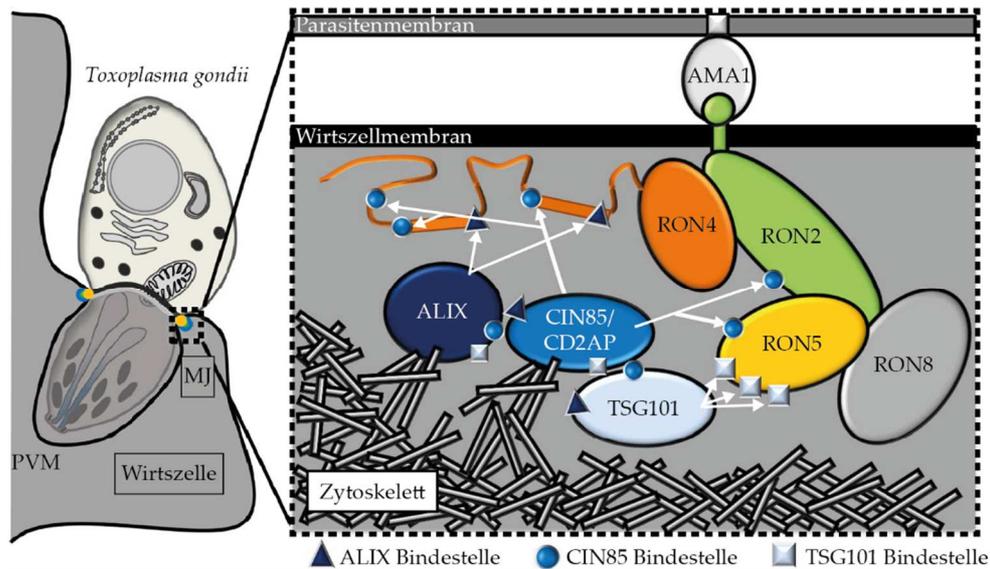
**Abb. 1.2: Struktur eines *T. gondii* Tachyzoiten.** Aufnahme eines *T. gondii* Tachyzoiten in einer murinen peritonealen Exudatzelle mit einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM, rechts, modifiziert nach Hill et al., 2005 [42]) und graphische Darstellung dieser TEM-Aufnahme zur besseren Übersicht (links). Am, Amylopektin. Ap, Apicoplasten. Dg, Dichte Granula. Go, Golgi-Apparat. Im, Innerer Membrankomplex. Ko, Konoid. Mi, Mitochondrium. Mn, Mikronemen. Mt, Mikrotubuli. Nu, Nukleus. Pl, Plasmamembran. Pv, Parasitophore Vakuole. Rh, Rhoptrien. Tv, Tubulovesikuläre Membranen. Zy, Zytoplasma der Wirtszelle.

#### 1.1.4 Invasion in Wirtszellen und Bildung der PV

Die Wirtszellinvasion von *T. gondii* (Abb. 1.3) ist ein aktiver Prozess, der durch die sequentielle Sekretion von Proteinen aus den spezialisierten, apikal lokalisierten Organellen des Parasiten gesteuert wird. Der gesamte Invasionsprozess dauert nur ca. 25 – 40 s und ist somit deutlich schneller als phagozytische Ereignisse [41]. Angetrieben wird die Invasion zu einem großem Anteil durch einen Aktin-Myosin-Motorkomplex, welcher unterhalb der Plasmamembran von *T. gondii* lokalisiert ist und ein Substrat-abhängiges Gleiten (engl.: *gliding motility*) des Parasiten über Oberflächen ermöglicht [43]. Zudem sekretieren die Mikronemen bei dem initialen Kontakt mit der Wirtszelle, induziert durch erhöhte intrazelluläre Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Level [44], adhäsive Proteine wie AMA1 (engl.: *apical membrane protein 1*). Dem Membranprotein AMA1 wird bei der Invasion in Wirtszellen eine wichtige Rolle zugeschrieben, da Studien zeigen konnten, dass der Anlagerungsprozess in Abwesenheit dieses Proteins deutlich beeinträchtigt ist [45]. Neben Proteinen aus den Mikronemen (MIC-Proteine) sind auch Proteine, die aus den Rhoptrien (RON- und ROP-Proteine) sezerniert werden, an der Wirtszellinvasion beteiligt. Beispielsweise dient RON2, welches mit anderen RON-Proteinen einen Komplex bildet (bestehend aus RON2, -4, -5 und -8), als Ligand für AMA1 und ermöglicht so die irreversible Interaktion von *T. gondii* mit der Wirtszelle [46, 47]. Die RON2-AMA1 Interaktion ist für die Generierung einer besonderen Kontaktzone (MJ, engl.: *moving junction*) zwischen Parasit und

Wirtszelle essentiell [46]. Durch die MJ dringt der Parasit in die Zelle ein, wobei sich die Wirtsmembran vom apikalen zum posterioren Ende um den eindringenden Parasiten stülpt. Die entstehende, *T. gondii* umgebende Membran wird als parasitophore Vakuolenmembran (PVM) bezeichnet. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass drei Proteine dieses RON-Komplexes (RON2, -4 und -5) während der Invasion Wirtszellproteine (vgl. Abb. 1.3) zur MJ rekrutieren und für die Wirtszellinvasion nutzen [48]. Zudem wurden weitere MIC-Komplexe (z. B. MIC1-4-6 und MIC3-8) beschrieben, denen ebenfalls Schlüsselrollen in der Adhäsion an die Wirtszelle zugesagt werden, was u. a. eine Erklärung für das breite Wirtsspektrum von *T. gondii* darstellen könnte [49-51]. Elektrophysiologische Messmethoden und Analysen der Lipidkomposition weisen darauf hin, dass die PVM zu <85 % aus Komponenten der Wirtszellmembran gebildet wird [52, 53]. Proteine, die bei der Invagination der Membran in die PVM inkorporiert werden sind u. a. Proteine mit Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker (z. B. Sca-1 (engl.: *stem cell antigen 1*) und CD55 (engl.: *cluster of differentiation*) [52] sowie Lipide (z. B. Ganglioside und Cholesterol [53, 54]). Wirtszell-Membranproteine, die im Gegensatz exkludiert werden, sind u. a. die Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 (engl.: *intracellular adhesion molecule 1*), Integrin- $\beta$ 1, CD44 und Caveolin [52]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Ionen und kleine Moleküle <1300 Da frei über die PVM diffundieren können und somit den Ionenaustausch und die Nährstoffaufnahme ermöglichen [55]. Dieser nicht-selektive, passive Austausch wird von zwei, aus den Dichten Granula sezernierten, Proteinen (GRA-Proteine), GRA17 und GRA23, ermöglicht [56]. Neben den Strategien zum Austausch von Molekülen mit der Wirtszelle ist der Parasit kurz nach seiner Invasion dazu in der Lage Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum (ER) und das Mikrotubuli-organisierende Zentrum (MTOC) der Wirtszelle zu rekrutieren [57, 58]. Dieser Schritt wird ebenfalls der Erleichterung der Nährstoffaufnahme zugeschrieben. Beispielsweise zeigen Studien, dass *T. gondii* Lipide wie z. B. Liponsäure von Wirtsmitochondrien akquiriert [59]. Des Weiteren wird durch eine Infektion mit *T. gondii* mTOR (engl.: *mammalian target of rapamycin*), eine Seronin-Threonin-Kinase, aktiviert. Die Aktivierung von mTOR erfolgt höchstwahrscheinlich durch die in der PVM-enhaltenen Phosphatidsäure und führt zur Synthese von Proteinen, die dann ebenfalls vom Parasiten für die eigene Replikation genutzt werden können [60].

Die genaue Komposition der bei der Wirtszellinvasion generierten PVM von *T. gondii* ist noch nicht vollständig aufgeschlüsselt, eindeutig ist jedoch ihre Hauptaufgabe. Durch die Modifikation der PVM generiert der Parasit eine replikative Nische, in der er vor der Erkennung durch das Immunsystem des Wirtes weitestgehend geschützt ist und sich gleichzeitig mit den Nährstoffen der Wirtszelle für die eigene Replikation versorgen kann [61].



**Abb. 1.3: Modell der Wirtszellinvasion von *T. gondii*.** Schema der Invasion einer *T. gondii* Tachyzoite in eine Wirtszelle. AMA1 auf der Parasitenoberfläche interagiert mit einer kurzen extrazellulären Domäne von RON2, welche in die Membran der Wirtszelle integriert ist. RON2, -4, -5 und -8 sind im Zytosol der Wirtszelle lokalisiert. Der N-terminale Part von RON2 enthält zwei Bindestellen (dunkelblaue Dreiecke) für ALIX und drei Bindestellen (blaue Kreise) für CIN85. RON2 und RON5 besitzen ebenfalls ein Motiv zur Rekrutierung von CIN85. RON5 besitzt zudem drei Bindestellen (graue Quadrate) für TSG101. ALIX, CIN85 und TSG101 besitzen ebenfalls Motive um miteinander zu interagieren. ALIX und CIN85 bzw. CD2AP könnten mit Aktin und Aktin-bindenden Proteinen interagieren. Gemäß diesem Modell würde der RON-Komplex über mehrere spezifische Interaktionen physikalisch an das Aktin-Zytoskelett gebunden werden. Dies resultiert in einer Stabilisierung der MJ zwischen Parasit und Wirtszelle, die eine Invasion des Parasiten erleichtert (modifiziert nach Guérin et al., 2017 [48]). ALIX, *apoptosis-linked gene 2-interacting protein*. CIN85, *Cbl-interacting protein of 85 kDa*. CD2AP, *CD2-associated protein*. TSG101, *tumour-susceptibility gene 101*.

### 1.1.5 Immunantwort bei Infektion mit *T. gondii*

Trotz der von *T. gondii* entwickelten Strategien einer Immunantwort zu entgehen, ist eine Infektion für Individuen mit intaktem Immunsystem in der Regel harmlos. Nach der Detektion des Parasiten werden proinflammatorische Signalmoleküle produziert, was wiederum in einer Aktivierung von T- und B-Zellen und somit in der Induktion der adaptiven Immunantwort resultiert. Die Aktivierung der adaptiven Immunität stimuliert zudem die Zell-autonome Immunität, wodurch dem intrazellulären *T. gondii*-Wachstum so effektiv entgegengewirkt wird, dass keine Krankheitssymptome entstehen [62]. Da für die in dieser Arbeit durchgeführten Studien murine Zellen verwendet wurden, wird im Folgenden die Immunantwort im Modellorganismus der Maus beschrieben.

Im Rahmen der angeborenen Immunität erkennen TLRs (engl.: *toll-like receptors*) für Mikroorganismen charakteristische Komponenten, die PAMPs. In der Maus existieren 13 TLR-Familienmitglieder, die verschiedene Liganden erkennen und die Produktion diverser Signalmoleküle, wie Chemokine und Zytokine, induzieren [63]. Einer der Hauptsignalwege zur Erkennung von *T. gondii* in der Maus (Abb. 1.4) ist die Detektion des Parasitenproteins Profilin durch die TLR11- und TLR12-Rezeptoren dendritischer Zellen (DCs) in Endolysosomen [64-66]. Weiterhin erfolgt die Detektion von GPI-Ankerproteinen des Parasiten über TLR2 und TLR4, die auf Monozyten und Makrophagen exprimiert

sind [67]. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion individueller TLRs (z. B. von TLR11) nur einen moderaten Effekt auf die Infektanfälligkeit besitzt [68]. Mäuse mit Defekten in mehreren TLRs (z. B. bei einer kombinierten Deletion von TLR3, -7, -9 und -11) sowie MYD88 (engl.: *myeloid differentiation primary response 88*)-defiziente Mäuse weisen hingegen eine hohe Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit *T. gondii* auf [66, 69, 70]. Bei MYD88 handelt es sich um ein TLR-Adaptorprotein, welches nach der Interaktion mit individuellen TLRs weitere Signalkaskaden initiiert. MYD88 aktiviert unter anderem den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B (engl.: *nuclear factor  $\kappa$ B*), der wiederum im Nukleus die Transkription von Zytokinen wie Interleukin-12 (IL-12) induziert [71]. Studien konnten zeigen, dass die Produktion von IL-12 früh nach der Infektion für die Kontrolle der *T. gondii*-Infektion essentiell ist [72, 73]. Die IL-12 Produzenten im Rahmen einer Infektion mit dem Parasiten stellen DCs [74], Monozyten [75], Makrophagen [76] sowie die neutrophilen Granulozyten dar [77, 78], wobei CD8 $\alpha^+$  DCs als initiale IL-12 Hauptquelle *in vivo* beschrieben sind [74]. Neben IL-12 werden von Makrophagen nach einer *T. gondii*-Infektion auch Chemokine und Tumornekrosefaktoren (TNF) sezerniert [79, 80]. Während die Ausschüttung von TNF generell der Aktivierung weiterer Immunzellen dient, sind die Chemokine für die Rekrutierung weiterer Zellen, u. a. von Neutrophilen zum Infektionsherd verantwortlich [81, 82]. Rekrutierte und aktivierte Neutrophile sezernieren wiederum selbst Zytokine und Chemokine als auch antimikrobielle Moleküle und vermögen es u. a. über antimikrobielle Mechanismen wie der NETose, der Ausbildung DNA-basierter extrazellulärer Strukturen (NETs, engl.: *neutrophil extracellular traps*), Pathogene unschädlich zu machen [81, 83].

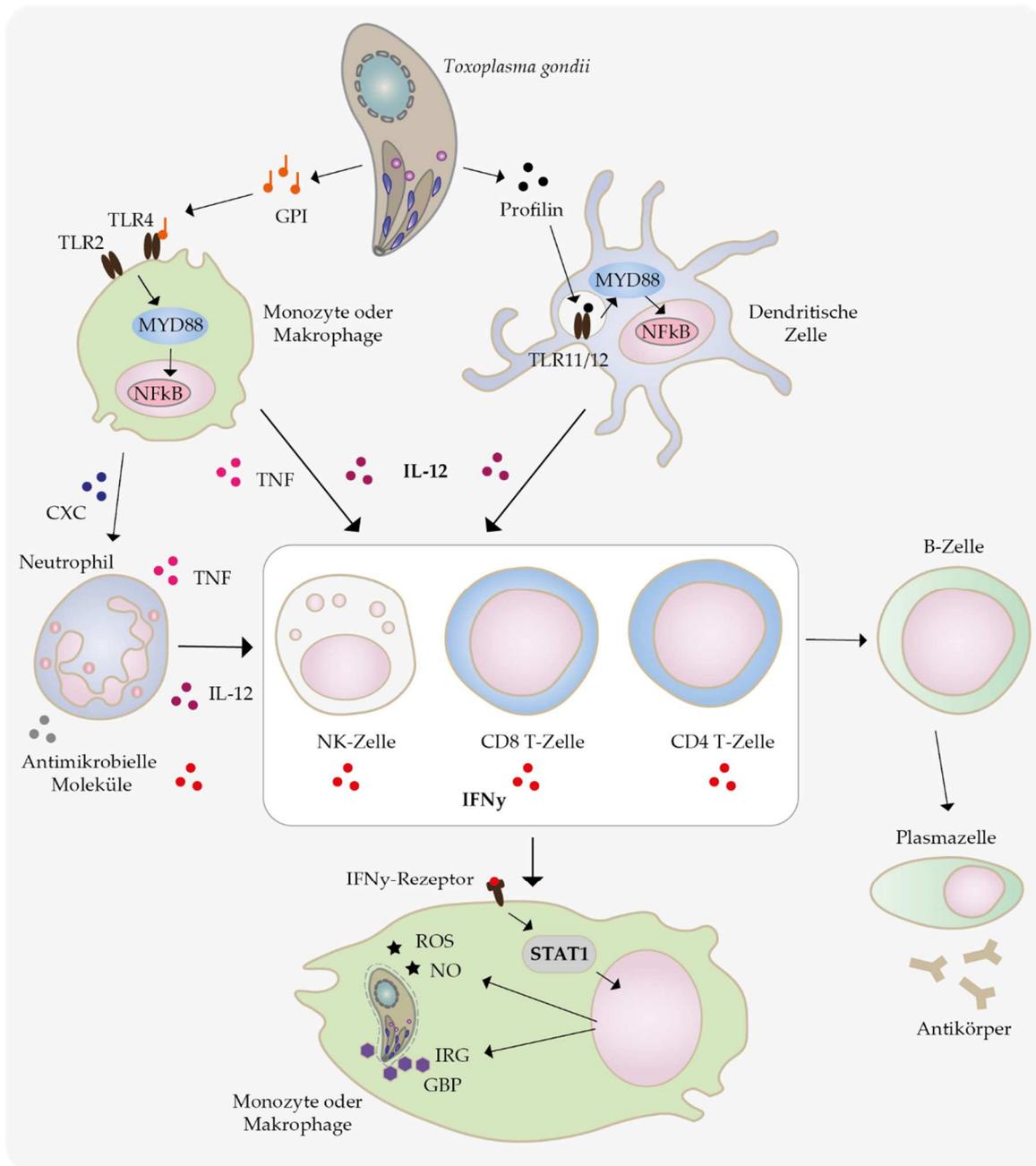
Während die Mechanismen der angeborenen Immunantwort bereits detailliert untersucht wurden, sind die Prozesse, die zur Stimulierung der adaptiven Immunität führen, weniger gut verstanden. Dies rührt unter anderem von der zuvor beschriebenen Fähigkeit des Parasiten sich durch Ausbildung einer PV vor Prozessen wie der Antigenprozessierung und -präsentation weitestgehend abzuschirmen [84]. Beispielsweise ist eine *T. gondii*-Infektion mit einer reduzierten Expression der für die Antigenpräsentation und Immunerkennung wichtigen MHC (engl.: *major histocompatibility complex*)-Moleküle verbunden [85]. Trotz dieser Mechanismen wurde im Rahmen von Infektionen mit Typ-II Toxoplasmen eine Aktivierung und Proliferation von DCs sowie eine starke CD8 $^+$  T-Zell-Antwort beschrieben. Eine Infektion mit Typ-I Toxoplasmen führt hingegen zu einer vergleichsweise schwachen Antwort [86]. Unter anderen die *T. gondii* Proteine GRA4 und GRA6 sowie ROP7 werden auf MHC-I-Molekülen präsentiert [87, 88]. Allerdings sind die beschriebenen Antigene polymorph und unterscheiden sich zwischen den drei klonalen Linien von *T. gondii*. Demnach ist anzunehmen, dass auch die adaptive Immunantwort entsprechend den Stamm-spezifischen Evasionsmechanismen variiert [89]. Andere Studien weisen den hoch immunogenen SAG (engl.: *surface antigen*)- und SRS (engl.: *SAG-related surface antigen*)-Oberflächenantigenen des Parasiten eine wichtige Rolle in der Stimulation der adaptiven Immunantwort zu. Beispielsweise SAG1 und SRS29C scheinen kritische Rollen in der Immunmodulation und der Attenuierung der Virulenz zu spielen [90, 91]. Mittels Antigenpräsentation von DCs aktivierte CD4 $^+$  T-Helfer-Zellen haben beim Aufbau der spezifischen B-Zellantwort und damit der Induktion der humoralen Immunantwort eine große Bedeutung [92, 93]. Aktivierte B-Zellen differenzieren zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen, deren produzierte

Antikörper zu einer Eliminierung von *T. gondii* durch Opsonisierung, d. h. der Beladung mit Antikörpern, und folgender Phagozytose durch z. B. Makrophagen führt [39, 94].

Durch die Ausschüttung von IL-12 wird neben der Proliferation der NK-Zellen, CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen auch die Synthese großer Mengen an Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) durch diese Zellen angeregt [73, 95]. Die IL-12 und IFN $\gamma$  Produktion stellt einen kritischen Schritt bei der Kontrolle von *T. gondii*-Infektionen dar. Studien konnten zeigen, dass Mäuse ohne funktionales IFN $\gamma$  (z. B. vermittelt durch Antikörper-Neutralisation [96]) oder genetischen Modifikationen von Komponenten des IL-12-IFN $\gamma$ -Signalweges (z. B. IFN $\gamma$  [96], IL-12 [97] oder dem IFN $\gamma$ -Rezeptor (IFN $\gamma$ R) [98]) eine hohe Suszeptibilität gegenüber *T. gondii* aufweisen. Allerdings wurde auch beschrieben, dass *T. gondii* dazu in der Lage ist, den IFN $\gamma$ -Signalweg durch verschiedene Modifikationen und Suppressor-Moleküle zu unterbinden. Beispielsweise verhindern TgIST (engl.: *T. gondii inhibitor of STAT1 transcriptional activity*)-induzierte Änderungen in der Chromatin-Struktur das Binden des durch IFN $\gamma$  aktivierten Transkriptionsfaktors STAT1 (engl.: *signal transducer and activator of transcription 1*) an Promotoren [99, 100]. Zusätzlich reguliert *T. gondii* die Synthese der SOCS (engl.: *suppressor of cytokine signaling*)-Proteine SOCS1 [101, 102] und SOCS3 [103] hoch, die ebenfalls den STAT1-Signalweg inhibieren. Beim Menschen bewirkt die IFN $\gamma$ -vermittelte Abwehr weiterhin die Induktion der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) sowie die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, engl.: *reactive oxygen species*). Das Enzym IDO katalysiert den Abbau von Tryptophan in der Wirtszelle, wodurch das Wachstum des für Tryptophan auxotrophen Parasiten inhibiert wird [104, 105]. In der Maus ist die Rolle von IDO hingegen noch nicht vollständig verstanden und bisherige Studien deuten eher auf funktional redundante Abwehrmechanismen dieses Enzyms hin [106, 107]. Mittels eines ähnlichen Mechanismus wird dafür in der Maus das Wachstum von *T. gondii* durch das IFN $\gamma$ -induzierte Enzym iNOS (engl.: *nitric oxide synthase*) gehemmt. Der antiparasitäre Effekt entsteht durch die Depletion von Arginin während der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthese des Enzyms, da *T. gondii* ebenfalls für Arginin auxotroph ist [108]. Weiterführende Analysen konnten demonstrieren, dass die NO-Produktion und der damit assoziierte Mangel an Arginin keine Rolle bei der Inhibierung des Parasiten in der akuten Phase der Infektion hat, aber in der chronischen Phase der Infektion für die Eliminierung von Bradyzoiten verantwortlich ist [109]. Studien zeigen, dass synthetisiertes NO in die PV diffundiert und durch die Inhibierung metabolischer Enzyme die *T. gondii* Proliferation hemmt [110, 111]. Neben NO werden auch ROS-Intermediaten eine Rolle bei der Eliminierung von *T. gondii* zugeschrieben. Allerdings sind die Ergebnisse der Studien teils kontrovers und scheinen stark von Wirt- und Zelltyp abhängig zu sein [110, 112, 113]. Darüber hinaus werden in Mäusen durch IFN $\gamma$  zwei GTPase-Familien, die bei der Modifikation und Disruption der PV involviert sind, hochreguliert: die IRGs (engl.: *immunity related GTPases*) und die murinen Guanylat-bindenden Proteine (mGBPs). Die meisten der 23 IRG-Proteine haben ein GKS-Motiv in ihrer aktiven Nukleotid-Bindestelle, wohingegen drei IRGs (Irgm1, -2 und -3) ein GMS-Motiv an dieser Position besitzen [114-117]. Die Irgm-Proteine befinden sich auf wirtseigenen Organellen und beugen der Assoziation von GKS-IRGs mit Membranen vor, indem sie mit dem GKS-IRG-Nukleotid-Bindemotiv assoziieren [118-120]. Die PV von *T. gondii* ist dagegen als wirtsfremder Organismus nicht durch GMS-IRGs markiert und kann durch GKS-IRGs, nach ihrer Freisetzung aus dem IRG-Komplex, erkannt werden [120]. Die ersten GKS-IRGs die nach einer Infektion zur PV rekrutieren sind Irgb6 und Irgb10 [115]. Eine Studie konnte

zeigen, dass mGBP2 in der Abwesenheit von GMS-IRGs nicht dazu in der Lage ist an der PV zu akkumulieren [120]. Nach einer anderen Studie hingegen führt die Deletion von den mGBPs auf Chromosom 3 (mGBP<sup>chr3-/-</sup>) zu einer reduzierten Rekrutierung von IRGs [121]. Weiter wurde bei einer Deletion von mGBP1 eine dezimierte Irgb6 Akkumulation nach der Infektion beobachtet [122]. In welcher Hierarchie mGBPs und IRGs zu der PV von *T. gondii* rekrutieren und durch welchen Mechanismus die Disruption der PV erreicht wird bleibt noch im Detail zu analysieren. Den bisher durchgeführten Studien nach wäre es denkbar, dass sich die IRGs und mGBPs gegenseitig über *Feedback Loops* regulieren, um zur Disruption der PV beizutragen [123]. Gegenspieler auf der Seite des Parasiten sind u. a. die ROP-Proteine ROP17 und ROP18, die durch die Phosphorylierung von IRGs das Ablösen der GTPasen von der Membran bewirken [124-126]. Interessanterweise wird der RH Typ-I *T. gondii*-Stamm durch die Deletion von ROP5, welches mit ROP17 und ROP18 einen Komplex bildet, avirulent [126-128].

Neben der beschriebenen IFN $\gamma$ -induzierten Immunität spielen auch die Prozesse der Autophagie bzw. der Makroautophagie bei der Immunabwehr gegen *T. gondii* eine Rolle [123]. Der Autophagie-Prozess beinhaltet die Bildung einer Ubiquitin-ähnlichen Maschinerie aus mehreren Autophagie-Proteinen (ATGs), die die Rekrutierung von ATG8-Proteinen wie LC3 (engl.: *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) zur so genannten Isolationsmembran initiieren [129]. Membran-gebundenes LC3 bindet wiederum an Adaptorproteine wie NDP52 (engl.: *nuclear dot protein 52 kDa*) und p62/SQSTM1 (engl.: *Sequestosome 1*), die ihrerseits ubiquitinierte Proteine auf dem Pathogen binden [130, 131]. Durch die Umhüllung der zu degradierenden Proteine/Zielorganellen mit der Isolationsmembran entstehen schließlich die Autophagosomen, die durch Fusion mit Lysosomen den hydrolytischen Abbau der zu degradierenden Komponenten vermitteln. Für die ATGs haben sich im murinen System zwei essentielle Schritte bei der Eliminierung von *T. gondii* herauskristallisiert. Einerseits sind sie bei der Rekrutierung der zuvor beschriebenen GTPasen, den IRGs und mGBPs, zur PVM involviert [123]. Andererseits deutet die Akkumulation von LC3-positiven Membranen um den Parasiten nach der Ruptur der PVM auf eine für die ATG-Proteine klassische Rolle im Autophagie-Prozess hin [123]. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass ATG5 für die Rekrutierung von Irga6 und Irgb6 [115, 132] sowie ATG3 für die Beladung der PV mit mGBP2 und anderen IRGs [133, 134] verantwortlich ist. In Übereinstimmung mit diesen Daten führt eine Depletion aller LC3-Homologe zu einer verminderten GTPasen-Rekrutierung an die PVM [135].



**Abb. 1.4: Immunantwort auf eine Infektion mit *T. gondii*.** Mittels TLR2 und TLR4 auf Makrophagen und Monozyten werden *T. gondii*-Proteine mit GPI-Anker detektiert. Durch das Adaptorprotein MYD88 wird der Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert, wodurch die Produktion und Freisetzung von CXC-Chemokinen, TNF und IL-12 induziert wird. Die CXC-Sekretion aktivierter Makrophagen rekrutiert und induziert neutrophile Granulozyten, die IFNγ und IL-12 produzieren und antimikrobielle Peptide zur Eliminierung von *T. gondii* sezernieren. TLR11/12 in DCs sind die Hauptrezeptoren für die Detektion des *T. gondii*-Proteins Profilin. TLR11 und TLR12 aktivieren ebenfalls MYD88-vermittelte Signalwege. Durch sezerniertes TNF und IL-12 werden CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen sowie NK-Zellen aktiviert. Von diesen Zellen ausgeschüttetes IFNγ bindet an den IFNγR auf Monozyten und Makrophagen. Als Resultat kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1, der antiparasitäre Effektormechanismen, wie reaktive ROS, NO, IRGs und GBPs induziert. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktivieren zudem spezifische B-Zellen, die zu Plasmazellen differenzieren und *T. gondii*-spezifische Antikörper ausschütten.

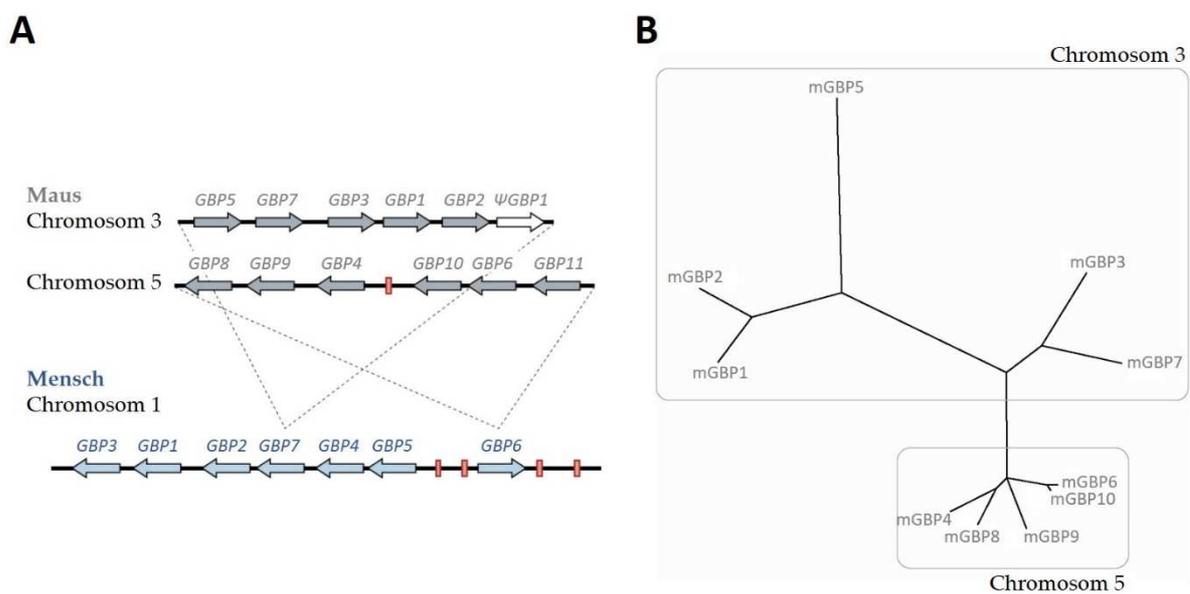
Die E3-Ubiquitin-Ligasen TRAF6 (engl.: *TNF receptor associated factor 6*) und TRIM21 (engl.: *tripartite motif-containing protein 21*) sind für die Ubiquitinierung der PVM von Typ-II und Typ-III Toxoplasmen verantwortlich [136, 137]. Welche Substrate von den E3-Ligasen an der PVM ubiquitiniert werden ist noch nicht bekannt, allerdings konnte gezeigt werden, dass mGBP1 und mGBP2 sowie Irga6 durch Ubiquitin modifiziert werden [138, 139]. Eine weitere Studie deutet an, dass p62 erst nach der Ubiquitinierung der PV rekrutiert wird, um dann selbst eine verstärkte Rekrutierung von mGBP1, mGBP2 und TRIM21 zu ermöglichen [136]. Zusätzlich soll es durch den CD40-Rezeptor induziert zur Autophagie von *T. gondii* kommen können [140]. CD40 wird durch Bindung an CD154 auf aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert, wodurch TRAF6 mit CD40 assoziiert und in Synergie mit TNF über Beclin-1 bzw. ULK1 (engl.: *Unc-51 like autophagy activating kinase*) autophagozytotische Prozesse einleitet [141-143]. Um den Autophagie-Prozessen wie der Anlagerung von LC3-positiven Membranen an der PVM entgegen zu wirken aktiviert *T. gondii* den EGFR (engl.: *epidermal growth factor receptor*)-Signalweg [144]. Eine Studie konnte zeigen, dass die MIC-Proteine MIC3 und MIC6 von Typ-I und Typ-II Toxoplasmen entscheidend zu diesem Prozess beitragen. Durch den EGFR wird die Proteinkinase B aktiviert, welche die Rekrutierung von LC3-positiven Membranen zur PVM verhindert [144].

Wie das breite Spektrum der vom Wirt generierten Immunantworten und den vom Parasit im Gegenzug entwickelten Evasionsmechanismen demonstriert, befinden sich Wirt und Pathogen in einem stetigen evolutionären Wettrüsten. Dieses Wettrüsten im Rahmen einer Infektion ist im Mausmodell bereits detaillierter beschrieben als beim Menschen, wobei von einem großen Unterschied in den Immunantworten zwischen Maus und Mensch ausgegangen werden muss. Menschen besitzen beispielsweise nur ein Pseudogen für TLR11 und kein Gen für TLR12 [145], zudem ist die Familie der IRGs bis auf ein einzelnes homologes, nicht durch IFN $\gamma$ -induzierbares Gen beim Menschen nicht existent [146]. Immunmechanismen auf die hingegen auch der Mensch zurückgreifen kann sind u. a. die Ubiquitinierung, die Autophagie und ein Repertoire an GBPs [123].

## 1.2 Guanylat-bindende Proteine

In den meisten Zelltypen wird die antimikrobielle Immunabwehr durch Typ-I (IFN $\alpha$  und IFN $\beta$ ) und Typ-II IFN (IFN $\gamma$ ) stark hochreguliert, wodurch die Expression von über 2000 IFN-stimulierten Genen (ISGs) induziert wird [147]. Mitunter zu den am stärksten exprimierten ISGs zählt eine Gruppe von GTPasen, die Guanylat-bindenden Proteine (GBPs) [148-150]. Die GBPs zählen zu der IFN-induzierbaren GTPase-Superfamilie denen neben den GBPs, die bereits eingeführten IRGs, die Myxovirus-Resistenz-Proteine (Mx-Proteine) und die sehr großen VLIIG (engl.: *very large IFN-inducible GTPases*)-GTPasen zugeordnet werden [151]. Für die 65 – 73 kDa GBPs konnten mittels Hidden Markov Modeling bioinformatisch 132 intakte *GBP*-Gene innerhalb von 32 verschiedenen Taxa der Eukaryoten ermittelt werden [152, 153]. Die GBPs sind unter den Vertebraten hoch konserviert, wobei die GBP-Abundanz zwischen den verschiedenen Spezies variiert. Für die Maus konnten beispielweise 11 GBP-codierende Gene (*GBP1 – 11*, grau) und für den Menschen 7 GBP-codierende Genloci (*GBP1 – 7*, blau) identifiziert werden (Abb. 5.1A). Bei der Maus sind die GBP-codierenden Sequenzen auf zwei Cluster, eins auf Chromosom 3 (*GBP<sup>chr3</sup>*) und das andere auf Chromosom 5, verteilt. Beim Menschen sind dagegen alle *GBP*-Gene in

einem einzigen Cluster auf Chromosom 1 lokalisiert [154-157]. Der phylogenetische Baum der mGBPs gibt zu erkennen, dass mGBP4, mGBP6, mGBP8, mGBP9 und mGBP10 auf Chromosom 5 untereinander höher verwandt sind als die restlichen mGBPs (Abb. 1.5B; vgl. Länge der Genzweige bezüglich der übergeordneten Knoten) [155]. Die humanen und murinen GBPs besitzen eine Aminosäuren (AS)-Sequenzidentität von 40 – 98 % [156, 158]. Das Vorkommen und die Konservierung von GBPs in verschiedensten Taxa (Vertebraten, Cephalochordata, Protisten, Pflanzen und Algen) legt nahe, dass die GBPs evolutionär gesehen nicht redundante Funktionen erfüllen müssen. In der Tat konnten in den letzten Jahren Schlüsselfunktionen für GBPs in der Immunabwehr gegen intrazelluläre Pathogene wie *T. gondii*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) und *Francisella novicida* (*F. novicida*) sowie einige Viren identifiziert werden [147, 159].



**Abb. 1.5: Genomische und phylogenetische Organisation von GBPs.** (A) Chromosomale Lokalisation der murinen und humanen GBP-Genfamilien. Die roten Vierecke kennzeichnen Fragmente von Pseudogenen. Das Chromosom 3 (3H1) der Maus ist syntenisch mit dem telomeren Ende des humanen Chromosomenclusters 1q22.2, während das Chromosom 5 (5E5) der Maus mit dem für humanes GBP6 codierenden zentromerischen Ende von Chromosom 1 syntenisch ist (modifiziert nach Kim et al., 2016, [160]). *ΨGBP1*, GBP1 Pseudogen. (B) Phylogenetischer Baum der cDNA-Sequenzen von murinem GBP1 bis GBP10. Die Rahmen zeigen die chromosomale Lokalisation der entsprechenden Genloci (modifiziert nach Kresse et al, 2008, [155]).

### 1.2.1 Struktur und biochemische Eigenschaften von GBPs

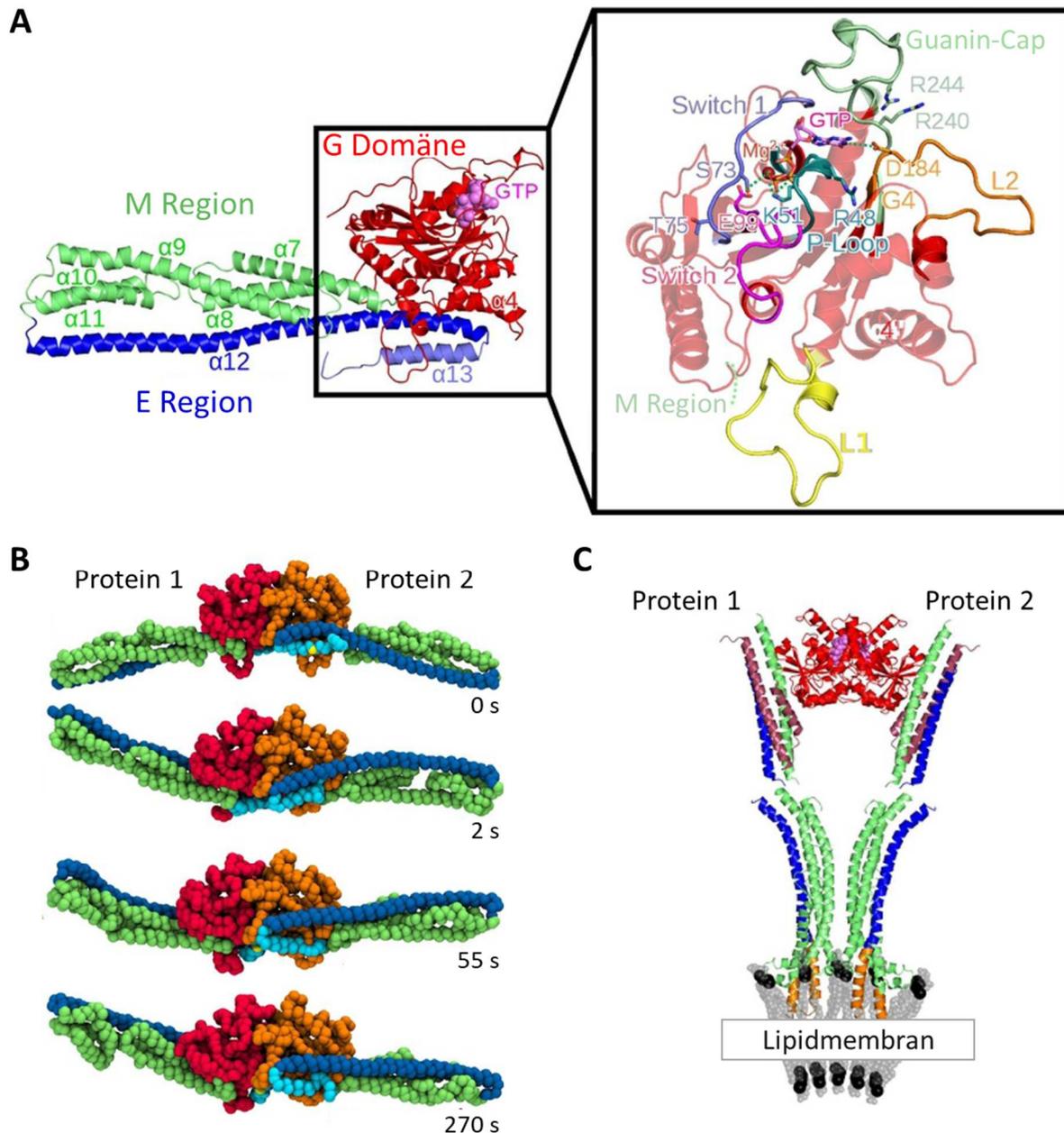
Die GBPs werden aufgrund ähnlicher struktureller und biochemischer Eigenschaften der Dynamin-Superfamilie zugeordnet. GTPasen dieser Superfamilie zählen zu den Mechanoenzymen, welche die durch die Hydrolyse des Nukleotids Guanosintriphosphat (GTP) gewonnene Energie nutzen können um Membranen zu remodellieren oder Membranfusionen einzuleiten. Charakteristische Eigenschaften, die GBPs mit Dynamin und den Dynamin-ähnlichen Proteinen teilen, sind ihre Fähigkeiten zur Nukleotid-abhängigen Selbstassemblierung um größere Oligomere zu bilden, ihre niedrigen GTP-Bindungsaffinitäten und das Charakteristikum vieler Mitglieder der Dynamin-Familie mit

Lipidmembranen zu interagieren [161]. Die GBPs wurden ursprünglich aufgrund ihrer Eigenschaft Guanosinmonophosphat (GMP), Guanosindiphosphat (GDP) als auch GTP mit mikromolaren Affinitäten zu binden, identifiziert [148]. Die Eigenschaft neben GTP auch GDP und GMP binden zu können ist selten. Interessanterweise konnten Folgestudien zeigen, dass GBPs die besondere Eigenschaft besitzen GTP nicht nur zu GDP, sondern auch in einem konsekutiven Schritt weiter zu GMP zu hydrolysieren. Die physiologische Funktion für diese exzeptionelle Eigenschaft konnte bisher nicht definiert werden. Die Produktratio variiert zwischen 0 % GMP (hGBP5 und mGBP5) und 85 – 90 % GMP (hGBP1) für die verschiedenen GBPs und die jeweiligen experimentellen Konditionen [152, 162-165].

Die erste Kristallstruktur von hGBP1 wurde vor rund 20 Jahren gelöst und konnte zeigen, dass die Gesamtlänge des Proteins ungefähr 130 Å beträgt [166]. Die generelle Struktur von GBPs (Abb. 1.6A) besteht aus zwei Parts: Einer N-terminalen globulären GTPase (G)-Domäne und einer gestreckten helikalen Domäne die in eine mittlere (M)-Region und eine C-terminale (CT) GTPase-Effektor (E)-Region unterteilt werden kann. Die G-Domäne enthält die GTP-Bindestelle mit den vier konservierten Sequenzelementen: dem kanonischen G1 Motiv/der P-Loop (engl.: *phosphate-binding loop*) GXXXXGK(S/T), dem Switch 1/dem G2 (T)-Motiv, dem Phosphat- und Magnesium ( $Mg^{2+}$ )-bindenden Switch 2/der G3 DXXG-Sequenz und dem Nukleotid-Spezifität generierenden T(V/L)RD G4-Motiv [155]. Das T(V/L)RD-Motiv, welches den Kontakt zur Nukleinbase Guanin herstellt, weicht von dem klassischen N/TKXD-Motiv in anderen GTPasen der Dynamamin-Familie ab [167, 168]. Die im Vergleich zu der Familie der kleinen GTPasen deutlich differierende Orientierung von Guanin wurde durch die Auflösung einer zweiten hGBP1 Kristallstruktur in Gegenwart von einem nicht hydrolysierbaren GTP-Analogen ermittelt [169]. Weiterhin konnten zwei einzigartige Strukturen in Nähe der Guaninbase und der Phosphat-bindenden Region identifiziert werden, die als Guanin- und Phosphat-Cap bezeichnet wurden [169]. Das Phosphat-Cap ist so positioniert, dass es die Phosphatgruppen des GTP-Moleküls von der umgebenden Lösung abgrenzt und keinen Zugang für beispielsweise GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) ermöglicht [162]. In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte gezeigt werden, dass die  $\alpha 6$ -Helix von hGBP1 als internes GAP fungiert und GBPs somit auch in dieser Funktion den Dynamamin-ähnlichen Proteinen ähneln [170]. Die M-Region der helikalen Domäne besteht aus zwei Helixbündeln ( $\alpha 7-11$ ), die sich von der G-Domäne fort erstrecken und dem GBP-Molekül eine längliche Struktur geben [166]. Die CT-E-Region besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices ( $\alpha 12/13$ ) die sich entlang der M-Region zurück zur G-Domäne faltet und hierdurch der langen  $\alpha 12$ -Helix ermöglicht über acht Kontakte mit der M-Region und über vier Kontakte mit der G-Domäne zu interagieren [166].

Eine weitere charakteristische Eigenschaft der GBPs, die sie aufgrund ihrer einzigartigen G-Domäne besitzen, ist ihre hohe intrinsische GTPase-Aktivität ( $2 - 150 \text{ min}^{-1}$ ) [148, 151, 171]. Für hGBP1 wurde mit steigender GBP-Konzentration ein Anstieg in der GTPase-Aktivität um mindestens das Hundertfache beschrieben. Dies lässt vermuten, dass die GTPase-Aktivität kooperativ ist bzw. eine Dimerisierung oder Oligomerisierung für die Stimulation verantwortlich ist [166]. In der Tat konnte in nachfolgenden Studien gezeigt werden, dass GBPs in der Gegenwart von GTP-Analoga zu Dimeren (Abb. 1.6B) und in Gegenwart von z. B. einem Übergangskomplex aus GDP und Aluminiumfluorid ( $GDP-AlF_x$ ) zu Tetrameren assemblieren [171, 172]. Neuere Analysen mussten die Ergebnisse zur Tetramerbildung für hGBP1 und hGBP5 jedoch revidieren, da die GBPs aufgrund der experimentellen

Bedingungen irrtümlicherweise als Tetramere identifiziert wurden [163, 166, 171, 173]. Durch die transiente Interaktion der G-Domänen bei der GTP-Hydrolyse verlängert sich die Struktur um ca. 120 Å, weshalb die Dimere in Gelfiltrationsstudien durch ihren vergrößerten hydrodynamischen Radius als höhere Oligomere identifiziert worden waren [171, 174]. Zusätzliche Informationen zur Multimerisierung und zum GTP-Hydrolysemechanismus von GBPs wurden durch die Kristallisierung der G-Domäne von hGBP1 im Komplex mit verschiedenen nicht-hydrolysierbaren GTP-Analoga erhalten [171]. Diese Studie konnte zeigen, dass die Homodimerisierung von GBPs durch Interaktionen der Switch-Regionen der G-Domäne erfolgt. Durch die Dimerisierung wird zudem eine Umpositionierung von einem konservierten Arginin (R; bei hGBP1 R48 vgl. Abb. 16.1) aus dem P-Loop induziert. Im Nukleotid-freien und GMP-gebundenen Zustand ragt dieses Arginin in das Lösungsmittel, während es sich in Folge der Dimerisierung zum  $\gamma$ -Phosphat orientiert und durch die Stabilisierung des Übergangszustandes dessen Abspaltung stimuliert [171]. Die besondere Eigenschaft von GBPs GTP in einem konsekutiven Schritt über GDP weiter zu GMP zu hydrolysieren, wird durch eine Änderung in der Nukleotidkonformation an der Ribose erreicht. Diese bewirkt, dass die Interaktionen mit dem Guanin intakt bleibt und das  $\beta$ -Phosphat in die Position des  $\gamma$ -Phosphats positioniert wird [166, 171]. Eine kürzlich mittels Quantenmechanik/ Molekularmechanik-Simulation durchgeführte Studie konnte zudem zeigen, dass ein Serin (S; S73 bei hGBP1) aus Switch 1 für die Hydrolysereaktion relevant ist [175]. Die Aminosäure wird durch die Dimerisierung ins aktive Zentrum von hGBP1 eingeführt und optimal für die Koordination des angreifenden Wasser Moleküls positioniert [175]. Die Tetramer-Bildung wird entsprechend einer Studie über eine Interaktion der  $\alpha$ 12/13-Helices mit der G-Domäne ermöglicht [176]. *In vitro*-Experimente zeigen, dass die kooperative Selbstassemblierung teils zu extrem großen Supramolekularen-Strukturen führt, die nicht weniger als 8000 GBP Protomere umfassen und an der PV von *T. gondii* akkumulieren [177]. Dies legt die Vermutung nahe, dass GBPs, ähnlich zu Dynamamin, als Mechanoenzyme agieren könnten, um durch die Ruptur von Membranen die Eliminierung von Pathogenen zu erleichtern [159, 177, 178]. Von BDLP (engl.: *bacterial dynamin-like protein*) aus *Nostoc punctiforme*, einem Bakterienprotein der Dynamamin-Superfamilie mit strukturellen Ähnlichkeiten zu GBPs, konnte ein Modell für eine Protein-Lipid Assemblierung (Abb. 1.6C) mittels Kryoelektronenmikroskopie rekonstruiert werden [179]. Diese Assemblierung zeigt eine ausgesprochen weite Domänenöffnung der beiden helikalen Regionen und eine Insertion des zwei-Helix-Motivs in eine Doppelmembran [179]. Ob eine solche rigorose Umlagerung der GBP-Domänen inklusive Insertion zu einer Membrankrümmung beitragen könnte, ist in Zukunft noch weiter zu untersuchen.



**Abb. 1.6: Struktur und Oligomerisierung von humanem GBP1.** (A) Konformation der GTP-gebundenen hGBP1-Kristallstruktur (Protein Data Bank (PDB) 1F5N [180]). Humanes GBP1 besteht aus einer globulären G-Domäne (rot) und einer ausgestreckten helikalen Domäne. Die helikale Domäne ist in eine M-Region (grün) und eine E-Region unterteilt. In der Kristallstruktur fehlende Schleifenstrukturen wurden modelliert. Die Vergrößerung zeigt die vier GTP-Bindemotive: die G1 P-Loop (türkis), den G2 Switch 1 (blau), den G3 Switch 2 (G3, magenta) und die G4 L2-Loop (orange). Die Guanin-Cap-Struktur (grün), die L1-Loop (gelb) und die für die GTP-Bindung und Hydrolyse wichtigen AS-Reste sind mittels Stick Darstellung hervorgehoben. (B) Dimermodell von hGBP1 und Darstellung der Dimerbewegung über 270 s mittels Martini Simulation. (C) Modell für die Membran-Assoziation von BDLP (PDB 2J69), einem strukturell zu hGBP1 sehr ähnlichem Protein, über die Paddle Domäne (orange). Die Dimerisierung involviert die Assoziation der beiden G-Domänen (A-C wurden modifiziert nach Barz et al., 2019, [181]).

Drei der sieben humanen GBPs (hGBP1, hGBP2 und hGBP5) und drei der 11 murinen GBPs (mGBP1, mGBP2 und mGBP5) besitzen ein C-terminales CaaX-Motiv, welches durch Isoprenylierung modifiziert

wird [154, 157, 182]. Die Isoprenylierung ist eine posttranslationale Modifikation (PTM), die durch eine Anheftung von Farnesyl (15-C)- oder Geranylgeranyl (C-20)-Isopreneinheiten an Cysteine der CaaX-Box der zu modifizierenden Proteine charakterisiert ist [183]. Proteine mit einer solchen Lipidmodifikation weisen eine hohe Affinität für zelluläre Membranen auf [183]. Eine Studie mit hGBP1 konnte zeigen, dass farnesyliertes hGBP1 nur im Komplex mit GDP-AlF<sub>x</sub>, also einem simulierten Übergangszustand der GTP-Hydrolyse, an Membranen bindet [164]. In GUV (engl.: *giant-unilamellar vesicles*)-Experimenten konnte in der Gegenwart von GTP eine transiente Interaktion von hGBP1 mit Membranen konstatiert werden, allerdings nur bis das Substrat konsumiert war und auch eine Ruptur der GUVs war nicht zu beobachten [184]. Weiterhin konnten Studien demonstrieren, dass Mutationen im CaaX-Motiv sowie C-terminale Deletionen nicht nur die Assemblierung von GBPs an Membranen, sondern auch die zellautonome Immunität und die Inflammasom-Aktivierung beeinträchtigen [152, 158, 172, 185, 186]. Der CT-Part von GBPs scheint demnach für die Fusion der GTPasen mit Membranen sowie deren antimikrobiellen und antiviralen Aktivitäten essentiell zu sein.

### 1.2.2 Physiologische Funktion von GBPs

In der Abwesenheit von aktivierenden Immunsignalen sind GBPs Zell-, Zellzyklus- und Gewebe-abhängig höchstens auf einem geringen bis mittleren Level exprimiert [153, 187]. Eine robuste GBP-Expression erfordert dagegen eine Immunstimulation. Für humanes GBP1 und GBP5 konnte beispielsweise gezeigt werden, dass 24 h nach IFN $\gamma$ -Stimulation bis zu 300.000 Moleküle pro Zelle exprimiert werden [148, 188]. Neben IFN $\gamma$  können auch IFN $\alpha/\beta$ , IL-1 $\alpha/\beta$ , TNF und TLR-Aktivierung die Expression von einigen GBPs hochregulieren [154]. Die Unterschiede in der Induktion von GBPs ist auf Unterschiede in ihren Promotorelementen zurückzuführen. In den Promotorregionen der *GBP*-Gene befinden sich mehrere GAS (engl.: *IFN $\gamma$ -activated sequence*)- und ISRE (engl.: *IFN-stimulated response element*)-Elemente sowie in Einzelfällen auch NF $\kappa$ B-Bindestellen. Diese wechselwirken mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren bzw. Transkriptionsfaktorkomplexen aus STAT und IRF (engl.: *IFN-regulatory factor*)-Molekülen, wodurch die Transkription der *GBP*-Gene initiiert wird [153, 156, 189]. Murines GBP7 wird z. B. durch Typ-I und Typ-II IFN hochreguliert, was auf GAS- sowie ISRE-Motive im Promotorbereich schließen lässt [190]. Ein NF $\kappa$ B-Konsensus-Element konnte hingegen nicht identifiziert werden, dafür wurden in der mGBP7 Promotorregion mehrere AP-1 (engl.: *activating protein-1*)-Bindemotive ermittelt [157]. GBPs werden in diversen Zelltypen (u. a. in Phagozyten, NK-Zellen, T-Zellen) und Geweben exprimiert und konnten bisher insgesamt in nicht weniger als 84 Zelltypen des Menschen nachgewiesen werden [153, 187, 191]. Nach der Expression sind GBPs vor allem in der zytosolischen Zellfraktion nachweisbar [182]. Konfokalmikroskopie-Aufnahmen zeigen, dass GBPs nach IFN $\gamma$ -Stimulation vorwiegend eine Lokalisation in Vesikel-ähnlichen Strukturen (VLS) im Zytosol aufweisen [154, 192].

GBPs besitzen Schlüsselfunktionen in der Immunabwehr gegen intrazelluläre Pathogene, u. a. gegen Bakterien, Viren und Protozoen [153]. Die Analyse verschiedener Pathogene in unterschiedlichen Zelltypen sowie die Nutzung verschiedener Modellsysteme (human vs. murin) haben molekulare Mechanismen der GBP-vermittelten Immunabwehr aufdecken können, jedoch auch teils zu kontroversen Ergebnissen geführt [193]. Im Folgenden soll besonders, auf die antibakteriellen,

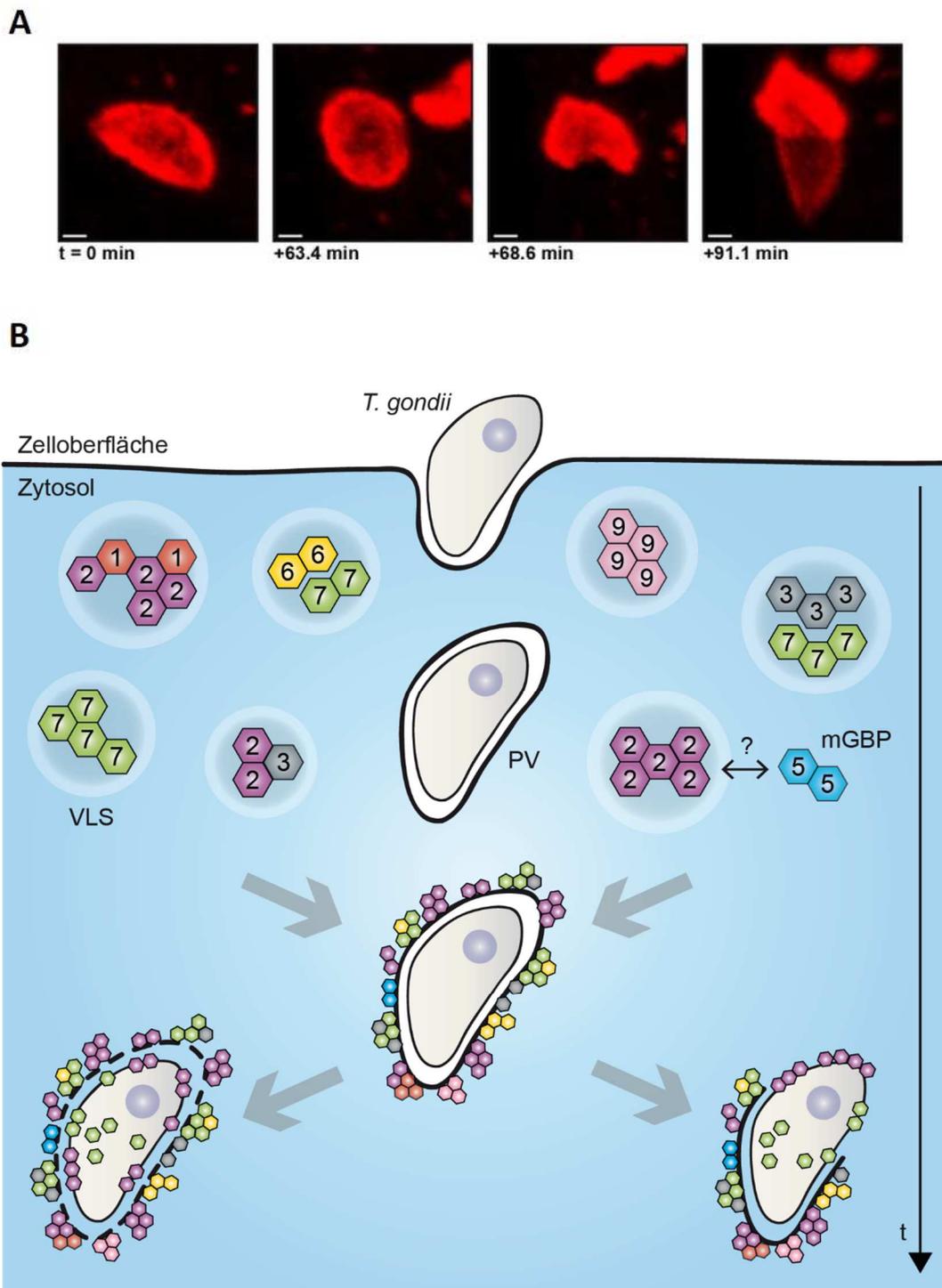
antiviralen und antiparasitären Mechanismen der GBP-vermittelten Immunabwehr im murinen System eingegangen werden.

Eine *in vitro*-Studie mit dem Bakterium *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) konnte demonstrieren, dass eine Vielzahl von mGBPs (mGBP1, -2, -3, -6, -7, -9 und -10) zur PV von Chlamydien, der Inklusion, rekrutieren [194]. Entsprechend den Studien zur Funktion von Irgm-Proteinen (GMS-IRGs), zwischen wirtseigenen und wirtsfremden Komponenten zu unterscheiden, wurde gezeigt, dass nicht nur die Rekrutierung von GKS-IRGs sondern auch die von mGBP2 von GMS-IRGs abhängig ist [120]. Andere Studien deuten an, dass mGBP<sup>chr3</sup> einen Effekt auf die Rekrutierung vom dem GKS-IRG-Protein Irgb10 bei Infektionen mit *F. novicida* besitzt [195]. Darüber hinaus wurde ermittelt, dass die Rekrutierung beider GTPase Familien, den IRGs und den mGBPs, zu Inklusionen von Chlamydien (und zu *T. gondii* PVs) von den Autophagie-Proteinen ATG3 und ATG5 abhängig ist [134]. ATG5 vermittelt im Komplex mit weiteren ATGs, dass ATG8-Proteine von ATG3 auf das Membranlipid Phosphatidylethanolamin übertragen werden. Dies belegt, dass der Schritt der Lipid-Anheftung an ATG8-Proteine für die Rekrutierung beider GTPase Familien zu PVs von Pathogenen essentiell ist [134]. In Übereinstimmung mit diesen Daten wurde demonstriert, dass es bei fehlender Aktivierung des ATG8-Homologs GABARAPL2 (engl.: *γ-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2*)/Gate-16 (engl.: *Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa*) durch Arf1 (engl.: *small GTPase ADP-ribosylation factor 1*) zur Bildung von GTPase-Aggregaten und verminderten Rekrutierung zu PVs kommt [196]. Neben der Rekrutierung von mGBPs scheinen Irgm-Proteine auch für die Translokation der E3-Ligase TRAF6 zur PV essentiell [136]. Durch die TRAF6-vermittelte Ubiquitinierung der PV werden wiederum Bindestellen für p62/SQSTM1 kreiert, was die Ubiquitinierung der PV verstärkt und vermeintlich die weitere Rekrutierung von mGBPs initiiert [136]. Den mGBPs werden zudem wichtige Funktionen für die Kontrolle bakterieller Infektionen mit *Mycobacterium bovis* und *L. monocytogenes* zugeschrieben. Eine Studie zeigt, dass mGBP7 bei der Assemblierung von NADPH-Komplexen an Bakterien-enthaltenden Phagosomen involviert ist bzw. dadurch auch die ROS-vermittelte Abwehr induzieren kann [158]. Zudem wurde demonstriert, dass mGBP7 die Cystein-Protease ATG4b bindet, die ATG8-Vorläuferproteine am CT-Ende schneidet und dadurch deren Lipidierung bzw. Verankerung an Membranen löst [158]. Murines GBP1 und GBP2 interagieren dagegen mit p62/SQSTM1 und Galektin-3 und leiten dadurch ebenfalls Autophagie-Prozesse ein [136, 158]. In Studien mit Listerien konnten dagegen keine Effekte von GBP<sup>chr3</sup> auf die Proliferation, die Rekrutierung von LC3 und die ROS-Produktion ausgemacht werden [121, 197]. Für mGBP2 ist dies ebenfalls nicht der Fall [197]. Eine Studie mit *F. novicida* zeigt, dass GBP<sup>chr3</sup> nicht nur bei der Ruptur der PV eine Rolle spielen, sondern auch nach deren Lyse das zytosolische Pathogen selbst anvisieren [159]. Weiterhin zeigt diese Studie, dass durch die Rekrutierung von mGBP2 und mGBP5 auch Irgb10 rekrutiert wird, was schließlich in der Lyse des Bakteriums resultiert [159, 178, 195]. Durch die Lyse freigesetztes Lipopolysaccharid (LPS) bzw. bakterielle DNA aktivieren das „nicht-kanonische“ Inflammasom/Caspase-11, das NLRP3 (engl.: *NOD-, LRR- and pyrin-domain containing protein 3*)-Inflammasom und das AIM2 (engl.: *absent in melanoma 2*)-Inflammasom und leitet dadurch die Pyroptose ein [152, 195]. In mit *Yersinia* und *Legionella* infizierten Zellen konnte eine Involvierung von Galektinen in der IRG/mGBP-vermittelten Inflammasom-Aktivierung bestätigt werden. Galektin-3 wird durch die Präsenz von bakteriellen

Sekretionssystemen zur PV rekrutiert, woraufhin auch mGBP1 und mGBP2, da diese mit Galektin-3 interagieren, zur PV translozieren [198]. Ebenso können lysierte Vakuolen z. B. bei *Salmonella* durch eine Interaktion mit Galektin-8, einem Interaktionspartner des Autophagie-Adapterproteins NDP52, durch die Autophagie-Maschinerie erkannt werden [199]. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass für die IFN $\gamma$ -induzierte Zell-autonome Abwehr gegen Bakterien ein kooperatives Zusammenspiel von mGBPs sowie IRGs, als auch ein intaktes Autophagie-System und die Aktivierung des Inflammasoms erforderlich sind.

Die beschriebene antivirale Aktivität von hGBP1 gegen VSV (engl.: *vesicular stomatitis virus*) und EMCV (engl.: *Encephalomyocarditisvirus*) vor rund 20 Jahren war der erste Nachweis über Funktionen von GBPs in der Abwehr von Pathogenen [200]. Für hGBPs sind mittlerweile eine Reihe von antiviralen, wenn auch im Vergleich Mx-Proteinen eher schwache, Aktivitäten gegenüber einigen Viren (u. a. gegen das Hepatitis C Virus, Influenza A und das humane Immundefizienz-Virus-1) beschrieben [201-203]. Dagegen wurden bisher nur drei Studien, die auf eine antivirale Aktivität von mGBPs weisen, publiziert. Für mGBP2 konnte gezeigt werden, dass es wie hGBP1 die Replikation von VSV und EMCV zu inhibieren vermag [204]. Während für die Inhibierung von EMCV dabei eine funktionale GTP-Bindestelle erforderlich war, konnte VSV auch durch die mGBP2 S52N-Mutante, die eine deutlich reduzierte GTP-Bindung aufweist, inhibiert werden [204]. Eine weitere *in vitro*-Studie konnte demonstrieren, dass mGBP1 eine Funktion in der antiviralen Abwehr gegen das *Dengue*-Virus besitzt [205]. Infizierte mGBP1<sup>-/-</sup>-Zellen zeigten hier reduzierte Level an antiviralen Zytokinen und eine dezimierte NF $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität. Die dritte Studie hinsichtlich der antiviralen Aktivität von IRGs und mGBPs gegenüber dem murinen Norovirus (MNV) wurde erst kürzlich veröffentlicht [206]. Die Resultate dieser Studie konnten zeigen, dass das ATG8-Protein LC3 nach der Assoziation mit dem viralen Replikationskomplex mGBP1 und mGBP2 rekrutiert und dadurch die MNV-Replikation inhibiert. Die Tatsache, dass sowohl LC3 als auch IRGs und mGBPs für die Inhibierung des MNV vonnöten sind, erinnert stark an die Wirtsabwehr gegen *C. trachomatis* und *T. gondii* [193].

Die Analyse der Funktion von mGBPs in der angeborenen Immunabwehr gegen Parasiten beschränkt sich bisher hauptsächlich auf *T. gondii*. Erste Studien konnten hier zeigen, dass mGBP1, -2, -3, -6, -7 und -9 zur *T. gondii* PV in embryonalen Fibroblasten und Makrophagen rekrutieren [154]. Folgestudien deuten zudem auf eine Rekrutierung von mGBP10 zur PV hin, wohingegen für mGBP5 und mGBP8 nur in sehr seltenen Fällen eine Assoziation mit der PV ausgemacht werden konnte [177, 194]. Mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) und Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) wurde gezeigt, dass mGBP2 mit mGBP1 und in einem geringeren Ausmaß mit mGBP3 interagiert bzw. kolokalisiert [177]. Ko-IP-Experimente belegen zudem, dass mGBP2 an mGBP5 bindet, obwohl in FRET-Experimenten keine Interaktion der beiden Proteine nachgewiesen werden konnte [177, 207]. Neueste Studien demonstrieren des Weiteren eine nahezu vollständige Kolokalisation sowie Co-Rekrutierung von mGBP7 und mGBP3 an die *T. gondii* PV, obwohl auch in Abwesenheit von mGBP7 eine Rekrutierung von mGBP2, mGBP3 und mGBP6 erfolgt [208]. Ebenso wurde eine partielle Kolokalisation von mGBP7 mit mGBP6 ermittelt. Dieselbe Studie zeigt weiterhin, dass die mGBP7-Rekrutierung einer langsameren Kinetik als die der mGBP2 Rekrutierung folgt [208].



**Abb. 1.7:** Intrazelluläre Lokalisation und Dynamik von mGBPs bei Infektion mit *T. gondii*. (A) Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von mit mCherry-mGBP2<sup>-/-</sup> transduzierten mGBP2<sup>-/-</sup> murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs). Die Zellen wurden mit IFN $\gamma$  stimuliert und mit *T. gondii* ME49 infiziert. Maßstabsbalken, 1  $\mu$ m (modifiziert nach Kravets et al., 2016, [177]). (B) Schematische Darstellung der mGBP Lokalisation und Dynamik in *T. gondii*-infizierten Zellen (modifiziert nach Kravets et al., 2016, [177]).

Der Großteil der mGBPs lokalisiert in uninfizierten Zellen in zytoplasmatischen VLS und bildet große Homo- und Heteromultimere [121, 177, 207]. Diese supramolekularen Strukturen relokalisieren bei einer Infektion mit *T. gondii* zur PVM und bilden sehr große Komplexe aus bis zu 8000 Protomeren aus

[177]. Weiterhin konnten Lebenszellaufnahmen zeigen, dass sowohl mGBP2 als auch mGBP7 dazu in der Lage sind, ins PV-Lumen zu gelangen und direkt an der Membran des Parasiten zu akkumulieren (Abb. 1.7A-B) [177, 208]. Ob die Ruptur der PVM und der Parasitenmembran durch eine Funktion von mGBPs als Mechanoenzyme erfolgt, ist noch nicht erwiesen, stellt aber sicherlich eine spannende Hypothese dar, die es in Zukunft noch näher zu analysieren gilt [153]. Mutagenese-Experimente mit mGBP2 deuten darauf hin, dass die GTP-Hydrolyse, die Multimerisierung sowie die Isoprenylierung von CaaX-GBPs für deren Lokalisation in VLS und ihre Abwehrfunktionen erforderlich ist [172]. Wie bereits im Zusammenhang mit Chlamydien-Infektionen erläutert, deuten einige Studien auf eine kooperatives Zusammenspiel von mGBPs und IRGs bei ihrer Redistribution zu PVs hin [115, 139]. Zudem sind auch bei *T. gondii*-Infektionen das Adapterprotein p62/SQSTM1 und die E3-Ligasen TRAF6 und TRIM21 bei der Ubiquitinierung der PV involviert, wodurch diese als vermeintlich „defekte“ Organelle erkannt werden und die weitere Rekrutierung von mGBPs initiiert wird [136, 209]. Interessanterweise konnte erst kürzlich in einer Studie gezeigt werden, dass neben dem Irga6-Protein mGBP1 und mGBP2 bereits unabhängig von einer Infektion mit *T. gondii* ubiquitiniert werden [138]. Bei der Ubiquitinierung handelt es sich um eine PTM bei der entweder einzelne Ubiquitin-Reste (Monoubiquitinierung) oder mehrere gekoppelte Ubiquitine (Polyubiquitinierung) von spezifischen Ligasen kovalent an Lysine von Zielproteinen gekoppelt werden (Abb. 5.2). In diesen Prozess sind drei Enzyme (E), die nach der Reaktionsfolge E1-, E2- und E3-Ligase bezeichnet werden, involviert. Durch die Anheftung des 8,5 kDa Moleküls bzw. mehrerer Ubiquitinmoleküle können die modifizierten Proteine in ihrer Interaktion mit anderen Proteinen gefördert oder behindert, ihre Aktivität beeinflusst, ihre Lokalisation in der Zelle verändert oder ihr gezielter Abbau beschleunigt werden [210, 211]. Für mGBP1 konnten gleich 10 ubiquitinierte Lysine (K51, K57, K87, K372, K389, K443, K444, K493, K532 und K560) und für mGBP2 überdies 25 modifizierte Lysine (K51, K57, K87, K215, K232, K372, K389, K396, K444, K451, K460, K509, K518, K520, K532, K534, K538, K551, K557, K560, K568, K569, K578, K581 und K585) identifiziert werden [138]. Ebenso konnten in derselben Studie auch Ubiquitin-Modifikationen für Irgm1 und Irgm2 ermittelt werden. Interessanterweise vermittelt eine vom Bakterium *Shigella flexneri*-codierte Ubiquitin E3-Ligase durch die Ubiquitinierung von humanem GBP1 dessen Degradation und wirkt hierdurch dessen Funktion, die Aktin-basierte Mobilität des Bakteriums zu inhibieren, entgegen [212, 213]. Ob eine derartige Modulation von mGBPs auch durch *T. gondii*-Effektormoleküle ausgeübt wird, bleibt noch zu untersuchen. Da die mGBPs bereits in Abwesenheit einer Infektion ubiquitiniert werden, erscheint es jedoch wahrscheinlicher, dass dieser Prozess wegbereitend für die Relokalisation von mGBPs zur *T. gondii* PV ist [138]. Diese Annahme wird durch eine Studie unterstützt, die eine p62/SQSTM1-abhängige Rekrutierung von mGBPs zur PV vorschlägt [136]. Die Studie zeigt, dass es nach der Ubiquitinierung der PV zu einer koabhängigen Rekrutierung von TRAF6 und p62/SQSTM1 kommt und p62 über dessen Ubiquitin-Bindedomäne an die PV bindet und gleichzeitig zu einer verstärkten Assoziation von mGBP1 und mGBP2 mit der PV führt [136].

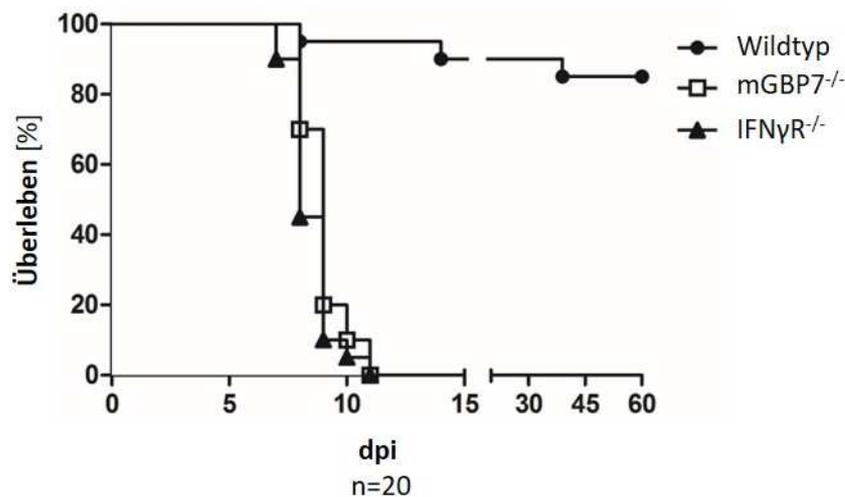
Neben p62 wurden, wie bereits im Rahmen von *C. trachomatis*-Infektionen erwähnt, die E2-ähnlichen Enzyme ATG3 und ATG5, sowie das murine ATG8-Homolog Gate-16 als weitere Wegbereiter für die Rekrutierung von mGBP2 zur PV vorgeschlagen [134, 196, 214]. Die hier beschriebene Assemblierung von mGBPs an PVs erfolgt allerdings hauptsächlich bei den weniger virulenten Typ-II und Typ-III

Toxoplasmen [121, 154]. Die virulenteren Typ-I *T. gondii* interferieren mit diesem koordinierten Abwehrmechanismus der mGBPs. Die vom Parasiten sekretierten Effektormoleküle ROP16, ROP18, ROP5 und GRA15 sind bei diesem Prozess beteiligt, möglicherweise direkt durch die Phosphorylierung von mGBPs oder auch indirekt durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT6 [89, 207]. Zudem beeinträchtigen weitere *T. gondii*-Proteine wie TgIST die Aktivierung von STAT1, wodurch die IFN $\gamma$ -induzierte mGBP Expression gehemmt wird [99, 100]. Die meisten Studien in mGBP<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Gendefekten (mGBP1<sup>-/-</sup>, mGBP2<sup>-/-</sup> und GBP<sup>chr3-/-</sup>) wurden mit ME49 Typ-II Toxoplasmen durchgeführt, wobei sich alle Mäuse gegenüber einer Infektion mit diesem Parasitenstamm als suszeptibel erwiesen [153].

### 1.2.3 Rolle von mGBP7 in der Immunabwehr gegen *T. gondii*

*In vitro*-Infektionsexperimente konnten zeigen, dass sieben (mGBP1, -2, -3, -6, -7, -9 und -10) der 11 murinen mGBPs nach IFN $\gamma$ -Stimulation an der PVM von *T. gondii* ME49 assemblieren [154, 177, 194]. Allerdings konnte bisher nur für zwei dieser mGBPs, mGBP7 und mGBP2, gezeigt werden, dass sie dazu in der Lage sind ins PV Lumen zu gelangen und direkt an der Membran des Parasiten zu akkumulieren (Abb. 1.7) [177, 208]. Interessanterweise wurde in Studien mit mGBP<sup>chr3-/-</sup>-Mäusen, d. h. Mäusen mit einer Deletion von mGBP1, -2, -3, -5 und -7, bei Infektion mit  $1 \times 10^2$  *T. gondii* ME49 Tachyzoiten eine Mortalitätsrate von 90 % dokumentiert [121]. Bei alleiniger *mGBP7*-Gendeletion in Mäusen wurde in einer aktuellen Studie ein noch stärkerer Phänotyp beschrieben [208]. Bei Infektion mit 40 Zysten von *T. gondii* ME49 erreichte in dieser Studie die Mortalität der mGBP7<sup>-/-</sup>-Mäuse an Tag 10 100 % (Abb. 1.8). In einer vergleichbaren Studie wurde bei der Infektion von mGBP2<sup>-/-</sup>-Mäusen mit ebenfalls 40 Zysten von *T. gondii* ME49 eine etwas geringere Mortalitätsrate von ungefähr 70 % beschrieben [197]. Die aufgeführten *in vivo*-Studien implizieren, dass sowohl mGBP7 als auch mGBP2 wichtige Schlüsselenzyme in der Wirtsabwehr gegen *T. gondii* darstellen, wobei insbesondere mGBP7 nicht redundante Effektorfunktionen in der zellulären Immunabwehr zu erfüllen scheint. Die weitere Analyse der mGBP7<sup>-/-</sup>-Mäuse gab zu erkennen, dass die Tiere durch die parasitäre Infektion einen starken Aszites entwickeln und in ihren Organen (Milz, Leber und Lunge) eine signifikant erhöhte Parasitenlast nachzuweisen ist. Weiterhin reagieren die mGBP7<sup>-/-</sup>-Mäuse auf die Infektion mit einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine (IL12p70, IFN $\gamma$ , TNF) sowie reaktiver NO-Spezies [208]. Wie bereits erläutert, wurde darüber hinaus eine Kolo-kalisation von mGBP7 mit zwei weiteren mGBPs (mGBP3 und mGBP6) und eine im Vergleich zu mGBP2 nachfolgende Relokalisation aus den VLS zur PV des Parasiten beschrieben.

Die in diesem Abschnitt dokumentierten Beobachtungen demonstrieren, dass mGBP7 für die Kontrolle der IFN $\gamma$ -vermittelten Immunabwehr von *T. gondii* essentiell ist. Die Identifizierung mGBP7-interagierender Proteine, eine detaillierte biochemische Charakterisierung und die Strukturaufklärung der GTPase werden in Zukunft sicherlich wesentliche Grundsteine für ein besseres Verständnis der molekularen Abwehrmechanismen von mGBP7 legen.



**Abb. 1.8:** Infektion von mGBP7-defizienten Mäusen mit *T. gondii*. Wildtyp, IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup>- und mGBP7<sup>-/-</sup>-Mäuse (n=20) wurden i. p. mit 40 Zysten von ME49 *T. gondii* infiziert und über 60 Tage überwacht. Gezeigt ist die Überlebensrate der Wildtyp, IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup>- und mGBP7<sup>-/-</sup>-Mäuse in Prozent (modifiziert nach Steffens et al., 2020, [208]).

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

*T. gondii* ist ein obligat intrazellulärer Parasit und der Erreger der Infektionskrankheit Toxoplasmose. Während der Wirtszellinvasion bildet *T. gondii* ein eigenes subzelluläres Kompartiment, die sogenannte PV, in der sich der Parasit repliziert und vor den Abwehrmechanismen der Zelle geschützt ist [61]. Mitglieder der IFN-induzierten GTPase-Familie der mGBPs akkumulieren direkt an der *T. gondii* PVM, vermitteln deren Ruptur oder Permeabilisierung und führen somit letztendlich zur Eliminierung des Parasiten [172, 177, 197, 208]. mGBP7 werden essentielle Funktionen in der Immunabwehr gegen *T. gondii* zugeschrieben, da mGBP7<sup>-/-</sup>-Mäuse ca. an Tag 10 nach einer Infektion mit Typ-II ME49 Toxoplasmen versterben [208]. Die molekularen Mechanismen dieser effektiven Abwehr von mGBPs und insbesondere von mGBP7 sind bisher nur unzureichend verstanden. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die GTPase mGBP7 im Detail biochemisch zu charakterisieren und mit mGBP7 interagierende Proteine zu identifizieren, die weitere Anhaltspunkte für die zu Grunde liegenden Prozesse der mGBP7-vermittelten Immunität liefern würden.

Für die biochemische Charakterisierung von mGBP7 und einer K51A mGBP7-Mutante sollten beide Proteine zunächst heterolog in Bakterien exprimiert und anschließend aufgereinigt werden. Mit dem aufgereinigten Protein war es dann jeweilig das Ziel, die GTPase-Aktivität des Enzyms zu analysieren und den Effekt verschiedener GTP-Phosphatanaloga auf die Enzymaktivität zu ermitteln. Weiterhin galt es, die Produkte der mGBP7-vermittelten GTP-Hydrolysereaktion zu identifizieren und das Oligomerisierungsverhalten der GTPase zu studieren. Abschließend zu den biochemischen Analysen sollte zur Strukturaufklärung von mGBP7 versucht werden, die GTPase zu kristallisieren bzw. mittels Kleinwinkel-Röntgenstreuung ein 3D-Volumenmodell von WT und K51A mGBP7 zu erstellen.

Für das Studium der mGBP7-Abwehrfunktionen und -Dynamiken in Wirtszellen, war es ein weiteres Ziel in Fibroblasten mit mGBP7 interagierende Proteine zu identifizieren. Einerseits sollten mGBP7-

Interaktionspartner in uninfizierten Zellen ermittelt werden, um ein besseres Grundverständnis für die Natur und Dynamiken von mGBP7-VLS zu erhalten. Andererseits galt es mit mGBP7 interagierende Proteine in *T. gondii*-infizierten Zellen zu bestimmen, damit weitere Einblicke über die molekularen Funktionen von mGBPs an *T. gondii* PVs gewonnen werden. Nach der Validierung potentieller Interaktionspartner sollte anschließend deren Lokalisation im Zytoplasma in An- und in Abwesenheit einer Infektion mit dem Parasiten ausgemacht werden. Insbesondere sollten die, zur Bestimmung der Lokalisation mit einem GFP (engl.: *green fluorescent protein*)-Fluoreszenz-Tag versehenen Kandidatenproteine, auf eine Kollokalisierung mit mCherry-mGBP7 und mit der PV untersucht werden.

## 2 Material

### 2.1 Bezugsquellen

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Biozym, Hamburg
Aluminiumchlorid Hexahydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniummolybdat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin Natriumsalz (Amp)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ATP (Adenosin-5'-triphosphat)	Thermo Scientific, Braunschweig
Berylliumfluorid	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
$\beta$ -Mercaptoethanol	Gibco, Karlsruhe Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Caseinhydrolysat	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol (CAM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Invitrogen, Karlsruhe
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Thermo Scientific, Braunschweig
Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Distilled Water (dH <sub>2</sub> O, steril)	Thermo Scientific, Braunschweig
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco, Karlsruhe
(D)PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution)	Gibco, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (EtOH)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
FKS (Fötales Kälberserum)	PAN-Biotech, Aidenbach
FluoroBrite™ DMEM Medium	Gibco, Karlsruhe
Fluoromount-G	SouthernBiotech, Birmingham (USA)
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
GDP (Guanosin-5'-diphosphat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutathion (GSH)	Thermo Scientific, Braunschweig
Glycerol	Merck, Darmstadt
GMP (Guanosin-5'-monophosphat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GTP (Guanosin-5'-triphosphat), 100 mM	GE Healthcare, München
GTPyS (Guanosin-5'-( $\gamma$ -thio)-triphosphat)	Jena Bioscience, Jena
Hefeextrakt (pulverisiert)	Roth, Karlsruhe
HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Serva, Heidelberg
Interferon- $\gamma$ , murin	R&D Systems, Wiesbaden
Imidazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Immersionsöl W	Zeiss, Jena
Immersionsöl 518F	Zeiss, Jena
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	Fermentas, St. Leon-Rot
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt

Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck, Darmstadt
LB-Agar	Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver Oxoid™	Thermo Scientific, Braunschweig
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Malachitgrün	Merck, Darmstadt
Mant-GTPγS (2'/3'-O-(N-Methyl-anthraniloyl)- guanosin-5'-γ-thio)-triphosphat	Jena Bioscience, Jena
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Merck, Darmstadt
MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid (NaF)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	NEB, Frankfurt am Main
Natriumorthovanadat	Merck, Darmstadt
NP-40/Igepal	NEB, Frankfurt am Main
Oligo dT Primer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Orange G	Thermo Scientific, Braunschweig
Pefabloc SC	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Roche, Mannheim
Phosphorsäure	Biochrom, Berlin
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Merck, Darmstadt
Polybren	Merck, Darmstadt
RPMI-Medium	Roche, Mannheim
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Saponin	Calbiochem-Merck, Darmstadt
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
Stickstoff	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypsin	Serva, Heidelberg
Trypton/Pepton	Gibco, Karlsruhe
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Ziegenserum	Roth, Karlsruhe
	Agilent Dako, Hamburg

### 2.1.2 Kits und andere Reagenzien

Name	Bezugsquelle
Complete Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free	Roche, Mannheim
Coomassie SimplyBlue™ SafeStain	Invitrogen, Karlsruhe
CutSMART Buffer	NEB, Frankfurt am Main
ECL (Enhanced Chemiluminescence)	Thermo Scientific, Braunschweig
ECL SuperSignal™ West Pico PLUS	Thermo Scientific, Braunschweig
Expand™ Long Template PCR System	Roche, Mannheim
Gibson Assembly Master Mix	NEB, Frankfurt am Main
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche, Mannheim

jetPRIME Transfection Reagent/Buffer	Polyplus, Illkirch (Frankreich)
Loading Dye Solution, orange (6x)	Thermo Scientific, Braunschweig
Lysepuffer für Zellen	ChromoTek, Planegg
MassRuler™ DNA Ladder	Thermo Scientific, Braunschweig
NativePAGE™ 3 – 12 % Bis-Tris Protein Gele	Thermo Scientific, Braunschweig
NativePAGE™ Running Buffer Kit	Thermo Scientific, Braunschweig
NativePAGE™ Sample Prep Kit	Thermo Scientific, Braunschweig
Ni-NTA-Agarose (25 mL)	Qiagen, Hilden
NucleoBond Xtra Maxi	Macherey-Nagel, Düren
NuPAGE™ Bis-Tris Gele (4 – 12 %)	Thermo Scientific, Braunschweig
NuPAGE™ SDS Running Buffer (20x)	Thermo Scientific, Braunschweig
NuPAGE™ Transfer Buffer (20x)	Thermo Scientific, Braunschweig
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Braunschweig
PFA (Paraformaldehyd) Lösung 4 % in PBS	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Braunschweig
Re-Blot Plus Strong Solution	Merck, Darmstadt
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TA Cloning Kit 2.1	Invitrogen, Karlsruhe
Transkriptionspuffer für cDNA-Synthese	Invitrogen, Karlsruhe
TRIzol™ RNA Isolation Reagent	Thermo Scientific, Braunschweig
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Dako, Hamburg
Zyppy Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research, Freiburg

## 2.2 Nukleinsäuren

### 2.2.1 Plasmide

Die erfolgreiche Klonierung generierter Konstrukte wurde durch Restriktionsanalysen (Abschnitt 3.2.9) und Sanger-Sequenzierung (Abschnitt 3.2.12) überprüft.

Plasmide	Eigenschaften	Bezugsquelle, Publikation
pLP/VSVG	Lentivirale Transduktion (VSV-G), CMV-Promoter, Amp <sup>R</sup>	Invitrogen, Karlsruhe
psPAX2	Lentivirale Transduktion (Gag, Pol, Env), CMV-Promoter, Amp <sup>R</sup>	Didier Trono, Addgene plasmid #12260
pQE80L	Expressionsvektor für N-terminale His <sub>6</sub> -Fusionsproteine, T5 Promoter/lac Operator, Amp <sup>R</sup>	Qiagen, Hilden
pQE80L-mGBP7	Insert: mGBP7 ORF	Kloniert, diese Arbeit
pQE80L-mGBP7 K51A	Insert: mGBP7 ORF mit K51A Mutation	Kloniert, diese Arbeit
pTUB-HA	Amp <sup>R</sup> , CAM <sup>R</sup>	B. Striepen, Center for Tropical and Emerging Global Diseases, University of Georgia, Athens, USA
pTUB-mCherry	Insert: mCherry ORF	Dissertation N. Steffens, 2020 in Kooperation mit J. Mock
pTUB-SRS29C-mCherry	Insert: SRS29C ORF	Kloniert, diese Arbeit
pWPI	Expressionsvektor mit IRES-EGFP, EF1 $\alpha$ -Promoter, Amp <sup>R</sup>	Didier Trono, Addgene plasmid #12254
pWPI-HA-mGBP2	Insert: HA-mGBP2 ORF	Dissertation E. Kravets, 2012
pWPI-HA-mGBP7	Insert: HA-mGBP7 ORF	

pWPXL	Expressionsvektor, EF1 $\alpha$ -Promoter, Amp <sup>R</sup>	Didier Trono, Addgene plasmid #12257
pWPXL-GFP-w/o-STOP	Insert: GFP ORF Expressionsvektor für N-terminale GFP- Fusionsproteine	Dissertation C. Konermann, 2008
pWPXL-GFP-mut Kozak	Insert: GFP ORF Expressionsvektor für C-terminale GFP- Fusionsproteine	Kloniert, C. Beuter-Gunia
pWPXL-Clca1-GFP	Insert: Clca1 ORF	Kloniert, Life Technologies
pWPXL-GFP-Jup	Insert: Jup ORF	Kloniert, Life Technologies
pWPXL-GFP-Rftn1	Insert: Rftn1 ORF	Kloniert, Life Technologies
pWPXL-GFP-mGBP7	Insert: mGBP7 ORF	Kloniert, C. Beuter-Gunia
pWPXL-GFP-Sytl2	Insert: Sytl2 ORF	Kloniert, Life Technologies
pWPXL-GFP-Tom1	Insert: Tom1 ORF (Q3UDC3, Isoform 2)	Kloniert, Life Technologies
pWPXL-Sytl2-GFP	Insert: Sytl2 ORF (Q99N50-3, Isoform 3)	Kloniert, Life Technologies
pWPXL-Tom1-GFP	Insert: Tom1 ORF	Kloniert, Life Technologies
pWPXL-mCherry-w/o-STOP	Insert: mCherry ORF	Dissertation V. Klümpers, 2013
pWPXL-mCherry-mGBP7	Insert: mCherry mGBP7 ORF	Kloniert, E. Kravets

## 2.2.2 Oligonukleotide

Die in diesem Kapitel aufgeführten Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen, auf eine Endkonzentration von 100 pmol/ $\mu$ L eingestellt und bei -20 °C aufbewahrt.

### Primer für die Klonierung

Bezeichnung	5' - 3' Sequenz	Verwendung
mGBP7 pQE80L for	AAT TGG ATC CGC ATC TGG TC	Klonierung in pQE80L
mGBP7 pQE80L rev	AAT TAA GCT TTT AGA GTT TT	Klonierung in pQE80L
pWPI-HA-mGBP7 for1	GAC ACC GAC TCT AGA GAA TTC CAC CAT GTA CCC ATA CGA CGT CCC AGA CTA CGC TGC ATC TGG TCC C	Klonierung mit HA-tag in pWPI
pWPI-HA-mGBP7 rev	CTA ACC GGT ACT AGT GGA TCC CTC GTT AGA GTT TTC TAA CTT TGT CTG AAT TCT GTG TCT GAT TCA TTT GGC	Klonierung mit HA-tag in pWPI
pWPI-IRES-F	CGA GGG ATC CAC TAG TAC CGG TTA GAC TAC GGG CTG CAG GAA TTC	Klonierung pWPI Vektorüberhang für Gibson Assembly mit HA-mGBP7 Insert
pWPI-R	GGT GGA ATT CTC TAG AGT CGG TGT CAA ATG TCG AAA TTC CTC ACG	Klonierung pWPI Vektorüberhang für Gibson Assembly mit HA-mGBP7 Insert
SRS29C for	TCG TTG GCA TTT TTT CTT GAA TTC CAT GGC GAC GCG TGC GTC TTT G	Klonierung in pTUB-mCherry
SRS29C rev	TGT TAT CCT CCT CGC CCT TGC TCA CAT AGG CAA GTG CCG TCA TCG CA	Klonierung in pTUB-mCherry

## Primer für die Mutagenese

Bezeichnung	5' - 3' Sequenz	Verwendung
mGBP7-Lys51-F	AGG ACT ATA CCG TAC GGG AGC ATC CTA CTT GAT GAA CCG C	Mutation von pQE80L- mGBP7
mGBP7-Lys51-R	GCG GTT CAT CAA GTA GGA TGC TCC CGT ACG GTA TAG TCC T	Mutation von pQE80L- mGBP7

## Primer für die Sequenzierung

Bezeichnung	5' - 3' Sequenz	Verwendung
Clca seq1	TTT CAC TGC TCA AGT CCA GAA GG	Sequenzierung Clca1 Insert von pWPXL
Clca seq2	TGG CTA CTG CTC ACA TGA GTC AG	Sequenzierung Clca1 Insert von pWPXL
EF1a Jup seq1	ACT GAG TGG GTG GAG ACT ATC TGT CCT GTT CTA CGC CAT CAC	Sequenzierung von pWPI Sequenzierung Jup Insert von pWPXL
Jup seq2	GGC CAC TGG TCA AGG CAA CTA TTG	Sequenzierung Jup Insert von pWPXL
Kozak for seq	GGT ACA GTG CAG GGG AAA G	Sequenzierung von pWPXL- GFP-mut Kozak
Kozak rev seq	CCG TCC AGC TCG ACC AG	Sequenzierung von pWPXL- GFP-mut Kozak
pQE-80L Seq FP pQE-80L Seq RP pWPI-R	CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG GTT CTG AGG TCA TTA CTG G GGT GGA ATT CTC TAG AGT CGG TGT CAA ATG TCG AAA TTC CTC ACG	Sequenzierung von pQE80L Sequenzierung von pQE80L Sequenzierung von pWPI
Rftn1 seq	AGT ACT ACC CTG TCA CCA TCC	Sequenzierung Rftn1 Insert von pWPXL
Syt12 seq1	ACG TGA GAT TCT CTG CCG TG	Sequenzierung Syt12 Insert von pWPXL
Syt12 seq2	TTT ACA GTG GAG ACT TTG GCA ACC	Sequenzierung Syt12 Insert von pWPXL
Tom1 seq	AGC TAC TAC AGG AAC TGA ACC	Sequenzierung Tom1 Insert von pWPXL
w/o for seq	GAT CAC TCT CGG CAT GGA CG	Sequenzierung von pWPXL- GFP-w/o-STOP
w/o rev seq	CCA CAT AGC GTA AAA GGA GC	Sequenzierung von pWPXL- GFP-w/o-STOP

## 2.3 Proteine

### 2.3.1 Enzyme

Enzyme	Bezugsquelle
Antarctic Phosphatase	NEB, Frankfurt am Main
DNase I (Desoxyribonuklease I)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Reverse Transkriptase, M-MLV	Invitrogen, Karlsruhe
RNaseOUT™	Invitrogen, Karlsruhe
<i>PfuUltra</i> High-Fidelity DNA Polymerase	Agilent Dako, Hamburg
Proteinase K	Roche, Mannheim
rSAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)	NEB, Frankfurt am Main

T4 DNA-Ligase	Roche, Mannheim
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	NEB, Frankfurt am Main

### 2.3.2 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme	Bezugsquelle
Apa I	Fermentas, St. Leon-Rot
Bam HI	Roche, Mannheim
Dpn I	NEB, Frankfurt am Main
Hind III	Fermentas, St. Leon-Rot
Hinc II	NEB, Frankfurt am Main
Kpn I - HF	NEB, Frankfurt am Main
Pac I	NEB, Frankfurt am Main

### 2.3.3 Antikörper

Antigen	Ursprung	Klon	Bestellnr. #	Bezugsquelle
β-Aktin (Maus)	Maus	8H10D10, monoklonal	3700	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Clathrin (Human)	Kaninchen	AS1650 - C-Terminus, polyklonal	ab21679	Abcam, Cambridge (UK)
Clca1 (Human)	Kaninchen	EPR12254-88, monoklonal	ab180851	Abcam, Cambridge (UK)
GFP	Maus	Klon 7.1 und 13.1, monoklonal	11814460001	Roche, Mannheim
HA-Agarose	Maus	HA-7, monoklonal	A2095	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HA	Maus	HA-7, monoklonal	H3663	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
His	Maus	Tetra His, monoklonal	34670	Qiagen, Hilden
ISG15 (Human)	Kaninchen	polyklonal	PA5-17461	Thermo Scientific, Braunschweig
Jup (Human)	Kaninchen	C-Terminus, polyklonal	LS-C352407	Biozol, Eching
mCherry	Maus	monoklonal	632543	Clontech Laboratories, Inc., California (USA)
mGBP2	Kaninchen	EVNGKPVTSDEYLEHC, polyklonal	Degrandi	Eurogentec, Seraing (Belgien)
mGBP7	Kaninchen	CGGKSSMNTNSDKVRK, polyklonal	Degrandi	Eurogentec, Seraing (Belgien)
Raftlin (Maus)	Kaninchen	AS207-451, polyklonal	ABIN1860396	Antibodies-online, Aachen
SRS29C ( <i>T. gondii</i> )	Kaninchen	1811608, polyklonal	Degrandi, DE18103	Eurogentec, Seraing (Belgien)
Syt12 (Human)	Kaninchen	AS329-880, polyklonal	ab231133	Abcam, Cambridge (UK)
Tom1 (Human)	Kaninchen	Ag11706, polyklonal	17506-1-AP	Proteintech, Manchester (UK)
<i>T. gondii</i> (SAG1)	Maus	TP3, monoklonal	ab8313	Abcam, Cambridge (UK)
Ubiquitin (linkage-specific K27)	Kaninchen	EPR17034, monoklonal	ab181537	Abcam, Cambridge (UK)

Ubiquitin (linkage-specific K48)	Kaninchen	Apu2, monoklonal	05-1307	Merck, Darmstadt
Ubiquitin (linkage-specific K63)	Kaninchen	Apu3, monoklonal	05-1308	Merck, Darmstadt
Ubiquitin (linkage-specific K29, K48, K63)	Maus	FK2, monoklonal	04-263	Merck, Darmstadt

### 2.3.4 Sekundärantikörper

Antigen	Wirt	Adsorption	Konjugation	Bestellnr. #	Bezugsquelle
Maus IgG	Ziege	Rind, Ziege, Maus, Ratte + Human IgG	Alexa Fluor 633	A-21071	Thermo Scientific, Braunschweig
Maus IgG	Pferd	-	HRP-gekoppelt	7076	Cell Signaling, Cambridge (UK)
Kaninchen IgG	Ziege	-	Alexa Fluor 405	ab175652	Abcam, Cambridge (UK)
Kaninchen IgG	Ziege	-	HRP-gekoppelt	7074	Cell Signaling, Cambridge (UK)

## 2.4 Zellen

### 2.4.1 Zelllinien

Zelltyp	Eigenschaften	Referenz
293FT	Humane, primäre, embryonale Nierenzelllinie transformiert mit humanen Adenovirus Type 5 DNA, zusätzlich mit pCMVSPORT6Tag.neo transformiert	Invitrogen, Karlsruhe
HS27/HFF MEFs	Humane Vorhautfibroblasten Murine embryonale Fibroblasten (MEFs) am Tag 14,5 p. c. aus C57BL/6 Embryonen	ATCC (CRL-1634 <sup>TM</sup> ), Wesel Isoliert und präpariert von C. Beuter-Gunia
mGBP7 <sup>-/-</sup> MEFs	MEFs am Tag 14,5 p. c. aus mGBP7 <sup>-/-</sup> C57BL/6 Embryonen	Isoliert und präpariert von C. Beuter-Gunia
mGBP7 <sup>-/-</sup> MEFs + GFP-mGBP7	mGBP7 <sup>-/-</sup> MEFs transduziert mit pWPXL-GFP-mGBP7	Dissertation N. Steffens, 2020
mGBP7 <sup>-/-</sup> MEFs + mCherry-mGBP7	mGBP7 <sup>-/-</sup> MEFs transduziert mit pWPXL-mCherry-mGBP7	Dissertation N. Steffens, 2020
NIH 3T3	Murine, embryonale Fibroblastenzelllinie	ATCC (CRL-1658 <sup>TM</sup> ), Wesel

### 2.4.2 Bakterien- und Parasitenstämme

Bezeichnung	Stamm / Genotyp	Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	DH5 $\alpha$ , F <sup>-</sup> $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 <math>\lambda</math> thi-1 gyrA96 relA1</i>	Thermo Scientific, Braunschweig #18258012
<i>Escherichia coli</i> Rosetta <sup>TM</sup>	Rosetta <sup>TM</sup> (DE3)pLysS, F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysSRARE (Cam <sup>R</sup> )	Merck, Darmstadt #70956
<i>Toxoplasma gondii</i> ME49	ME49, Typ-II	ATCC, Wesel

## 2.5 Puffer, Lösungen und Medien

### 2.5.1 Stammlösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	
<b>Antibiotika</b>		
Amp-Stammlösung	100 µg/mL	in ddH <sub>2</sub> O
CAM-Stammlösung	34 µg/mL	in EtOH
<b>Bakterienkultur und Proteinaufreinigung</b>		
2xYT-Medium*	16 g/L 10 g/L 5 g/L	Trypton/Pepton Hefeextrakt NaCl in dH <sub>2</sub> O
LB-Medium*	10 g/L 5 g/L 5 g/L	Caseinhydrolysat Hefeextrakt NaCl in dH <sub>2</sub> O
Puffer A (Lysepuffer für Ni-NTA)	50 mM 300 mM 5 mM 10 mM 1 mM 250 µM	Tris/HCl, pH 8,0 NaCl MgCl <sub>2</sub> Imidazol β-Mercaptoethanol Pefabloc SC
Puffer B (Waschpuffer für Ni-NTA)	50 mM 250 mM 5 mM 10 mM 1 mM	Tris/HCl, pH 8,0 NaCl MgCl <sub>2</sub> Imidazol β-Mercaptoethanol
Puffer C (Elutionspuffer für Ni-NTA)	50 mM 150 mM 5 mM 300 mM 1 mM	Tris/HCl, pH 8,0 NaCl MgCl <sub>2</sub> Imidazol β-Mercaptoethanol
Puffer GFPA (Gelfiltrationspuffer)	50 mM 5 mM 2 mM	Tris/HCl, pH 8,0 MgCl <sub>2</sub> DTT
<b>Immunfluoreszenz</b>		
Antikörper (AK)-Lösung	2 % (v/v) 0,0002 % (v/v)	Ziegenserum Saponin in PBS
Blockierungslösung	2 % (v/v) 0,002 % (v/v)	Ziegenserum Saponin in PBS
DAPI-Lösung	1:2500	in PBS
Permeabilisierungslösung	0,02 % (v/v)	Saponin in PBS
Waschlösung	0,0002 % (v/v)	Saponin in PBS

**Immunpräzipitation**

Ko-IP-Puffer	50 mM 10 mM 200 mM 10 mM 10 % (v/v) 0,5 % (v/v) 1 mM in dH <sub>2</sub> O	HEPES/KOH, pH 7,3 KCl NaCl MgCl <sub>2</sub> Glycerol NP-40/Igepal DTT 1 Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-free) PhosSTOP™ und 1 Tablette Phosphatase Inhibitor je 10 mL
--------------	--	---

**Elektroporation**

Cytomix	25 mM 0,15 mM 2 mM 120 mM 10 mM 5 mM  5 mM 5 mM	HEPES, pH 7,6 CaCl <sub>2</sub> EGTA KCl K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> MgCl <sub>2</sub>  ATP GSH
---------	---	---

**Malachitgrün GTPase-Aktivitäts-Assay**

Ammoniummolybdat-Lösung	7,5 % (w/v)	Ammoniummolybdat
Färbelösung	1 mL 250 µL 20 µL	Malachitgrün-Stammlösung Ammoniummolybdat-Lösung Tween-20 Lösung
GTPase-Reaktionspuffer	50 mM 5 mM 2 mM	Tris/HCl, pH 7,5 MgCl <sub>2</sub> DTT
Malachitgrün-Stammlösung	0,122 % (w/v) 20 % (v/v)	Malachitgrün H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Stopplösung	20 mM	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Tween-20 Lösung	11 % (w/v)	Tween-20

**PCR und Klonierung**

5x DNA-Auftragspuffer	15 % (v/v) 0,05 % (w/v) 0,05 % (w/v)	Ficoll Typ 400 Bromphenolblau Xylencyanol
Agarosegel	1 – 2 % (w/v)	Agarose in 1x TAE-Puffer
dNTP-Mix	1 mM 1 mM 1 mM 1 mM	dATP dCTP dGTP dTTP
TAE-Elektrophoresepuffer	40 mM 20 mM 2 mM	Tris/HCl, pH 8,0 Essigsäure EDTA

<b>SDS-PAGE und Western Blot (WB)</b>		
5x WB-Auftragspuffer	30 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	45 % (w/v)	Glycerol
	25 % (w/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol
	10 % (w/v)	SDS
	0,15 % (w/v)	Bromphenolblau
Blockierlösung	3 – 5 % (w/v)	Milchpulver (MP) oder
	3 – 5 % (w/v)	BSA in TBS-T
TBS-T	10 mM	Tris/HCl, pH 7,6
	150 mM	NaCl
	0,1 % (v/v)	Tween-20

\* Medien für die Bakterienkultur wurden vor der Verwendung durch Autoklavieren (121 °C, 2 bar, 20 min) sterilisiert. Das Festmedium entsteht durch Zugabe von 12 g Agar pro Liter vor dem Autoklavieren.

## 2.5.2 Medien für die Zellkultur

Zelltyp	Grundmedium	FKS*	Penicillin/Streptomycin	$\beta$ -Mercaptoethanol	DMSO
293FT	DMEM	10 % (v/v)		0,05 mM	
HS27/HFF	DMEM	10 % (v/v)		0,05 mM	
MEFs	DMEM	10 % (v/v)		0,05 mM	
NIH 3T3	DMEM	10 % (v/v)	1 % (v/v)	0,05 mM	
Einfriermedium		90 % (v/v)			10 % (v/v)

\* Das FKS wurde vor der Verwendung für 30 min bei 56 °C inkubiert, um Komplementproteine zu inaktivieren

## 2.6 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Aluminiumfolie	Roth, Karlsruhe
Centricon Amicon Ultra-15 (50 kDa MWCO)	Merck, Darmstadt
Cryotubes (1 mL, 1,8 mL)	Thermo Scientific, Braunschweig
Einmalspritzen, Omnifix (5 mL)	B Braun, Melsungen
Eppendorf Tubes (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf, Hamburg
Falcon Tubes steril (15 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Fluoreszenzküvetten QS 10.00	Starna, Pfungstadt
Gelfiltrationssäule Superdex 200 26/600	GE Healthcare, München
Gelfiltrationssäule Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, München
Handschuhe Micro-Touch Nitra-Tex	Ansell, Richmond (Australien)
Kanülen	
23G, Microlance 3	BD, Heidelberg
26G, Sterican	B Braun, Melsungen
Küvetten	Brand, Wertheim
Microscope Coverslips high precision	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Nitrocellulose-Membran, Amersham™ Protan™	GE Healthcare, München
Objekträger	VWR International, Darmstadt
Parafilm M	Bemis, Braine L'Alleud (Belgien)
PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,2 mL	Biozym, Hessisch Oldendorf
Petrischalen steril:	
- 10 cm coated	Falcon, Corning, New York (USA)
- 10 cm uncoated	Greiner Bio One, Frickenhausen

Pipettenspitzen (steril und unsteril):	Starlab International, Hamburg
- 10 µL	
- 20 µL	
- 200 µL	
- 1000 µL	
Pipetten:	Costar, Corning, New York (USA)
- 5 mL	
- 10 mL	
- 25 mL	
- 50 mL	
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Well-Platten:	Falcon, BD Biosciences, Heidelberg
- 6 Well-Platte (steril)	
- 12 Well-Platte (steril)	
- 24 Well-Platte (steril)	
- 96 Well-Platte Flachboden	
- 96 Well-Platte (steril)	
Whatman Grad 3MM Chr	GE Healthcare, München
Zellkulturflaschen mit Filter:	
- T25	Falcon, Corning, New York (USA)
- T75	
- T162	
Zellschaber	Starlab International, Hamburg Greiner Bio One, Frickenhausen

## 2.7 Technische Ausstattung

Name	Hersteller
Abzug	WRT-Laborbau, Stadtlohn
ÄKTA	GE Healthcare, München
Analysewaage Chyo JL-180	Welabo, Nettetal
Cell Density Meter Ultraspec	Amersham, Amersham (UK)
ECL Imager Chemostar	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen
Ein- und Multikanalpipetten	Thermo Scientific, Braunschweig
Eismaschine NordCap	Simag, Milan (Italien)
Elektroporationsgerät:	Bio-Rad, Hercules (USA)
Pulse Controller Plus	
Capacitance Extender Plus	
Gene Pulser II	
Elektrophoresekammer für DNA	Hoefer, Amsterdam
Elektrophoresekammer XCell SureLock Mini-Cell	Thermo Scientific, Braunschweig
FACS Aria™ III	BD, Heidelberg
Fluoreszenzspektrometer Fluorolog-3	HORIBA, Bensheim
Fraktionssammler Frac-920	GE Healthcare, München
Gefrierschrank H86-570-1	EWALD Innovationstechnik, Rodenberg
Heizplatte RH basic 2	IKA-Werke, Staufen
Inkubator HERA cell 240	Kendro, Langenselbold
Inkubator BBD6220	Thermo Scientific, Braunschweig
Magnetrührer MR3001 K	Heidolph, Schwabach
MALDI-TOF/TOF ultrafleXtreme	Bruker Daltonics, Leipzig
Mikroskop Axio Observer 3	Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss, Jena
Mikroskop Konfokal LSM780	Zeiss, Jena
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart
Millipore Elix advantage 3	Millipore, Schwabach

Milli-Q Reference A+	Merck, Darmstadt
Molecular Imager Gel Doc™ XR+	Bio-Rad, Hercules (USA)
Multi-Angle Light Scattering	
Detector miniDAWN Treos2	Wyatt Technology, Dernbach
HPLC System Agilent 1260	Agilent Dako, Hamburg
Optilab T-rEX differential refractometer	Wyatt Technology, Dernbach
Multistep-Dispenser Handystep	Brand, Wertheim
Nanodrop 1000	Peqlab, Erlangen
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
pH-Meter MP225	Mettler-Toledo, Giessen
Photometer TECAN Sunrise	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Pipettierhelfer Pipetboy acu	VWR International, Darmstadt
Power Source E861	Consort, Turnhout (Belgien)
Power Source Peqpower 250	Peqlab, Erlangen
Power Source Power Ease 90W	Thermo Scientific, Braunschweig
Roller Mixer BTR10-12V	Ratek, Boronia (Australien)
Rotator SB3	Stuart, Staffordshire (UK)
Schüttler Multitron Inkubationsschüttler	Infors, Bottmingen (Schweiz)
Schüttler Kreisschüttler 3015	GFL, Burgwedel
Schüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Schüttler Reax top	Heidolph, Schwabach
Semi-Dry-Elektroblotter PerfectBlue™	Peqlab, Erlangen
Sicherheitswerkbank Herasafe™	Kendro, Langensfeld
Thermocycler T1, T3 & T-gradient	Biometra, Göttingen
Thermoschüttler Mixer HC	Starlab International, Hamburg
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Thermo Scientific, Braunschweig
Waage Precisa 600C	Precisa, Dietikon (Schweiz)
Wasserbad W6	Labortechnik Medingen, Dresden
Zelldisruptor	Constant Systems, Daventry (UK)
Zentrifuge Evolution RC Centrifuge Sorvall	Thermo Scientific, Braunschweig
Rotor F8S-6x1000y FIBERlite	
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Thermo Scientific, Braunschweig
Zentrifuge Microcentrifuge MiniStar silverline	VWR International, Darmstadt
Zentrifuge Sorvall RC-4	Thermo Scientific, Braunschweig
Zentrifuge Ultracentrifuge Optima™ L90K	Beckman Coulter, Krefeld
Rotor Type 45Ti	

## 2.8 Software

Name	Hersteller
Adobe Acrobat XI Pro	Adobe
Adobe Illustrator 2019	Adobe
Adobe Photoshop CS6	Adobe
ASTRA7	Wyatt Technology
Blast	National Library of Medicine
EndNote X7	Clarivate Analytics
flexAnalysis 3.0	Bruker Daltonics
Fiji	Fiji contributors Rueden et al.
Geneious Pro 5.5.8	Geneious
GraphPad Prism 5	GraphPad Software
Imaris	Bitplane
iQ™5 2.0 Optical System	Bio-Rad
Microsoft Office 2010	Microsoft
Zen 2012 (blue edition)	Zeiss

## 3 Methoden

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Kultivierung adhärenter Zelllinien erfolgte in Oberflächen-beschichteten Zellkulturflaschen oder 6/12/24-Well-Platten unter sterilen Bedingungen. Bei 80 – 100 % Konfluenz der Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und durch dreiminütige Inkubation bei 37 °C mit Trypsin/EDTA (0,25 %) vom Boden gelöst. Durch Zugabe von FKS-haltigem Medium wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellen vereinzelt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C. Nach Verwerfen des Trypsin-haltigen Überstandes wurden die Zellen erneut in Medium resuspendiert und je nach Zelllinie, Kulturgefäß und Zelldichte 1/2 - 1/20 Volumen zu frischem Medium in die entsprechenden Kulturgefäße gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 10 % CO<sub>2</sub>.

#### 3.1.2 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Das langsame Einfrieren von Zellen erfolgte mit einem Zusatz von 10 % DMSO (v/v) in FKS (vgl. Abschnitt 2.5.2). Die Zellen wurden in Cryotubes überführt, 30 min bei -20 °C inkubiert und ü. N. bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden die Zellen zur Langzeitkonservierung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Auftauen der Zellen erfolgte möglichst rasch bei 37 °C, da DMSO toxisch auf Zellen wirkt. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in frischem, vorgewärmtem Medium aufgenommen, durch Zentrifugation (5 min, 1200 rpm, 4 °C) sedimentiert und in frischem Medium in Kulturgefäßen ausgesät.

#### 3.1.3 Lentivirale Transduktion zur Herstellung stabiler Zelllinien

Für die Lentivirus-Produktion wurden nach zweimaligem Passagieren 1x10<sup>6</sup> 293FT-Zellen in einer 6-Well-Platte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte bei einer Konfluenz von 60 – 80 % die transiente Transfektion von drei Plasmiden mit jetPRIME Reagenzien.

500 µL	jetPRIME Puffer
5 µg	pWPXL-Expressionsvektor
3,75 µg	pLP/VSVG Plasmid
1,25 µg	psPAX2 Plasmid

Der Reaktionsansatz wurde gemischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden 20 µL jetPRIME Reagenz hinzugefügt, gemischt, erneut zentrifugiert und für 10 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ein Mediumwechsel der 293FT-Zellen vorgenommen. Der Transfektionsansatz wurde unter Schwenken auf die Zellen gegeben und für 24 – 48 h bei 37 °C inkubiert. Die zu transduzierenden Zielzellen wurden in 24-Well-Platten entsprechend ausgesät, um am Tag der Transduktion eine Konfluenz von 100 % zu erreichen. Die Viren wurden geerntet, indem das Medium

von den 293FT-Zellen abgenommen und für 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert wurde. Der virenhaltige Überstand wurde entweder direkt verwendet oder in Cryotubes aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Für die Transduktion wurde ein Gemisch aus 500 µL Virusüberstand und 2,5 µL Polybrene auf die Zellen gegeben. Diese wurden für 30 min bei 37 °C temperiert, dann für 99 min bei 30 °C und 1.200 rpm zentrifugiert und anschließend nochmals für 6 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen erneut für 48 – 72 h bei 37 °C inkubiert. Der Erfolg der Transduktion wurde durch Überprüfung der Zellmorphologie und der Fluoreszenz bestätigt. Nach zweimaligem Passagieren unter S2-Bedingungen wurden die Zellen über einen durchflusszytometrischen Sortiervorgang angereichert und unter S1-Bedingungen für Folgearbeiten kultiviert.

### 3.1.4 Kultivierung von *T. gondii*

Für die Kultivierung der intermediär virulenten Typ-II ME49 *T. gondii* wurden  $1 \times 10^6$  Tachyzoiten in T25-Zellkulturflaschen auf einen HS27-Zellmonolayer überführt. Nach Vermehrung der Parasiten und Lyse der Wirtszellen wurde der Überstand abgenommen und bei 700 rpm für 5 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet mit Wirtszellrückständen wurde verworfen und die Parasiten durch eine weitere Zentrifugation des Überstandes bei 1.400 rpm für 15 min pelletiert. Die pelletierten Parasiten wurden in frischem Medium resuspendiert, gezählt und auf neue HS27-Wirtszellen überführt bzw. für weitere Versuche verwendet.

### 3.1.5 *In vitro*-Infektion mit *T. gondii*

Am Vortag wurden je  $1 \times 10^4$  MEF-Zellen pro Well einer 24-Well-Platte in FluoroBrite DMEM-Medium auf sterile Deckgläser ausgesät. Diese wurden 16 h vor der Infektion mit *T. gondii* mit 100 U/mL IFN $\gamma$  stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die Infektion mit *T. gondii* erfolgte in einem Verhältnis von 1:50 von Zellen zu Parasiten. Die allgemeine Inkubationszeit bis zur Verwendung für weiterführende Immunfluoreszenz-Analysen betrug 2,5 h.

### 3.1.6 Immunfluoreszenz-Färbung für konfokalmikroskopische Analysen und Airyscan

Nach *in vitro*-Infektion (Abschnitt 3.1.5) von MEF-Zellen wurde das Medium abgenommen und die infizierten Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Für die Immunfluoreszenz-Färbung folgten mehrere Arbeitsschritte bei RT mit den in Abschnitt 2.5.1 aufgeführten, gekühlten (4 °C) Stammlösungen:

10 min	Fixierung mit PFA (4 %)
15 min	Permeabilisierung
20 min	Blockierung
45 min	Inkubation 1. AK-Lösung (SAG1 1:700; Clathrin 1:1000)
45 min	Inkubation 2. AK-Lösung (Alexa Fluor 405/633 1:200 )
3 min	DAPI-Zellkernfärbung

Zwischen den Arbeitsschritten wurde jeweils 2 x mit der Saponin-Waschlösung gewaschen. Die AK-Inkubation erfolgte unter abgedunkelten Bedingungen. Die Deckgläser mit den Zellen wurden mit Fluoromount-G auf Objektträgern fixiert, ü. N. bei RT im Dunkeln gelagert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt. Die fixierten Präparate wurden mit einem Zeiss LSM780 Konfokalmikroskop analysiert und die Aufnahmen durch ZEN 2012 Software, Fiji und Bitplane Imaris ausgewertet.

### 3.1.7 DNA-Transfer in *T. gondii*

Für die Transfektion eines pTUB-Expressionsplasmids in *T. gondii* wurden HS27-Zellen kurz vor dem Aussteigen der Tachyzoiten mit einem Zellschaber vom Flaschenboden abgelöst. Für den Zellaufschluss wurde die Zellsuspension mit Hilfe einer Spritze erst 2 x durch eine 23G- und dann 2 x durch eine 27G-Nadel geführt. Nachfolgend wurden die freigesetzten Parasiten wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben aus dem Überstand geerntet und in 700 µL Cytomix-Elektroporationspuffer aufgenommen. Die Suspension wurde in eine Elektroporationsküvette überführt und 75 µg Plasmid-DNA (pTUB-mCherry oder pTUB-mCherry-SRS29C) hinzugefügt. Nach 3 min Inkubation erfolgte die Elektroporation bei 2 kV, 25 µF und 50 Ω für ungefähr 250 µs. Nach der Transfektion wurden die Parasiten auf einen HS27-Zellmonolayer gegeben und nach einem Tag unter CAM-Selektion mit einer Endkonzentration von 20 µM kultiviert.

### 3.1.8 Ko-Immunpräzipitation

Zum Nachweis von Interaktionspartnern von mGBP7 wurde die Methode der Ko-IP angewendet. Zunächst wurden hierzu HA-mGBP7/mGBP2 stabil exprimierende mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen oder mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen 18,5 h vor der Ko-IP mit 100 U/mL IFN $\gamma$  stimuliert. Nach 16 h erfolgte eine Infektion der Zellen mit ME49 *T. gondii* in einem Verhältnis von 1:10 (Zellen:Parasiten) oder die Zellen blieben unbehandelt. Nach weiteren 2,5 h wurden die Zellen in Ko-IP Puffer lysiert und für 20 min auf einem Drehrad bei 4 °C rotiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten ebenfalls bei 4 °C oder auf Eis. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm und parallel eine Äquilibrierung der anti-HA-Agarose in Ko-IP Puffer nach Herstellerangaben. Nachfolgend wurde der Überstand in einem Verhältnis von 20:1 (Probenvolumen:anti-HA-Agarose) zum Präzipitationsantikörper gegeben und für 2 h auf einem Drehrad inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben bei 11.000 rpm für 1 min zentrifugiert und die Agarose 3 x mit je 500 µL Ko-IP-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen, die Agarose in 40 µL 5x WB-Auftragspuffer aufgenommen und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Abschließend wurden die Proben für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Gefäß überführt und bei -20 °C weggefroren.

Die erhaltenen Proben wurden entweder für MS-Analysen in die Massenspektrometrie (Abschnitt 3.3.14) gegeben oder auf ein SDS-Gel (4 – 12 %) aufgetragen (Abschnitt 3.3.3) und eine WB-Analyse (Abschnitt 3.3.4) durchgeführt.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Isolierung gesamtzellulärer-RNA aus eukaryotischen Zellen und *T. gondii*

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80 – 90 % wurden die Zellen trypsiniert, durch Zentrifugieren sedimentiert (5 min, 1200 rpm, 4 °C), der Überstand verworfen und die Zellen in kaltem 1x PBS aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 1200 rpm, 4 °C) wurde der Überstand vollständig entfernt, die Zellen in RLT-Puffer (enthalten im RNeasy Mini Kit, Qiagen) mit  $\beta$ -Mercaptoethanol-Zusatz resuspendiert (<math>5 \times 10^6</math> Zellen: 350  $\mu$ L;  $5 \times 10^6$  –  $1 \times 10^7$  Zellen: 600  $\mu$ L) und für 5 min bei RT inkubiert. Die weiteren Schritte zur Isolierung der Gesamt-RNA wurden mit dem RNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zur Isolierung der gesamtzellulären-RNA aus *T. gondii* Tachyzoiten wurden  $1 \times 10^7$  Parasiten wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben geerntet und nach einem Waschschrift mit PBS der Überstand vollständig entfernt. Anschließend wurde das Pellet in 350  $\mu$ L RLT-Puffer (enthalten im RNeasy Mini Kit, Qiagen) mit  $\beta$ -Mercaptoethanol-Zusatz resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Alle weiteren Schritte zur RNA-Isolierung wurden nach Herstellerangaben mit dem RNeasy Mini Kit nach durchgeführt.

### 3.2.2 cDNA-Synthese aus gesamtzellulärer RNA

Bei der cDNA-Synthese wurde die zuvor gewonnene RNA (Abschnitt 3.2.1) enzymatisch in cDNA umgeschrieben. Folgender Ansatz wurde in ein autoklaviertes 1,5 mL Reaktionsgefäß zusammen pipettiert:

2 – 3 $\mu$ g	RNA in 10 $\mu$ L DEPC-H <sub>2</sub> O
1 $\mu$ L	Oligo dT Primer (10 $\mu$ M)

Der Ansatz wurde 2 min bei 70 °C inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Im Anschluss wurden die folgenden Komponenten zum Reaktionsansatz hinzugefügt:

1 $\mu$ L	dNTPs für RNA (10 mM)
4 $\mu$ L	5x Transkriptionspuffer
2 $\mu$ L	DTT
1 $\mu$ L	RNaseOUT™
1 $\mu$ L	Reverse Transkriptase, M-MLV

Der resultierende 20  $\mu$ L Ansatz wurde für die cDNA-Synthese für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach folgte Enzyminaktivierung für 5 min bei 95 °C bevor die Proben auf Eis runter gekühlt wurden.

### 3.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR basiert auf der Eigenschaft von DNA-Polymerasen einzelsträngige DNA für die Synthese eines Komplementärstranges zu benutzen, um so bestimmte Gen-Sequenzen zu vervielfältigen. Für die PCR-Reaktion wurden folgende Komponenten (Expand™ Long Template PCR System Kit) unter Kühlung in einem PCR-Reaktionsgefäß angesetzt:

200 ng	DNA-Template
10 µL	Reaktionspuffer
1 µL	Primer 1 (20 pmol)
1 µL	Primer 2 (20 pmol)
1 µL	dNTP Mix (10 mM)
0,5 µL	DNA-Polymerase
ad 50 µL	dH <sub>2</sub> O

Die Bedingungen für die Reaktionszyklen sind im Folgenden aufgelistet:

1.	DNA Denaturierung	94 °C	2 min	
2.	DNA Denaturierung	94 °C	20 s	
3.	Primerhybridisierung	66 °C	30 s	<b>35x</b>
4.	Elongation	72 °C	2 min	
5.	Finale Elongation	72 °C	7 min	
6.	Lagerung	4 °C	max. 24 h	

### 3.2.4 Mutagenese-PCR

Für die zielgerichtete Mutagenese von DNA-Sequenzen wurden Mutagenese-Primer designt und das QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Ein Standard-Mutagenese PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

35 ng	DNA-Template
5 µL	10x Reaktionspuffer
0,5 µL	Primer 1 (150 ng)
0,5 µL	Primer 2 (150 ng)
1 µL	dNTP Mix (10 mM)
3 µL	QuikSolution
1 µL	<i>PfuUltra</i> HF DNA Polymerase
ad 50 µL	dH <sub>2</sub> O

Die Mutagenese-PCR wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

1.	DNA Denaturierung	95 °C	1 min	
2.	DNA Denaturierung	95 °C	50 s	
3.	Primerhybridisierung	60 °C	50 s	<b>18x</b>
4.	Elongation	68 °C	1 min/ 1000 bp	
5.	Finale Elongation	68 °C	7 min	
6.	Lagerung	4 °C	max. 24 h	

Nach der Amplifikation wurde dem PCR-Ansatz 1 µL Dpn I für den Abbau methylierter parentaler DNA hinzugefügt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 µL des Reaktionsansatzes für eine Transformation in *E. coli* (Abschnitt 3.2.8) verwendet.

### 3.2.5 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktion von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen ermöglicht die Analyse von Plasmid-DNA durch spezifische Fragmentierung. Nach der Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme mit Hilfe der Geneious Pro 5.5.8 Software wurden die Restriktionsansätze nach Herstellerangaben bzw. dem folgenden Schema angesetzt:

x $\mu$ L	Plasmid-DNA
2 $\mu$ L	Reaktionspuffer
x $\mu$ L	Enzym (2 – 5 Einheiten/ $\mu$ g DNA)
ad 20 $\mu$ L	dH <sub>2</sub> O

Die Restriktionsansätze wurden für 1 – 2 h oder ü. N. bei 37 °C inkubiert und im Anschluss entweder dephosphoryliert oder direkt mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.2.10) analysiert.

### 3.2.6 Dephosphorylierung von DNA

Zur Vermeidung der Selbst-Religation von Vektoren mit kompatiblen Enden wurden diese an ihren 5'-Enden dephosphoryliert. Hierzu wurden die Restriktionsenzyme nach dem Verdau zunächst durch Inkubation für 20 min bei 65 °C deaktiviert und dann mittels Inkubation für 5 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden dem Restriktionsansatz 1  $\mu$ L rekombinante Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP) oder Antarctic Phosphatase hinzugefügt und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.7 Ligation von DNA

Für die Ligation von DNA-Molekülen wurde die T4-Ligase verwendet. Diese Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende linearer DNA-Moleküle. Ein entsprechender Reaktionsansatz mit einem Verhältnis von Vektor zur DNA-Fragment von etwa 1:3 setzte sich wie folgt zusammen:

x $\mu$ L	DNA-Fragment (100 ng)
x $\mu$ L	Vektor (300 ng)
3 $\mu$ L	10x T4-Ligationspuffer
1 $\mu$ L	T4-Ligase
ad 30 $\mu$ L	dH <sub>2</sub> O

Der Ligationsansatz wurde ü. N. bei 4 °C inkubiert und anschließend für die Transformation in *E. coli* (Abschnitt 3.2.8) verwendet.

### 3.2.8 Transformation in *E. coli*

Für die Transformation von DNA wurden kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  oder Rosetta Zellen verwendet. Zunächst wurden 10  $\mu$ L Zellsuspension auf Eis aufgetaut, 2  $\mu$ L Ligationsansatz oder Plasmid-DNA zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen für 45 s als Hitzeschock bei 42 °C inkubiert und für 2 min auf Eis gesetzt. Es folgte die Zugabe von 250  $\mu$ L LB-Medium und 1 h Inkubation bei 37 °C unter Schütteln bei 800 rpm. Abschließend wurde der Gesamtansatz auf einer LB-Agarplatte

mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Positive Klone wurden anschließend über Plasmidisolierung (Abschnitt 3.2.9), Restriktionsanalyse (Abschnitt 3.2.5) und Sequenzierung (Abschnitt 3.2.12) verifiziert.

### 3.2.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Plasmidisolierung wurde 2 mL ein entsprechendes Antibiotikum-enthaltendes LB-Medium mit einer Einzelkolonie der ü. N. inkubierten Bakterien-Agarplatten (Abschnitt 3.2.8) angeimpft. Nach Inkubation unter Schütteln für 6 – 7 h bei 37 °C wurde die 2 mL Bakterienkultur entweder für die Plasmid-Isolierung im kleinen Maßstab oder für das Animpfen einer großen Kultur verwendet. Erfolgte die Plasmid-Isolierung im kleinen Maßstab wurde das High Pure Plasmid Isolation Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Alternativ wurde die Bakterienkultur in einen Erlenmeyerkolben mit 100 mL Antibiotika-haltigem LB-Medium überführt und ü. N. unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA mit Hilfe des NucleoBond Xtra Maxi Kits nach Herstellerangaben. Die DNA-Sequenz isolierter Plasmide wurde mittels Restriktionsanalyse (Abschnitt 3.2.5) und Sanger-Sequenzierung (Abschnitt 3.2.12) überprüft.

### 3.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Für die Herstellung von 1 – 2 %igen (w/v) Agarosegelen wurde die erforderliche Menge an Agarose in 1x TAE-Elektrophoresepuffer aufgenommen und durch Erhitzen gelöst. Nach dem Zusatz von 1 µg/mL Ethidiumbromid wurde die Lösung in eine Elektrophorese-Kammer mit eingesetztem Kamm zur Erzeugung der Probetaschen gegossen. Nach Aushärtung des Gels wurde der Probenkamm vorsichtig entfernt und die Kammer mit 1x TAE-Puffer aufgefüllt. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit 5x DNA-Auftragspuffer (Loading Dye Solution, orange) versetzt und mit einem Längenstandard-Marker (MassRuler™ DNA Ladder) in die Probetaschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 130 V jeweils nach Größe der DNA-Fragmente für 45 – 60 min. Da das zugesetzte Ethidiumbromid in die DNA interkaliert, erfolgte die Detektion der Gelbanden durch UV-Bestrahlung ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) in einem Geldokumentationssystem.

### 3.2.11 Kryokonservierung von Bakterien

Zur Langzeitlagerung von Bakterien wurden 850 µL einer frischen Bakterienkultur zu 150 µL sterilem Glycerol (Endkonzentration 15 % v/v) gegeben und bei -80 °C eingefroren.

### 3.2.12 Sanger-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden im Genomics & Transcriptomics Labor (GTL) des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHU) oder von der Firma Beckman Coulter Genomics/GENEWIZ (USA, Boston) durchgeführt.

### 3.3 Proteinanalytische Methoden

#### 3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen

Für die Herstellung von Proteinlysaten wurden  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen trypsinisiert und mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in ChromoTek Lysepuffer ( $100 \mu\text{L}/1 \times 10^6$  Zellen) resuspendiert und 30 min auf einem Drehrad bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  und 13.000 rpm. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur Weiterverwendung (Abschnitt 3.3.2) bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

#### 3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test

Die Proteinkonzentration wurde nach Angaben des Herstellers mittels Pierce BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay Kit bestimmt. Hierzu wurden die Lösungen A und B im Verhältnis 50:1 vermischt und je  $40 \mu\text{L}$  in eine 96-Well-Platte vorgelegt. Anschließend wurde je  $2 \mu\text{L}$  BCA-Standard (2,0; 1,0; 0,5; 0,25 und  $0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) sowie je  $2 \mu\text{L}$  der zu analysierenden Proteinproben hinzugefügt und die Platte für 30 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  im Dunklen geschwenkt. Durch photometrische Messung der Proben bei 562 nm und mittels der im Folgenden erstellten BSA-Eichkurve wurde die Proteinkonzentration der zu testenden Proben bestimmt. Für WB-Analysen (Abschnitt 3.3.4) wurden 20 – 40  $\mu\text{g}$  Protein eingesetzt.

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

Die SDS (Natriumdodecylsulfat)-PAGE wurde durchgeführt, um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Hierfür wurden die zu untersuchenden Proben mit 5x WB-Auftragspuffer ( $\pm \beta$ -Mercaptoethanol) versetzt und für 10 min bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach dem Einsetzen der 4 – 12 % Bis-Tris-Gradientengelen in die Gelkammern wurden diese mit 1x SDS Running Buffer befüllt. Daraufhin wurden die Proben zusammen mit einem Proteinstandard auf das Gel aufgetragen und bei einer konstanten Spannung von 150 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die gefärbte Lauffront das untere Ende des Gels erreichte. Die Gele wurden entweder für eine Coomassie-Färbung (Abschnitt 3.3.5) oder eine Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran mit folgender AK-Detektion (Abschnitt 3.3.4) verwendet. Die nicht reduzierende SDS-PAGE wurde nach Vorinkubation mit verschiedenen  $\beta$ -Mercaptoethanol-Konzentrationen (0, 5, 10, 50 mM) durchgeführt.

#### 3.3.4 Western Blot (semidry)

Mit der Methode des WB können Proteine auf eine Trägermembran übertragen werden und über spezifische AK-Bindung nachgewiesen werden. Zur Übertragung von mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.3) im Gel aufgetrennten Proteinen wurden zunächst sechs Whatman-Papiere, eine Nitrocellulose-Membran und das SDS-Gel in 1x NuPAGE™ Buffer mit zugesetztem Methanol äquilibriert. Dann wurden die aufgeführten Komponenten in folgender Reihenfolge luftblasenfrei in eine Elektrobloot-Kammer geschichtet:

1. 3 Whatman-Papiere
2. Nitrocellulose-Membran
3. SDS-Gel
4. 3 Whatman-Papiere

Die Transferzeit betrug 1 h bei 110 mA pro Gel. Anschließend wurde die Membran in ein Falcon-Röhrchen überführt und in entsprechender Blockierlösung (5 % MP/BSA in TBS-T je nach 1. AK  $\pm$  0,2 %  $\text{NaN}_3$ ) für 1 h bei RT blockiert. Es folgte ein Waschschrift mit TBS-T und die Inkubation mit dem Primärantikörper ü. N. bei 4 °C in entsprechender Lösung auf einem Falcon-Roller:

$\alpha$ - $\beta$ -Aktin:	1:5000, 5 % MP
$\alpha$ -Clca1:	1:200, 5 % MP
$\alpha$ -GFP:	1:1000, 5 % MP
$\alpha$ -HA:	1:1000, 5 % MP
$\alpha$ -His:	1:500, 3 % BSA
$\alpha$ -ISG15:	1:500, 5 % BSA
$\alpha$ -Jup:	1:200, 5 % MP
$\alpha$ -mCherry:	1:1000, 5 % MP
$\alpha$ -mGBP7:	1:5000, 5 % BSA

$\alpha$ -Raftlin:	1:500, 5 % MP
$\alpha$ -SRS29C:	1:500, 3 % BSA
$\alpha$ -Tom1:	1:500, 5 % MP
$\alpha$ -Syt12:	1:200, 5 % MP
$\alpha$ -K27 Ub:	1:1000, 3 % MP
$\alpha$ -K48 Ub:	1:1000, 5 % MP
$\alpha$ -K63 Ub:	1:500, 3 % MP
$\alpha$ -K29/48/63 Ub:	1:1000, 3 % BSA

Am Folgetag wurde die Membran 3x mit TBS-T für je 5 min gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 1 h bei RT mit einem an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörper (1:2500) in einer entsprechenden Lösung (3 % MP/BSA in TBS-T je nach 1. AK-Lösung). Danach wurde die Membran wiederholt 3x mit TBS-T für je 5 min gewaschen. Die Detektion des spezifisch gebundenen Antikörpers und somit des Proteins von Interesse erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems. Die Membran wurde mit der Detektionslösung (bestehend aus gleichen Teilen der Lösungen A und B) benetzt, in eine Plastikfolie gelegt und die Chemolumineszenz detektiert. Um weitere Proteine auf derselben Membran zu detektieren, wurde diese nach der ECL-Detektion zunächst mit  $\text{dH}_2\text{O}$  gewaschen, dann zur Ablösung der AK-Bindungen mit der Re-Blot Lösung für 30 min inkubiert und abschließend mit TBS-T gewaschen. Die Membran konnte dann erneut geblockt und mit AK-Lösungen inkubiert werden.

### 3.3.5 Coomassie G250-Färbung

Zur Sichtbarmachung und Überprüfung der Reinheit von mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteinproben (Abschnitt 3.3.3) wurde eine Coomassie G250-Färbung durchgeführt. Die Färbung erfolgte mit SimplyBlue™ SafeStain nach Herstellerangaben. Hierzu wurden die Gele unter Schwenken 3x mit 100 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  gewaschen, dann für 3 h mit 100 mL Färbelösung inkubiert und abschließend nochmals 3 h mit 100 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  gewaschen. Die Gele wurden zum Einscannen in Folie eingeschweißt.

### 3.3.6 Proteinexpression und Aufreinigung

Für die Proteinexpression im großen Maßstab wurden sechs Liter 2xYT-Medium, mit 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Amp und 34  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CAM zur Selektion, mit 150 mL einer *E. coli* Rosetta™ 2(DE3)pLysS Übernachtskultur

angepflegt. Die Expression vom WT mGBP7 Protein und der K51A mGBP7 Mutante mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag wurde durch die Zugabe von 150 mM IPTG bei einer optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von 0,5 induziert. Beide Inkubationsschritte erfolgten bei einer Temperatur von 37 °C im Schüttelinkubator bei 1800 U/min. Nach 4 h Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (8000 U/min, 20 min, 4 °C) und in Puffer A resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen unter Kühlung durch Hochdruckhomogenisation in einem sogenannten Zelldisrupter in drei Durchläufen bei einem Druck von 2,7 kbar aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation für 1 h bei 48.000 rpm wurden zu 40 mL des Überstandes 10 mL äquilibrierte Ni-NTA-Suspension gegeben und ü. N. auf einem Drehschüttler bei 200 rpm und 4 °C inkubiert. Es folgten drei Waschschritten mit je 45 mL Puffer B, auf die hin das gebundene Protein mit 5 mL Puffer C eluiert wurde. Die 5-minütigen Zentrifugationsschritte zur Sedimentation der Ni-NTA-Suspension wurden jeweils bei 4 °C und 1500 U/min durchgeführt. Die Proteinreinheit wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung sowie WB überprüft. Im Anschluss wurde die 5 mL Elutionsfraktion auf eine mit GFPA-Puffer äquilibrierte Superdex 200 26/600-Säule aufgetragen. Die monomeres mGBP7 Protein enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und mittels Zentrifugation in einem 50 kDa MWCO (engl.: *molecular weight cut-off*) Konzentrator angereichert. Die Aufkonzentrierung erfolgte bis zu einem Volumen von 5 mL und wurde dann für einen Größenausschluss-Chromatographie (SEC, engl.: *size exclusion chromatography*)-Lauf verwendet. Auch nach der SEC wurden die eluierten Proteinfractionen mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung und WB analysiert. Reine mGBP7-Fractionen wurden mittels 50 kDa MWCO Konzentrator auf 10 – 20 mg/mL konzentriert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.3.7 Malachitgrün GTPase-Aktivitäts-Test

Die Analyse der GTPase-Aktivität von mGBP7 erfolgte mit dem Malachitgrün GTPase-Aktivitäts-Test durch die Messung der freigesetzten Menge an anorganischem Phosphat. Die Reaktionen wurden bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 100 µL durchgeführt. Neben GTPase-Reaktionspuffer enthielten die Reaktionsansätze 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 0 – 5 mM GMP, GDP oder GTP. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,68 µM (Gesamtmenge an Protein: 5 µg) oder 0,83 µM (Gesamtmenge an Protein: 6,2 µg) mGBP7 Protein gestartet und nach 0 und 20 min durch Zugabe von 25 µL des Reaktionsgemisches in 175 µL eiskalte Stopplösung angehalten. Anschließend wurde 50 µL frisch angesetzte Färbelösung hinzugefügt. Nach 15 min Inkubation wurde die Menge an freiem Phosphat durch die Messung der Extinktion bei 595 nm quantifiziert. Die erhaltenen Datenpunkte wurden mit einer Standard Michaelis-Menten-Gleichung angepasst:

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

Dabei beschreibt  $v$  die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration  $[S]$ ,  $v_{\max}$  entspricht der Maximalgeschwindigkeit und die Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  bezeichnet die Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte von  $v_{\max}$  ist. Obwohl der Reaktionsmechanismus von GBPs einen Dimerisierungsschritt beinhaltet, wurde in dieser Arbeit die

klassische Michaelis-Menten-Gleichung, die eine solche Dimerisierungs-abhängige Katalyse nicht berücksichtigt, für die Auswertung verwendet. Aufgrund dieser Tatsache wurden alle kinetischen Parameter als apparente Werte angegeben. Zusätzlich wurde die GTPase-Aktivität bei konstanter GTP-Konzentration von 2 mM GTP und variabler Menge von 0 bis 1 mM an mGBP7 Protein (Gesamtmenge an Protein: 0 – 7,4 mg) gemessen. In diesem Fall wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 mM GTP gestartet und alle weiteren Schritte wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt. Die Daten wurden mit Hilfe einer quadratischen (spezifische Aktivität) Gleichung von GraphPad Prism oder einer allosterisch sigmoidalen (Enzymaktivität) Gleichung angepasst:

$$v = \frac{v_{\max} [E]^h}{K_{0.5} + [E]^h}$$

Hierbei beschreibt  $v$  die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration  $[E]$ ,  $v_{\max}$  ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und  $h$  stellt den Hill-Koeffizienten dar. Die Konzentration des Enzyms, die eine halb-maximale Reaktion ergibt, ist als  $K_{0.5}$  definiert.

Die Inhibierung der GTPase-Aktivität durch  $\gamma$ -Phosphatanaloga wurde mit je 1, 10 und 100 mM  $\text{BeF}_x$ - und  $\text{AlF}_x$ -Stammlösungen (1, 10 und 100 mM  $\text{AlCl}_3$  supplementiert mit 5, 50 und 500 mM NaF) analysiert. Die Orthovanadat-Stammlösungen von 1, 10 und 100 mM wurden aus  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (pH 10) hergestellt und vor der Verwendung 2 min lang gekocht [215, 216]. Zur Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) wurde die GTPase-Aktivität gegen den dekadischen Logarithmus der jeweiligen Inhibitor-Konzentration aufgetragen. Die Daten wurden anhand der folgenden logistischen Gleichung analysiert:

$$y = \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + 10^{((\log IC_{50} - x) \cdot h)}}$$

In dieser Gleichung steht  $y$  für die spezifische GTPase-Aktivität,  $y_{\max}$  für die GTPase-Aktivität des Ausgangsplateaus und  $y_{\min}$  für die GTPase-Aktivität des inhibierten Endplateaus.  $x$  repräsentiert die logarithmische Konzentration des Inhibitors. Der Hill-Koeffizient  $h$  beschreibt die Steilheit der Kurve und der  $IC_{50}$  ist die Inhibitor-Konzentration bei der die Enzymaktivität zu 50 % inhibiert ist.

Bei allen GTPase-Messungen wurde je zusätzlich eine Reaktion mit EDTA (Endkonzentration 20 mM) durchgeführt, um die Autohydrolyse von GTP zu ermitteln und von den Messdaten subtrahieren zu können. Die Bestimmung der freien Phosphatkonzentrationen erfolgte mit Hilfe einer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Standardkurve. Jeder Messwert ist das Ergebnis einer Doppelbestimmung und jedes Experiment wurde 3x durchgeführt. Die Daten wurden mit der GraphPad Version 5.01 ausgewertet.

### 3.3.8 SEC-MALS (*Multi-angle light scattering*)

SEC-MALS Experimente wurden mittels einer an ein HPLC-System angeschlossenen analytischen Superdex 200 10/300-Säule durchgeführt. Das HPLC-System wurde zudem an einen Mehrwinkel-Lichtstreuungsdetektor und einen Brechungsindex-Detektor bzw. ein Differential-Refraktometer gekoppelt. Vor den Messungen wurde die Säule mit GFPA-Puffer ohne Nukleotidzusatz äquilibriert.

Anschließend wurde 100 mL aufgereinigtes mGBP7 Protein mit einer Konzentration von 3,5 mg/mL (47 mM) bzw. 12 mg/mL (162 mM) für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, für 5 min mit  $\pm$  5 mM GTP $\gamma$ S vorinkubiert und mit einer Flussrate von 0,6 mL/min auf die SEC-Säule geladen. Die Datenerfassung und -verarbeitung erfolgte mit der ASTRA7-Software. Alle SEC-MALS-Analysen wurden von Martin Prescher (Biochemie I, HHU) durchgeführt.

### 3.3.9 Native Gelelektrophorese (Native PAGE)

Die Blue Native PAGE (BN-PAGE) wurde generell wie im NativePAGE Bis-Tris Gel Manual (Thermo Scientific) beschrieben durchgeführt. Vor der BN-PAGE wurde 1,4  $\mu$ M (Gesamtmenge an Protein: 2  $\mu$ g) aufgereinigtes WT oder K51A mGBP7 Protein in GTPase-Reaktionspuffer vorgelegt und dann nach Zugabe von 2 mM GTP $\gamma$ S oder 2 mM GTP in Kombination mit den  $\gamma$ -Phosphatanaloga für 20 min bei 37 °C (oder 4 °C, Daten nicht gezeigt) inkubiert. Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ L durchgeführt und als Inhibitor-Konzentration wurde je das Fünffache des entsprechenden  $IC_{50}$ -Wertes verwendet (135  $\mu$ M Orthovanadat, 1,85 mM AlF $_x$  und 1,85 mM BeF $_x$ ). Nach der Inkubation wurden die Proben auf Eis gekühlt, mit 5  $\mu$ L NativePAGE-Probenpuffer versetzt und auf ein 3 – 12 %iges Bis-Tris NativePAGE-Gel aufgetragen. Für den BN-PAGE-Lauf wurde entsprechend den Anweisungen NativePAGE Running Anode Buffer und NativePAGE Dark Blue Cathode Buffer (mit 0,02 % Coomassie G-250) verwendet. Zunächst wurde für den Lauf bei 4 °C für 45 min eine Spannung von 150 V, dann für weitere 45 min eine Spannung von 250 V angelegt. Nachfolgend wurden die Gele in einer Fixier-Lösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure), dann in einer Entfärbungs-Lösung (30 % Essigsäure) und abschließend in einer Coomassie-Färbelösung (Abschnitt 3.3.5) inkubiert. Zur Abschätzung der Molekülmassen wurde zusätzlich zum BN-Marker das denaturierte mGBP7 Protein elektrophoretisch aufgetrennt. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte über Densitometrie mit Hilfe der Fiji-Software [217]. Insgesamt wurde jede Bande dreimal gemessen und eine entsprechende Hintergrundmessung abgezogen. Die Summe der einzelnen Messwerte wurde auf 100 % gesetzt und die berechneten Mittelwerte in Abb. 4.8 mit Hilfe der GraphPad-Software Version 5.01 illustriert.

### 3.3.10 Fluoreszenztitration

Um die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) für GTP von mGBP7 und der mGBP7 K51A-Mutante zu ermitteln, wurde das fluoreszierende GTP-Analogon mant-GTP $\gamma$ S verwendet. Die Titrations zur Bestimmung der  $K_D$  für die Dissoziation des Liganden vom jeweiligen Enzym erfolgten an einem Fluorolog-3 Spektrofluorometer in QS 10.00 Fluoreszenzküvetten. Die Messungen wurden in GFPA-Puffer mit Zusatz von 0,5  $\mu$ M mant-GTP $\gamma$ S bei 25( $\pm$ 1) °C durchgeführt. Die Anregung des mant-Fluorophors erfolgte bei einer Schlitzbreite von 2 nm und 355 nm. Die Emission wurde bei 448 nm gemessen. Zur Bestimmung der  $K_D$ -Werte wurde eine quadratische Bindungskurve an die Messdaten angepasst [172, 218].

### 3.3.11 MALDI-TOF

Die Kombination aus Matrix-unterstützter Laser-Desorptions-Ionisierung (MALDI) und Flugzeit (TOF, engl.: *time of flight*)-Massenspektroskopie wurde genutzt, um die Produkte der GTP-Hydrolysereaktion von mGBP7 zu charakterisieren. Zunächst wurden hierzu 4 mM GTP in 100  $\mu$ L GTPase-Reaktionspuffer vorgelegt. Gestartet wurde die Reaktion (30 min, 37 °C) durch die Zugabe von 22,5 mM (Gesamtmenge an Protein: 166,2  $\mu$ g) mGBP7 Protein. Nach der Reaktion wurden die Probe mit 1  $\mu$ L einer MALDI-Matrixlösung von  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure (HCCA) in 0,1 % TFA/Acetonitril 1:10 versehen und fixiert. Die Messung erfolgte an einem MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme des Center of Molecular and Structural Analytics (HHUCeMSA, HHU). Die Spektren wurden in einem linearen Messmodus innerhalb eines Massenbereichs von m/z 200 bis m/z 3500 aufgenommen. Die Datenauswertung erfolgte mittels flexAnalysis 3.0 Software.

### 3.3.12 Kristallographie

Für die Kristallisationsversuche von mGBP7 und der K51A-Mutante wurde hoch aufkonzentriertes Protein mit möglichst hoher Reinheit den Mitarbeitern vom Center for Structural Studies (CSS, Stefanie Kobus und Astrid Port, HHU, gefördert durch die deutsche Forschungsgesellschaft (DFG), DFG Grant Nummer 417919780) übergeben. Die Kristallisation erfolgte mittels der Dampfdiffusionsmethode *sitting drop* und die erhaltenen Kristalle wurden am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY, [219]) in Hamburg gemessen.

### 3.3.13 SAXS-Analysen

Für die SAXS (engl.: *small-angle X-ray scattering*, SAXS)-Analysen wurde hoch aufkonzentriertes Protein den Mitarbeitern vom CSS (Sander Smits und Jens Reiners, HHU, DFG Grant Nummer 417919780) übergeben. Die SAXS-Messungen erfolgten an der SAXS-Anlage Xeuss 2 in Grenoble (INST 208/761-1 FUGG) bzw. an der PETRA II Beamline P12 in Hamburg (DESY [219]). Die 3D-Volumenmodelle für mGBP7 und die mGBP7 K51A-Mutante wurden anhand der Streuungsdaten mit dem Programm GASBOR [220, 221] erstellt. Mit dem Programm SUPCOMB [221, 222] wurden die entsprechenden mGBP7-Homologiemodelle in die volumetrischen Hüllen modelliert.

### 3.3.14 Massenspektrometrie

Alle massenspektrometrischen Analysen der Ko-IP-Proben (Abschnitt 3.1.8) wurden im Molecular Proteomics Laboratory (MPL, HHU, Prof. Dr. Kai Stühler) von Gereon Poschmann durchgeführt.

Die durch einen tryptischen Verdau erhaltenen Peptide wurden zunächst mit Hilfe eines einstündigen Lösungsmittelgradienten auf einer nano-Flüssigkeitschromatographie-Anlage aufgetrennt (UltiMate 3000, Thermo Scientific, Idstein) [223]. Anschließend erfolgte eine Analyse mit einem direkt gekoppelten Q Exactive Plus Massenspektrometer (Thermo Scientific, Bremen) im Daten-abhängigen Modus. Hierbei wurden nach einer Vorläuferionen-Analyse die Ionen mit der höchsten Intensität durch den eingebauten Quadrupol isoliert, anschließend fragmentiert und dann entsprechende

Fragmentspektren aufgenommen. Die Identifizierung und Quantifizierung der aufgenommenen Massenspektren erfolgte mit MaxQuant [224].

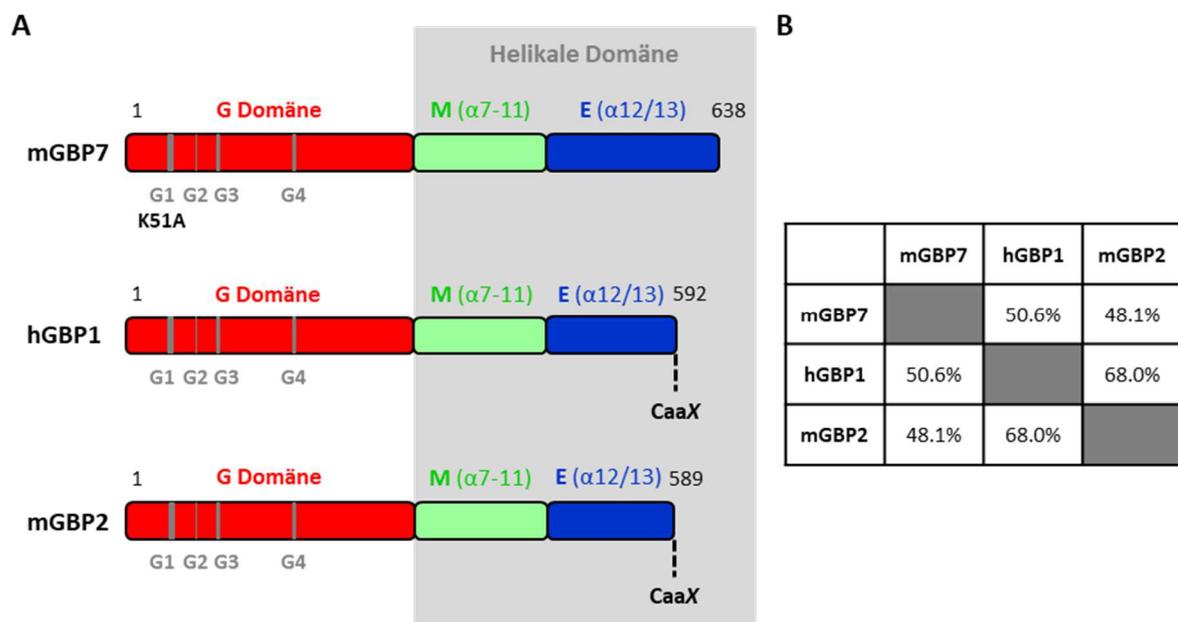
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Biochemische Charakterisierung von mGBP7

GBPs sind eine Familie von Interferon-induzierbaren GTPasen, die Schlüsselenzyme in der Wirtsabwehr gegen intrazelluläre Erreger darstellen [150, 151]. Bisher wurden bereits humanes GBP1 und GBP5 (hGBP1/5), sowie murines GBP2 (mGBP2) hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften im Detail analysiert [172, 176, 225]. Das erste Hauptziel dieser Arbeit war es, das murine GBP7 (mGBP7) biochemisch zu charakterisieren. Hierfür sollten insbesondere die GTPase-Aktivität, das Oligomerisierungsverhalten, sowie die Struktur von mGBP7 entschlüsselt werden.

#### 4.1.1 Expression und Aufreinigung von mGBP7

Das mGBP7 Protein wurde als His<sub>6</sub>-Fusionsprotein kloniert und in *E. coli* Rosetta™ 2(DE3)pLysS exprimiert. Neben mGBP7 mit Wildtyp (WT)-Sequenz wurde zudem eine mGBP7 Mutante (K51A) mit einer Punktmutation an Position 51 kloniert und exprimiert (vgl. Abb. 4.1). Unter anderem konnte für hGBP1 und mGBP2 gezeigt werden, dass der Austausch von der bei physiologischem pH positiv geladenen Aminosäure (AS) Lysin (K), zu der neutral geladenen AS Alanin (A), zu einem Verlust der GTPase-Aktivität führt [163, 172].



**Abb. 4.1: Strukturvergleich der GBP-Domänen von mGBP7, hGBP1 und mGBP2. (A)** Alle drei GBP Mitglieder verfügen über eine N-terminale, globuläre GTPase-Domäne (G-Domäne) und eine C-terminale, helikale Domäne, die in eine mittlere Region (M, α7-11) und eine GTPase Effektor-Region (E, α12/13) unterteilt werden kann. Die G-Domäne umfasst die Nukleotid-Bindemotive G1-G4 (grau, für Erklärung siehe Einleitung). Die untersuchte K51A-Mutation im G1-Motiv von mGBP7 ist markiert. Ein Vergleich der einzelnen GBP-Domänen gibt zu erkennen, dass die mGBP7 E-Region ca. 50 Aminosäuren (AS) mehr als die E-Region von hGBP1 und mGBP2 umfasst. Zudem fällt auf, dass mGBP7 kein C-terminales CaaX-Motiv als Isoprenylierungsstelle besitzt. **(B)** Übersicht über die AS-Sequenzidentität von mGBP7, hGBP1 und mGBP2 in Prozent (ClustalW Alignment).

Die höchste Proteinreinheit wurde durch eine Nickel-NTA-Agarose batch Aufreinigung in Kombination mit zwei aufeinanderfolgenden SEC-Läufen erreicht (Abb. 4.2). Die Reinheit der aufgereinigten Proteinfraktionen wurde mittels Größenauffrennung in einer SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung überprüft (nicht gezeigt). Reine, monomere Fraktionen wurden gepoolt und mittels Centricon, einem Zentrifugalkonzentrator mit einem 50 kDa Filtereinsatz, aufkonzentriert. Aufkonzentriertes, monomeres Protein wurde dann erneut im SDS-Gel mittels Coomassie-Färbung nachgewiesen (Abb. 4.3A). Die Detektion mit dem anti-mGBP7 [208, 226] und anti-His Antikörper dienten der eindeutigen Identifikation der mGBP7-Proteinbanden (Abb. 4.3B) und zeigten nur einen geringen Anteil an Proteindegradation.

Die Coomassie-Färbungen sowie die WB-Analysen zeigen, dass mGBP7 mittels Ni-NTA-Agarose und SEC-Aufreinigung für die folgenden Analysen in hoher Reinheit erhalten wurde.

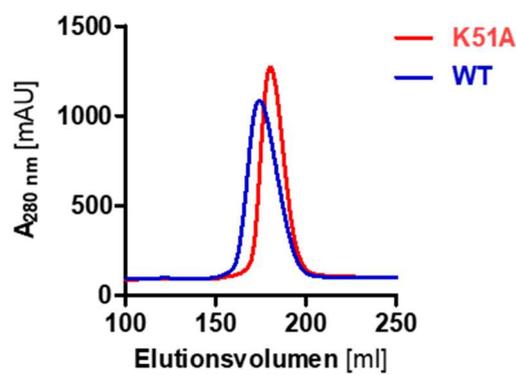


Abb. 4.2: Profile der Größenausschlusschromatographie von WT und K51A mGBP7. Die mGBP7 Proteine mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag wurden in Rosetta™ 2(DE3)pLysS exprimiert und wie in Abschnitt 3.3.6 beschrieben aufgereinigt.

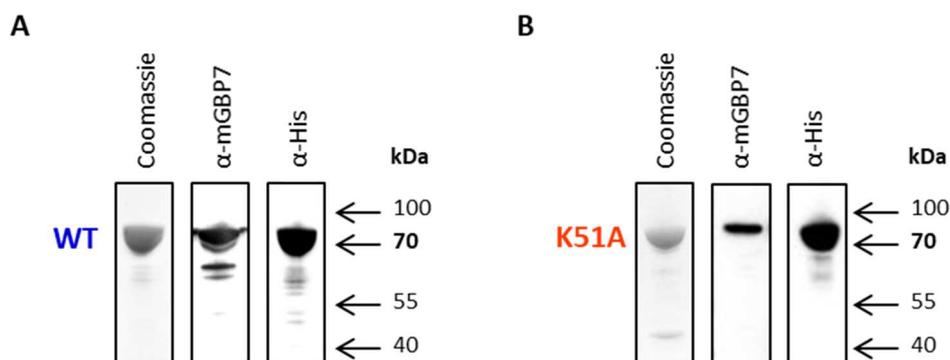


Abb. 4.3: Reinheit und Identifikation von WT und K51A mGBP7. 5 µg von aufgereinigtem WT (A) oder K51A (B) mGBP7 Protein wurden auf ein 4 – 12 %iges SDS-Gel aufgetragen und entweder mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt (linkes Panel) oder mittels Immunoblotting mit dem polyklonalen anti-mGBP7 Antikörper (mittleres Panel) oder dem monoklonalen anti-Tetra His Antikörper (rechtes Panel) detektiert.

#### 4.1.2 Analyse der GTPase-Aktivität von WT und K51A mGBP7

Die GTPase-Aktivität von WT mGBP7 und der K51A Mutante wurden mittels Malachitgrün Phosphatassay anhand der Detektion der freigesetzten Menge an Phosphat bestimmt. Bei dieser Analyse wurde nicht nur GTP, sondern auch GDP und GMP als Substrat getestet, da GBPs die besondere Eigenschaft besitzen, GTP nicht nur zu GDP, sondern auch weiter zu GMP umzusetzen (vgl. Abb. 4.6A) [171, 172, 227]. Wurde GMP als Substrat angeboten, konnte weder für das WT Protein noch für die K51A Mutante freigesetztes Phosphat gemessen werden (Abb. 4.4A, Tab. 4.1). Auch in der Gegenwart von GDP konnte für die K51A Mutante keine Phosphat-Freisetzung und auch für das WT mGBP7 nur eine minimale Hydrolyserate detektiert werden (Abb. 4.4B, Tab. 4.1). Wurde mGBP7 WT jedoch GTP als Substrat angeboten, konnte eine GTPase-Aktivität mit einer apparenten maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{\max, \text{app}}$ ) von  $265,2 \pm 4,7 \text{ nmol min}^{-1}$  pro mg Protein und eine apparente Wechselzahl ( $k_{\text{cat, app}}$ ) von  $19 \text{ min}^{-1}$  für das WT Protein bestimmt werden (Abb. 4.4C, Tab. 4.1, WT<sub>0.68</sub>). Die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  entspricht der Anzahl an Substratmolekülen, die pro Zeiteinheit von einem Enzym in das Reaktionsprodukt umgesetzt werden. Im Vergleich wurde für die K51A Mutante nur eine zu vernachlässigende  $v_{\max, \text{app}}$  von  $5,2 \pm 4,5 \text{ nmol min}^{-1}$  pro mg Protein und eine  $k_{\text{cat, app}}$  von  $1 \text{ min}^{-1}$  bestimmt (Abb. 4.4C, Tab. 4.1, K51A<sub>0.68</sub>). Die entsprechenden hyperbolischen Kurven für die spezifische Aktivität von mGBP7 deuteten zudem an, dass keine Kooperativität hinsichtlich der GTP-Bindung vorliegt (Abb. 4.4C). Um die kalkulierten Werte für  $v_{\max}$  und  $k_{\text{cat}}$  zu bestätigen, wurde in einer Messung die Konzentration an GTP konstant bei 2 mM gehalten und die mGBP7 Protein Konzentration variiert (Abb. 4.4D). Das Auftragen der Enzymaktivität gegen die mGBP7 Konzentration ergab hier eine sigmoidale Bindungskurve (Abb. 4.4D, oberhalb). Diese sigmoidale Kurve zeigt an, dass die Hydrolyse von GTP kooperativ ist und durch die Homodimerisierung des Proteins stimuliert wird. Durch die Auftragung der Proteinkonzentration gegen die apparenten Hydrolyseraten ( $\text{min}^{-1}$ ) konnte mit Hilfe einer quadratischen Gleichung [166], welche die Dimerisierung beschreibt, eine Dimerisierungskonstante von  $0,8 \mu\text{M}$  bestimmt werden (Abb. 4.4D, unterhalb). Diese Auftragung deutete zudem an, dass bei der zuvor verwendeten Proteinkonzentration von  $0,68 \mu\text{M}$  nur ca. 80 % der maximalen Proteinaktivität erreicht wurde. Im Folgenden wurde deshalb eine weitere Messung mit der optimalen Proteinkonzentration von  $0,83 \mu\text{M}$  Protein durchgeführt, bei der eine höhere Dimerisierungsrate zu erwarten war. Hier konnte eine  $v_{\max, \text{app}}$  von  $278,9 \pm 9,8 \text{ nmol min}^{-1}$  pro mg Protein und eine minimal höhere  $k_{\text{cat, app}}$ , die mit dem Ergebnis in 4.3D übereinstimmt, von  $20 \text{ min}^{-1}$  kalkuliert werden (Abb. 4.4C, Tab. 4.1, WT<sub>0.83</sub>). Dieses Ergebnis verdeutlicht nochmals, dass die GTP-Spaltung von mGBP7 kooperativ und von der Enzymkonzentration abhängig ist.

Zusammenfassend zeigen die GTPase-Messungen, dass mGBP7 eine hohe intrinsische GTPase-Aktivität ( $k_{\text{cat, app}} = 20 \text{ min}^{-1}$ ) besitzt und dass die AS Lysin an Position 51 für dessen Aktivität essentiell ist. Zudem verdeutlichen diese Ergebnisse, dass vor allem GTP, und nicht GDP oder GMP, als Substrat für die mGBP7-induzierte Hydrolysereaktion dient.

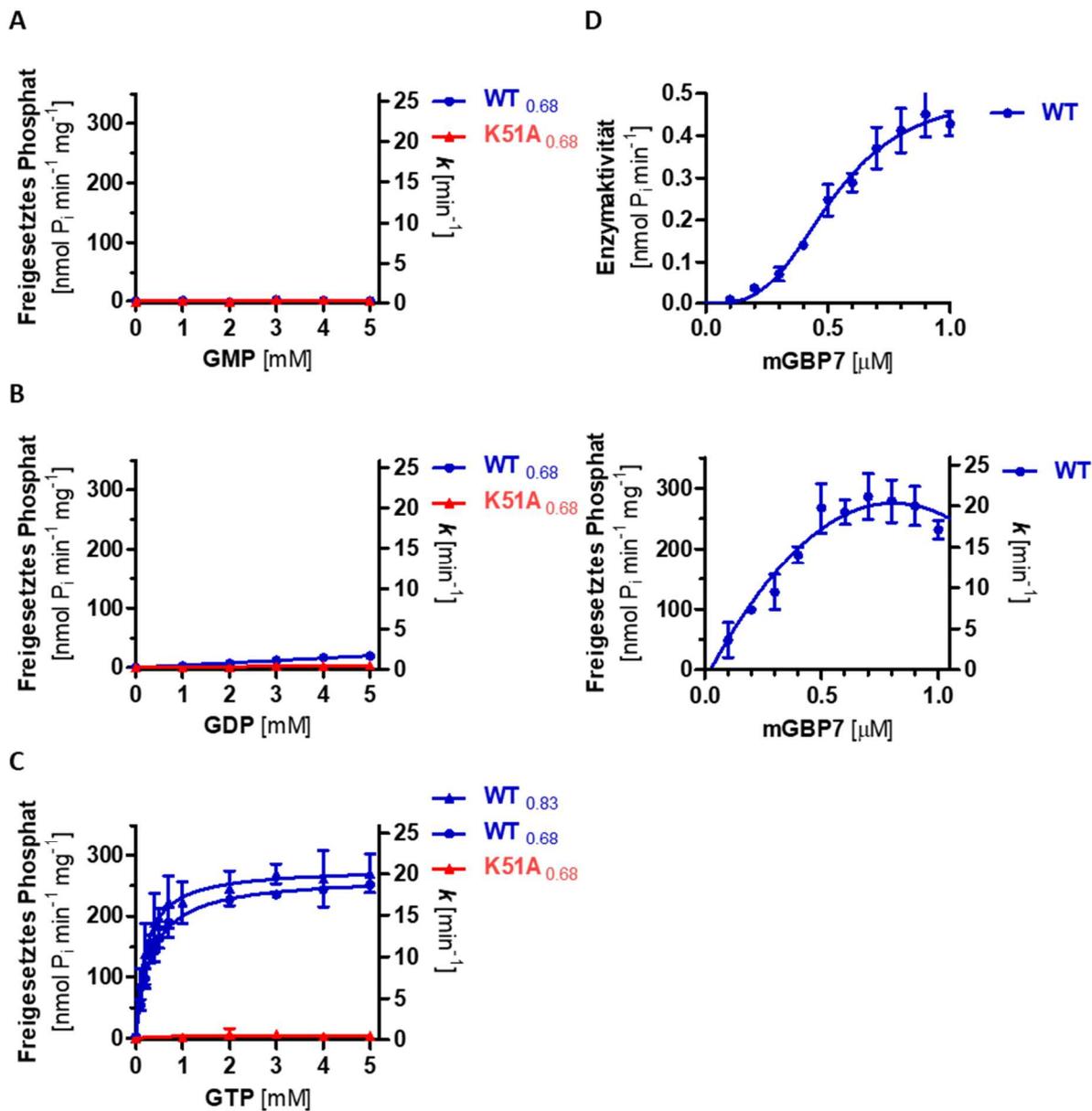


Abb. 4.4: GTPase-Aktivität von WT und K51A mGBP7. Die GTPase-Aktivität von WT mGBP7 (blau) und der K51A mGBP7 Mutante (rot) wurde in Abhängigkeit von der GMP (A), GDP (B) oder GTP (C und D) Konzentration gemessen. Die GTPase-Aktivität wurde in der Gegenwart von 0,68 μM Protein (A-C, WT<sub>0.68</sub> and K51A<sub>0.68</sub>) oder 0,83 μM Protein (C, WT<sub>0.83</sub>) bestimmt. In einem weiteren Assay wurde die GTP Konzentration konstant bei 2 mM gehalten und die Menge an mGBP7 Protein von 0 – 1 μM variiert (D). Die Daten in A-C wurden mit der Michaelis-Menten-Gleichung gefittet. Der Datensatz in D wurde mit einem allosterisch sigmoidalem Fit (Enzymaktivität) beziehungsweise einem quadratischen Fit ( $k$ , spezifische Aktivität) analysiert. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  S.D. von je drei unabhängigen Experimenten.

Tab. 4.1: Übersicht über die ermittelten, kinetischen Parameter der mGBP7 GTPase-Aktivität in der Gegenwart verschiedener Nukleotide. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  S.D. von je drei unabhängigen Experimenten.  $v_{\max, \text{app}}$ , apparente maximale Reaktionsgeschwindigkeit.  $K_{\text{m, app}}$ , apparente Michaelis-Menten-Konstante.  $k_{\text{cat, app}}$ , apparente Wechselzahl. ND, nicht detektiert.

	GTP			GDP			GMP		
	$v_{\max, \text{app}}$ <i>nmol min<sup>-1</sup></i> <i>mg<sup>-1</sup></i>	$K_{\text{m, app}}$ <i>μM GTP</i>	$k_{\text{cat, app}}$ <i>min<sup>-1</sup></i>	$v_{\max, \text{app}}$ <i>nmol min<sup>-1</sup></i> <i>mg<sup>-1</sup></i>	$K_{\text{m, app}}$ <i>μM GDP</i>	$k_{\text{cat, app}}$ <i>min<sup>-1</sup></i>	$v_{\max, \text{app}}$ <i>nmol min<sup>-1</sup></i> <i>mg<sup>-1</sup></i>	$K_{\text{m, app}}$ <i>μM GMP</i>	$k_{\text{cat, app}}$ <i>min<sup>-1</sup></i>
WT <sub>0.83</sub>	278,9 $\pm$ 9,8 <sup>a</sup>	207,0 $\pm$ 32,3 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-
WT <sub>0.68</sub>	265,2 $\pm$ 4,7 <sup>b</sup>	323,4 $\pm$ 21,7 <sup>b</sup>	19 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
WT	-	-	20 <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	-
K51A <sub>0.68</sub>	5,2 $\pm$ 4,5 <sup>b</sup>	ND	1 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND

<sup>a</sup> Die GTPase Aktivität wurde in der Gegenwart von 0,83  $\mu\text{M}$  (totale Menge an Protein: 6,2  $\mu\text{g}$ ) mGBP7 Protein gemessen (WT<sub>0.83</sub>, Fig. 4.4C).

<sup>b</sup> Die GTPase Aktivität wurde in der Gegenwart von 0,68  $\mu\text{M}$  (totale Menge an Protein: 5  $\mu\text{g}$ ) mGBP7 Protein gemessen (WT<sub>0.68</sub> und K51A<sub>0.68</sub>, Fig. 4.4A-C).

<sup>c</sup> Die GTPase Aktivität wurde in der Gegenwart von 2 mM GTP bestimmt (WT, Fig. 4.4D).

#### 4.1.3 GTP-Bindungsaffinität von WT und K51A mGBP7

Um mGBP7 besser zu dem zuvor studierten mGBP2 vergleichen zu können, wurde im Folgenden die GTP-Bindungsaffinität von WT und K51A mGBP7 mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Als Substrat diente in dieser Analyse das nicht hydrolysierbare GTP-Analogon GTP $\gamma$ S mit fluoreszierender mant-Gruppe. Interessanterweise wurde für WT mGBP7 eine  $K_{\text{D}}$  von 0,22  $\mu\text{M}$  bestimmt (Abb. 4.5). Mit derselben Methode war zuvor für WT mGBP2 eine ähnlich hohe Affinität zu mant-GTP $\gamma$ S mit einer  $K_{\text{D}}$  von 0,45  $\mu\text{M}$  bestimmt worden [172]. Das mGBP7 WT Protein besitzt demnach eine zweifach höhere GTP-Bindungsaffinität als WT mGBP2 und liegt, der niedrigen  $K_{\text{D}}$  nach zu urteilen, unter physiologischen Bedingungen eher GTP-gebunden als Nukleotid-frei vor [172]. Für die K51A mGBP7 Mutante konnte dagegen nahezu keine Bindung in der Gegenwart von mant-GTP $\gamma$ S detektiert werden (Abb. 4.5). Für die K51A Mutante von mGBP2 war zuvor eine wesentlich schwächere Bindung an mant-GTP $\gamma$ S, mit einer  $K_{\text{D}}$  von 44,1  $\mu\text{M}$ , beschrieben worden [172].

Insgesamt zeigen die Resultate an, dass mGBP7 eine ähnlich hohe GTP-Bindungsaffinität wie mGBP2 besitzt und, dass die K51A Mutation die GTP-Bindung stark beeinträchtigt. Dies bedeutet, dass das Lysin 51 für die GTP-Bindung notwendig ist.

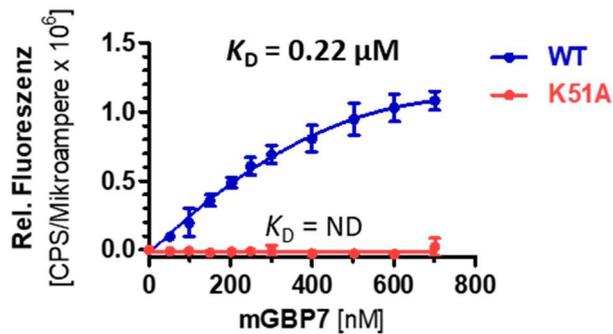
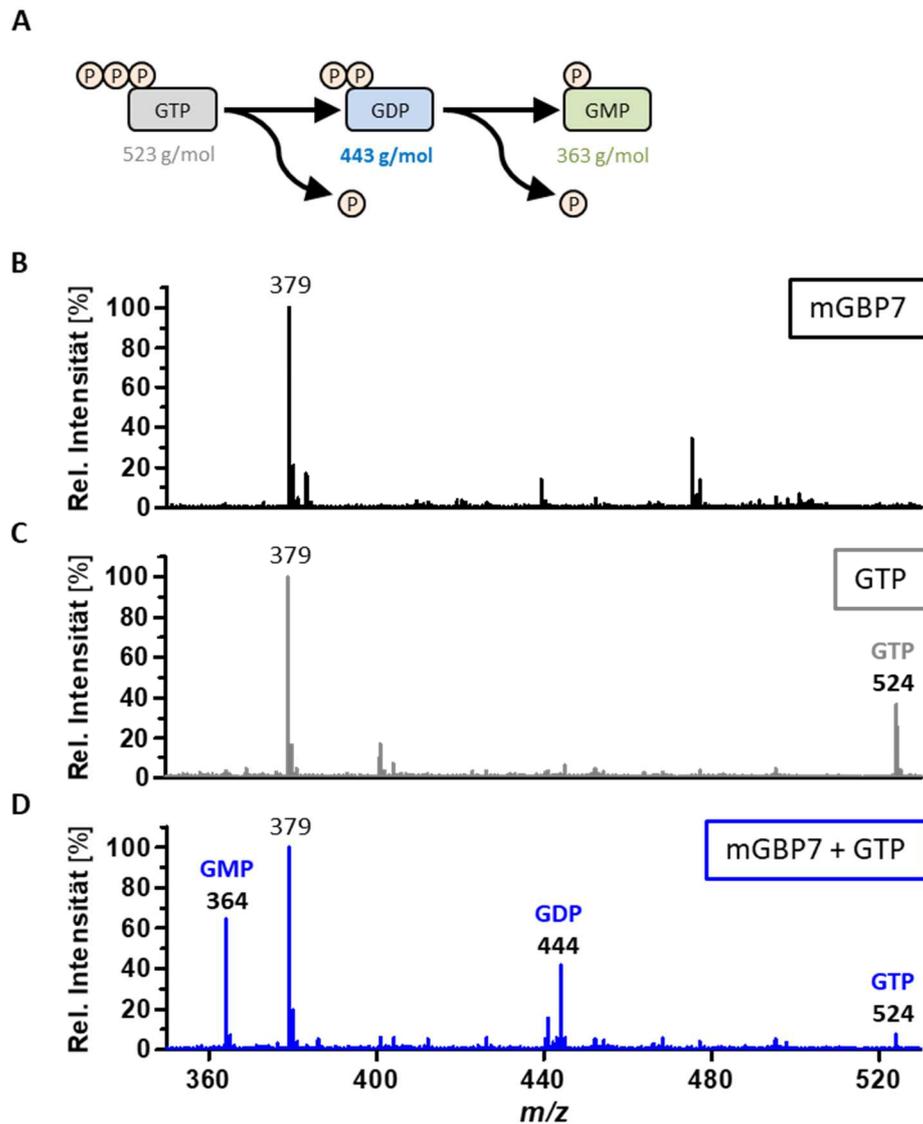


Abb. 4.5: GTP-Bindungsaffinität von WT und K51A mGBP7. WT oder K51A mGBP7 Protein wurde zu Gelfiltrationspuffer, der 0,5  $\mu\text{M}$  mant-GTP $\gamma\text{S}$  enthielt, titriert. Die Fluoreszenz wurde bei 355 nm angeregt und die Emission bei 448 nm gemessen. Die erhaltenen Daten wurden, wie in Abschnitt 3.3.10 beschrieben, mit einer quadratischen Gleichung gefittet. Die Ergebnisse stellen jeweils Mittelwerte  $\pm$  S.D. von je drei unabhängigen Messungen dar.  $K_D$ , Dissoziationskonstante. CPS, *counts per second*.

#### 4.1.4 mGBP7 hydrolysiert GTP zu GDP und GMP

In einer vorausgegangenen Studie konnte bereits gezeigt werden, dass für mGBP2, ähnlich wie für hGBP1, GMP das Hauptprodukt der GBP-vermittelten GTP-Hydrolyse darstellt [172]. In dieser Arbeit wurden die Produkte der mGBP7-spezifischen Hydrolyse mittels MALDI-TOF-MS ermittelt. Die erhaltenen Spektren zeigen, dass ebenfalls für das mGBP7 Protein, neben dem GDP, das GMP ein Hauptprodukt der GTP-Hydrolyse-reaktion repräsentiert (Abb. 4.6D). Zur Kontrolle und mit dem Wissen, dass mGBP7 eine hohe Affinität für mant-GTP $\gamma\text{S}$  besitzt, wurde eine Messung ohne zusätzlich hinzugefügtes GTP vorgenommen. Mit dieser Kontrolle konnte gezeigt werden, dass das aufgereinigte mGBP7 Protein bei den Messungen Nukleotid-frei vorlag (Abb. 4.6B).

Insgesamt zeigen die MALDI-TOF-MS Ergebnisse, dass mGBP7 GTP nicht nur zu GDP, sondern auch weiter zu GMP hydrolysiert und dass bei der Aufreinigung keine Nukleotide mitgeführt wurden.

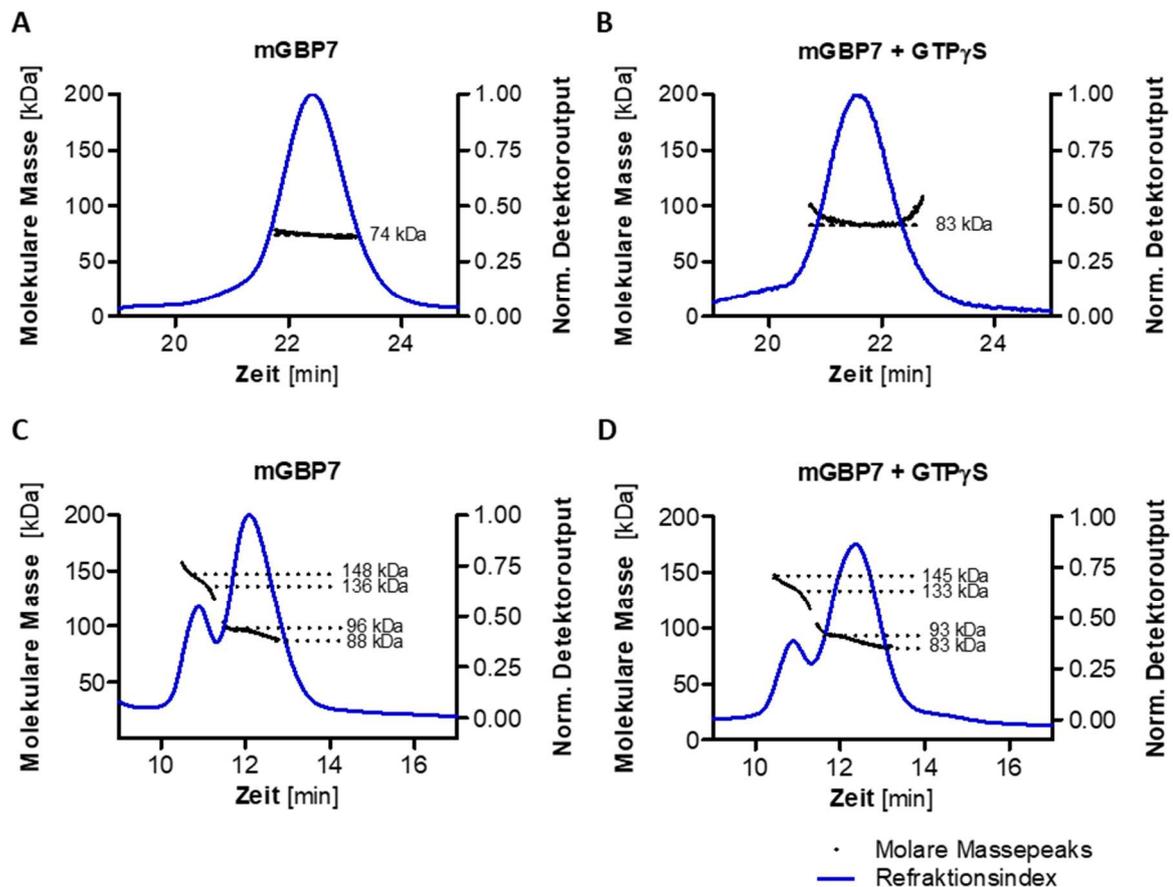


**Abb. 4.6:** Identifikation von Reaktionsprodukten der mGBP7-vermittelten GTP-Hydrolyse. (A) Schematische Darstellung der GTP-Hydrolyse von GTP über GDP zu GMP. Die Reaktionsprodukte der GTPase-Aktivitätsmessungen wurden mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Das Massenspektrum einer Kontrollprobe mit mGBP7, der kein GTP zugefügt wurde (B), eine Kontrollprobe mit zugefügtem GTP ohne Protein (C) und das Massenspektrum einer Probe, der mGBP7 und GTP zugefügt wurde (D), sind abgebildet. Die jeweils zu den einfach positiv geladenen Ionen  $[M+H]^+$  von GMP, GDP und GTP korrespondierenden Peaks sind entsprechend gekennzeichnet (B-D). Der Peak bei  $379\ m/z$  in den Spektren wurde auf Grund der gewählten HCCA ( $189\ \text{g/mol}$ ;  $[2M+H]^+$ ) MALDI-Matrixlösung detektiert.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis.

#### 4.1.5 mGBP7 bildet einen transienten Dimer

Für die bisher biochemisch untersuchten GBPs konnte gezeigt werden, dass sie bei der Bindung von GTP dimerisieren [172, 193]. Unter anderem für mGBP2 war in Gelfiltrationsstudien demonstriert worden, dass es als Dimer in der Gegenwart von GTP $\gamma$ S von der Säule eluiert [172]. Zudem wurde postuliert, dass mGBP2 in der Gegenwart von GDP und AlF<sub>x</sub> zu Tetrameren assembliert [172]. Um herauszufinden, ob auch mGBP7 Dimere oder sogar Tetramere bildet, wurde die Oligomerisierung von mGBP7 mittels SEC und anschließender Mehrwinkel-Lichtstreuung (MALS) untersucht. Die MALS-Messung ermöglicht die Bestimmung des Molekulargewichts von Molekülen anhand ihrer Lichtstreuung und unabhängig vom hydrodynamischen Radius der eluierenden Spezies [228]. Mit dieser Methode konnten bei einer Konzentration von 3,5 mg/mL mGBP7 Protein in der Abwesenheit von Nukleotiden ein durchschnittliches Molekulargewicht von 74 kDa und nach der Vorinkubation mit 5 mM GTP $\gamma$ S ein mittleres Molekulargewicht von 83 kDa bestimmt werden (Abb. 4.7A-B). Diese molaren Massen stimmen mit der monomeren Form des 73,9 kDa großen His<sub>6</sub>-mGBP7 Proteins überein. Bei einer Konzentration von 12 mg/mL Protein konnten hingegen zwei molekulare Spezies von 93,6 und 142,2 kDa in der Abwesenheit von Nukleotiden detektiert werden (Abb. 4.7C). Und auch nach Vorinkubation mit GTP $\gamma$ S wurden bei 12 mg/mL Protein zwei molekulare Spezies von 89,9 und 135,1 kDa bestimmt (Abb. 4.7D). Bei den Messungen mit einer Proteinkonzentration von 12 mg/mL muss berücksichtigt werden, dass die zwei detektierten Peaks jeweils zu nah aneinander liegen, um eine eindeutige Bestimmung der Molekulargewichte zu ermöglichen (Abb. 4.7C-D). Durch die Nähe der beiden Peaks werden dem höheren Oligomer bei der Messung Anteile des Monomers zugeschrieben und umgekehrt. Dies verschiebt die berechnete molekulare Masse des mGBP7 Dimers zu einem geringeren apparenten Molekulargewicht und die des mGBP7 Monomers zu einem höheren apparenten Molekulargewicht. Die Auswirkungen auf das Monomer sind dabei höher, da größere Partikel mehr Licht streuen. Wenn also folglich nur die oberen Grenzwerte von 148 und 145 kDa für den Dimer und die unteren Grenzwerte von 88 und 83 kDa für das Monomer berücksichtigt werden (vgl. Abb. 4.7C-D), passen die kalkulierten Werte gut zu den zu erwartenden Molekularmassen eines mGBP7 Dimers und Monomers. Diese Daten zeigen, dass die mGBP7 Dimerisierung eher von der Proteinkonzentration, als von der Anwesenheit von Nukleotiden beeinflusst wird. Allerdings muss auch berücksichtigt werden, dass das GTP $\gamma$ S und das mGBP7 Protein während der Gelfiltration separiert werden könnten und dies der Grund für die fehlende Ausbildung einer größeren Dimerfraktion ist. Um weiterhin auszuschließen zu können, dass sich die mGBP7 Dimere bei hohen Proteinkonzentrationen aufgrund von nicht physiologischen Disulfidbrücken bilden, wurden SDS-PAGE-Analysen der untersuchten Proteinfractionen mit und ohne Reduktionsmittel durchgeführt. Sowohl mit als auch ohne das Reduktionsmittel  $\beta$ -Mercaptoethanol konnte bei dieser Analyse nur monomeres WT und K51A mGBP7 detektiert werden (Abb. S1), weshalb ausgeschlossen werden konnte, dass die mGBP7 Dimere auf Grund unspezifischer Disulfidbrückenbildung erhalten wurden.

Schlussfolgernd kann festgehalten werden, dass mGBP7 in einer monomeren und einer dimeren Form existiert und dass die Zugabe von GTP $\gamma$ S keinen Effekt auf das Monomer-Dimer-Gleichgewicht hat.



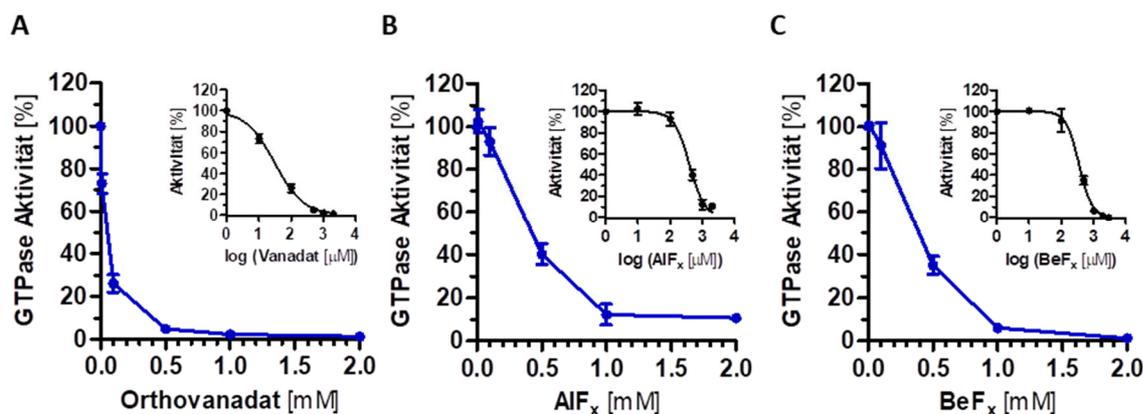
**Abb. 4.7: SEC-MALS: Konzentrationsabhängige Dimerisierung von mGBP7.** Die Chromatogramme von WT mGBP7 zeigen den differentiellen Refraktionsindex (blau) und die berechneten Massepeaks (schwarz). Die SEC-MALS-Analysen wurden in der Abwesenheit von Nukleotiden (**A** und **C**) oder nach der Vorinkubation mit 5 mM GTP $\gamma$ S (**B** und **D**) durchgeführt. Bei Proteinkonzentrationen von 3,5 mg/mL Protein (**A** und **B**) wurde im Durchschnitt eine Molarmasse von  $74 \pm 2$  kDa (**A**) und  $83 \pm 1$  kDa (**B**) bestimmt. Die SEC-MALS-Elutionsprofile bei 12 mg/mL Protein zeigten hingegen zwei molekulare Spezies. Kalkulierte molare Massen in Abwesenheit von Nukleotiden (**C**):  $142,2 \pm 6,9$  kDa,  $93,6 \pm 3,0$  kDa. Berechnete Molekulargewichte in der Gegenwart von GTP $\gamma$ S (**D**):  $89,8 \pm 3,0$  kDa,  $135,1 \pm 6,0$  kDa. Inklusive des His<sub>6</sub>-Tags hat das monomere mGBP7 Protein eine theoretische Masse von 73,9 kDa. SEC, Größenausschlusschromatografie (engl.: *size-exclusion chromatography*). MALS, Mehrwinkel-Lichtstreuung (engl.: *multi-angle light scattering*).

#### 4.1.6 Inhibierung der mGBP7 GTPase-Aktivität durch GTP-Analoga

Als nächster Schritt wurde die Inhibierung der mGBP7-spezifischen Hydrolyse durch GTP-Analoga untersucht. Um die terminale Phosphatgruppe ( $\gamma$ -Phosphat) von GTP im Übergangszustand der Hydrolysereaktion zu imitieren, wurden der Probe neben GTP zusätzlich Orthovanadat oder AlF<sub>x</sub> zugesetzt. Um das  $\gamma$ -Phosphat in seinem gebundenen Grundzustand zu imitieren, wurde neben GTP zusätzlich Berylliumfluorid (BeF<sub>x</sub>) hinzugefügt. Die GTPase-Aktivität wurde bei dieser Analyse folglich durch die Bindung von Orthovanadat, AlF<sub>x</sub> oder BeF<sub>x</sub> an der Position des  $\gamma$ -Phosphats nach dem ersten GTP-Hydrolyseschritt inhibiert. Um sicherzustellen, dass GDP in diesem Fall nicht den limitierenden Faktor für die Bildung der GDP-konjugierten Inhibitorkomplexe darstellt, wurden die Experimente zum Vergleich auch in Gegenwart von 2 mM GDP und 2 mM GTP durchgeführt (Abb. S2). Interessanterweise waren unter beiden Bedingungen ähnliche Konzentrationen von bis zu 2 mM der

$\gamma$ -Phosphatanaloga vonnöten, um eine starke (90 %) oder nahezu vollständige Inhibierung der mGBP7-medierten GTP-Hydrolyse zu erhalten (Abb. 4.8). Des Weiteren wurden die mittleren inhibitorischen Konzentrationen aller drei Inhibitoren bestimmt (Tab. 4.2). Für Orthovanadat wurde mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 31  $\mu$ M der niedrigste  $IC_{50}$  der getesteten Inhibitoren berechnet. Der  $IC_{50}$ -Wert für  $AlF_x$  lag bei 405/390  $\mu$ M und damit ca. 13-fach höher als der  $IC_{50}$  für Orthovanadat. Für  $BeF_x$  lag der  $IC_{50}$ -Wert ungefähr in dem Bereich des  $IC_{50}$  für  $AlF_x$ , und war mit 355/279  $\mu$ M ca. 10-fach höher als der  $IC_{50}$  für Orthovanadat. Anschließend wurde analysiert, ob die Phosphatanaloga das mGBP7 Protein in seiner dimeren Form stabilisieren können. Hierzu wurden GTPase-Messungen in der Gegenwart von GTP sowie GTP $\gamma$ S/ $AlF_x$ / $BeF_x$  durchgeführt und die Proben mittels nativer Gelelektrophorese analysiert (Abb. 4.9). Unter allen Bedingungen konnten für WT mGBP7 Monomere und Dimere im Gel erhalten werden (Abb. 4.9A). In der Abwesenheit von Nukleotiden wurde ca. 8 % WT mGBP7 Dimer gemessen. In Gegenwart der nicht hydrolysierbaren GTP-Analoga konnte nur eine geringe Erhöhung zu ca. 12 % Dimerbildung ermittelt werden. Ein vergleichbares Monomer-Dimer-Verhältnis wurde interessanterweise auch für die K51A Mutante bestimmt (Abb. 4.9B).

Insgesamt unterstützen diese Ergebnisse die SEC-MALS-Daten und zeigen erneut, dass die mGBP7 Dimerisierungsrate nicht durch die Anwesenheit von Nukleotiden beeinflussbar ist.



**Abb. 4.8: Inhibierung von mGBP7 durch  $\gamma$ -Phosphatanaloga.** Die GTPase-Aktivität von WT mGBP7 wurde in der Gegenwart von 0,01, 0,1, 0,5, 1,0 und 2,0 mM Orthovanadat (A),  $AlF_x$  (B) oder  $BeF_x$  (C) gemessen. Zudem waren je 2 mM GTP und 0,68  $\mu$ M (totale Menge an Protein: 5  $\mu$ g) mGBP7 WT Protein in den Proben enthalten. Die Daten wurden entsprechend der zweiten Gleichung in Abschnitt 3.3.7 gefittet. Zusätzlich wurden die Dosis-Wirkungs-Kurven (schwarz) zur Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte abgebildet. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  S.D. von je drei unabhängigen Experimenten.  $IC_{50}$ , mittlere inhibitorische Konzentration.

Tab. 4.2: Übersicht über die berechneten  $IC_{50}$ -Werte für die verschiedenen  $\gamma$ -Phosphatanaloga. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  S.D. von je drei unabhängigen Experimenten.  $IC_{50}$ , mittlere inhibitorische Konzentration.

$\gamma$ -Phosphatanalog	2 mM GTP	2 mM GTP + 4 mM GDP
Orthovanadat	$31 \pm 2^a$	$31 \pm 6^b$
$AlF_x$	$405 \pm 61^a$	$390 \pm 48^b$
$BeF_x$	$355 \pm 53^a$	$279 \pm 71^b$

<sup>a</sup>Die GTPase-Aktivität wurde in der Gegenwart von 2 mM GTP und 0,68  $\mu$ M (totale Menge an Protein: 5  $\mu$ g) mGBP7 Protein gemessen (s. Abb. 4.8).

<sup>b</sup>Die GTPase-Aktivität wurde in der Gegenwart von 2 mM GTP, 4 mM GDP und 2,5  $\mu$ M (totale Menge an Protein: 18,5  $\mu$ g) mGBP7 Protein gemessen (s. Abb. S2).

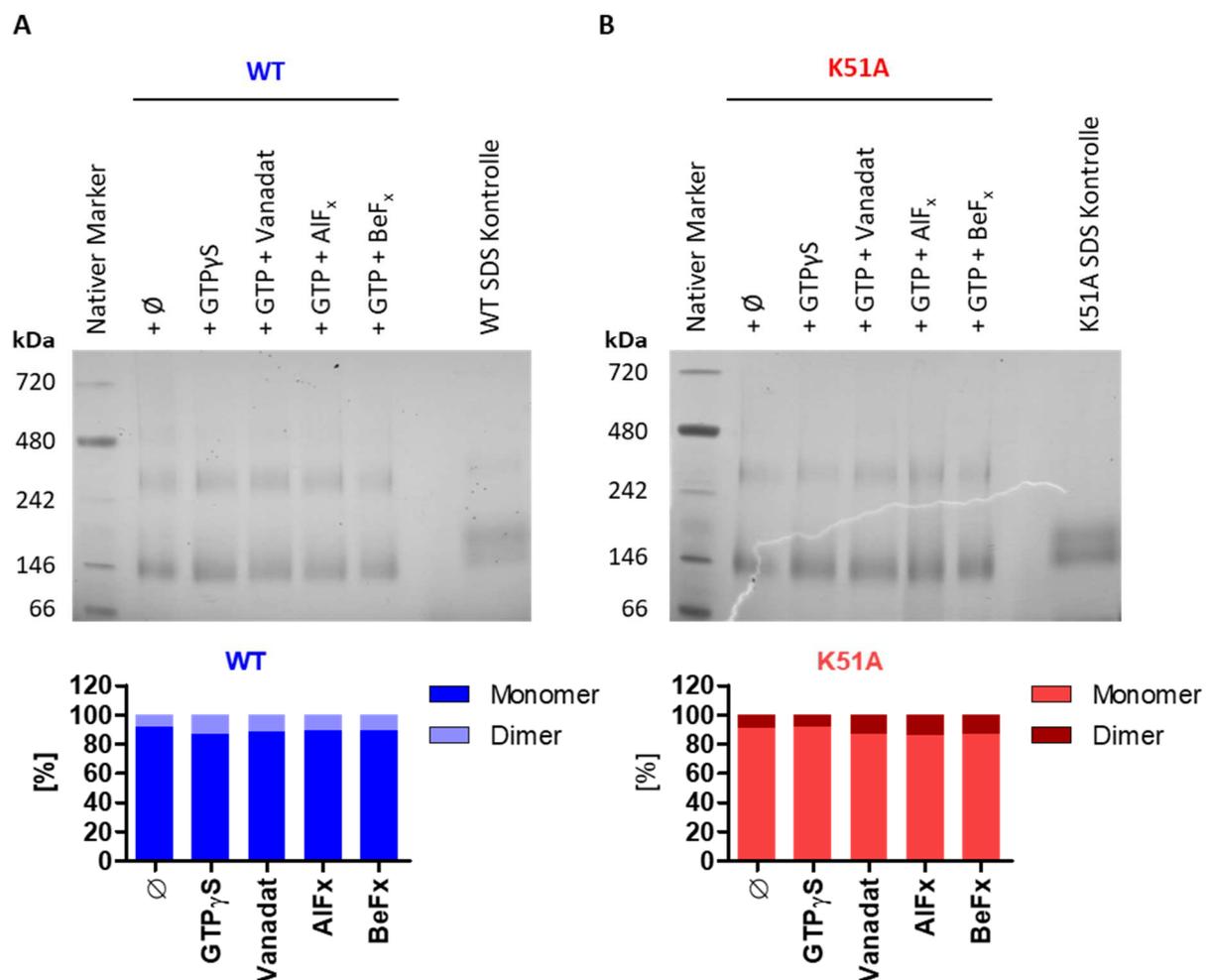
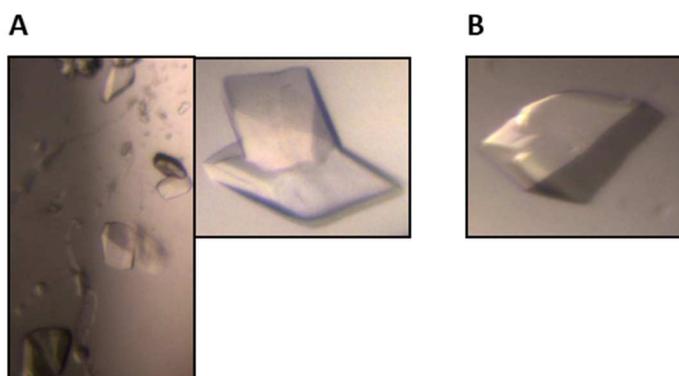


Abb. 4.9: Native Gelelektrophorese mit WT und K51A mGBP7. 1,2  $\mu$ M (totale Menge an Protein: 2  $\mu$ g) aufgereinigtes WT mGBP7 oder K51A Mutante wurden in Gelfiltrationspuffer mit 2 mM GTP $\gamma$ S oder GTP in Kombination mit Orthovanadat oder  $AlF_x$  oder  $BeF_x$  versetzt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die WT (A) oder K51A (B) mGBP7 Proben wurden mittels nativer Gelelektrophorese in einem 4 – 12 %igem Bis-Tris-Gel aufgetrennt. Die molekularen Massen des nativen Markers sind an der Seite des Gels angegeben. Zur Kontrolle der Laufhöhe des mGBP7 Monomers wurde je eine mGBP7 WT oder K51A SDS Kontrollprobe mitgeführt (rechte Spuren). Unterhalb der Gele sind die densitometrischen Analysen, die mit Fiji Software [217] durchgeführt wurden, gezeigt.

#### 4.1.7 Initiale Kristallisationsversuche von mGBP7

Die einzige, bisher bekannte GBP-Kristallstruktur ist die von hGBP1 [166]. In dieser Arbeit daher versucht, mittels Kristallisation die dreidimensionale Struktur von mGBP7 zu lösen. Hierzu wurde das WT Protein und die K51A Mutante wie in Abschnitt 3.3.6 beschrieben exprimiert und aufgereinigt. Große Mengen des rekombinanten Proteins mit möglichst hoher Reinheit wurden dann den Mitarbeitern vom CSS der HHU (Abschnitt 3.3.12) übergeben. Die Kristallisation des frisch aufgereinigten Proteins erfolgte dort mittels der *sitting drop*-Dampfdiffusionsmethode. Nach einigen Optimierungsversuchen konnten für die K51A mGBP7 Mutante die optisch qualitativ besten Kristalle (Abb. 4.10) erhalten werden. Bei der Messung am Synchrotron wurden für diese allerdings nur Auflösungen von ca. 10 – 15 Å erreicht.

Insgesamt war die Kristallzüchtung für die K51A Mutante von mGBP7 erfolgreicher als die von WT mGBP7. Um einen Kristall mit einer ausreichend hohen Auflösung von 1 – 3 Å zu erhalten, müssen in künftigen Studien die Aufreinigungs- sowie die Kristallisationsbedingungen noch weiter optimiert werden.

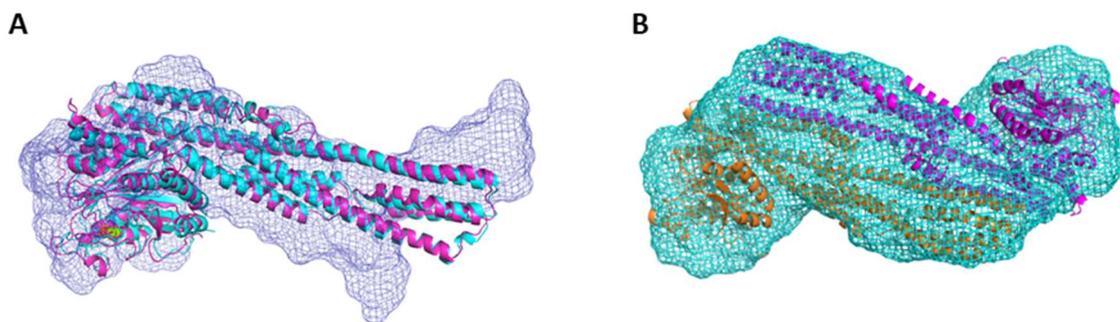


**Abb. 4.10: Proteinkristalle von K51A mGBP7.** Zur Kristallisation über die Dampfphase wurde die *sitting drop*-Methode verwendet. Verwendete Bedingungen für die Kristallisation von K51A mGBP7: **(A)** Core IV, C7 (0,1 M Imidazol, pH 7,5, 10 % PEG 8000); **(B)** Core IV, C7 (0,1 M Imidazol, pH 8,0, 10 % PEG 8000). Für den Kristall in **(B)** wurde eine Auflösung von ca. 10 – 15 Å am DESY [219] in Hamburg gemessen. Alle Kristallisationsansätze wurden von Stefanie Kobus (CSS, HHU) durchgeführt.

#### 4.1.8 Strukturaufklärung von mGBP7 mittels SAXS

Da die Kristallisation von mGBP7 trotz einigen Optimierungsversuchen nicht erfolgreich war, wurden im Folgenden SAXS/Kleinwinkelröntgenstreuungsexperimente durchgeführt. Mittels SAXS-Analyse können sowohl die Form als auch die Oligomerisierung von nativen Proteinen in Lösung mit niedriger Auflösung ( $>15 \text{ \AA}$ ) bestimmt werden. Hierfür wurde das WT mGBP7 Protein und die K51A Mutante wie in Abschnitt 3.3.6 exprimiert und aufgereinigt. Hoch aufkonzentriertes Protein wurde dann den Mitarbeitern des CSS übergeben und an der SAXS-Anlage (Xeuss 2, Grenoble, INST 208/761-1 FUGG) bzw. an der Beamline P12 (PETRA III, DESY Hamburg [219]) gemessen. Für K51A mGBP7 wurde anhand der Streuungsdaten mit dem Programm GASBOR [220, 221] ein 3D-Volumenmodell für ein Monomer (Abb. 4.11A) und für WT mGBP7 ein 3D-Volumenmodell für ein Dimer (Abb. 4.11B) erstellt. Mit dem Programm SUPCOMB [221, 222] wurden die entsprechenden mGBP7 Homologiemodelle in die volumetrischen Hüllen modelliert. Für die K51A Mutante zeigte sich in diesem Vergleich, dass die Strukturen insgesamt sehr ähnlich zueinander sind, allein die M- und E-Region sind im berechneten SAXS-Modell weiter aufgespannt (Abb. 4.11A). Diese Öffnung zwischen M- und der E-Region ist beim WT SAXS-Modell nicht zu erkennen. Für WT mGBP7 konnte ein Proteindimer, dass durch Dimerisierung der E-Domänen entsteht, bestimmt werden (Abb. 4.11B).

Die Übereinstimmung von Homologie- und SAXS-Modell für WT mGBP7 bestätigt, dass mGBP7 ein transientes Dimer bilden kann.



**Abb. 4.11: Kleinwinkelröntgenstreuungsanalysen von mGBP7.** (A) SAXS-Analyse der aufgereinigten mGBP7 K51A Mutante. Die volumetrische Hülle des Proteins wurde anhand der Streuungsdaten mit GASBOR [220, 221] berechnet. Das vorhergesagte Homologiemodell für K51A mGBP7 wurde mit Hilfe des Programms SUPCOMB [221, 222] in die volumetrische Hülle positioniert. (B) SAXS-Analyse von WT mGBP7. Die volumetrische Hülle des gemessenen Proteindimers wurde mit GASBOR [220, 221] berechnet. Das generierte Homologiemodell für das WT mGBP7 Dimer wurde mit dem Programm SUPCOMB [221, 222] in die volumetrische Hülle gesetzt. Alle SAXS-Messungen und -Analysen wurden von Jens Reiners und Sander Smits (CSS, HHU) durchgeführt.

## 4.2 Interaktionspartner von mGBP7

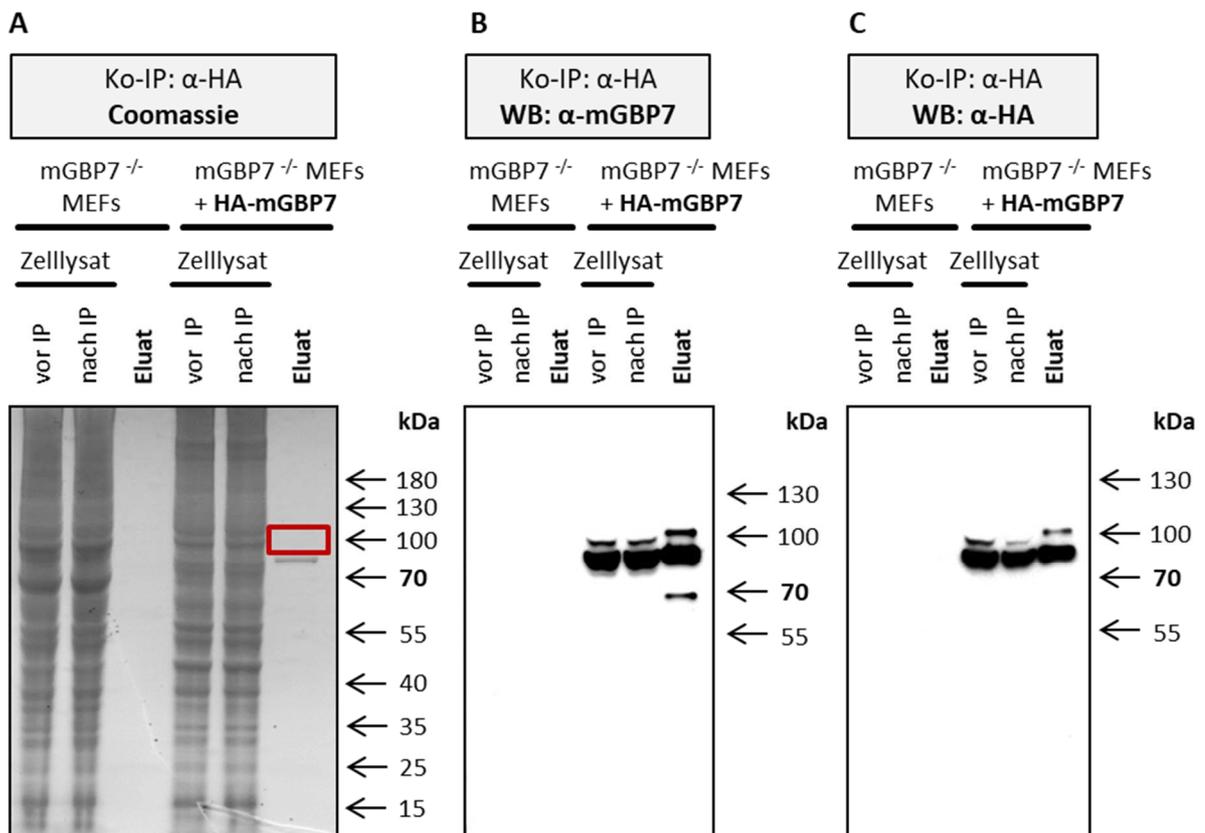
Neben der biochemischen Charakterisierung von mGBP7 war das zweite Hauptziel dieser Arbeit Interaktionspartner dieser GTPase zu identifizieren. Einerseits war es das Ziel, Interaktionspartner von mGBP7 in bzw. an VLS (vgl. 4.1.8) zu ermitteln. Andererseits sollten Interaktionspartner, welche bei der Relokalisation von mGBP7 zur *T. gondii* PV (vgl. 4.1.8) und/oder der Disruption der PV eine Rolle spielen könnten, identifiziert werden.

### 4.2.1 Ubiquitinierung von mGBP7

Für die Identifikation von Interaktionspartnern von mGBP7 wurde zunächst ein lentivirales HA-mGBP7 Konstrukt kloniert und dann mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs stabil mit diesem Konstrukt mit N-terminalem HA-Tag transduziert (Abb. S3). Anschließend wurden Ko-IP-Experimente durchgeführt bei denen das heterolog exprimierte HA-mGBP7 und die möglichen Interaktionspartner mittels eines anti-HA Antikörpers an Agarose gekoppelt wurden. Nach Waschschrritten zur Entfernung unspezifischer Interaktionspartner wurden als letzter Schritt der Ko-IP die gebundenen Proteine, also das mGBP7 und die wechselwirkenden Interaktionspartner, mit Auftragspuffer eluiert. Als Negativkontrolle für die Ko-IPs wurden mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen, die kein mGBP7 exprimieren, verwendet. Bei der Analyse der Ko-IP-Proben mittels anti-HA- und anti-mGBP7-WB (Abb. 4.12B und 4.12C) konnten zwei mGBP7 Spezies mit unterschiedlicher Molekülmasse detektiert werden. Um aufzuschlüsseln, inwiefern PTMs der GTPase eine Rolle für die veränderte Laufhöhe des Proteins bei einem höheren Molekulargewicht (MW) spielen könnten, wurde die markierte Region oberhalb der angenommenen mGBP7 Hauptbande (Abb. 4.12A) ausgeschnitten und massenspektrometrisch im MPL (HHU, Gereon Poschmann) analysiert. Wie aus Tabelle 4.3 abzulesen ist, konnten bei dieser Messung ungefähr gleiche Mengen an Ubiquitin wie mGBP7 Protein (Intensität/MW) in den Proben nachgewiesen werden. Ubiquitin ist ein in Eukaryoten ubiquitär vorkommendes 8,6 kDa Protein, welches durch Ligasen an andere Proteine gekoppelt werden kann. Durch diesen Prozess des Anheftens eines oder auch mehrerer Ubiquitinmoleküle, welcher als Ubiquitinierung bezeichnet wird, können die Eigenschaften eines Proteins verändert werden [210, 211]. Um zu überprüfen, ob mGBP7 ubiquitiniert wird, wurden im Folgenden weitere Ko-IP-Experimente durchgeführt und die Eluate nach Auftrennung mittels SDS-PAGE mit einem anti-mGBP7 und verschiedenen anti-Ubiquitin Antikörpern analysiert (Abb. 4.13). Neben den uninfizierten Zellen wurden in diesem Rahmen auch die Zelllysate von *T. gondii*-infizierten Zellen untersucht, um zu ermitteln, ob sich durch ein Infektionsevent der Ubiquitinierungsstatus von mGBP7 verändert. Bei diesen WB-Analysen konnten nicht nur zwei, sondern gleich mehrere, verschieden große mGBP7 Spezies detektiert werden (Abb. 4.13A). Dabei spielte es keine Rolle, ob die Zellen mit *T. gondii* infiziert worden waren oder nicht. Um zu analysieren, ob und mit welchen Ubiquitinketten mGBP7 modifiziert wird, wurden die Laufhöhen der mGBP7 Proteinspezies mit denen der Ubiquitin-Banden verglichen (Abb. 4.13B-E). Wie die eingezeichneten Pfeile andeuten, wurden auf der Laufhöhe von mGBP7 unter anderem Ubiquitin, welches über seine Lysinreste 27 (K27, Abb. 4.13C) und 48 (K48, Abb. 4.13D) verknüpft ist, detektiert. Über Lysin 63- (K63-) verknüpfte Ubiquitinketten an mGBP7 konnten eher ausgeschlossen werden (Abb. 4.13E). Die detektierten Banden erschienen hier nicht direkt auf Laufhöhe mit mGBP7 und waren auch teilweise in den Proben der nicht mit HA-mGBP7

rekonstituierten mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen zu erkennen. Nach den WB-Ergebnissen wäre dafür eine Modifikation von mGBP7 mit über Lysin 29-verknüpften Ubiquitinketten möglich (Abb. 4.13B). Aussagen darüber, ob sich die Ubiquitinierung von mGBP7 im Falle einer Infektion mit *T. gondii* verändert, konnten anhand dieser Ergebnisse nicht mit Sicherheit gemacht werden. Der Bandenintensität nach zu urteilen scheint das mGBP7 Protein sowohl in An- als auch in Abwesenheit einer Infektion einen ähnlichen Ubiquitinierungszustand aufzuweisen (vgl. Abb. 4.13B-E). Mit mGBP7 als Ladekontrolle könnte auf eine erhöhte Modifikation von mGBP7 mit über K27-verknüpften Ubiquitinmolekülen spekuliert werden.

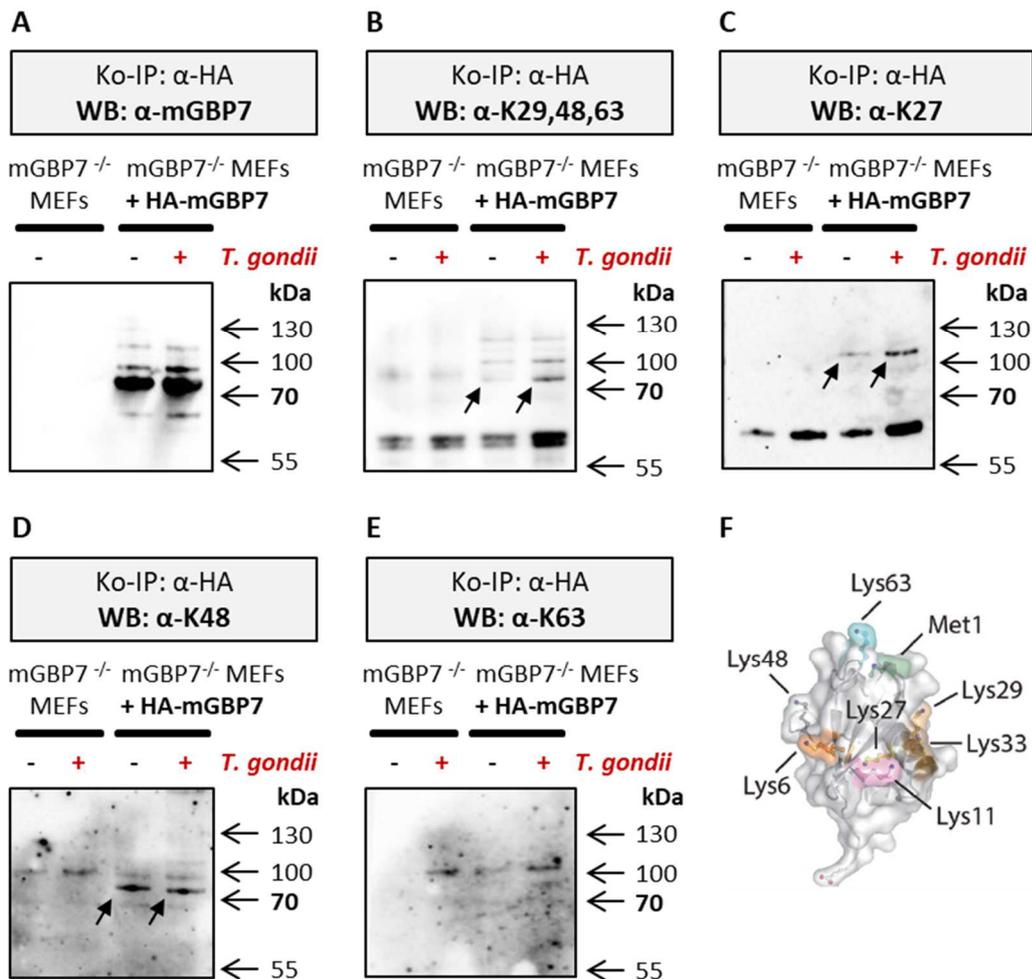
Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse, dass mGBP7 sowohl in An- als auch in Abwesenheit einer *T. gondii*-Infektion mehrfach ubiquitiniert wird.



**Abb. 4.12: Analyse der ersten Ko-Immünpräzipitation.** Stabil HA-mGBP7 exprimierende MEFs wurden für 16 h mit IFN $\gamma$  induziert und die Ko-IP mit anti-HA-Agarose wie in Abschnitt 3.1.8 beschrieben durchgeführt. Die während der Ko-IP genommenen Kontrollproben zum Bindungserfolg von HA-mGBP7 an die anti-HA-Agarose („vor IP“/„nach IP“) und das Ko-IP-Eluat wurden in einem 4 – 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Als Präzipitationskontrolle wurden mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen, welche kein mGBP7 exprimieren, verwendet. **(A)** Die Coomassie-Brilliantblau-Färbung zeigt eine Bande im Eluat der mit HA-mGBP7 rekonstituierten Zellen. Die rot markierte Region oberhalb dieser Bande wurde ausgeschnitten, verdaut und massenspektrometrisch (MPL, HHU, Gereon Poschmann) analysiert. **(B)** Detektion von in den Proben enthaltenem HA-mGBP7 mittels Immunoblot mit dem polyklonalen anti-mGBP7 Antikörper. **(C)** Detektion von in den Proben enthaltenem HA-mGBP7 mittels Immunoblot mit dem monoklonalen anti-HA Antikörper (HA-7). Inklusive des HA-Tags hat mGBP7 eine theoretische Masse von 73,8 kDa.

**Tab. 4.3: Massenspektrometrie Ergebnisse.** Übersicht über die identifizierte Proteinspezies, Molekulargewicht (MW) und Intensität/MW der gemessenen Probe.

Protein	MW	Intensität/MW
Ubiquitin-60s ribosomales Protein L40	8,72	53760927,6
mGBP7	72,72	47253850,4

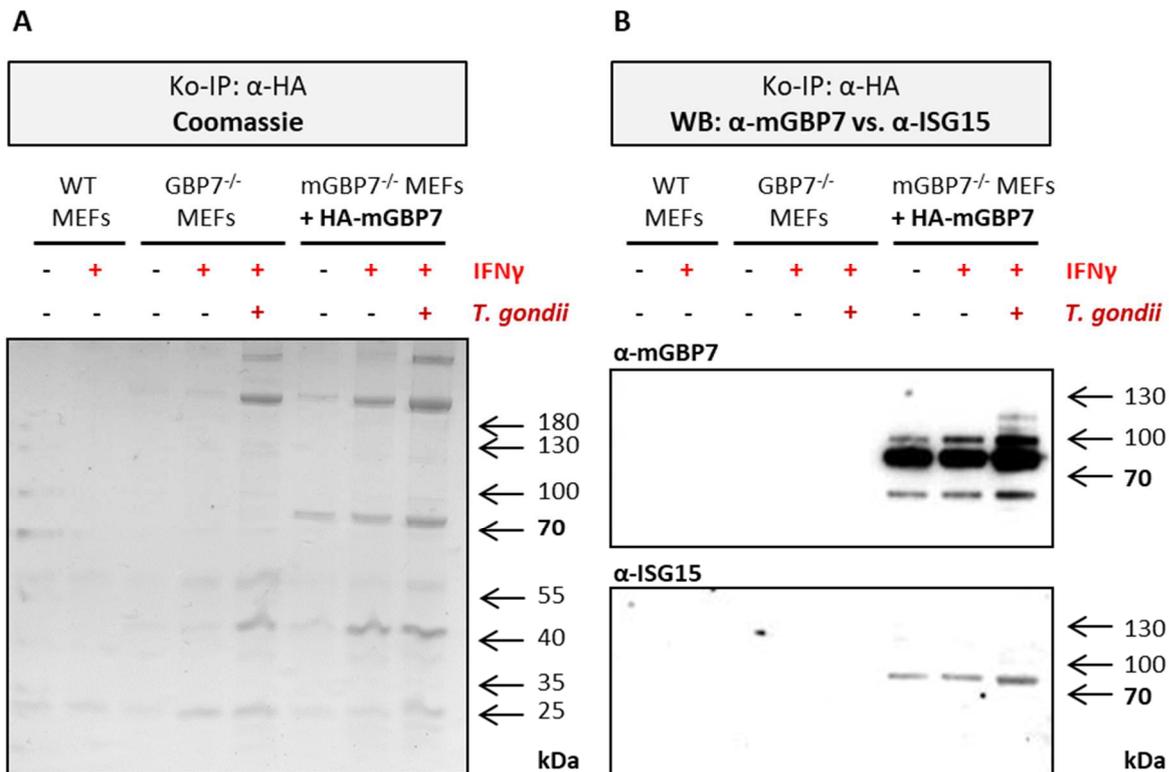


**Abb. 4.13: Ubiquitinierung von mGBP7.** Stabil HA-mGBP7 exprimierende MEFs wurden für 16 h mit IFN $\gamma$  induziert und dann entweder für weitere 2,5 h inkubiert oder mit einer MOI (engl.: *multiplicity of infection*) von 10 für weitere 2,5 h mit *T. gondii* infiziert. Die Ko-IPs wurden mit anti-HA-Agarose wie in Abschnitt 3.1.8 beschrieben durchgeführt. Als Präzipitationskontrollen wurden mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs, welche kein mGBP7 exprimieren, verwendet. Die Eluate wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem polyklonalen anti-mGBP7 (A) und verschiedenen monoklonalen anti-Ubiquitin Antikörpern: (B) α-K29,48,63: erkennt Ubiquitinmoleküle, die über ihre Lysine 29, 48, und 63 verknüpft sind; (C) α-K27: erkennt Ubiquitinmoleküle, die über ihr Lysin 27 verknüpft sind; (D) α-K48: erkennt Ubiquitinmoleküle, die über ihr Lysin 48 verknüpft sind; (E) α-K63: erkennt Ubiquitinmoleküle, die über ihr Lysin 63 verknüpft sind. Die schwarzen Pfeile (B, C und D) zeigen auf die Banden, welche in vergleichbarer Laufhöhe zu den mGBP7-Banden (A) detektiert wurden. Inklusiv des HA-Tags hat mGBP7 eine theoretische Masse von 73,8 kDa. (F) Schematische Darstellung von Ubiquitin als Cartoon mit einer semitransparenten Oberfläche und den acht modifizierbaren AS-Resten (farblich hervorgehoben) als Ball und Stick-Repräsentation (modifiziert nach Swatek et al., 2016 [211]). Lys, Lysin. Met, Methionin.

#### 4.2.2 ISGylierung von mGBP7

Neben Ubiquitin konnte wiederholt das Interferon-stimulierte Gen 15 Protein (ISG15) in den Ko-IP-Proben der mit HA-mGBP7 rekonstituierten Zellen identifiziert werden (vgl. Abb. 4.16B). Bei ISG15 handelt es sich um ein 17 bzw. 15 kDa Protein, welches über E1 – E3 Enzyme, ähnlich wie Ubiquitin, kovalent an Zielproteine konjugiert werden kann (Abb. 5.2). Dieser Prozess wird als ISGylierung bezeichnet [229, 230]. Da ISG15 auch schon in Ko-IP-MS-Experimenten mit mGBP2 (Elisabeth Kravets, unpublizierte Daten) identifiziert werden konnte, wurde im Folgenden überprüft, ob ISG15 als frei vorliegendes Molekül einen direkten Interaktionspartner von mGBP7 darstellt, oder ob das Ubiquitin-ähnliche Molekül an mGBP7 bzw. andere Proteine konjugiert vorliegt. Hierzu wurden erneut Ko-IP-Experimente mit anschließenden SDS-PAGE-Analysen durchgeführt (Abb. 4.14). Auch hier wurden zusätzlich die Zellysate von *T. gondii*-infizierten Zellen untersucht, um mögliche Unterschiede in der Protein ISGylierung im Rahmen einer Infektion zu analysieren. Mittels anti-mGBP7-WB konnten erneut mehrere, verschieden große mGBP7-Spezies detektiert werden (Abb. 4.14B, oberes Panel). Zudem konnte interessanterweise mit dem anti-ISG15 Antikörper (Abb. 4.14B, unteres Panel) in allen Lysaten aus HA-mGBP7-exprimierenden Zellen Banden auf der Laufhöhe der mGBP7-Bande mit der höchsten Intensität (vgl. Abb. 4.14B, oberes Panel) detektiert werden. Dies deutet stark darauf hin, dass das mGBP7 Protein ISGyliert wird und dass diese Modifikation auch in Abwesenheit einer Infektion auftritt. Anhand der Bandenintensitäten, und mit dem konstitutiv exprimierten HA-mGBP7 Protein als Ladekontrolle, erschien es nicht so, als ob durch eine *T. gondii*-Infektion eine vermehrte ISG15-Konjugation an mGBP7 initiiert wird. Die massenspektrometrische Analyse der Ko-IP-Proben zeigten jedoch, dass die normalisierte Intensität für ISG15 in den mit *T. gondii* infizierten Proben ca. um den Faktor 5 erhöht ist (Abb. S4A). In der normalisierten Intensität für Ubiquitin konnten dagegen unter den beiden Ko-IP-Konditionen ( $\pm$  *T. gondii*) kein Unterschied gemessen werden (Abb. S4B). Um das durch eine *T. gondii*-Infektion vermehrt ISGylierte Lysin (K) von mGBP7 zu identifizieren, wurden die verschiedenen Intensitäten für Peptide mit Glycin-Glycin-(Gly-Gly)-Modifikationen an Lysinen, die durch PTMs wie eine Ubiquitinierung oder eine ISGylierung entstehen [231], verglichen. Hier zeigte sich, dass das Peptid EAIAVFMEHSFK(Gly-Gly)DENQQFQK und demnach das K373 im Verbindungsteil der  $\alpha$ 8- und  $\alpha$ 9-Helix von mGBP7 im Rahmen einer Infektion verstärkt (Faktor 3) modifiziert wird (Abb. S4C).

Insgesamt weisen die Resultate sehr stark darauf hin, dass mGBP7 sowohl in An- als auch in Abwesenheit einer *T. gondii*-Infektion ISGyliert wird, wobei eine Infektion mit *T. gondii* zu einer erhöhten Konjugation von ISG15 an mGBP7 führt.



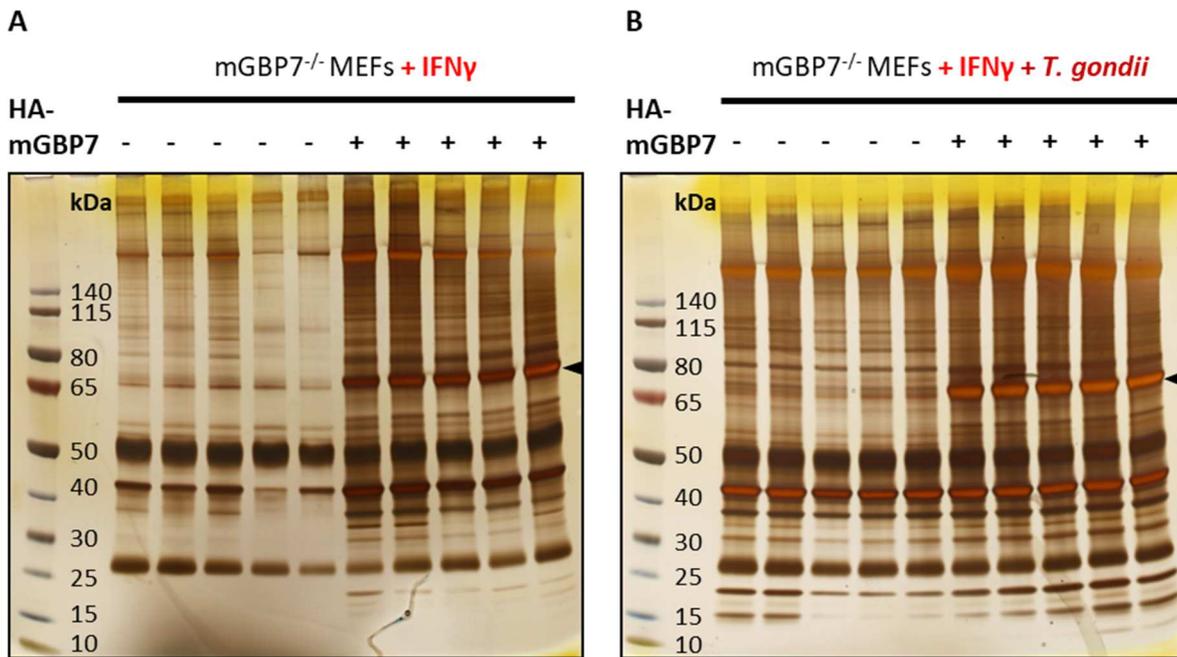
**Abb. 4.14: ISGylierung von mGBP7.** Stabil HA-mGBP7 exprimierende MEFs wurden für 16 h mit IFN $\gamma$  induziert (-/+ ) und dann entweder für weitere 2,5 h inkubiert oder mit *T. gondii* mit einer von 10 für weitere 2,5 h infiziert. Die Ko-IPs wurden mit anti-HA-Agarose wie in Abschnitt 3.1.8 beschrieben durchgeführt. Als Präzipitationskontrollen wurden mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs, welche kein mGBP7 exprimieren, und Wildtyp (WT) MEFs verwendet. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und dann mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt (**A**) oder mittels Immunoblot analysiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem polyklonalen anti-mGBP7 (**B**, oberes Panel) und einem polyklonalen anti-ISG15 (**B**, unteres Panel) Antikörper. HA-mGBP7 hat eine theoretische Masse von 73,8 kDa.

#### 4.2.3 Optimierung der Ko-Immunpräzipitationsbedingungen

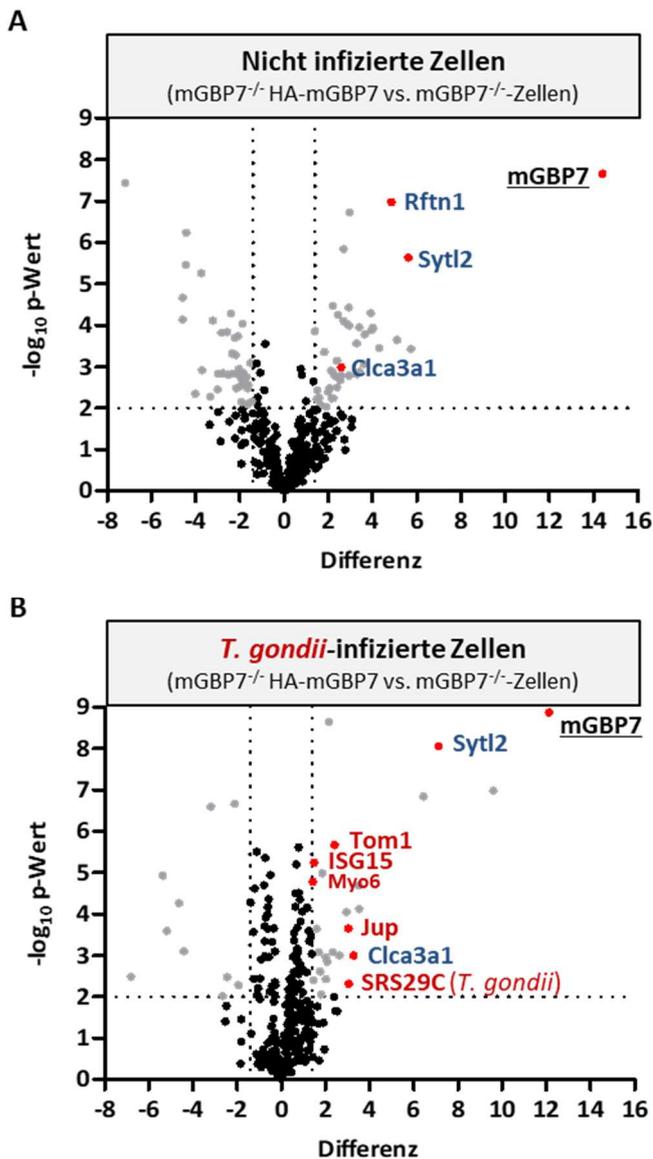
Bei den verwendeten initialen Ko-IP-Bedingungen (pH 7, Waschen: 4x1 mL Ko-IP-Puffer, 1x 1 mL PBS) konnten bei der Coomassie-Färbung neben der Bande für mGBP7 keine weiteren erkennbaren Banden von kopräzipitierten Proteinen detektiert werden (Abb. 4.12A). Und auch bei der anschließenden MS-Analyse wurden nur sehr wenige potentielle Interaktionspartner identifiziert (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde zunächst versucht, die Anzahl an kopräzipitierten Interaktionspartnern von mGBP7 für die MS-Analyse zu optimieren. Hierzu wurden unter anderem verschiedene pH-Werte sowie eine verschiedene Anzahl an Waschschritten getestet. Drei der durchgeführten Optimierungsversuche inklusive der final gewählten Bedingungen für alle weiteren Ko-IP-Experimente sind in Abbildung S9 dargestellt.

#### 4.2.4 Identifikation von mGBP7-Interaktionspartnern

Mit den optimierten Bedingungen (s. Abschnitt 2.5.1, Abb. S5C) wurden im Folgenden die Ko-IP-Experimente zur Identifikation der Interaktionspartner von mGBP7 in/an den VLS bzw. der *T. gondii* PV durchgeführt werden. Für die Zuverlässigkeit der Messungen wurden je Kondition (mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen ± HA-mGBP7; ± *T. gondii*) fünf biologische Replikate untersucht. Die einzelnen Replikate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Silberfärbung visualisiert (Abb. 4.15). Die Ähnlichkeit der SDS-Gel-Bandenmuster (Abb. 4.15) sowie der MS-Proteinquantifizierungsdaten (*Heatmap*, Abb. S6) innerhalb der Replikate einer Experimentalgruppe als auch das Clustering der Replikate im Rahmen der Hauptkomponentenanalyse (PCA, engl.: *principal component analysis*; Abb. S7) demonstrieren die Konsistenz bzw. die Reproduzierbarkeit der Daten. Um eine Übersicht über die mittels MS identifizierten, potentiellen mGBP7-Interaktionspartner zu erhalten und die jeweils differentiell exprimierten Proteine hervorzuheben, wurden sogenannte *Volcano Plots* erstellt (Abb. 4.16). Diese Art von Streudiagramm illustriert das Verhältnis von statistischer Signifikanz (p-Wert) und Höhe des Abundanzunterschiedes beim Vergleich zweier Gruppen (Abundanzveränderungen, hier angegeben als Differenz) in großen Datensätzen. Die Proteine, die den größten Abundanzunterschied zeigten und auch der Literatur nach als mögliche mGBP7-Interaktionspartner besonders relevant erschienen (z. B. bei Involvierung in Autophagie-Prozesse [232], Zell-Zell-Kontakten [233, 234], VLS-Exozytose [235], *T. gondii* Virulenz [91] oder Ca<sup>2+</sup>-abhängige Prozesse [236, 237], die bei der Ruptur der PV bzw. des Parasiten eine Rolle spielen könnten; vgl. Tab. 4.4) wurden farblich hervorgehoben (rote Kreise, vgl. Abb. 4.16). Bereits in nicht infizierten Zellen gemessene Interaktionspartner wurden mit blauem Schriftzug und erst im Rahmen einer Infektion mit *T. gondii* ermittelte interagierende Proteine wurden mit dunkelrotem Schriftzug kenntlich gemacht (vgl. Abb. 4.16A vs. 4.16B). Auffällig war hier erneut, dass ISG15 nur in den mit *T. gondii* infizierten Zellen mit hoher Abundanz detektiert wurde (Abb. 4.16B). Dies verstärkt nochmals die Annahme, dass eine Infektion mit *T. gondii* zu einer erhöhten Konjugation von ISG15 an mGBP7 führt. Alle weiterführend analysierten, potentiellen Interaktionspartner von mGBP7 sind in Tabelle 4.4 nochmals gesondert aufgeführt.



**Abb. 4.15: Biologische Ko-IP-Replikate für die MS-Analysen.** Stabil HA-mGBP7 exprimierende mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs wurden für 16 h mit IFN $\gamma$  induziert und dann entweder für weitere 2,5 h inkubiert (**A**) oder mit *T. gondii* mit einer MOI von 10 für weitere 2,5 h infiziert (**B**). Die Ko-IPs wurden mit anti-HA-Agarose wie in Abschnitt 3.1.8 beschrieben durchgeführt. Als Kontrollen für falsch positive Interaktionspartner dienten Ko-IP-Replikate mit den mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs. Die am Rand der SDS-Gele eingezeichneten schwarzen Pfeile geben die Bandenhöhe von HA-mGBP7 (theoretische Masse: 73,8 kDa) an. Die Analyse der Ko-IP-Proben mittels SDS-PAGE und Silberfärbung erfolgte im MPL (HHU, Gereon Poschmann).



**Abb. 4.16: Volcano Plots der MS-Daten.** *Volcano Plots* zu den quantitativen MS-Daten der anti-HA-mGBP7 Ko-IPs (+ IFN $\gamma$ , mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs + HA-mGBP7) im Vergleich zu den Kontroll-Ko-IPs (+ IFN $\gamma$ , mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs). Die x-Achse zeigt die Differenz der Abundanzänderung bzw. die Differenz der Mittelwerte der log<sub>2</sub>-Intensitäten (normalisiert, *label-free quantification*), wohingegen die y-Achse die berechnete Signifikanz für diese Differenz anzeigt. Für beide Konditionen (nicht infizierte vs. *T. gondii*-infizierte Zellen) wurden jeweils fünf biologische Replikate durchgeführt und analysiert. Als Schwellenwert für die Abundanzänderung wurde ein Wert von  $\geq 1,4$  (log<sub>2</sub>-Differenz  $\geq 1,4$  oder  $\leq -1,4$ ) gewählt. Der Schwellenwert für die statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert  $\leq 0,01$  ( $-\log_{10}$  p-Wert  $\geq 2$ ) gesetzt. Statistisch relevante Proteine sind mit einem roten oder grauen Punkt und statisch insignifikante Proteine mit einem schwarzen Punkt gekennzeichnet. Der *Volcano Plot* in (A) zeigt die möglichen Interaktionspartner von mGBP7 in Abwesenheit einer Infektion in/an den VLS (blaue Beschriftung). Der *Volcano Plot* in (B) zeigt die ermittelten Interaktionspartner von mGBP7 nach einer Infektion der Zellen mit *T. gondii* (dunkelrote Beschriftung) für 2,5 h. Die MS-Analyse der Ko-IP-Proben wurde wie in Abschnitt 3.3.14 beschrieben durchgeführt.

**Tab. 4.4: Potentielle mGBP7-Interaktionspartner.** Übersicht über die anhand der statistischen Signifikanz (p-Wert) und der Abundanzveränderungen (Differenz) sowie der Literatur ausgewählten, potentiellen mGBP7-Interaktionspartner für die Folgestudien.

Protein	Name (engl.)	Organismus	Uninfiziert	<i>T. gondii</i> infiziert	Funktion	Prozess
Clca3a1 /Clca1	<i>Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channel regulator 3A-1</i>	Maus	+	+	Ca <sup>2+</sup> -aktivierte Chlorid-Kanalaktivität	Chlorid-Transport, Hydrolyse, Proteolyse
Jup	<i>Junction plakoglobin</i>	Maus	-	+	α-Catenin-bindend, Cadherin-bindend, Phosphatasen- und Kinasen-bindend	Zelladhäsion, Zellmigration
Rftn1	<i>Raftlin</i>	Maus	+	-	dsRNA-bindend, Lipid Raft Assemblierung	BCR- u. TCR-Signaling, IL17-Produktion, TLR3-Signaling
SRS29C	<i>SAG-related sequence 29C</i>	<i>T. gondii</i>	-	+	Negativer Regulator der <i>T. gondii</i> Virulenz	Regulation der <i>T. gondii</i> Virulenz
Syt12	<i>Synaptotagmin-like 2</i>	Maus	+	+	Neurexin-bindend, PIP <sub>2</sub> -bindend, PS-bindend, Rab27A-bindend	Ca <sup>2+</sup> -Signaling, Proteintransport, (VLS) Exozytose
Tom1	<i>Target of Myb protein1</i>	Maus	-	+	Clathrin-bindend, Myosin6*-bindend, Tollip-bindend, Ubiquitin-bindend	Intrazellulärer Proteintransport

\*Myosin6 (Myo6) wurde in der Co-IP-MS-Analyse als potentieller Interaktionspartner von mGBP7 identifiziert und deshalb auch in Abbildung 4.16B farblich hervorgehoben (dunkelrote Beschriftung).

BCR, B-Zell-Rezeptor. IL17, Interleukin 17. PIP<sub>2</sub>, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. PS, Phosphatidylserin. TCR, T-Zell-Rezeptor. TLR3, Toll-like Rezeptor 3.

#### 4.2.5 Validierung von mGBP7-Interaktionspartnern mittels Ko-IP und WB

Um die Spezifität der Interaktion von mGBP7 mit den potentiellen Interaktionspartnern näher analysieren zu können, wurden die mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs mit einem mGBP2-Fusionskonstrukt mit N-terminalem HA-Tag transduziert. Zur Überprüfung der Abundanzveränderungen sowie der Integrität der HA-getaggten Proteine wurden WB-Analysen durchgeführt (Abb. S3). Diese zeigten für HA-mGBP2 ein im Vergleich zum HA-mGBP7 leicht geringeres Expressionslevel, konnten aber die Integrität der beiden Fusionsproteine bestätigen. Für die Validierung der identifizierten mGBP7-Interaktionspartner wurden dann erneut Ko-IP-Experimente mit mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen, und mit HA-mGBP2 bzw. HA-mGBP7 rekonstituierten mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen durchgeführt. Die anschließende Identifikation von kopräzipitierten Proteinen erfolgte mittels WB (Abb. 4.17 und 4.18).

Syt12 (engl.: *Synaptotagmin-like 2*) konnte mittels WB allein in den mit HA-mGBP7 rekonstituierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.17A). Dass Syt12 nicht in den Proben der mit HA-mGBP2 rekonstituierten Zellen detektiert werden konnte, spricht für eine spezifische Interaktion von Syt12 mit mGBP7. Zudem konnte für Syt12 nicht nur eine, sondern gleich vier verschiedene Isoformen in den HA-

mGBP7 Ko-IP-Proben detektiert werden. Die Zuordnung der detektierten Banden zu den entsprechenden Sytl2 Isoformen war nicht eindeutig möglich, da nach Transkription von *syt2* durch differenzielles Spleißen 17 unterschiedliche mRNAs produziert werden, die für insgesamt 16 Isoformen codieren (NCBI accession Q99N50). Ein Abgleich der identifizierten Peptide mit den Sequenzen der Sytl2 Isoformen ließ vermuten, dass unter anderem die Isoform 2 (127 kDa) sowie die Isoform 3 (104 kDa), mit jeweils 13 identifizierten Peptiden, als Interaktionspartner von mGBP7 fungieren. Der Vergleich mit den, über dem anti-Sytl2-WB dargestellten, Intensitäten aus der vorherigen Ko-IP-MS-Analyse legen nahe, dass durch die *T. gondii*-Infektion eine verstärkte Interaktion von mGBP7 mit Sytl2 initiiert wird und dass eine Sytl2 Isoform, vermutlich Isoform 6 (12 identifizierte Peptide, 43 kDa), überhaupt erst durch die Infektion mit *T. gondii* mit der GTPase wechselwirkt.

Für Clca1 (engl.: *Calcium-activated chloride channel regulator (3A)-1*) konnten sowohl in den HA-mGBP2 als auch in den HA-mGBP7 Ko-IP-Eluaten schwache Banden detektiert werden (Abb. 4.17B). Die deutlichsten Banden konnten allerdings, in Übereinstimmung mit den Intensitäten aus den Ko-IP-MS-Analysen, für die mit HA-mGBP7 rekonstituierten, mit *T. gondii* infizierten Zellen erhalten werden. Die zwei intensivsten Banden sind in Übereinstimmung mit einer Studie, die vorschlägt, dass Clca1 nach dessen Synthese als Vorläuferprotein von 125/130 kDa autoproteolytisch in ein 90 kDa N-terminales und ein 32 – 38 kDa C-terminales Produkt gespalten wird [238].

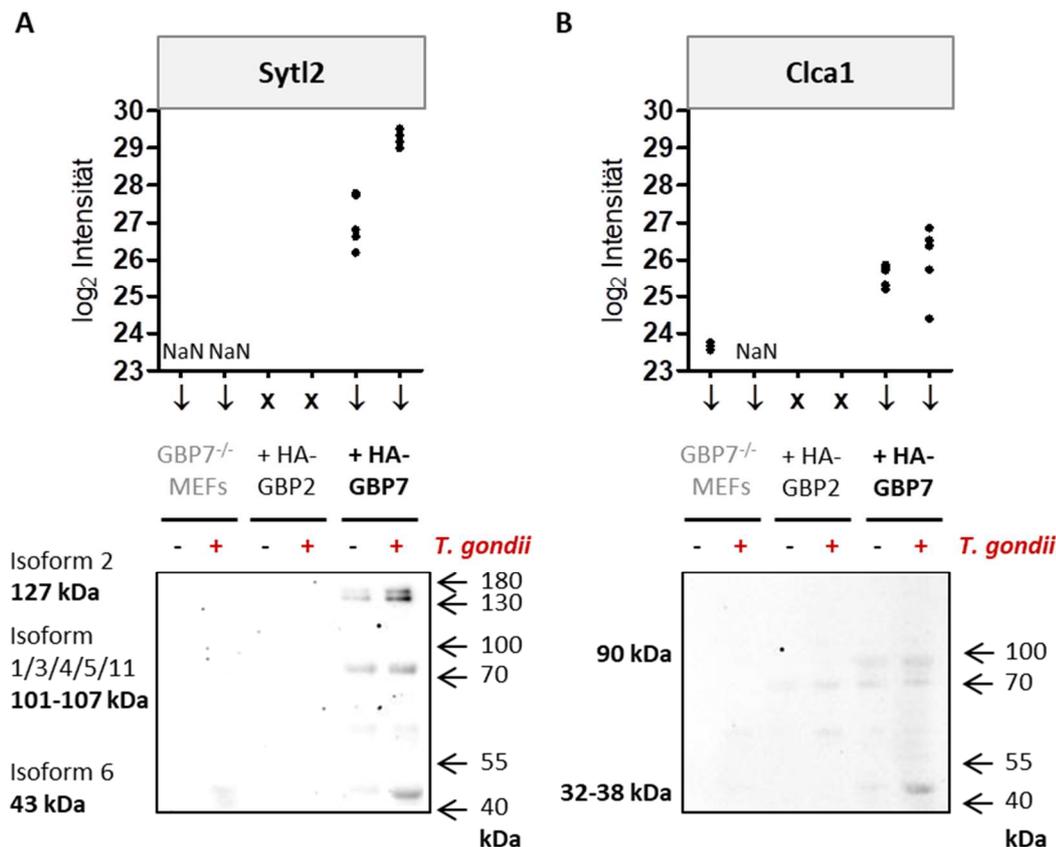
Das 82 kDa große Jup (engl.: *Junction plakoglobin*) konnte nur in den mit HA-mGBP7 rekonstituierten Zellen ( $\pm$  *T. gondii*) detektiert werden (Abb. 4.18A). Dies spricht, zusammen mit den MS-Intensitäten der vorherigen Ko-IP-Proben, für eine spezifische Interaktion von mGBP7 mit Jup und zeigt, wie bei den anderen Messungen, dass auch nicht der HA-Tag für eine Ko-Präzipitation der untersuchten Kandidatenproteine verantwortlich war. Neben der 82 kDa Bande wurden jedoch auch in allen Ko-IP-Proben mehr oder weniger starke Banden oberhalb der 100 kDa Markerbande detektiert. Diese könnten möglicherweise durch eine Kreuzreaktivität des polyklonalen anti-Jup Antikörpers erklärt werden.

Rftn1 (engl.: *Raftlin*) konnte insbesondere in den mit HA-mGBP7 rekonstituierten, *T. gondii*-infizierten Zellen detektiert werden (Abb. 4.18B). Dies stimmt nicht vollkommen mit den zuvor gemessenen Intensitäten für Rftn1 überein. Bei diesen konnten vergleichbare Peptidintensitäten für Rftn1 sowohl in An- als auch in Abwesenheit einer Infektion mit *T. gondii* detektiert werden. Allerdings ist hier, bzw. auch bei allen anderen WB-Analysen der Ko-IP-Proben zu beachten, dass keine Ladungskontrollen mitgeführt werden konnten und auch die Auftragung geringerer Proteinmengen der Grund für schwächere Banden sein können. Weiterhin fällt beim anti-Rftn1-WB auf, dass auch eine schwache Bande für die HA-mGBP2-Probe der *T. gondii*-infizierten Zellen zu erkennen ist, was darauf hindeuten könnte, dass auch mGBP2 dazu in der Lage ist, mit Rftn1 zu interagieren. Die schwachen Banden oberhalb der 62 kDa Bande könnten bedeuten, dass auch Rftn1 posttranslational modifiziert wird. Andererseits könnte auch eine Kreuzreaktivität des polyklonalen anti-Rftn1 Antikörpers für die Detektion der zusätzlichen Banden verantwortlich sein.

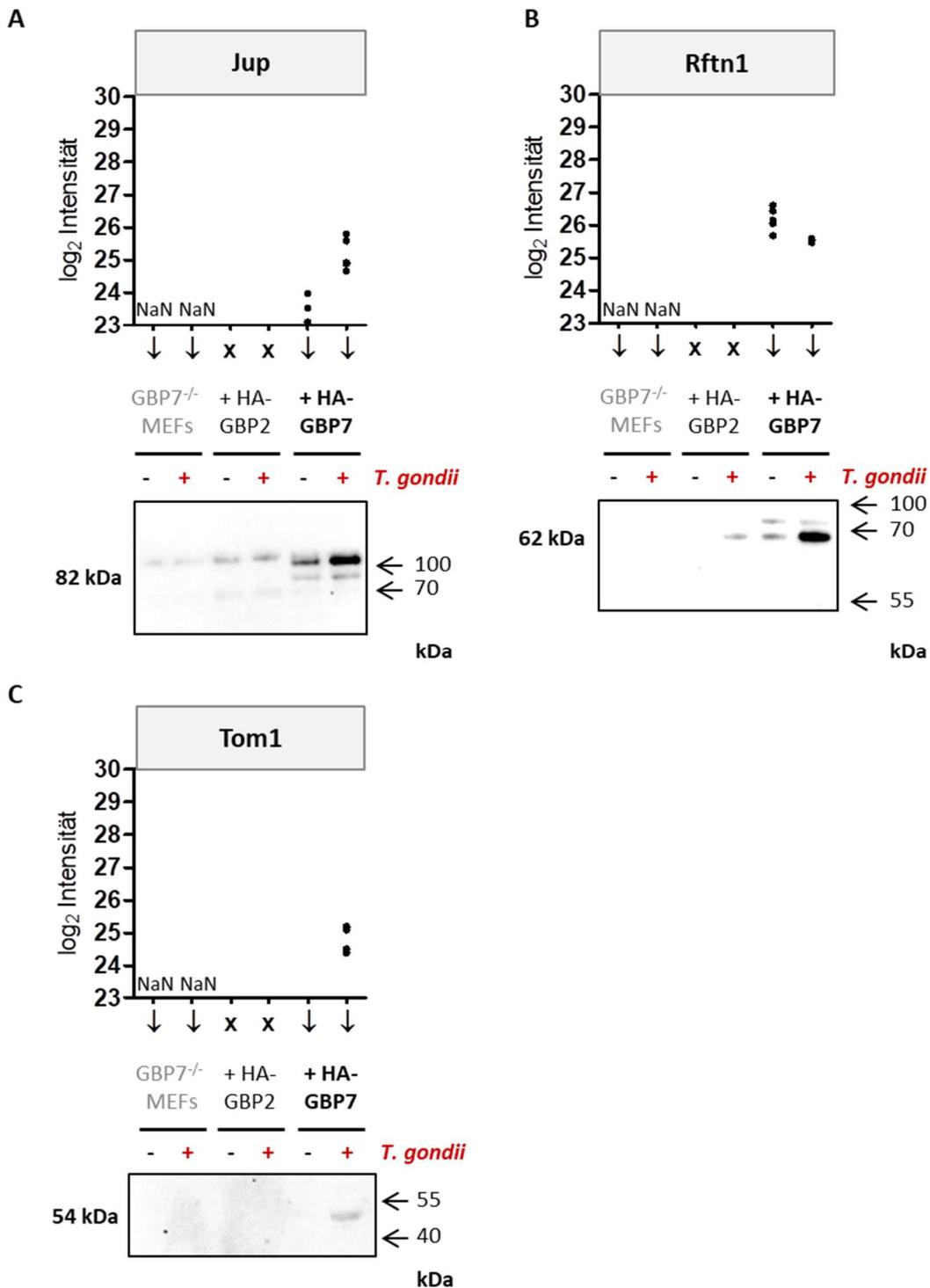
Für Tom1 (engl.: *Target of Myb protein 1*) konnten, in Übereinstimmung mit den zuvor für Tom1 bestimmten Intensitäten, nur in den mit mGBP7 rekonstituierten, *T. gondii*-infizierten Zellen eine

Bande für Tom1, bei der entsprechenden Größe von 54 kDa, detektiert werden (Abb. 4.18C). Dies spricht für die hohe Spezifität der Interaktion von mGBP7 mit Tom1 und zeigt auch hier, dass Tom1 nicht auf Grund einer Wechselwirkung mit dem HA-Tag kopräzipitiert wurde.

Insgesamt konnten mit Hilfe der durchgeführten Ko-IP-WB-Analysen die Interaktionen von mGBP7 mit Sytl2, Clca1, Jup, Rftn1 und Tom1 validiert werden. Vor allem Sytl2 sowie Tom1 weisen diesen Ergebnissen nach eine hochspezifische Interaktion mit mGBP7 auf.



**Abb. 4.17: Validierung von mGBP7-Interaktionspartnern mittels Ko-IP und Western Blot (1).** Stabil HA-mGBP7 exprimierende mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs wurden für 16 h mit IFN $\gamma$  induziert und dann entweder für weitere 2,5 h inkubiert (-) oder mit *T. gondii* (+) mit einer MOI von 10 für weitere 2,5 h infiziert. Die Ko-IPs wurden mit anti-HA-Agarose wie in Abschnitt 3.1.8 beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle für falsch positiv identifizierte Interaktionspartner dienten Ko-IPs mit mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs. Als Kontrolle für die Spezifität wurden Ko-IPs mit HA-mGBP2 rekonstituierten mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs durchgeführt. Die Ko-IP-Eluate wurden auf SDS-Gelen aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem polyklonalen anti-Syt12 (AS329-880) (A) oder einem monoklonalen anti-Clca1 (EPR12254-88) (B) Antikörper. Oberhalb der SDS-Gele sind jeweils die einzelnen log<sub>2</sub>-Intensitäten der fünf Ko-IP-MS-Replikate für Sytl2 und Clca1 (vgl. Abb. 4.16) graphisch dargestellt. Die theoretischen Massen der detektierten Proteine sind neben dem WB gezeigt. Da die vorherige Ko-IP-MS-Analyse ohne die mit HA-mGBP2 rekonstituierten Zellen durchgeführt worden war, sind für mGBP2 in diesen Graphen keine Daten gezeigt. NaN, *not a number*.



**Abb. 4.18: Validierung von mGBP7-Interaktionspartnern mittels Ko-IP und Western Blot (2).** Die Validierung erfolgte gemäß der in Abb. 4.17 beschriebenen Vorgehensweise. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem polyklonalen anti-Jup- (C-Terminus) (A), einem polyklonalen anti-Rftn1- (AS207-451) (B) oder einem polyklonalen anti-Tom1 (Ag11706) (C) Antikörper. Oberhalb der SDS-Gele sind jeweils die mittels MS-Analyse ermittelten einzelnen log<sub>2</sub>-Intensitäten der fünf Ko-IP-MS-Replikate für Jup, Rftn1 und Tom1 (vgl. Abb. 4.15) graphisch dargestellt. Die theoretischen Massen der detektierten Proteine sind neben dem WB gezeigt. Da die vorherige Ko-IP-MS-Analyse ohne die mit HA-mGBP2 rekonstituierten Zellen durchgeführt worden war, sind für mGBP2 in diesen Graphen keine Daten gezeigt. Rftn1 wurde nur in vier der fünf Ko-IP-MS-Replikate der mit HA-mGBP7 rekonstituierten *T. gondii*-infizierten Zellen identifiziert, weshalb das Protein im entsprechenden *Volcano Plot* (Abb. 4.16B) nicht erscheint. NaN, *not a number*.

#### 4.2.6 Validierung der mGBP7-Interaktionspartner mittels GFP/mCherry-Fusionskonstrukten

Zur weiteren Validierung der mGBP7-Interaktionspartner wurden mit mCherry-mGBP7 rekonstituierte mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen mit entsprechenden C- und N-terminalen GFP-Fusionskonstrukten potentieller Kandidatenproteine transduziert.

Die Analyse von fixierten Zellen mittels Konfokalmikroskopie zeigte, dass Clca1-GFP eine recht homogene Verteilung im Zytosol mit nur wenigen kleinen Akkumulationen aufweist (Abb. 4.19A). Darüber hinaus zeigen die *in vitro*-Analysen von *T. gondii*-infizierten Zellen, dass Clca1-GFP im Gegensatz zu mCherry-mGBP7 nicht an der PV des Parasiten akkumuliert (Abb. 4.19B). Auf den Konfokalaufnahmen der uninfizierten Zellen war keine Kolokalisation der beiden Proteine zu erkennen. Dafür konnte, in Übereinstimmung mit den Ko-IP-MS-Daten, in den *T. gondii*-infizierten Zellen teilweise eine Kolokalisation in VLS-artigen Strukturen ausgemacht werden (Abb. 4.19B).

In den mit GFP-Jup und mCherry-mGBP7 transduzierten Zellen konnte bei Abwesenheit einer Infektion eine verstärkte Akkumulation der beiden Proteine zu größeren, VLS-untypischen Aggregaten beobachtet werden (Abb. 4.20). Eine Kolokalisation von Jup und mGBP7 an *T. gondii* PVs war nicht auszumachen und auch insgesamt wurde bei dieser Zelllinie eine verminderte Akkumulation von mGBP7 an PVs beobachtet (Abb. 4.20B).

Die Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von GFP-Rftn1 zeigten eine weitgehend homogene Verteilung des Fusionsproteins im Zytosol und keine eindeutige Kolokalisation mit mGBP7 (Abb. 4.21). Zudem wurde bei den mit *T. gondii*-infizierten Zellen keine bis nur eine sehr schwache Akkumulation an den PVs der Parasiten beobachtet und nur im Einzelfall konnte an Zell-Zell-Kontakten eine Kolokalisation der beiden Proteine ausgemacht werden (Abb. 4.21B, Vergrößerung).

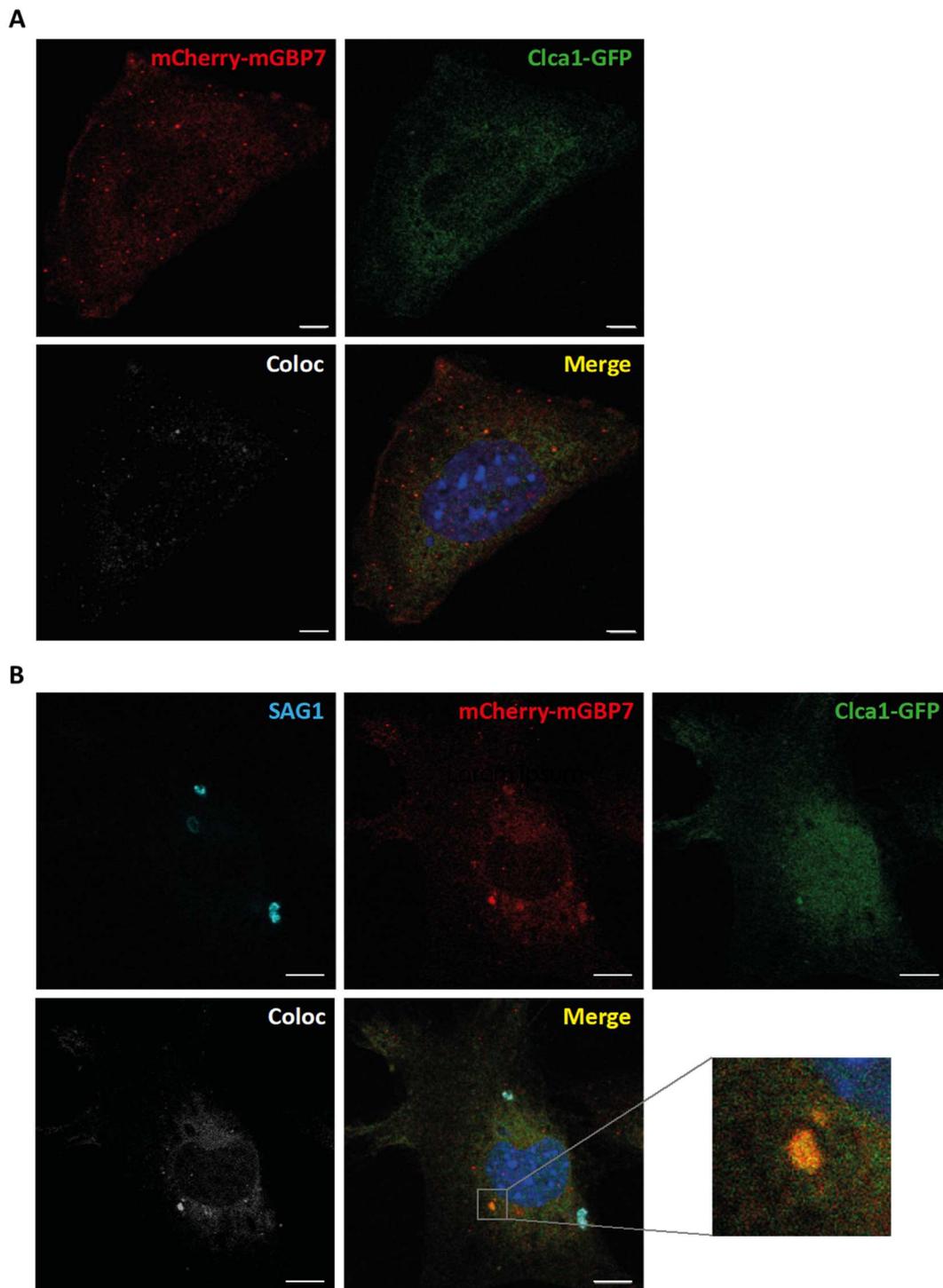
Zur Überprüfung des Expressionslevels sowie der Integrität von Clca1-GFP, GFP-Jup und GFP-Rftn1 wurde eine anti-GFP-WB-Analyse der Zelllysate durchgeführt (Abb. S8). Bei dieser Analyse zeigte sich, dass die drei Proteine zwar vollständig exprimiert werden, jedoch auch freies GFP in den Zelllysaten enthalten war (Abb. S8). Dies könnte eine Erklärung für die, in der Konfokalmikroskopie beobachtete, teils sehr homogen wirkende Verteilung der Fusionsproteine im Zytosol sein (vgl. Abb. 4.19-4.21).

Syt12 kristallisierte sich sowohl bei den Ko-IP-MS- als auch bei den Ko-IP-WB-Ergebnissen als einer der vielversprechendsten Interaktionspartner von mGBP7 heraus (vgl. Abb. 4.16 und 4.17A). Für Syt12 wurden sowohl N- (GFP-Syt12) als auch C-terminale (Syt12-GFP) Fusionskonstrukte der Isoform 3 generiert. Im Folgenden sind jedoch nur die Konfokalaufnahmen der mit Syt12-GFP transduzierten Zelllinie gezeigt, da für GFP-Syt12 eine weitreichend homogene, nicht wie bei einem Protein mit Transmembranregion zu erwartende, membranständige Lokalisation beobachtet wurde (nicht gezeigt). Syt12-GFP konnte dagegen hauptsächlich an der Zellmembran und in vesikelartigen Strukturen im Zytosol in der Nähe des Nukleus lokalisiert gefunden werden (Abb. 4.22A). Aussagen über eine Kolokalisation der beiden Proteine in Abwesenheit einer Infektion waren anhand der konfokalmikroskopischen Aufnahmen nicht eindeutig möglich. Dafür war bei den mit *T. gondii* infizierten Zellen eine Kolokalisation von Syt12 und mGBP7 an Parasiten PVs zu beobachten (Abb.

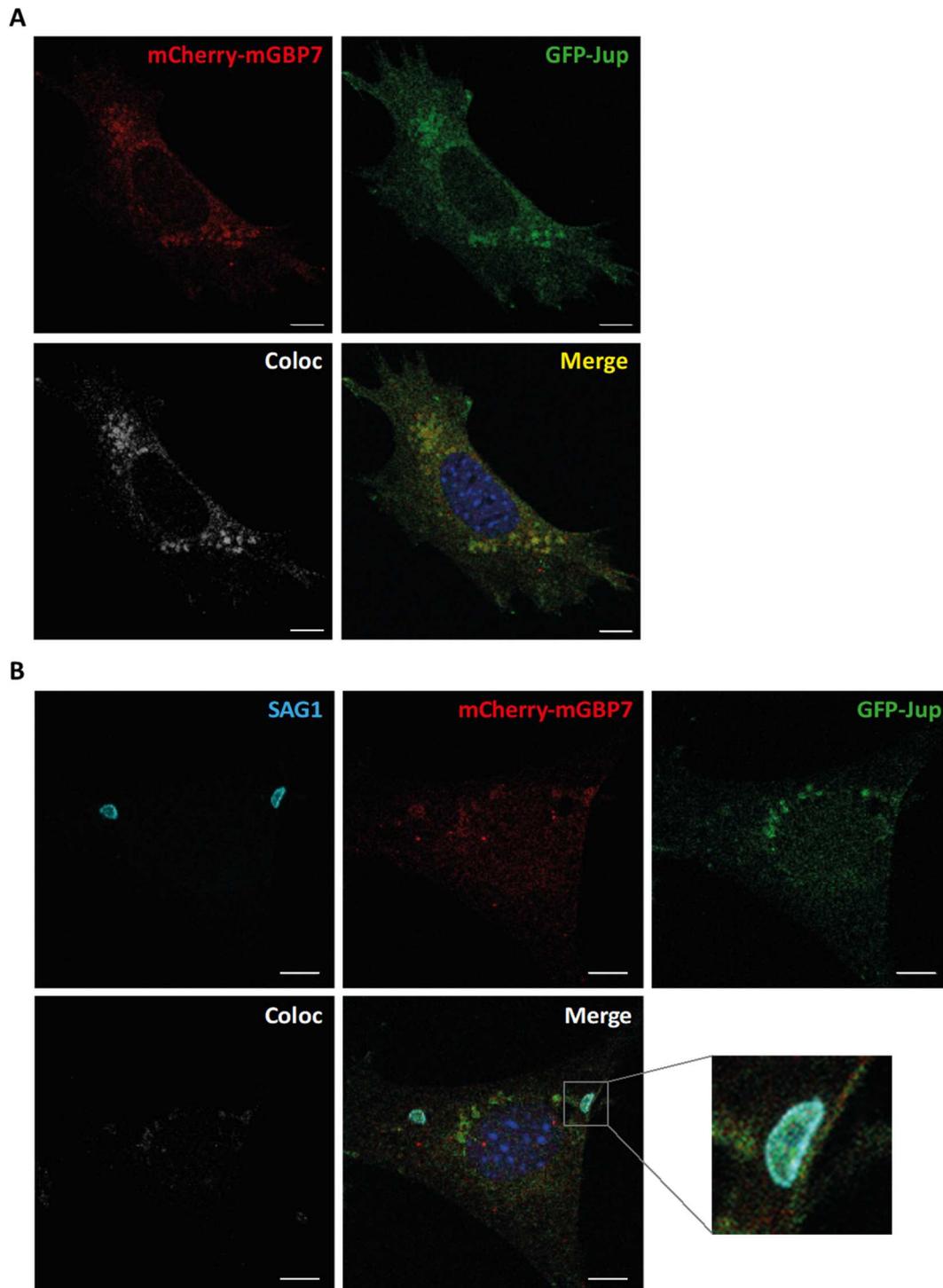
4.22B, s. Coloc-Bild und Vergrößerung). Auch die Sytl2-Fusionsproteine wurden zur Überprüfung des Expressionslevels und der Integrität mittels WB analysiert (Abb. 4.24A). Bei der Detektion mit dem anti-Sytl2 und anti-GFP Antikörper zeigte sich, stimmig mit den Konfokalaufnahmen, dass Sytl2-GFP in im Gegensatz zu GFP-Sytl2, zumindest in ausreichenden Mengen, *full length* (132 kDa) exprimiert wird. Für GFP-Sytl2 wurden die Banden mit der höchsten Intensität hingegen erst unterhalb der 70 kDa Markerbande detektiert. Allerdings wurden auch für Sytl2-GFP einige Degradationsbanden erhalten, die auf eine verminderte Integrität des Proteins hindeuten (Abb. 4.24A, oberes und mittleres Panel).

Neben Sytl2 konnte auch Tom1, sowohl in den Ko-IP-MS- als auch in den Ko-IP-WB-Ergebnissen als spezifischer mGBP7-Interaktionspartner bei einer Infektion mit *T. gondii* ermittelt werden (Abb. 14.16B und 4.18C). In Übereinstimmung mit diesen Daten wurde in unifizierten Zellen größtenteils keine Kolokalisation von Tom1 und mGBP7 beobachtet. Nur in wenigen Fällen war vereinzelt in kleinen, Vesikel-ähnlichen Strukturen eine Kolokalisation der beiden Proteine zu erkennen (Abb. 4.23A, Vergrößerung). Die kolokalisierenden Voxel im Imaris Coloc-Bild wurden schätzungsweise aufgrund der sehr homogenen Verteilung von Tom1-GFP im Zytosol beobachtet (Abb. 4.23A). In den fixierten, *T. gondii*-infizierten Zellen war dagegen eine deutliche Kolokalisation an einzelnen Parasiten PVs vorhanden. In nahezu allen Fällen konnte Tom1-GFP nur an den *T. gondii* PVs, an denen gleichzeitig eine Akkumulation von mCherry-mGBP7 detektiert wurde, beobachtet werden und umgekehrt (Abb. 4.23B und S9A). Die Aufnahmen zeigen sehr überzeugend, dass beide Proteine nah aneinander positioniert, dieselben Areale an der *T. gondii* PV bedecken, während andere Bereiche an der PV bzw. andere Parasiten in derselben Zelle keine mGBP7- oder Tom1-Rekrutierung aufweisen (Abb. 4.23B und S9A). Für das Tom1-Fusionsprotein mit dem N-terminalen GFP-Tag wurde nur in Einzelfällen eine Akkumulation an *T. gondii* PVs beobachtet (nicht gezeigt). Bei der Analyse des Expressionslevels und der Integrität der Tom1-Fusionsproteine zeigte sich entsprechend, dass im Zelllysat der mit GFP-Tom1 rekonstituierten Zellen wesentlich mehr Degradationsbanden detektiert wurden, als im Zelllysat der mit Tom1-GFP rekonstituierten Zellen (Abb. 4.24B, oberes Panel). Im anti-GFP-WB wurden hingegen für beide Tom1-Konstrukte einige Degradationsbanden erhalten, welche anzeigen, dass die Integrität beider Proteine durch den GFP-Tag vermutlich beeinträchtigt wird (Abb. 4.24B, mittleres Panel).

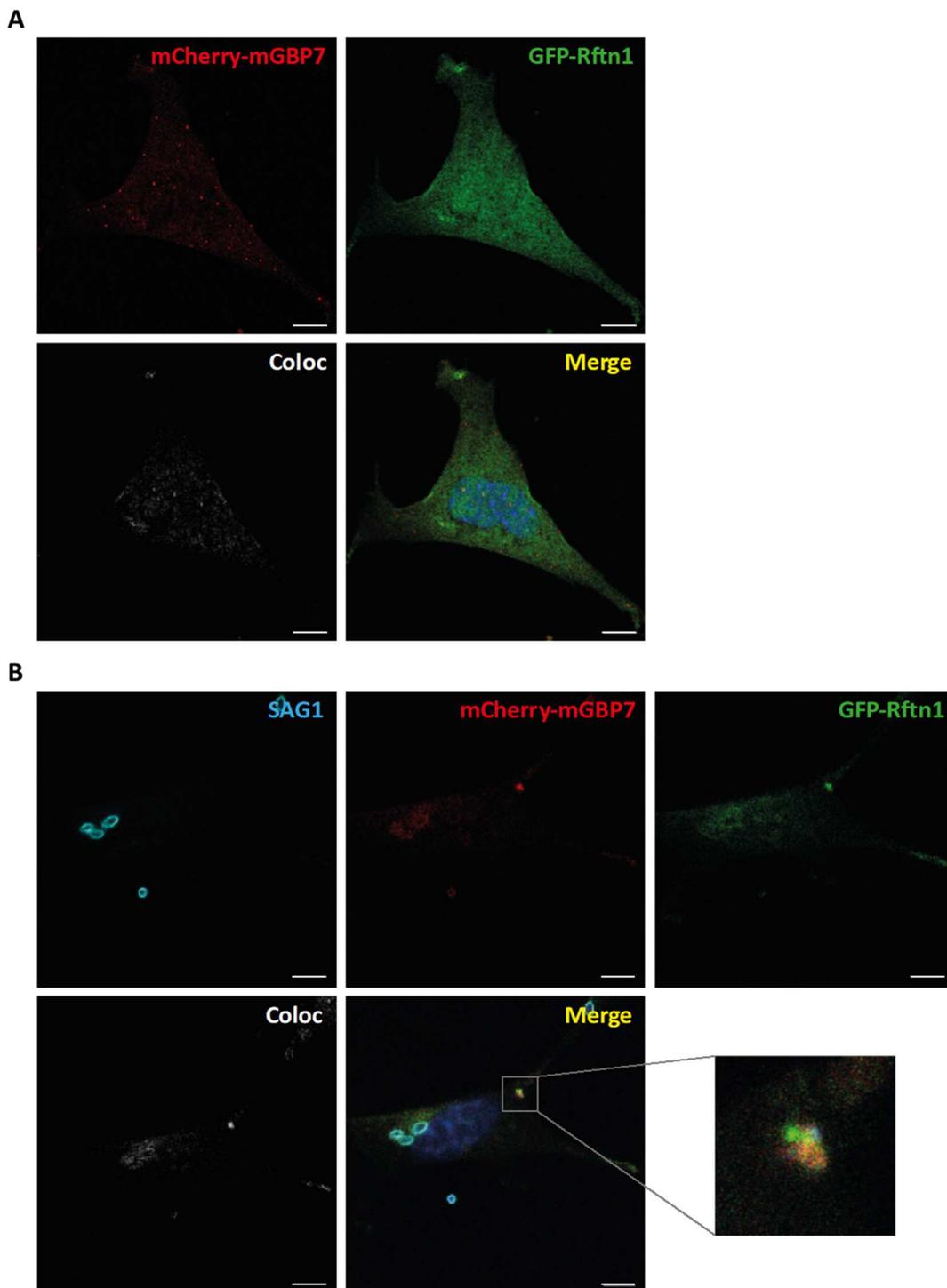
Insgesamt konnten die Konfokalaufnahmen der fixierten Zellen demonstrieren, dass die Clca1- und Rftn1-Fusionskonstrukte nur sehr vereinzelt mit mGBP7 kolokalisieren. Weiterhin wurde eine Kolokalisation von GFP-Jup mit mGBP7 in größeren Aggregaten beobachtet. Für die Isoform3 von Sytl2 und insbesondere für Tom1 konnte zudem eine starke Kolokalisation mit mGBP7 an *T. gondii* PVs beobachtet werden. Diese Ergebnisse bestätigen die vorhergegangenen Ko-IP-Analysen weitgehend und verifizieren vor allem Sytl2 und Tom1 als mGBP7-Interaktionspartner bei *T. gondii*-Infektionen.



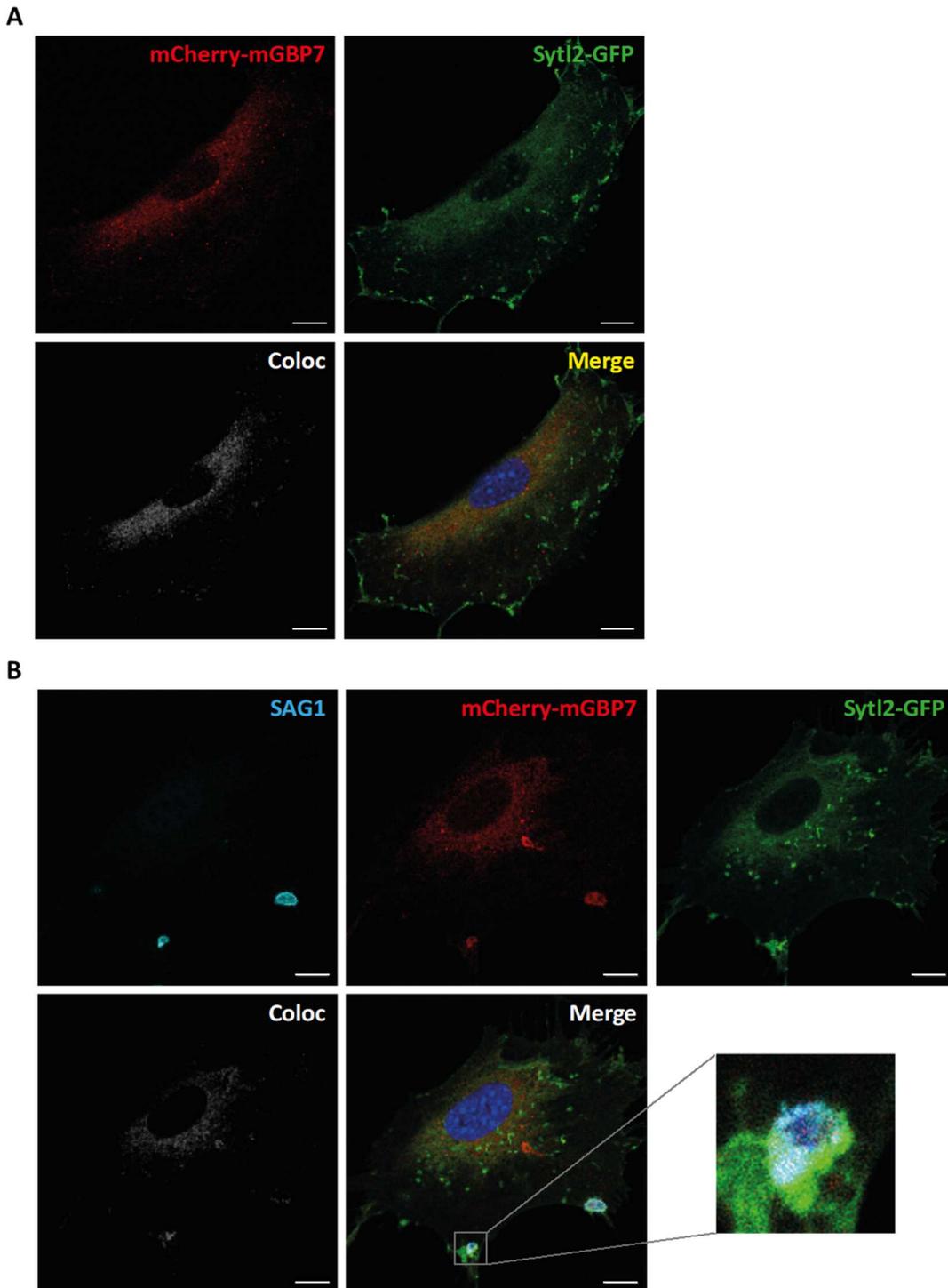
**Abb. 4.19: Subzelluläre Lokalisation von mCherry-mGBP7 und Clca1-GFP.** Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von mGBP7 mit N-terminalem mCherry- und Clca1 mit CT GFP-Tag transduziert in mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs. Die Zellen wurden 16 h vor der Fixierung mit IFN $\gamma$  stimuliert und dann unbehandelt weitere 2,5 h inkubiert **(A)** oder mit einer MOI von 10 mit *T. gondii* **(B)** infiziert (2,5 h). Nach der Fixierung wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Kolokalisierende Voxel beider Proteine (Coloc, ImarisColoc Kanal) werden je als weiße Punkte dargestellt. **(A)** mGBP7 bildet distinkte subzelluläre VLS und auch Clca1 weist eine teilweise vesikuläre Lokalisation auf ( $n \geq 3$ ). Maßstabsbalken, 5  $\mu$ m. **(B)** *T. gondii* wurde durch AK-Färbung von SAG1 (mAB gegen TP3) visualisiert (Sekundärantikörper: Alexa Fluor 633, cyan). Clca1 weist eine vesikuläre, aber gleichzeitig sehr homogene Verteilung im Zytosol auf und mGBP7 bildet distinkte subzelluläre VLS. Beide Proteine kolokalisieren teilweise im Zytosol (Vergrößerung), aber nicht an Parasiten PVs ( $n \geq 3$ ). Maßstabsbalken, 10  $\mu$ m.



**Abb. 4.20: Subzelluläre Lokalisation von mCherry-mGBP7 und GFP-Jup.** Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von mGBP7 mit N-terminalem mCherry- und Jup mit N-terminalem GFP-Tag transduziert in mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs. Die Zellen wurden 16 h vor der Fixierung mit IFN $\gamma$  stimuliert und dann unbehandelt weitere 2,5 h inkubiert (**A**) oder mit einer MOI von 10 mit *T. gondii* (**B**) infiziert (2,5 h). Nach der Fixierung wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Kolokolisierende Voxel beider Proteine (Coloc, ImarisColoc Kanal) werden je als weiße Punkte dargestellt. (**A**) Jup und mGBP7 kolokolisieren in für GBPs untypisch großen VLS ( $n \geq 3$ ). Maßstabsbalken, 10  $\mu$ m. (**B**) *T. gondii* wurde durch AK-Färbung von SAG1 (mAB gegen TP3) visualisiert (Sekundärantikörper: Alexa Fluor 633, cyan). Jup und mGBP7 kolokolisieren nur sehr vereinzelt im Zytosol und an den Parasiten PVs ist keine Kolokolisation (Vergrößerung) der beiden Proteine festzustellen ( $n \geq 3$ ). Maßstabsbalken, 5  $\mu$ m.

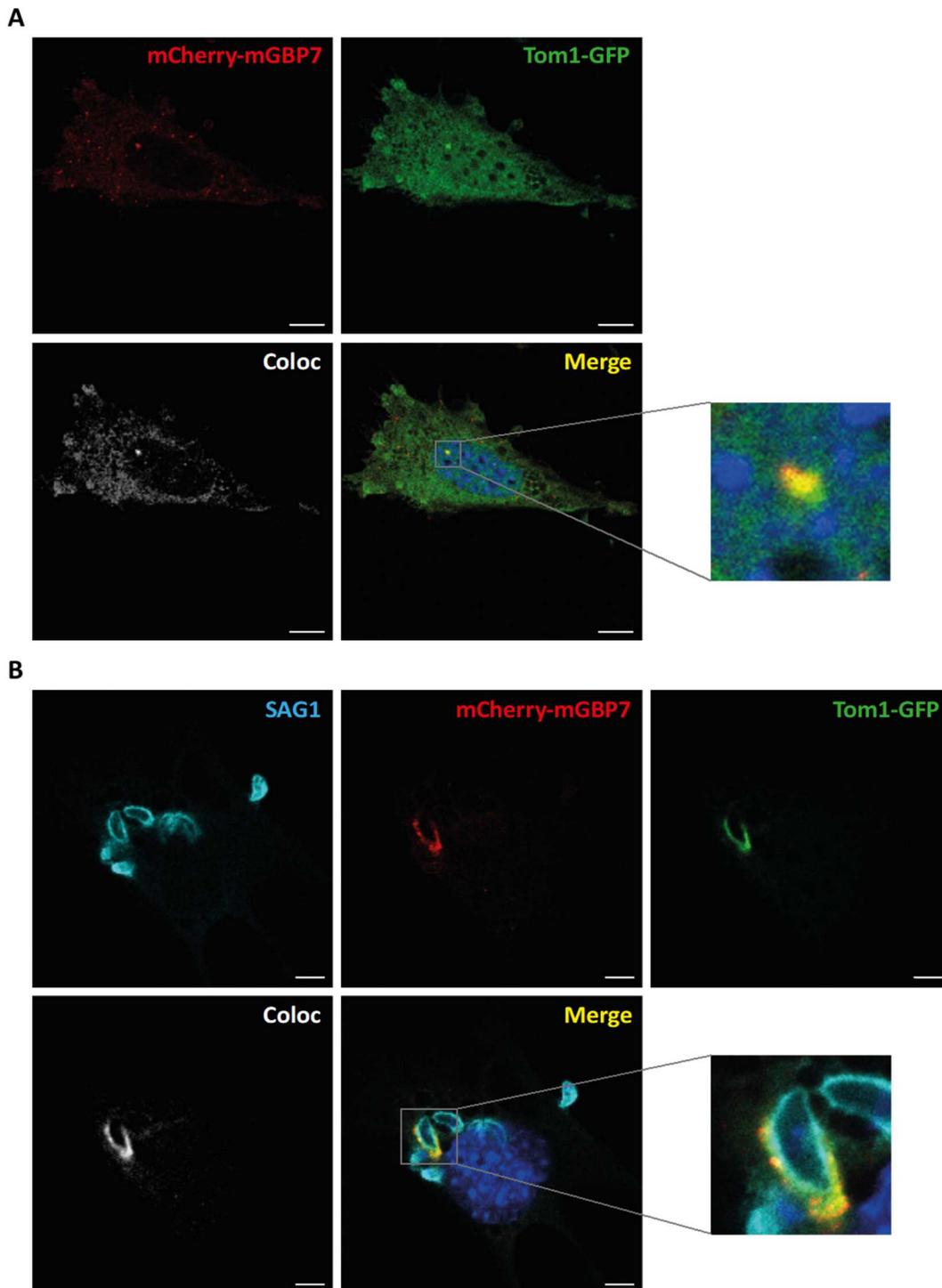


**Abb. 4.21: Subzelluläre Lokalisation von mCherry-mGBP7 und GFP-Rftn1.** Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von mGBP7 mit N-terminalem mCherry- und Rftn1 mit N-terminalem GFP-Tag transduziert in mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs. Die Zellen wurden 16 h vor der Fixierung mit IFN $\gamma$  stimuliert und dann unbehandelt weitere 2,5 h inkubiert **(A)** oder mit einer MOI von 10 mit *T. gondii* **(B)** infiziert (2,5 h). Nach der Fixierung wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Kolokalierende Voxel beider Proteine (Coloc, ImarisColoc Kanal) werden je als weiße Punkte dargestellt. **(A)** Die GTPase mGBP7 bildet distinkte, subzelluläre VLS, wohingegen Rftn1 eine eher homogene Verteilung im Zytosol zeigt. Eine Kolokalisation der beiden Proteine ist nur vereinzelt festzustellen ( $n \geq 3$ ). Maßstabsbalken, 10  $\mu$ m. **(B)** *T. gondii* wurde durch AK-Färbung von SAG1 (mAB gegen TP3) visualisiert (Sekundärantikörper: Alexa Fluor 633, cyan). Rftn1 und mGBP7 kolokalalisieren in geringen Mengen an den *T. gondii* PVs und einem Zell-Zell-Kontakt (Vergrößerung) ( $n \geq 3$ ). Maßstabsbalken, 10  $\mu$ m.



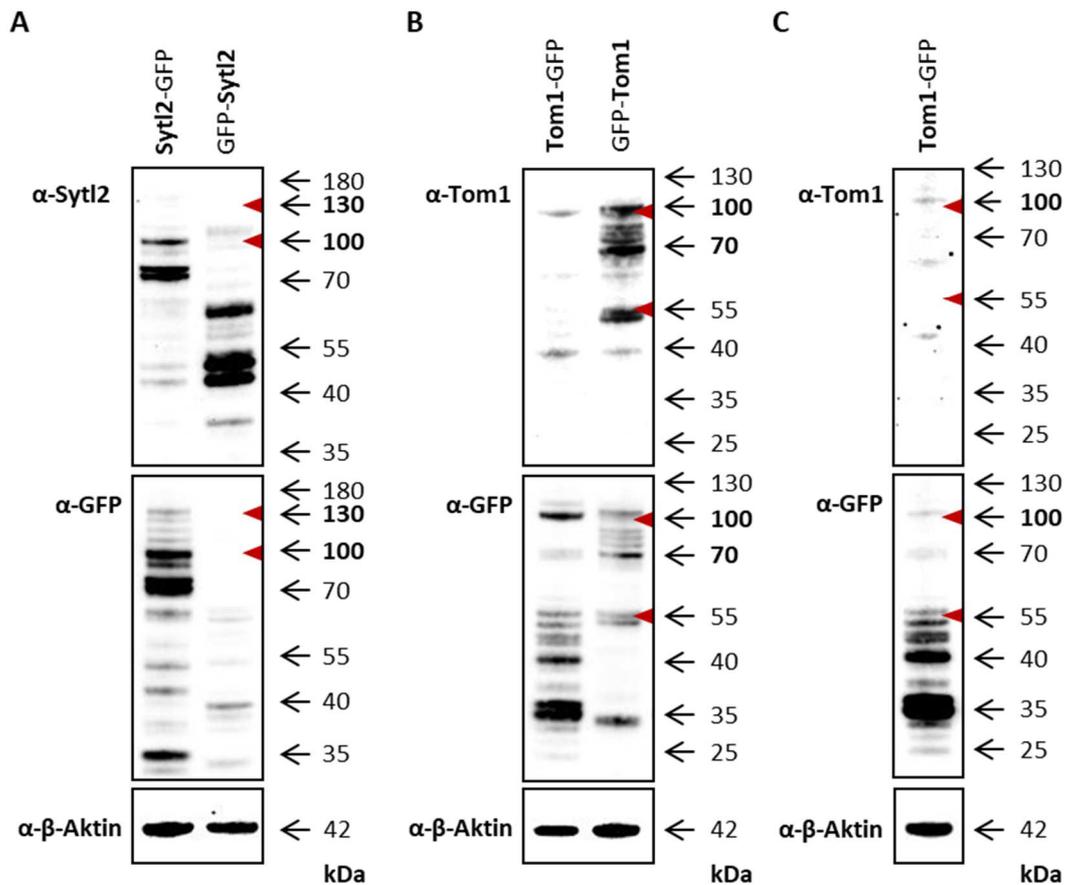
**Abb. 4.22: Subzelluläre Lokalisation von mCherry-mGBP7 und Sytl2-GFP.** Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von mGBP7 mit N-terminalem mCherry- und Sytl2 mit CT GFP-Tag transduziert in mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs. Die Zellen wurden 16 h vor der Fixierung mit IFN $\gamma$  stimuliert und dann unbehandelt weitere 2,5 h inkubiert (**A**) oder mit einer MOI von 10 mit *T. gondii* (**B**) infiziert (2,5 h). Nach der Fixierung wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Kolokalisierende Voxel beider Proteine (Coloc, ImarisColoc Kanal) werden je als weiße Punkte dargestellt. (**A**) mGBP7 bildet distinkte subzelluläre VLS und auch Sytl2 weist eine eher Vesikel-ähnliche Lokalisation mit hoher Konzentration in der Nähe der Zellmembran auf ( $n \geq 3$ ). Durch die homogene Verteilung beider Proteine in der Nähe des Nukleus sind im Coloc-Bild kolokalisierende Voxel zu erkennen. Maßstabsbalken, 10  $\mu$ m. (**B**) *T. gondii* wurde durch AK-Färbung vom Oberflächenmarker SAG1 (mAB gegen TP3) visualisiert (Sekundärantikörper: Alexa Fluor 633, cyan).

Syt12 und mGBP7 zeigen eine ähnliche Lokalisation wie in (A) und kolokalisieren an einer *T. gondii* PV (Vergrößerung) ( $n \geq 3$ ). Maßstabsbalken, 10  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 4.23: Subzelluläre Lokalisation von mCherry-mGBP7 und Tom1-GFP.** Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von mGBP7 mit N-terminalem mCherry-Tag und Tom1 mit CT GFP-Tag in mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs. Die Zellen wurden 16 h vor der Fixierung mit IFN $\gamma$  stimuliert und dann unbehandelt weitere 2,5 h inkubiert (**A**) oder mit einer MOI von 10 mit *T. gondii* (**B**) infiziert (2,5 h). Nach der Fixierung wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Kolokalisierende Voxel beider Proteine (Coloc, ImarisColoc Kanal) werden je als weiße Punkte dargestellt. (**A**) Tom1 weist eine eher homogene Verteilung im Zytosol auf, während mGBP7 distinkte subzelluläre VLS bildet ( $n \geq 3$ ). Aufgrund der homogenen Verteilung von Tom1 sind im Coloc-Bild vermehrt kolokalisierende Voxel zu erkennen. Maßstabsbalken, 10  $\mu\text{m}$ . (**B**) *T. gondii* wurde durch AK-Färbung von SAG1 (mAB gegen TP3) visualisiert (Sekundärantikörper: Alexa Fluor 633,

cyan). Tom1 und mGBP7 kolokalisieren deutlich an der PV eines Parasiten (Vergrößerung) ( $n \geq 3$ ). Maßstabsbalken, 5  $\mu\text{m}$ .



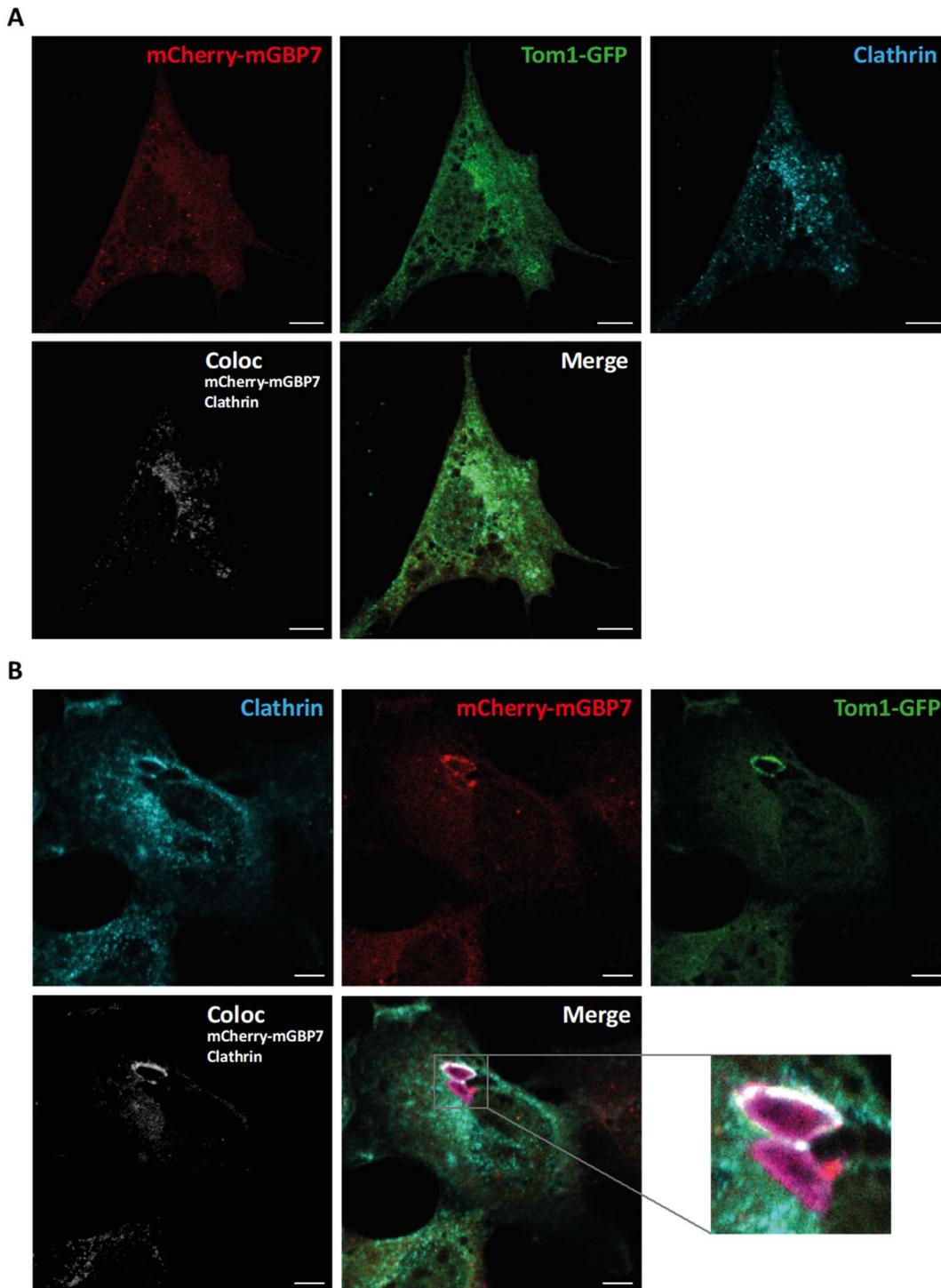
**Abb. 4.24:** Western Blot-Analysen der mit Sytl2, Tom1 und/oder mGBP7 rekonstituierten mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen. Die Zelllysate der rekonstituierten mGBP7<sup>-/-</sup>-Zelllinien wurden auf 4 – 12 %igen SDS-Gelen aufgetrennt und mittels Immunoblot mit dem monoklonalen anti-GFP Antikörper (Klon 7.1 und 13.1, mittlere Panels) und dem monoklonalen anti- $\beta$ -Aktin Antikörper (AC-74, untere Panels) analysiert. (A) Die Zelllysate der mit mCherry-mGBP7 und Sytl2-GFP/GFP-Sytl2 rekonstituierten mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs wurden mittels Immunoblot mit dem polyklonalen anti-Sytl2 Antikörper (AS329-880, oberes Panel) untersucht. (B) Die Zelllysate der mit mCherry-mGBP7 und Tom1-GFP/GFP-Tom1 rekonstituierten mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs wurden mittels Immunoblot mit dem polyklonalen anti-Tom1 Antikörper (Ag11706, oberes Panel) analysiert. (C) Die Zelllysate der mit Tom1-GFP rekonstituierten mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs wurden mittels Immunoblot mit dem polyklonalen anti-Tom1 Antikörper (Ag11706, oberes Panel) analysiert. Inklusive des GFP-Tags hat Sytl2 (104 kDa) eine theoretische Masse von 132 kDa und Tom1 (57 kDa) eine theoretische Masse von 85 kDa. Die jeweils zu erwartenden Bandenhöhen für die molekularen Massen der Proteine mit und ohne GFP-Tag wurden mittels dunkelroter Pfeile markiert.

#### 4.2.7 Detaillierte Analyse der Interaktion von mGBP7 mit Tom1

Zur weiteren Analyse der Interaktion von mGBP7 mit Tom1 wurde in weiteren Kolokalisationsstudien parallel die Lokalisation des Strukturproteins Clathrin untersucht. Clathrin ist ein Protein, das an der Einstülpung von Membranen und der Vesikelbildung beteiligt ist und bereits in vorhergegangenen Studien als Interaktionspartner von Tom1 identifiziert werden konnte [239-241]. Hierfür wurden erneut Konfokalmikroskopie-Analysen mit den mit mCherry-mGBP7 und Tom1-GFP transduzierten mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen durchgeführt. Um neben den beiden Fusionsproteinen auch Clathrin visualisieren zu

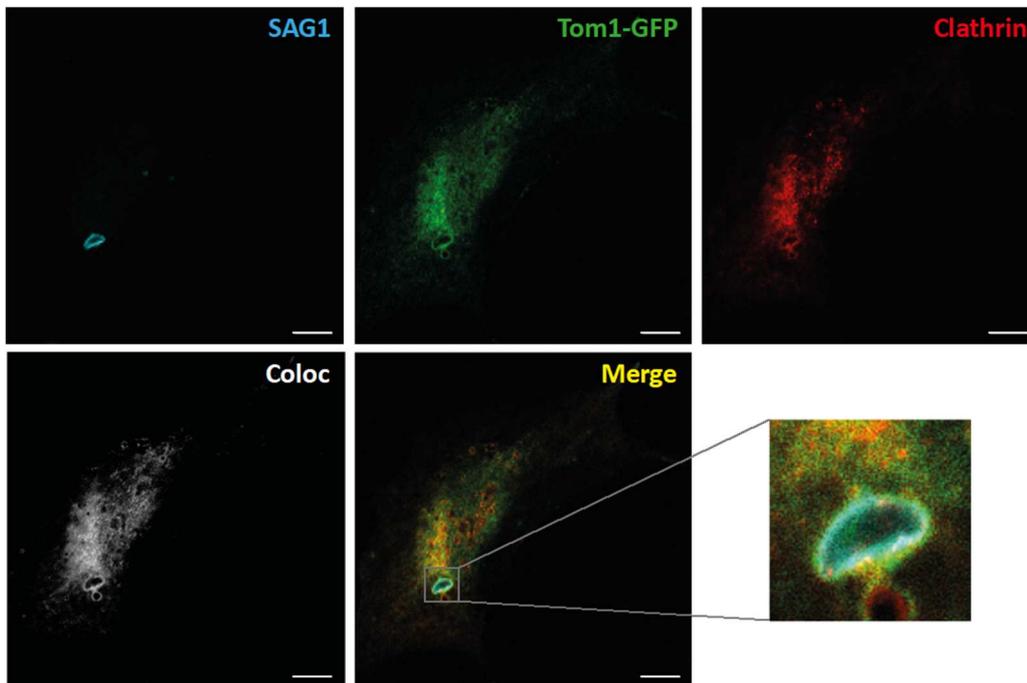
können, wurde nach dem Fixieren der Zellen anstelle der DAPI-Färbung der Zellkerne eine Immunfluoreszenz-Färbung mit einem Clathrin Antikörper vorgenommen. Für Clathrin und Tom1 konnte mittels der Konfokalmikroskopie-Aufnahmen bereits in den uninfizierten Zellen eine eindeutige Kolokalisation ausgemacht werden (Abb. 4.25A). Die Analyse der *T. gondii*-infizierten Zellen ließ zudem erkennen, dass nicht nur Tom1 und mGBP7 sondern auch Clathrin zu denselben Regionen von einzelnen *T. gondii* PVs rekrutiert (*Merge*, Abb. 4.25B und S9B). Dies weist erneut auf eine hohe Spezifität der Tom1-mGBP7-Interaktion hin und deutet an, dass auch Clathrin eine Rolle in der Immunabwehr gegen *T. gondii* spielen könnte. Um zu evaluieren, ob Tom1 auch in der Abwesenheit von mGBP7 zum Parasiten rekrutieren kann, wurden mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs allein mit Tom1-GFP transduziert und die Lokalisation von Tom1 wie zuvor anhand fixierter Zellen analysiert. Die Analysen zeigten, dass das Tom1-Fusionsprotein in Abwesenheit von mGBP7 und einer IFN $\gamma$ -Stimulation keine Akkumulation an *T. gondii* PVs aufweist (Abb. S10). In IFN $\gamma$ -stimulierten Zellen konnte dagegen vereinzelt eine geringe Rekrutierung von Tom1-GFP an die PV eines Parasiten beobachtet werden (vgl. Abb. 4.26). Die Tom1-Akkumulation an *T. gondii* PVs scheint demnach, gemäß diesen ersten Ergebnissen, durch die Abwesenheit von mGBP7 nicht vollständig verhindert zu werden. Für eine eindeutige Schlussfolgerung müssten in Folgestudien Quantifizierungen für die Tom1-Rekrutierung in den allein mit Tom1 und den mit Tom1 und mGBP7 rekonstituierten Zellen vorgenommen werden. Zur Überprüfung des Expressionslevels und der Integrität von Tom1-GFP wurden auch diesmal anti-Tom1- und anti-GFP-WB-Analysen durchgeführt (Abb. 4.24C). Die Bandenmuster beider Blots zeigten hier jeweils ein ähnliches Muster, wie das der mit Tom1-GFP und mCherry-mGBP7 rekonstituierten Zellen (vgl. Abb. 4.24B). Bei dieser Analyse konnte vermutlich sogar eine noch geringere Menge an *full length* exprimiertem Tom1 detektiert werden, was ebenfalls eine Erklärung für die verringerte Akkumulation von Tom1 an der *T. gondii* PV darstellen könnte.

Zusammenfassend konnten diese weiterführenden Analysen anschaulich verdeutlichen, dass nicht nur Tom1, sondern auch Clathrin an denselben Arealen von *T. gondii* PVs akkumuliert wie mGBP7. Eine Aussage darüber, ob die Rekrutierung von Tom1 durch die Abwesenheit von mGBP7 beeinflusst wird, ist anhand der bisher vorliegenden Daten nicht eindeutig zu treffen.



**Abb. 4.25: Subzelluläre Lokalisation von mCherry-mGBP7, Tom1-GFP und Clathrin bei einer Infektion mit *T. gondii*.** Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von Clathrin, mGBP7 mit N-terminalem mCherry- und Tom1 mit CT GFP-Tag in transduzierten mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs. Die Zellen wurden für 16 h mit IFN $\gamma$  stimuliert und dann unbehandelt weitere 2,5 h inkubiert (**A**) oder mit einer MOI von 10 mit *T. gondii* (**B**) infiziert (2,5 h). Kolocalisierende Voxel von mCherry-mGBP7 und Clathrin (Coloc, ImarisColoc Kanal) werden jeweils als weiße Punkte dargestellt. Nach der Fixierung wurde Clathrin durch AK-Färbung (Sekundärantikörper: Alexa Fluor 405, cyan) visualisiert. (**A**) Clathrin zeigt eine distinkte Akkumulation und bildet eine teils netzartige Struktur im Zytosol aus. Tom1 weist eine eher homogene Verteilung im Zytosol auf und ist verstärkt in Bereichen mit hoher Clathrin-Dichte lokalisiert (n $\geq$ 3). Maßstabsbalken, 10  $\mu$ m. (**B**) Nach der Fixierung wurde *T. gondii* SAG1 mittels AK-Färbung (mAB gegen

TP3; Sekundärantikörper: Alexa Fluor 633, violett) visualisiert. Clathrin und mGBP7 kolokalisieren an der PV eines Parasiten ( $n \geq 3$ ). Maßstabsbalken, 5  $\mu\text{m}$ .



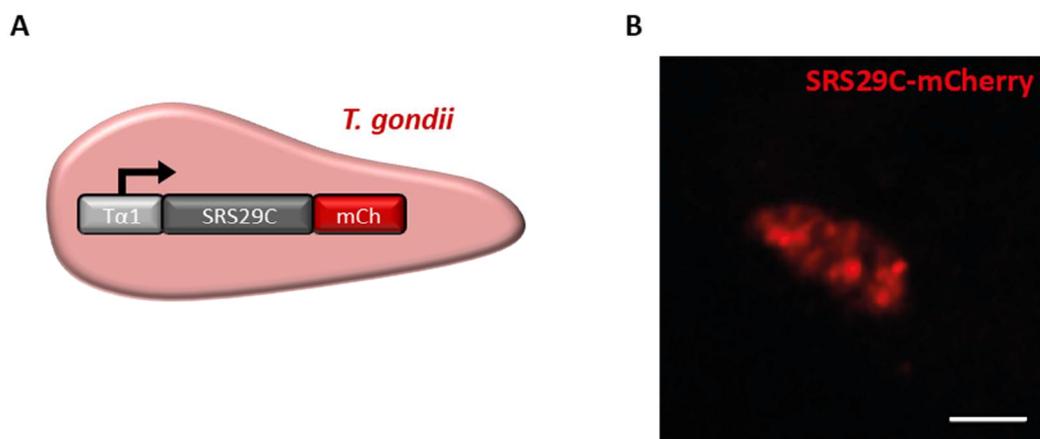
**Abb. 4.26: Subzelluläre Lokalisation von Tom1-GFP und Clathrin in  $mGBP7^{-/-}$ -Zellen bei einer Infektion mit *T. gondii*.** Konfokalmikroskopie-Aufnahme von Clathrin und Tom1 mit CT GFP-Tag in transduzierten  $mGBP7^{-/-}$  MEFs. Die Zellen wurden für 16 h mit IFN $\gamma$  stimuliert und anschließend mit einer MOI von 10 mit *T. gondii* infiziert (2,5 h). Nach der Fixierung wurde *T. gondii* durch AK-Färbung des SAG1 Oberflächenmarkers (mAB gegen TP3; Sekundärantikörper: Alexa Fluor 633, violett) und Clathrin durch AK-Färbung des C-Terminus (AS1650 bis C-Terminus; Sekundärantikörper: Alexa Fluor 405, cyan) visualisiert. Kolokalisierende Voxel von Tom1-GFP und Clathrin (Coloc, ImarisColoc Kanal) werden je als weiße Punkte dargestellt. Tom1 und Clathrin zeigten eine vergleichbar starke Kolokalisation im Zytosol, aber nur eine schwache Akkumulation/Kolokalisation an der *T. gondii* PV ( $n \geq 3$ ). Maßstabsbalken, 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.8 Generierung von SRS29C-mCherry exprimierenden *T. gondii*

Neben Wirtszellproteinen wurde auch das *T. gondii*-Protein SRS29C (engl.: *SAG-related sequence SRS29C*) in den Ko-IP-MS-Experimenten als potentieller Interaktionspartner von mGBP7 identifiziert (Abb. 4.16B). SRS29C ist ein Oberflächenprotein von *T. gondii* Tachyzoiten (u. a. von Typ-II ME49), welches in einer Studie in 2012 als negativer Regulator der Virulenz identifiziert werden konnte [242, 243]. Zur näheren Analysen und für den Nachweis einer möglichen Interaktion von mGBP7 und SRS29C, wurde im Folgenden ein SRS29C-mCherry Fusionskonstrukt kloniert und mittels Elektroporation in ME49 *T. gondii* Tachyzoiten transfiziert (Abb. 4.27A). Die Analyse von fixierten, SRS29C-mCherry exprimierenden ME49 *T. gondii* mittels Konfokalmikroskopie konnte zeigen, dass das Fusionsprotein vom Parasiten exprimiert wird und eine distinkte Lokalisation aufweist (Abb. 4.27B). Zur Überprüfung des Expressionslevels sowie der Integrität von SRS29C wurden anti-mCherry- und anti-SRS29C-WB-Analysen von *T. gondii*-Lysaten durchgeführt (Abb. S11). Mit dem im Rahmen dieser Arbeit generierten, polyklonalen anti-SRS29C Antikörper konnte sowohl in den nicht transduzierten als auch in den mit SRS29C-mCherry transduzierten *T. gondii* ME49 Lysaten eine Bande auf Höhe der theoretischen Masse von SRS29C (39,1 kDa) und SRS29C-mCherry (65,7 kDa) detektiert werden (Abb.

S11A). Auch in der anti-HA Ko-IP-Probe konnte die zu erwartende Bande auf Laufhöhe von SRS29C ermittelt werden (Abb. S11A). Da die Bande bei ca. 65 kDa jedoch auch im Lysat der nicht transduzierten *T. gondii* erhalten wurde, ist hier keine eindeutige Aussage darüber möglich, ob tatsächlich SRS29C-mCherry detektiert wurde. Zudem konnten auch im anti-mCherry-WB keine Banden auf der Höhe des mCherry-Fusionsproteins detektiert werden (Abb. S11B). Eine allgemeine Problematik stellte bei der WB-Analyse die Spezifität sowie die Affinität beider Antikörper dar. Mit dem anti-SRS29C Antikörper konnten sowohl im HS27 als auch im 3T3 Zelllysat unspezifische Banden detektiert werden (Abb. S11A). Weiterhin wurde mit dem anti-mCherry Antikörper im Lysat der mCherry exprimierenden 3T3 Zellen nur eine sehr schwache Bande auf Höhe des mCherry Proteins (26,6 kDa) erhalten (Abb. S11B). Wesentlich stärkere Banden wurden dagegen für den HA-Tag, d. h. die Hämagglutinin Domänen (HA<sub>0</sub>/HA<sub>1</sub>/HA<sub>2</sub>), in der anti-HA Ko-IP-Probe detektiert. Insgesamt ist in diesem Zusammenhang weiter zu erwähnen, dass sich die Antibiotika-Selektion der transduzierten *T. gondii* als problematisch erwies. Der Nachweis SRS29C-mCherry exprimierender *T. gondii* war nur für einen kurzen Zeitraum nach der Elektroporation mittels Konfokalmikroskopie möglich. Für weitere Experimente sollte demnach kurz nach der Elektroporation eine Selektion mittels Vereinzelung/Klonierung durchgeführt werden.

Insgesamt konnte eine Methode zur Elektroporation von *T. gondii* ME49 etabliert werden. Um stabil SRS29C-mCherry exprimierende *T. gondii* generieren und nachweisen zu können, wird für Folgeexperimente eine Klonierungsmethode vorgeschlagen.



**Abb. 4.27: Generierung von SRS29C-mCherry exprimierenden *T. gondii*.** (A) Schematische Darstellung der mittels Elektroporation generierten *T. gondii* Mutanten. Fluoreszierendes SRS29C-mCherry wird unter Kontrolle des Tα1 Tubulin Promoters exprimiert. (B) Die Transfektion von ME49 *T. gondii* mit SRS29C-mCherry erfolgte mittels Elektroporation wie in Abschnitt 3.1.7 beschrieben. Nach Antibiotika-Selektion der SRS29C-mCherry exprimierenden *T. gondii* wurden mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs infiziert und nach 2,5 h wie in Abschnitt 3.1.6 beschrieben fixiert. Die Airyscan-Aufnahme des Parasiten zeigt ein distinktes Verteilungsmuster des exprimierten SRS29C-Fusionsproteins. Maßstabsbalken, 2 µm.



## 5 Diskussion

GBPs sind Schlüsselenzyme in der Wirtsabwehr gegen Bakterien, Viren und Protozoen [158, 244]. Sie schützen den Wirt in dem sie mit intrazellulären Mikroben, ihren Replikationsnischen wie Vakuolen oder im Fall von Viren mit ihrem Replikationskomplex assoziieren. Durch diese Assoziation werden die Pathogene in ihrer Replikation restringiert [158, 244]. Die exakten molekularen Mechanismen dieser antimikrobiellen Funktion von GBPs sind noch nicht vollständig verstanden. Bisher konnten insbesondere hGBP1, hGBP5 und mGBP2, die allesamt ein C-terminales CaaX-Motif besitzen, bezüglich ihrer biochemischen und strukturellen Eigenschaften im Detail analysiert werden [163, 165, 170, 172, 180, 225]. Zudem wurden bisher hauptsächlich die zellulären Interaktionen von GBPs mit einem CaaX-Isoprenylierungsmotif (u. a. hGBP1, hGBP5, mGBP1 und mGBP2) untersucht, um aufzuklären welche Prozesse zur Inhibierung der Pathogene führen könnten [122, 152, 158, 165, 177, 197, 213]. Für mGBP7, ein GBP ohne ein solches Motif für Membranassoziationen, konnte beispielsweise noch nicht ermittelt werden, welche Mechanismen es dem Protein ermöglichen nicht nur an der PVM von *T. gondii* sondern auch direkt an der Parasitenmembran selbst zu akkumulieren [208]. Weiterhin fehlen bisher Daten zu den biochemischen und strukturellen Charakteristika dieser GTPase, die ebenfalls relevante Einblicke in die grundlegenden Prozesse der mGBP7-vermittelten Immunabwehr ermöglichen würden. Zudem ist unbekannt, ob mGBPs weitere Effektormoleküle rekrutieren und welche Rolle diese bei der Pathogenabwehr spielen. In dieser Arbeit erfolgte daher eine detaillierte biochemische und strukturelle Charakterisierung von mGBP7. Zudem wurden durch die Identifikation von mit mGBP7-interagierenden Proteinen erste Einblicke in die zellulären Interaktionen und die Abwehrmechanismen von mGBP7 im Rahmen von *T. gondii*-Infektionen gewährt.

### 5.1 Biochemische Charakterisierung von mGBP7

In einer vorhergegangenen Studie konnte bereits die Biochemie von mGBP2, dem putativen Ortholog von hGBP1, detailliert analysiert werden [172]. Die Studie konnte zeigen, dass verschiedene Mutationen individuelle Defekte in der Bindung von Nukleotiden, der GTPase-Aktivität und der Oligomerisierung von mGBP2 bewirken. In dieser Arbeit wurde nun das erste Mal die erfolgreiche Aufreinigung und biochemische Charakterisierung von mGBP7 beschrieben. Die Charakterisierung von mGBP7 war von besonderem Interesse, da neben der Akkumulation von mGBP7 am Parasiten in Experimenten mit mGBP7<sup>-/-</sup>-Mäusen ein starker Phänotyp bei Infektionen mit ME49 *T. gondii* beschrieben worden war [208]. Bei Infektion der mGBP7<sup>-/-</sup>-Mäuse mit 40 Zysten i. p. wurde ähnlich wie bei IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup>-Mäusen bereits ca. an Tag 10 p. i. eine Mortalitätsrate von 100 % beobachtet. Zudem fiel im Zug des AS-Sequenzalignments auf, dass mGBP7 zwar kein CaaX-Motif besitzt, aber mit 638 AS über einen verlängerten C-Terminus verfügt und die wohl größte GTPase der mGBP-Familie darstellt [226]. Weiterhin sollte analysiert werden, ob eventuell bestimmte Unterschiede von mGBP7 gegenüber mGBP2 in der Affinität zu GTP, der GTP-Hydrolyse, der Oligomerisierung oder der Domänenstruktur Aufschlüsse über die individuellen biologischen Funktionen im Wirt geben könnten. Für mGBP2<sup>-/-</sup>-Mäuse konnte zuvor in *T. gondii*-Infektionsexperimenten unter vergleichbaren Versuchsbedingungen eine Mortalitätsrate von ca. 70 % mit einem biphasischen Sterbeverlauf beschrieben werden [197].

Die GTP-Affinitätsmessungen ergaben, dass mGBP7 eine zweifach höhere Affinität für GTP ( $K_D$  von 0,22  $\mu\text{M}$ ) als mGBP2 und eine etwa fünffach höhere Affinität für GTP als hGBP1 aufweist [163, 168, 172, 245]. Demzufolge kann mGBP7 unter physiologischen intrazellulären Bedingungen mit  $470 \pm 220 \mu\text{M}$  GTP das Nukleotid effizient binden und hydrolysieren [172, 246]. Eine Erklärung für diese im Vergleich zu hGBP1 und mGBP2 leicht erhöhte GTP-Affinität von mGBP7 könnte möglicherweise auf Unterschiede in der GTPase-Domäne und/oder minimale Konformationsänderungen zurückzuführen sein. Ein Vergleich der GTP-Bindungsmotive zeigt, dass mGBP7 im Gegensatz zu den beiden anderen GBPs, die ein „TLRD“-G4-Bindemotiv besitzen, über ein „TVRD“-Motiv verfügt [155, 168]. Diese Variation im G4-Motiv führt zu einem konservativen Austausch aliphatischer AS (L/V). Eine Mutagenese-Studie könnte hier hilfreich sein, um zu analysieren, ob dieser Unterschied Auswirkungen auf die GTP-Bindungsaffinität besitzt. Allgemein liegt die Substrataffinität von mGBP7 mit 0,22 mM GTP im zu erwartenden Bereich für Mitglieder der Dynamin-Superfamilie [168]. Gleichzeitig ist sie damit um einiges niedriger als die GTP-Bindungsaffinitäten von Mitgliedern der kleinen GTPase-Familien wie der Ras- ( $K_D = \text{ca. } 80 \text{ pM}$ ) oder der  $G_\alpha$ -Proteine ( $K_D = \text{ca. } 50 \text{ pM}$ ) [168, 247, 248]. Zuvor wurde demonstriert, dass die GTP-Bindungsaffinität von hGBP1 und mGBP2 durch eine Punktmutation an der AS-Position 51 (K51A) stark beeinträchtigt wird (ca. 50- vs. 100-fach) [163, 172]. Die Mutation führt zu einem Austausch von einem bei physiologischem pH-Wert positiv geladenen Lysin (K) zum neutral geladenen Alanin (A). Für K51A mGBP7 scheint dieser Effekt sogar noch stärker ausgeprägt, da keine Bindung von mGBP7 an das schwer hydrolysierbare GTP-Analogon GTP $\gamma$ S gemessen werden konnte (Abb. 4.5). Dieses Ergebnis bestätigt demnach die kritische Funktion von K51 im P-Loop bzw. dem G1-Motiv für die Nukleotid-Bindung.

Die Messungen zur Analyse der GTPase-Aktivität wurden zunächst bei konstanter Proteinkonzentration durchgeführt, um die optimale Nukleotidkonzentration zu ermitteln bei der das Enzym gesättigt ist (Abb. 4.4A-C). Im Folgenden wurde dann bei konstanter Nukleotidkonzentration die Proteinmenge variiert, um die Proteinkonzentration zu definieren, bei der 100 % Enzymaktivität erreicht wird (Abb. 4.4D). Die GTPase-Messungen, die schließlich bei der optimalen mGBP7-Konzentration durchgeführt wurden, ergaben bei der Auswertung nach Michaelis-Menten eine apparente  $v_{\text{max, app}}$  von  $278,9 \pm 9,8 \mu\text{M GTP}$  und eine apparente  $K_{\text{M, app}}$  von  $207,0 \pm 32,3 \mu\text{M GTP}$  (Abb. 4.4C, WT<sub>0.83</sub>). Bei der Auftragung der Enzymaktivität gegen die Proteinkonzentration konnte darüber hinaus eine sigmoidale Bindungskurve erhalten werden, was auf eine positive Kooperativität der GTP-Hydrolyse hinweist (Abb. 4.4D). Eine positive Kooperativität meint in diesem Fall, dass die Hydrolyse von GTP durch Dimerisierung des Proteins verstärkt wird. Diese Beobachtung konnte bereits für mGBP2 und hGBP1 gemacht werden [166, 172]. Eine weitere charakteristische Eigenschaft der GBPs ist eine hohe intrinsische GTPase-Aktivität. Sie besitzen in der Regel eine Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  zwischen 2 bis  $100 \text{ min}^{-1}$  bzw. für mGBP2 konnte in einer vorangegangenen Studie mit einer  $k_{\text{cat}}$  von  $102 \text{ min}^{-1}$  bereits eine vergleichbar hohe Wechselzahl definiert werden [172]. Die  $k_{\text{cat, app}}$  von mGBP7 beträgt  $20 \text{ min}^{-1}$  (Tab. 4.1). Sie ist demnach fünffach geringer als die von mGBP2 oder hGBP1 ( $k_{\text{cat}} = 95 \text{ min}^{-1}$ ), liegt aber in einem vergleichbaren Bereich zu der von hGBP2 ( $k_{\text{cat}} = 23 \text{ min}^{-1}$ ) [163, 172]. Der direkte Vergleich deutet demnach an, da für mGBP7 eine zweifach höhere GTP-Bindungsaffinität gemessen

und für mGBP2 eine fünffach höhere  $k_{\text{cat}}$  nachgewiesen wurde, dass die insgesamt katalytische Effizienz der beiden mGBPs ungefähr im selben Bereich liegen wird.

Den Ergebnissen der GTPase-Aktivitätsmessungen nach können GMP und GDP nur in zu vernachlässigbaren Mengen als Substrat für die Hydrolyse dienen (Abb. 4.4A-B). Die MALDI-TOF-MS Ergebnisse zeigten darüber hinaus, dass GTP von mGBP7 sowohl zu GDP und als auch weiter zu GMP hydrolysiert wird (Abb. 4.6). Zusammen deuten diese Ergebnisse auf einen zweistufigen konsekutiven GTP-Hydrolysemechanismus von mGBP7 hin. Unterstützt wird diese Hypothese von einer Studie, die demonstrieren konnte, dass die hGBP1-vermittelte GTP-Hydrolyse über zwei aufeinanderfolgenden Abspaltungen einzelner Phosphatgruppen und nicht über eine einzelne Abspaltung von Pyrophosphat erfolgt [227]. Für hGBP1 und mGBP2 konnte zudem nachgewiesen werden, dass GMP das Hauptreaktionsprodukt (85 – 90 % vs. 74 % GMP) der GTP-Hydrolyse darstellt [163, 172, 249]. Murines und humanes GBP5 unterscheiden sich in dieser Eigenschaft von mGBP7, hGBP1 und mGBP2, da sie die Hydrolyse von GTP nur zu GDP und nicht weiter zu GMP katalysieren [152, 165]. Die besondere Eigenschaft von einigen GBPs, GTP zu einem je individuellen Verhältnis aus GDP und GMP zu hydrolysieren ist außergewöhnlich und wirft Fragen nach ihrer physiologischen Funktion auf. Beispielsweise stellt sich die Frage, ob GBPs durch die zusätzliche, aus dem zweiten Hydrolyseschritt gewonnene Energie dazu in der Lage sind intrazelluläre Pathogene effektiver und/oder schneller zu eliminieren oder auch, ob die GMP-Produktion für die Immunabwehr der Wirtszellen nicht nur vorteilhaft, sondern vielleicht sogar notwendig ist. Dies sind Fragen, die es gilt in der Zukunft zu beantworten, um die komplexe Rolle von GBPs in der Wirtsabwehr vollständig zu durchleuchten.

Die MALS-Ergebnisse zeigen, dass mGBP7 ein transientes Dimer bildet und dass diese Dimerisierung nicht durch das Vorhandensein des schwer hydrolysierbaren GTP-Analogons GTP $\gamma$ S beeinflusst wird (Abb. 4.7). Hier zeigt sich demnach ein deutlicher Unterschied zu mGBP2. Für mGBP2 konnte in Gelfiltrationsstudien demonstriert werden, dass die GTPase in der Gegenwart von GTP $\gamma$ S als Dimer von der Säule eluiert, während in der Abwesenheit von Nukleotiden nur das mGBP2 Monomer detektiert wurde [172]. Demzufolge bleibt festzuhalten, dass mGBP7 und mGBP2 deutliche Unterschiede in ihren Multimerisierungseigenschaften besitzen. Diese Ergebnisse illustrieren, dass die GBPs trotz ihrer hohen Sequenzidentität Unterschiede in ihrem Oligomerisierungsverhalten aufweisen, die noch weitere Forschungsarbeiten erfordern. Allerdings ist auch zu erwähnen, dass ein separierter mGBP7 Dimer Peak nur erhalten werden konnte, wenn hohe Proteinkonzentrationen (12 mg/mL) für die SEC-Analyse verwendet wurden (Abb. 4.7C-D). Andernfalls zeigte sich nur ein breiter Peak, der voraussichtlich ein Gemisch aus mGBP7 Monomer und Dimer enthielt (Abb. 4.7A-B). Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass das mGBP7 Protein und das Nukleotid GTP $\gamma$ S während des SEC-Laufs voneinander getrennt wurden und deshalb kein größerer Dimer-Anteil detektiert werden konnte. Was hingegen ausgeschlossen werden kann ist, dass das Dimer auf Grund unspezifischer Disulfidbrückenbildung erhalten wurde, da in der SDS-PAGE-Analyse mit und ohne Zusatz von Reduktionsmittel nur das mGBP7 Monomer detektiert wurde (Abb. S1). Insgesamt zeigen die MALS-Ergebnisse, dass die mGBP7 Dimerbildung transient ist und der dimere Zustand während der GTP-Hydrolyse nur von kurzer Dauer ist.

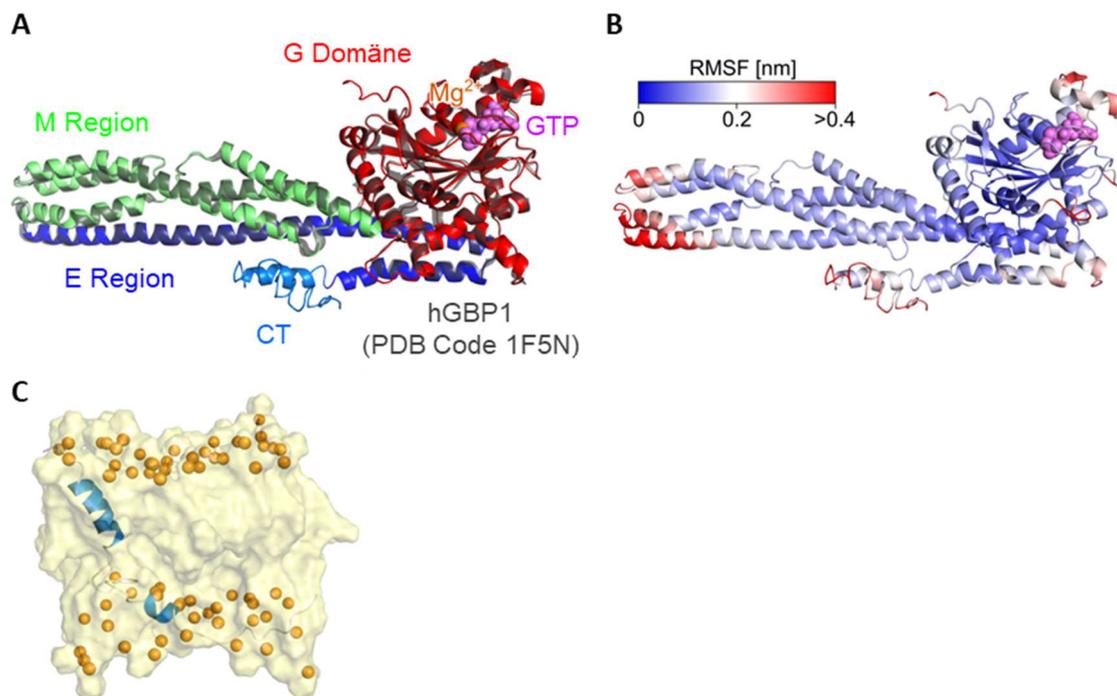
Um die Oligomerisierung von mGBP7 noch mehr im Detail zu analysieren, wurde zudem die Methode der nativen Gelelektrophorese verwendet. Zuvor wurde hierfür ermittelt, ob die Enzymaktivität von mGBP7 durch  $\gamma$ -Phosphatanaloga wie Orthovanadat,  $\text{AlF}_x$  oder  $\text{BeF}_x$  im Komplex mit GDP nach dem ersten Hydrolyseschritt im Grund- bzw. Übergangszustand inhibiert werden kann. Bisher konnte nur für hGBP1 und mGBP2 gezeigt werden, dass diese durch die Bindung von  $\text{GDP} \cdot \text{AlF}_x$  in einem Übergangszustand verbleiben [166, 172]. Diese Arbeit demonstriert, dass die GTPase-Aktivität von GDP-gebundenem mGBP7 nicht nur durch  $\text{AlF}_x$ , sondern ebenfalls durch Orthovanadat und  $\text{BeF}_x$  inhibiert werden kann. Zudem zeigen die  $IC_{50}$ -Werte, dass Orthovanadat mit einem ca. 12-fach niedrigeren  $IC_{50}$  einen potenteren Inhibitor als die beiden anderen analysierten  $\gamma$ -Phosphatanaloga darstellt (vgl. Tab. 4.2). Die Beobachtung, dass mGBP7 durch  $\text{GDP} \cdot \text{AlF}_x$  inhibiert wird zeigt Parallelen zu der Familie der  $G_\alpha$ -Proteine auf. Diese sind in der Gegenwart von ihren entsprechenden GAPs dazu in der Lage mit  $\text{GDP} \cdot \text{AlF}_x$  zu interagieren [250, 251]. Vergleichbar zu den MALS-Ergebnissen konnte auch in der nativen Gelelektrophorese bei Inkubation von WT und K51A mGBP7 mit GTP und einem Überschuss der verschiedenen  $\gamma$ -Phosphatanaloga nahezu kein Effekt auf die Oligomerisierung ausgemacht werden (Abb. 4.9A). Vielmehr demonstrieren die Ergebnisse, dass auch bei geringen Proteinkonzentrationen immer ein gewisser prozentualer Anteil (ca. 10 %) an mGBP7 als Dimer vorliegt (Abb. 4.9B). Demzufolge scheint die GTPase-Aktivität von mGBP7 im Gegensatz zu mGBP2 keine Grundvoraussetzung für die Dimerisierung des Proteins darzustellen [172].

## 5.2 Strukturelle Charakterisierung von mGBP7

Durch die Arbeitsgruppe Strodel (Physikalische Biologie, Computational Biochemistry Group, HHU, Jennifer Loschwitz) konnten in parallelen Arbeiten I-TASSER Homologiemodelle für mGBP7 generiert werden. Diese gaben zu erkennen, dass die GTPase im Vergleich zu hGBP1 einen um 49 AS verlängerten CT-Part besitzt (vgl. Abb. 5.1A) [226]. Weiter zeigte die Homologiemodellierung, dass dieser CT-Part verschiedene helikale und/oder Random Coil Strukturen annimmt und einen der flexibelsten Parts von mGBP7 darstellt (Abb. 5.1B) [226]. MD-Simulationen lieferten zudem den Nachweis, dass die 49 CT AS von mGBP7 in Lösung nicht stabil sind, da sie sich während der analysierten 100 ns begannen zu entfalten [226]. Dagegen wurde vorausgesagt, dass der CT-Part stabil ist, wenn er isoliert in eine Membran inseriert wird (Abb. 5.1B) [226].

Um diese Hypothese zu überprüfen wurde in Arbeiten von Nora Steffens (AG Pfeffer, Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, HHU) die subzelluläre Lokalisation von WT mGBP7 und einer mGBP7-Trunkationsmutante ohne diese 49 CT AS (mGBP7 $\Delta 49$ ) in mGBP7 $^{-/-}$ -Zellen analysiert [226, 252]. Für WT mGBP7 konnte, wie zuvor schon für mGBP2 [172], die für GBPs typische Lokalisation in VLS heterogener Größe im Zytosol beobachtet werden. Das trunkierte mGBP7 $\Delta 49$  war im Gegensatz dazu nicht in der Lage in VLS zu lokalisieren und zeigte eine durchweg homogene zytosolische Verteilung [226, 252]. Für mGBP2 konnte zuvor ermittelt werden, dass die Lokalisation in VLS von der Isoprenylierung des CaaX-Motivs abhängt [192]. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnte auch für alle humanen GBPs mit CaaX-Motiv demonstriert werden, dass diese *in vivo* prenyliert werden und dass die Isoprenylierung für die Assoziation mit Membranen erforderlich ist [253]. Daneben fiel auf, dass die CaaX-Sequenzen von GBP1, -2 und -5 konserviert sind, was auf eine wichtige biologische

Funktion hindeutet und die Frage aufwirft, ob GBPs ohne CaaX-Box zur Kompensation für dieses Bindungsmotiv andere Strukturen für die Wechselwirkung mit Membranen entwickelt haben. Hierzu wurde von Nora Steffens das Rekrutierungspotential von mGBP7<sup>Δ49</sup> zur *T. gondii* PV untersucht [226, 252], da WT-mGBP7 sowie weitere mGBPs (mGBP1, -2, -3, -6, -9 und -10) dazu in der Lage sind an der PV des Parasiten zu akkumulieren [154, 194]. Interessanterweise war nahezu keine Translokation von mGBP7<sup>Δ49</sup> an die PV von *T. gondii* nachweisbar [226, 252]. Diese Ergebnisse bekräftigten demnach die Ergebnisse der MD-Simulationen und weisen stark auf eine nicht redundante Funktion der 49 CT AS von mGBP7 für die korrekte Proteinlokalisierung in Zellen sowie die Assoziation mit Membranen hin [226, 252].



**Abb. 5.1: Homologiemodell für mGBP7 und ein Modell für den in die Membran insertierten CT-Part.** (A) Das mGBP7-Homologiemodell, welches mit I-TASSER (C-Score -0.18) generiert wurde, ist als Cartoon gezeigt. Das GTP-Molekül (violett) und das Mg<sup>2+</sup>-Ion (orange) sind als Sphären dargestellt. Zudem sind die G-Domäne (rot), die M-Region (grün), die E-Region (blau) und der 49 Aminosäuren (AS) umfassende CT-Part (hellblau) von mGBP7 farblich hervorgehoben. Die Kristallstruktur von hGBP1 (PDB Code 1F5N), die als eines der Templates diente, ist in Grau über das Modell gelegt. Der RMSD-Wert zwischen den beiden Strukturen beträgt 0.5 Å. (B) Die Proteinflexibilität (RMSF-Werte der C<sub>α</sub>-Atome während der MD-Simulation) ist auf das mGBP7 Modell projiziert. Konformativ starre AS sind in Blau und flexible AS sind in Rot, entsprechend der Farbskala über dem Modell, dargestellt. (C) Modell für die Insertion der AS 589-620 von mGBP7 (CT-Part) in eine POPC-Membran, die am Ende einer 250 ns MD-Simulation erhalten wurde. Die AS, die sich in einer helikalen Konformation befinden, sind in Blau, Coil- und Turn-Konformationen sind in Grau dargestellt. Die Membran ist als transparente gelbe Fläche illustriert. Die Kopfgruppen von Phosphatidylcholin sind in Orange gezeigt. Die Illustration wurde von Jennifer Loschwitz (Physikalische Biologie, HHU) erstellt und in (Legewie et al., 2019, [226]) veröffentlicht.

Zusammenfassend zeigten diese Studien, dass der CT-Part von mGBP7 eine gewisse Tendenz hat, eine helikale Struktur auszubilden, die flexibel, in Lösung jedoch instabil ist [226]. Zusammen mit den Ergebnissen der konfokalmikroskopischen Analysen kann darauf geschlossen werden, dass der CT-Part

von mGBP7 eine ähnliche Funktion wie das CaaX-Motiv anderer GBPs (GBP1, -2 und -5) zur Membranverankerung übernimmt [226].

Zur weiteren Strukturaufklärung von mGBP7 wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht das aufgereinigte His<sub>6</sub>-mGBP7 Protein zu kristallisieren. Hierfür wurde das Protein heterolog in Bakterien exprimiert und dann mittels *sitting drop*-Methode nach geeigneten Kristallisationsbedingungen gescreent. Die besten Auflösungen mit 10 – 15 Å wurden für K51A mGBP7 mit 0,1 M Imidazol, pH 7,5 – 8 und 10 % PEG 8000 erhalten (Abb. 4.10). Um zukünftig ausreichend große Kristalle mit guter Auflösung (1 – 3 Å) zu generieren, wird ein verfeinerter Screen mit geringfügiger Variation der Proteinkonzentration, des pH-Wertes, der Temperatur und der Zusatz verschiedener Nukleotide vorgeschlagen. Durch die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse könnten dann weitere Einblicke in den GTP-Hydrolysemechanismus und die Struktur des biologisch wichtigen CT-Parts von mGBP7 erhalten werden. Um die Größe, die Form und den oligomeren Zustand von mGBP7 in Lösung zu bestimmen wurde des Weiteren die SAXS-Analyse verwendet. Das 3D-Volumenmodell für K51A mGBP7 zeigte hier, dass die Größe und die Form insgesamt sehr ähnlich zum mGBP7 Homologiemodell sind, außer dass die M- und die E-Regionen im SAXS-Modell weiter aufgespannt sind (Abb. 4.11A). Interessanterweise konnten auch schon die Projektionen der Proteinflexibilität der mGBP7 Modelle zeigen, dass in diesem Bereich eine Großzahl konformativ flexibler AS lokalisiert ist (Abb. 5.1B). Fraglich ist hier, ob die Aufspannung einer mechanischen Funktion von mGBP7 zu Grunde liegen könnte wie z. B. Druck auf Membranen auszuüben. Diese Hypothese ist, wenn man die Homologie von GBPs zu Dynaminen und insbesondere dem engen GBP-Homolog Atlastin betrachtet [254], nicht allzu abwegig. Die GTPasen der Dynamain-Superfamilie, zu denen auch die GBPs zählen, werden aufgrund ihrer Eigenschaften Membranen remodellieren oder Membranfusionen einleiten zu können generell den Mechanoenzymen zugeordnet [161, 254]. Für Atlastin wurde im Detail vorgeschlagen, dass die Dimerisierung der GTPase-Domäne ein Tethering von (ER-)Tubuli vermittelt und im Anschluss Nukleotidhydrolyse-induzierte Konformationsänderungen von Atlastin eine Membranfusion ermöglicht [254-256]. Besonders interessant ist dieser Vergleich auch, da in den Bereichen in denen mGBP7 an *T. gondii* akkumuliert elektronenmikroskopisch tubuläre Strukturen ausgemacht werden konnten [252]. Anhand der Streuungsdaten für WT mGBP7 wurde des Weiteren ein 3D-Volumenmodell für ein mGBP7 Dimer erstellt (Abb. 4.11B). Dieses Modell zeigt eine Dimerisierung von mGBP7 über die E-Domänen und steht damit im Gegensatz zu Studien, die eine Dimerisierung von GBPs über die G-Domänen mit einer transienten Interaktion der  $\alpha$ 13-Helices vorschlagen (vgl. Abb. 1.6B) [171, 174]. Im Jahr 2000 wurde dagegen auch eine zum *ab initio* SAXS-Modell ähnliche Dimerstruktur vorgeschlagen, die durch die Ladungsverteilungen in den E-Domänen begünstigt werden soll [169]. Insgesamt konnten erste Erfolge bei der Ermittlung geeigneter Kristallisationsbedingungen für mGBP7 gemacht werden. Weiterhin geben die SAXS-Messungen weitere Strukturinformationen und unterstützen die Annahme, dass mGBP7 ein transientes Dimer bildet.

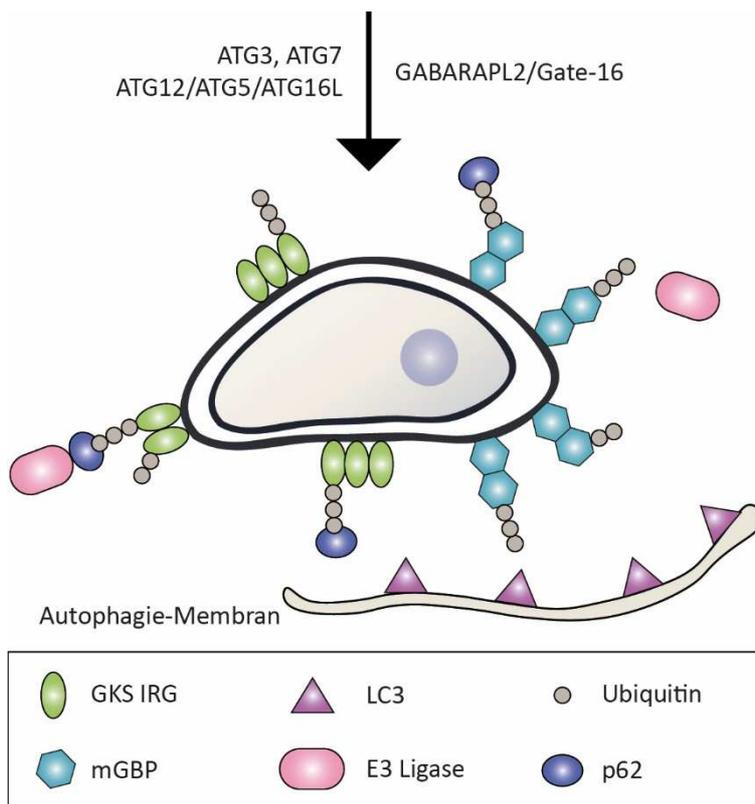
Zusammenfassend konnte im ersten Hauptteil dieser Arbeit mGBP7 biochemisch näher charakterisiert werden. Die Bestimmung der GTPase-Aktivität des Proteins, der Produkte der GTP-Hydrolyse, der Struktur und der Oligomerisierung von mGBP7 geben neue Einblicke in die Biochemie der GBPs und

zeigen eindeutig auf, dass die einzelnen GBPs trotz ihrer hohen Homologie auch je einige individuelle Eigenschaften aufweisen. Insbesondere wurde für mGBP7 ein GTP-unabhängiger Mechanismus der Dimerisierung beschrieben und eine Kopf-Schwanz-Dimerstruktur vorgeschlagen.

### 5.3 Posttranslationale Modifikationen von mGBP7

Die Analyse der Ko-IP-Proben mittels MS (Tab. 4.3) und anti-Ubiquitin-WB (Abb. 4.13) ergaben, dass mGBP7 mit großer Wahrscheinlichkeit mehrfach ubiquitiniert wird und dies bereits bei der Abwesenheit einer Infektion. Im Detail zeigen die WB-Ergebnisse, dass mGBP7 mit über K27- und K48-verknüpften Ubiquitinmolekülen modifiziert wird. Wie bereits erläutert, können Proteine durch die Ubiquitin PTM in ihrer Interaktion mit anderen Proteinen gefördert oder behindert, ihre Aktivität beeinflusst, ihre Lokalisation in der Zelle verändert oder ihr gezielter Abbau beschleunigt werden [210, 211]. Demnach wäre es von großem Interesse in Folgestudien über MS-Messungen die modifizierten Lysine von mGBP7 zu identifizieren und mittels Mutagenese-Studien die Effekte dieser gezielten Modifikationen zu analysieren. Interessanterweise konnte erst kürzlich in einer Studie im Jahr 2018 gezeigt werden, dass mGBP1 und mGBP2 ebenfalls bereits bei Abwesenheit einer Infektion ubiquitiniert werden [138]. Für mGBP1 wurden in dieser Studie 10 und für mGBP2 sogar ganze 25 modifizierte Lysine identifiziert. Die mehrfache Modifikation der mGBPs lässt vermuten, dass hier nicht nur ein gewisser Anteil fehlgefalteter und aus diesem Grund ubiquitinierte mGBP7 Proteine detektiert wurden. Vielmehr könnte man spekulieren, dass durch Ubiquitinierungsereignisse die Funktion und die Interaktion von mGBP7 mit anderen Proteinen beeinflussbar sind. Auffällig bei den modifizierten Lysinen von mGBP1 und mGBP2 ist, dass das K51, das für die GTPase-Aktivität dieser Proteine essentiell ist, modifiziert wird. Eine interessante Hypothese wäre hier, dass die GTPase-Aktivität von mGBPs vielleicht sogar durch die Ubiquitin-Modifikation gesteuert werden kann. Aus Fibroblasten isoliertes mGBP7 mit N-terminalem mCherry- bzw. GFP-Tag, welches posttranslational modifiziert wird, verfügt beispielsweise unter den gleichen Bedingungen (5 mM GTP, 0,68  $\mu$ M Protein) eine um 3x bzw. 5x schwächere GTPase-Aktivität [252]. Allerdings ist hier zu beachten, dass der mCherry- bzw. GFP-Tag mit 29 bzw. 27 kDa im Vergleich zu einem His<sub>6</sub>-Tag (>1 kDa) wesentlich größer ist und dieser einen negativen Effekt auf die GTPase-Aktivität besitzen könnte. Zudem wurden die mGBP7-Fusionsproteine aus IFN $\gamma$ -stimulierten Zellen isoliert, weshalb auch durch diesen Stimulus möglicherweise eine weitere PTM der GTPase erfolgt sein könnte [252]. Insgesamt konnte bei den WB-Analysen kaum ein Unterschied in den detektierten Bandenintensitäten in An- bzw. Abwesenheit einer Infektion mit *T. gondii* ausgemacht werden. Allein für über K27-verknüpfte Ubiquitinketten konnte in geringem Ausmaß eine verstärkte Modifikation bei Infektion der Zellen mit dem Parasiten ausgemacht werden (Abb. 4.13C). Einige Studien zeigen, dass Modifikationen mit über K27-verknüpften Ubiquitinmolekülen vor allem bei der Rekrutierung von Proteinen eine wichtige Rolle spielen [211]. Beispielsweise wurde gezeigt, dass durch die Ubiquitinierung des Adaptorproteins Optineurin mit über K27-verknüpften Ketten die Interaktion mit p62/SQSTM1 verstärkt wird und hierdurch Autophagie-Prozesse eingeleitet werden [257]. Weiter ist in diesem Zusammenhang interessant, dass auch für mGBP1 bereits eine Interaktion mit p62 nachgewiesen werden konnte [158] und eine von p62/SQSTM1 und der E3-Ligase TRAF6-abhängige Rekrutierung von mGBP1 und mGBP2 zur *T. gondii*

PV vorgeschlagen wurde [136]. Allgemein stellen Ubiquitinierungsprozesse in der IFN $\gamma$ -vermittelten Immunabwehr gegen *T. gondii* einen kritischen Schritt dar. Eine *in vivo*-Studie mit TRIM21<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte z. B. demonstrieren, dass eine fehlende Modifikation der PV bzw. der in direkter Umgebung des Parasiten befindlichen Proteine mit über K63-verknüpften Ubiquitinmolekülen durch die E3-Ligase TRIM21 zu einer starken Suszeptibilität gegenüber *T. gondii*-Infektionen führt [209]. Zudem konnte eine Ubiquitinierung von Irga6 nachgewiesen werden [139], weshalb anzunehmen ist, dass p62/SQSTM1 auch an der *T. gondii* PV akkumulierende GKS IRGs bindet. Eine Übersicht zu den wahrscheinlichen Proteininteraktionen und der Ubiquitinierung der PV ist in Abbildung 5.2 dargestellt.

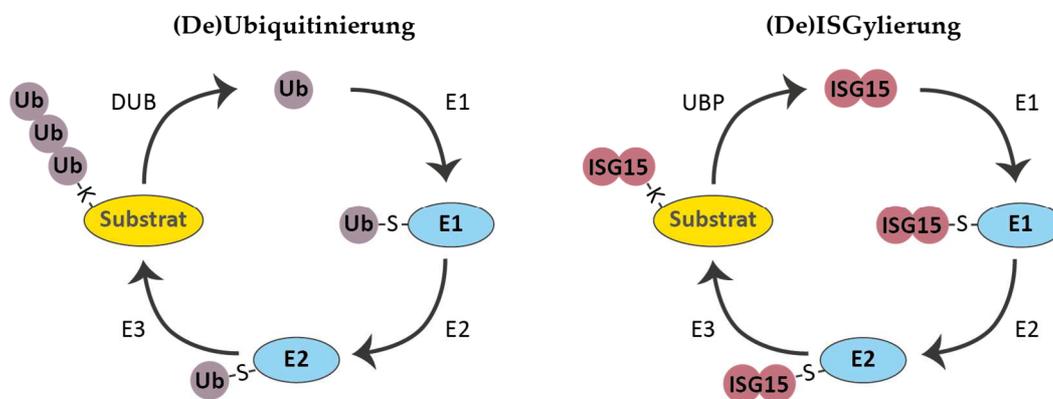


**Abb. 5.2: Modell zur IFN $\gamma$ -induzierten Ubiquitinierung der *T. gondii* PV in Mäusen.** Autophagie-Proteine wie ATG3, ATG7 und der Komplex ATG12/ATG5/ATG16L und das GABARAP Gate-16 haben einen positiven Effekt auf die Rekrutierung von GKS IRGs und mGBPs zur *T. gondii* PV. p62/SQSTM1 bindet ubiquitinierte Proteine auf der PV und induziert die Rekrutierung von mGBPs. (Ko-)rekrutierte E3-Ligasen (TRAF6 und TRIM21) vermitteln eine weitere Ubiquitinierung der PV. Die Ruptur der PV erfolgt vermutlich in einem kooperativen Prozess durch IRGs und mGBPs, woraufhin LC3-vermittelte Autophagieprozesse bei der Beseitigung von Membranrückständen oder dem Parasiten selbst assistieren (modifiziert nach Saeij et al., 2017, [258]).

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass Ubiquitinierungsprozesse in der IFN $\gamma$ -vermittelten Immunabwehr in Mäusen eine wichtige Rolle spielen. Inwieweit die Ubiquitinierung für die Funktion von mGBPs hinsichtlich der GTPase-Aktivität, der Relokalisation zur PV und der Eliminierung von *T. gondii* von Bedeutung ist, bleibt in Zukunft noch im Detail zu evaluieren.

Darüber hinaus ergab die initiale Analyse der Ko-IP-Proben mittels WB (Abb. 4.14), dass mGBP7 sehr wahrscheinlich in An- sowie in Abwesenheit einer Infektion mit *T. gondii* ISGyliert wird. Bei den mittels MS ermittelten Intensitäten für ISG15 (Abb. S4A) war zudem auffällig, dass es in den Ko-IP-Proben der

mit ME49 *T. gondii* infizierten Zellen mehr ISG15 kopräzipitiert wurde als in den uninfizierten Zellen. Demnach ist anzunehmen, dass es bei Infektion von MEFs mit ME49 *T. gondii* zu einer verstärkten ISGylierung der GTPase kommt. Bestärkt wurde diese Vermutung durch die finalen Ko-IP-MS-Ergebnisse, bei denen ISG15 gebunden an mGBP7 mit hoher Abundanz nur in den mit *T. gondii* infizierten Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.16B). Zudem zeigten die ermittelten Intensitäten für die detektierten Peptide mit Gly-Gly-Modifikation für das Peptid EAIAVFMEHSFK(Gly-Gly)DENQQFQK in der Anwesenheit von *T. gondii* eine verstärkte Intensität (Abb. S4C), was die Vermutung nahelegt, dass das K373 im Verbindungsstück der  $\alpha$ 8- und  $\alpha$ 9-Helix von mGBP7 im Rahmen einer Infektion verstärkt modifiziert wird. ISG15 ist eines der am stärksten durch Typ-I IFN hochregulierten Proteine, dem wichtige Funktionen in der angeborenen und erworbenen Immunität, der antiviralen Abwehr sowie der Kontrolle der Zellproliferation zugesagt werden [259]. Wie viele Ubiquitin-ähnliche Proteine (UBLs, engl.: *ubiquitin-like proteins*) wird es als inaktives Vorläuferprotein exprimiert [260, 261] und kann erst nach proteolytischer Spaltung am C-Terminus, wodurch ein Gly-Gly-Motiv exponiert wird, an Zielproteine konjugiert werden [261]. Interessanterweise besteht ISG15 aus zwei Ubiquitin-ähnlichen Domänen, die durch eine flexible Faltungsstruktur, einer sogenannten *hinge*-Region, miteinander verbunden sind [260, 262]. Der klassische Prozess der ISGylierung (vgl. Abb. 5.3) erfolgt analog zu Ubiquitin und UBLs durch die Aktivität von E1-, E2- und E3-Ligasen [259]. Nach der Übertragung auf ein E1-Enzym wird ISG15 an ein E2-Enzym gekoppelt, um dann schließlich mit der Hilfe eines E3-Enzyms an die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysin-Restes des Zielproteins konjugiert zu werden [263]. Diese ATP-verbrauchende Modifikation ist auch reversibel [263].



**Abb. 5.3: (De)Ubiquitinierung und (De)ISGylierung.** Die Konjugation von ISG15 an Substrate/Zielproteine erfolgt, ähnlich wie bei Ubiquitin, mittels einer Enzymkaskade durch drei Enzyme (E1 – E3). In einem ersten Schritt wird Ubiquitin/ISG15 durch ein E1-Enzym gebunden und aktiviert. Anschließend wird Ubiquitin/ISG15 erst auf eine E2-Ligase übertragen, bis es letztendlich über ein E3-Enzym an ein Substrat konjugiert wird. Die Konjugation von ISG15 erfolgt ebenso wie die von Ubiquitin an einen Lysin-Rest (K) des Zielproteins. Die Ubiquitinierung und die ISGylierung sind reversible Prozesse, die durch Isopeptidasen aufgehoben werden können (modifiziert nach Skaug et al., 2010, [264]) DUB, Deubiquitinierungsenzym. Ub, Ubiquitin. UBP, Ubiquitin-spezifische Peptidase.

Insgesamt konnten in Studien nicht weniger als hunderte potentiell ISGylierte Proteine, die in diverse Signalwege involviert sind, identifiziert werden [265-267]. Die physiologische Funktion der ISGylierung ist hingegen bisher nur für einige wenige dieser Proteine analysiert worden [260]. Eine Studie konnte beispielsweise zeigen, dass die Konjugation von ISG15 an Ubc13 (engl.: *ubiquitin-conjugating enzyme*

E2 13) dessen Fähigkeit inhibiert, Ubiquitin zu binden, wodurch die Ubc13-vermittelte Ubiquitinierung beeinträchtigt wird [268]. Demnach besitzt die ISG15-Modifikation von Ubc13 einen indirekten Effekt auf viele verschiedene zelluläre Funktionen [260, 268]. Ein Beispiel für die antiviralen Eigenschaften von ISG15 lieferte eine Studie mit Influenza A, die demonstrieren konnte, dass die virale Replikation durch die ISGylierung von NS1 (engl.: *non-structural protein 1*) beeinträchtigt wird [269]. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Konjugation von ISG15 an den intrazellulären Rezeptor RIG-I (engl.: *retinoic acid-inducible gene-1*) zur Herunterregulierung der zellulären RIG-I-Level und damit einem verminderten RIG-I-Signaling führen kann [270]. ISG15 scheint demnach auch als negativer *Feedback* Regulator dienen zu können, der es vermag, die Stärke der antiviralen Immunantwort zu modulieren [270, 271]. Interessanterweise wurde zudem festgestellt, dass die Zahl an ISGylierten Proteinen in humanen Zellen in Gegenwart von geringen Mengen an Reduktionsmitteln, die z. B. bei Experimenten wie den in dieser Arbeit durchgeführten Ko-IPs erforderlich sind, erhöht sind [260]. Diese Modifikation erfolgt allerdings nicht wie die klassische ISGylierung über ein C-terminales Glycin von ISG15 sondern über einen hoch reaktiven Cystein-Rest in der *hinge*-Region des Proteins [260]. Die Beobachtung, dass diese „atypische“ Konjugation von ISG15 an Zielproteine unter reduzierenden Bedingungen auch in lebenden Zellen auftritt, legt nahe, dass auch diese Modifikation funktionell relevant sein könnte [260, 270]. Die gleiche Studie konnte darüber hinaus zeigen, dass z. B. hGBP1 nicht ISGyliert wird und auch in anderen Studien wurde bisher keine ISG15-Modifikation von GBPs nachgewiesen [260]. In zukünftigen Studien wird es demnach von großem Interesse sein, die physiologische Funktion der ISGylierung von mGBP7 im Detail zu analysieren. Möglicherweise denkbar wäre es, dass durch die ISGylierung bzw. ferner auch der Ubiquitinierung die GTPase-Aktivität und/oder auch die Rekrutierung von mGBP7 moduliert wird. Ein guter Ansatzpunkt für diese Folgeanalyse wäre es hierfür zunächst zu evaluieren, ob durch die Mutation von K373 die durch die Parasiteninfektion hochregulierte Modifikation dieses Lysin-Restes aufgehoben werden kann. Im Zusammenhang mit *T. gondii*-Infektionen wurde bisher nur eine Studie durchgeführt, die zeigt, dass extrazelluläres, unkonjugiertes ISG15 die Rekrutierung von dendritischen Zellen zum Infektionsherd vermittelt, die in Folge IL-1 $\beta$  produzieren [272]. Zudem soll ISG15 in der Gegenwart von Typ-II *T. gondii* die Produktion von IFN $\gamma$  erhöhen [272].

Zusammenfassend liefert diese Arbeit erstmals konkrete Hinweise, dass es durch eine Infektion mit dem Parasiten ME49 *T. gondii* zu einer verstärkten ISGylierung von GBPs kommen kann. Zudem wurde ein Lysin-Rest von mGBP7 identifiziert, der in zukünftigen Studien als potentieller Ort der ISG15-Modifikation durch Mutagenese-Studien überprüft werden kann.

#### 5.4 Interaktionspartner von mGBP7: Clca1, Jup, Rftn1 und Sytl2

Zur Identifikation von mit mGBP7 interagierenden Proteinen wurden Ko-IP-Experimente mit mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs mit bzw. ohne rekonstituiertes HA-mGBP7 durchgeführt. Die Ähnlichkeit der je fünf biologischen Ko-IP-Replikate in der SDS-PAGE-Analyse (Abb. 4.15) und der *Heatmap* (Abb. S6) als auch das Clustering der Replikate im Rahmen der PCA-Analyse (Abb. S7) demonstrieren die Konsistenz der Experimente und der Daten. Als potentielle Interaktionspartner von mGBP7 für Folgeanalysen wurden Clca1, Jup,

Rftn1, Sytl2, Tom1 und SRS29C ausgewählt (vgl. Tab. 4.4). Die Validierung der Interaktionspartner erfolgte durch erneute Durchführung von Ko-IPs und Detektion der kopräzipitierten Kandidatenproteine mittels WB (Abb. 4.17 und 4.18). Zudem wurden GFP-Fusionskonstrukte der Kandidatenproteine kloniert und deren intrazelluläre Lokalisation und Kolo­kalisierung in Kombination mit mCherry-mGBP7 analysiert.

Bei der anti-Clca1-WB-Analyse konnte in den Ko-IP-Eluaten der mit HA-mGBP7 rekonstituierten Zellen mehrere schwache Banden detektiert werden (s. Abb. 4.17B). Die im Vergleich intensivsten Banden bei 90 kDa und ca. 40 kDa wurden, entsprechend den Ergebnissen einer Studie von Gandhi et al. im Jahr 1998 zur Charakterisierung dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Proteins, Clca1 zugeordnet [238]. Die Studie schlägt vor, dass das 125/130 kDa Clca1-Translationsprodukt autoproteolytisch in ein 90 kDa N-terminales und in ein 32 – 38 kDa C-terminales Produkt gespalten wird [238]. Die bei ca. 70 kDa detektierte Bande, die auch in den HA-mGBP2 Ko-IP-Eluaten erhalten wurde, könnte dagegen auf eine schwache Kreuzreaktivität des Primärantikörpers deuten. Insgesamt unterstützt die WB-Analyse die Annahme einer spezifischen Interaktion von mGBP7 mit Clca1, da weder in den Ko-IP-Eluaten der mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen ohne HA-Konstrukt noch in den mit HA-mGBP2 rekonstituierten mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen Banden dem Clca1 Protein zugeordnet werden konnten. Die *in vitro*-Analyse zur Lokalisation des Clca1-GFP-Fusionskonstruktes mittels Konfokalmikroskopie gab jedoch nur vereinzelt eine Kolo­kalisierung mit mCherry-mGBP7 zu erkennen (Abb. 4.19), obwohl *full length* exprimiertes Clca1-GFP in den Zelllysaten nachgewiesen werden konnte (Abb. S8). Allerdings ist zu beachten, dass durch die Fusion von GFP an Proteine deren Funktionalität und Lokalisation verändert oder beeinträchtigt werden kann. Für Folgestudien wird demnach vorgeschlagen, die Kolo­kalisierung von Clca1 mit mCherry-mGBP7 mittels AK-Färbung von Clca1 nachzuweisen. Ist dies erfolgreich, könnte versucht werden, Clca1 mit einem anderen Tag (z. B. einem SNAP-Tag) zu markieren und die Interaktion mit mGBP7 mittels 3D-Lebendzell-Mikroskopie zu analysieren. Clca1 wäre als mGBP7-Interaktionspartner im Rahmen von *T. gondii*-Infektionen interessant, da initiale Studien darauf hinweisen, dass humanes Clca1 den Chlorid (Cl<sup>-</sup>)-Transport über Membranen durch die Regulation  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierter Kanalproteine zu steuern vermag [273, 274]. Der Transport von Cl<sup>-</sup>-Anionen über die Plasmamembran von *T. gondii* ist z. B. wichtig, um ein basales pH-Level des Parasiten einzuhalten [275]. Zudem könnten durch den Transport von Cl<sup>-</sup>-Anionen auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportprozesse, die wiederum Effekte auf die Virulenz und die Replikation von *T. gondii* besitzen [276, 277], initiiert werden.

Das 82 kDa große Jup konnte allein den Ko-IP-Proben der mit HA-mGBP7 rekonstituierten mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen detektiert werden (Abb. 4.18A). Dies spricht zusammen mit den zuvor gemessenen MS-Intensitäten für eine spezifische Interaktion von Jup mit mGBP7. Die zusätzlichen Banden im anti-Jup-WB oberhalb der 100 kDa Bande könnten auf eine PTM von Jup zurückgeführt werden. Allerdings ist dies eher unwahrscheinlich, da Banden auf dieser Höhe ebenfalls in den mGBP7<sup>-/-</sup> Kontroll-Ko-IP-Proben nachgewiesen wurden. Wahrscheinlicher ist es, dass die Banden aufgrund von einer Kreuzreaktivität des Primärantikörpers erhalten wurden. Für eine PTM von Jup spricht hingegen auch die Analyse des Zelllysates der mit GFP-Jup rekonstituierten mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen mittels anti-GFP-WB. Diese zeigt eine Bande oberhalb der zu erwartenden Bandenhöhe von 109 kDa sowie einige Degradationsbanden (Abb. S8). Neben den MS- und WB-Ergebnissen sprechen auch die

Konfokalaufnahmen der mit GFP-Jup und mCherry-transduzierten mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen für eine Interaktion von mGBP7 mit Jup. Auf den *in vitro*-Aufnahmen fixierter Zellen ist zu erkennen, dass die beiden Fusionskonstrukte im Zytosol in unifizierten Zellen zu größeren Aggregaten fusionieren (vgl. Abb. 4.20A). Die sich bildenden Strukturen sind allerdings größer als die für GBPs typischen VLS. Zudem ist für Jup nur selten eine membranständige Lokalisation zu beobachten. Bei Jup bzw.  $\gamma$ -Catenin handelt es sich um ein Strukturprotein, das typischerweise in Zellkontakten wie Desmosomen und *Adherens Junctions* vorzufinden ist [278]. Es befindet sich auf der zytosolischen Seite der Zellkontakte und verbindet Cadherine mit dem Zytoskelett [278]. Interessanterweise deutet eine Studie mit humanem Jup an, dass sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus des Proteins eine wichtige Rolle für dessen subzelluläre Lokalisation spielen [279]. Demnach ist anzunehmen, dass die Lokalisation von Jup durch den GFP-Tag am N-Terminus verändert und eine fehlerhafte Lokalisation bzw. eine artifizielle Interaktion von Jup mit mGBP7 im Zytosol ermöglicht wird (vgl. Abb. 4.20A). Weiterhin scheint die Bildung der Jup-mGBP7-Aggregate auch für eine verminderte Fähigkeit der GTPase am Parasiten *T. gondii* zu akkumulieren verantwortlich. Neben der wichtigen Rolle von Jup als Adaptorprotein bei Zellkontakten werden dem  $\beta$ -Catenin-Homolog ebenfalls Funktionen in Signalkaskaden verschiedener Prozesse während der Apoptose, der Zellproliferation und der Motilität von Zellen zugeschrieben [280-282]. All diese Prozesse involvieren die Interaktion von zytoplasmatischem Jup mit verschiedenen Kinasen und die Inhibierung des Wnt- $\beta$ -Catenin-Signalweges durch Jup im Nukleus [280]. Bezüglich *T. gondii*-Infektionen ist eine erst kürzlich durchgeführte Studie interessant, die zeigen konnte, dass durch eine verstärkte Expression des *T. gondii*-Proteins GRA18 auch die Level von endogenem  $\beta$ -Catenin hochreguliert werden [283]. In einer anderen Studie konnte wiederum beobachtet werden, dass hGBP1 ein effektiver Suppressor der  $\beta$ -Catenin Expression ist [284]. Demzufolge kann spekuliert werden, ob eine generelle Verbindung zwischen GBPs und den Catenin-Homologen im Rahmen von *T. gondii*-Infektionen besteht. Zur näheren Analyse der Interaktion von Jup mit mGBP7 könnte in Folgestudien zunächst eine Jup-AK-Färbung von fixierten, mit mCherry-mGBP7 rekonstituierten mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen  $\pm$  *T. gondii* durchgeführt werden. Hierdurch wäre ein Vergleich der subzellulären Lokalisation vom GFP-Fusionskonstrukt zum unmodifizierten Jup-Protein gegeben. Ferner könnte untersucht werden, ob die Replikation von *T. gondii* in Jup<sup>-/-</sup>-Zellen verändert ist.

Die Ko-IP-MS- und die Ko-IP-WB-Ergebnisse für Rftn1 zeigen zusammenfassend, dass Rftn1 sowohl in An- als auch in Abwesenheit einer Infektion mit *T. gondii* mit mGBP7 interagiert (Abb. 4.16A und Abb. 4.18B). Die WB-Analyse der Ko-IP-Eluate der mit HA-mGBP2 rekonstituierten Zellen gibt zudem zu erkennen, dass Rftn1 zusätzlich mit mGBP2 kopräzipitiert (Abb. 4.18B). Da Rftn1 nur in den *T. gondii*-infizierten Zellen durch HA-mGBP2 kopräzipitiert wurde, ist davon auszugehen, dass Rftn1 nicht aufgrund einer Interaktion mit dem HA-Tag identifiziert werden konnte. Neben der vorhergesagten 62 kDa Bande für Rftn1 konnte je eine zusätzliche Bande zwischen 70 und 100 kDa in den Ko-IP-Eluaten mit HA-mGBP7 rekonstituierten Zellen detektiert werden (Abb. 4.18B). Diese Bande lässt vermuten, dass Rftn1 entweder posttranslational modifiziert wird oder, dass eine Kreuzreaktivität des anti-Rftn1-AKs vorliegt. In der Tat legen andere Studien nahe, dass humanes Rftn1 über eine N-Myristoylierungs- und eine S-Palmitoylierungsstelle verfügt [285, 286], wodurch die höher liegenden Banden zu erklären wären. Bei den Konfokalmikroskopie-Aufnahmen der mit mCherry-mGBP7 und GFP-Rftn1

rekonstituierten mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen konnte allerdings nur in sehr wenigen Fällen eine vereinzelte Kolokalisation der beiden Fusionsproteine ausgemacht werden (Abb. 4.21). Zudem war keine Akkumulation von Rftn1 am Parasiten zu erkennen (Abb. 4.21B). In Betracht gezogen werden muss allerdings auch hier, dass Rftn1 durch den N-terminalen 27 kDa GFP-Tag in seiner Funktionalität beeinträchtigt wird. Insbesondere die Membranverankerung des Proteins könnte durch GFP-Tag negativ beeinflusst sein, da sich die beiden erwähnten Acylierungsstellen ebenfalls am N-Terminus des Proteins befinden und eine Modifikation von Rftn1 mit Myristinsäure bzw. Palmitinsäure für die Lokalisation von Rftn1 in Lipid Rafts wichtig ist [285, 286]. Als Lipid Rafts werden spezielle Bereiche in der Zellmembran bezeichnet, in denen sich Cholesterin, Glycolipide und Sphingolipide anreichern und die an diversen zellulären Prozessen wie z. B. der Endozytose oder der Signaltransduktion beteiligt sind [287, 288]. Humanes Rftn1 wurde zunächst in B-Zellen als wichtiges Lipid Raft-Protein identifiziert, das BCR- und TCR-vermittelte Signalwege reguliert [285, 286]. Erst kürzlich wurde ermittelt, dass zytosolisches Rftn1 in humanen Zellen die zelluläre Aufnahme von TLR3/4-Liganden (z. B. von LPS, *polyinosinic:polycytidylic acid* und CpG-Oligonukleotiden) durch die Assoziation mit dem Clathrin-Adaptorprotein-2 (AP-2)-Komplex vermittelt [234, 289]. Unterstützt wird diese Annahme von IP-Analysen, die zeigen konnten, dass humanes Rftn1 mit Clathrin bzw. AP-2 kopräzipitiert [234, 289]. Die Erkennung von Liganden durch TLR3/4 führt über das TLR-Adaptorprotein TICAM-1/TRIF (engl.: *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*) zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3, NFκB sowie AP-1 und damit zur Produktion von Typ-I IFN und Zytokinen [285]. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist insbesondere die Beobachtung der Assoziation von Rftn1 mit Clathrin von Bedeutung, da eine Kolokalisation von mGBP7 mit Clathrin an der PV von *T. gondii* ausgemacht werden konnte (Abb. 4.25B). Die Überprüfung des Expressionslevels und der Integrität von GFP-Rftn1 mittels anti-GFP-WB vom Zelllysate gab zudem zu erkennen, dass eine Bande oberhalb der zu erwartenden Bande von 89 kDa erhalten wurde (Abb. S8). Dies deutet an, dass der GFP-Tag nicht mit einer potentiellen PTM von Rftn1 interferiert. Zur weiteren Validierung der Interaktion bzw. Kolokalisation von Rftn1 mit mGBP7 sollte in Folgeexperimenten zunächst eine AK-Färbung von Rftn1 in mit mCherry-mGBP7 rekonstituierten mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen ± *T. gondii* durchgeführt werden. Zudem könnte eine mögliche Interaktion bzw. Kolokalisation von Rftn1 und Clathrin über Ko-IP-Experimente und eine entsprechende AK-Färbung fixierter Zellen überprüft werden. Zusammenfassend geben diese Ergebnisse erste Indizien für eine Interaktion von Rftn1 und mGBP7 sowohl in An- als auch in Abwesenheit einer *T. gondii*-Infektion. Für Folgeexperimente wird darüber hinaus vorgeschlagen zu analysieren, ob Rftn1-Clathrin-vermittelte Prozesse eine Rolle bei der Immunabwehr von mGBP7 gegen *T. gondii* spielen könnten.

Als einen der vielversprechendsten Interaktionspartner von mGBP7 in An- sowie in Abwesenheit einer *T. gondii*-Infektion deuteten die Ko-IP-MS-Ergebnissen vor allem auf Sytl2 hin (vgl. Differenz der Abundanzänderung für Sytl2 und Signifikanz dieser Änderung; Abb. 4.16). Die Ko-IP-WB-Analyse der mit HA-mGBP7 rekonstituierten Zellen zeigte weiterhin, dass mindestens vier verschiedene Sytl2-Isoformen mit mGBP7 interagieren (Abb. 4.17A). Die Spezifität der Interaktion von mGBP7 mit Sytl2 demonstriert die Analyse der Ko-IP-Eluat der mit HA-mGBP2 rekonstituierten Zellen, da keine Banden für Sytl2 in diesen Proben detektiert wurden. Daher ist auch auszuschließen, dass Sytl2 aufgrund von

einer unspezifischen Interaktion mit HA kopräzipitiert wurde (Abb. 4.17A). Von Sytl2 werden durch alternatives Spleißen eine Vielzahl an Sytl2 Isoformen erhalten [290, 291], weshalb die Zuordnung der detektierten Sytl2-Banden nicht eindeutig möglich war (Abb. 4.17A). Auffällig zeigte sich, dass die detektierte Bande über der 40 kDa Markerbande, die anhand des Molekulargewichts mutmaßlich der Isoform 6 von Sytl2 zugeordnet wurde, nur in Anwesenheit einer Infektion mit *T. gondii* erhalten wurde. Insgesamt konnten 13 „unique“ (eindeutige) Peptidsequenzen für Sytl2 ermittelt werden (nicht gezeigt, Daten von G. Poschmann, MPL, HHU). Der Sequenzabgleich dieser Peptide mit den Sequenzen der verschiedenen Isoformen zeigte auf, dass alle identifizierten Sytl2-Peptidsequenzen im Transkript der Isoform 3 enthalten sind. Im Folgenden wurde daher ein Sytl2-GFP-Fusionskonstrukt der Isoform 3 generiert. Die *in vitro*-Konfokalmikroskopie-Aufnahmen der mit mCherry-mGBP7 und Sytl2-GFP rekonstituierten mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen zeigte, dass Sytl2 vor allem an der Zellmembran und in vesikelartigen Strukturen im Zytosol lokalisiert ist (Abb. 4.22A). Entgegen den Erwartungen der Ko-IP-Ergebnisse konnte eine Kolo-kalisation von mGBP7 und Sytl2 nur in Anwesenheit von *T. gondii* an der PV des Parasiten ausgemacht werden (Abb. 4.22B). Die WB-Analyse zur Überprüfung des Expressionslevels und der Integrität von Sytl2-GFP zeigte, dass das Fusionsprotein zumindest anteilig *full length* exprimiert wird (Abb. 4.24A). Die detektierten Degradationsbanden für Sytl2-GFP weisen jedoch auch auf eine verminderte Integrität des Proteins hin (Abb. 4.24A, oberer und mittlerer Panel). Die weitgehend homogene Verteilung von GFP-Sytl2 im Zytosol (nicht gezeigt) kann dadurch erklärt werden, dass die Familie der Synaptotagmin-ähnlichen Proteine (Slps) an ihrem N-Terminus eine für Proteininteraktionen wichtige Slp-Homologiedomäne (SHD) besitzen [290, 292]. Durch den N-terminalen GFP-Tag werden diese Interaktionen vermeintlich beeinträchtigt und damit auch die Lokalisation von Sytl2 in der Zelle beeinflusst. Für die SHD-Domäne von Sytl2 konnte eine spezifische Interaktion mit der Ras-ähnlichen GTPase Rab27A (engl.: *Ras-related protein 27A*) nachgewiesen werden [291, 293, 294]. Rab27A spielt eine vielseitige Rolle beim Transport und der Regulierung der Exozytose von sekretorischen Granula und Lysosomen-ähnlichen Organellen [295]. Die Interaktion von mGBP7 mit Rab27A lässt demzufolge die Vermutung zu, dass Sytl2 eine Funktion im Transport vesikelartiger Strukturen besitzen könnte. Interessanterweise konnte darüber hinaus eine Interaktion von Rab27A/B über die Slp-Homologe Slac2-a/c (engl.: *Slp homologue lacking C2 domains-a/c*) mit Myosin 5a nachgewiesen werden [296-298]. Myosin 5a ist ein Aktinfilament-bindendes Motorprotein [298], welches ebenfalls in dieser Arbeit in Abwesenheit einer *T. gondii*-Infektion mit HA-mGBP7 kopräzipitiert werden konnte (nicht gezeigt). Neben der SHD-Domäne verfügen Slps über eine variable Linker-Domäne und zwei C-terminale C2 (engl.: *protein kinase C conserved region 2*)-Domänen [299, 300]. Die C2-Domänen binden Ca<sup>2+</sup> sowie Phospholipide (PS und PIP<sub>2</sub>) und ermöglichen hierdurch das Anheften bzw. das sogenannte „Tethering“ sekretorischer Vesikel an Plasmamembranen [291, 295]. In Übereinstimmung mit den WB-Ergebnissen der Sytl2-GFP-Zelllysate, die eine Vielzahl an Degradationsbanden aufweisen, ist anzunehmen, dass Sytl2 auch durch den C-terminalen GFP-Tag in einem gewissen Ausmaß in seiner Funktionalität beeinträchtigt wird. Als ein Ziel zukünftiger Studien wird vorgeschlagen, die Lokalisation der verschiedenen endogenen Sytl2 Isoformen in der Zelle und deren Kolo-kalisation mit mGBP7 näher zu analysieren. Hierfür könnte eine AK-Färbung mit anti-Sytl2 der mit mCherry-mGBP7 rekonstituierten Zellen ± *T. gondii* durchgeführt werden. Zur Evaluation der Funktion der einzelnen Sytl2 Isoformen sollten darüber hinaus weitere Sytl2-GFP Fusionskonstrukte

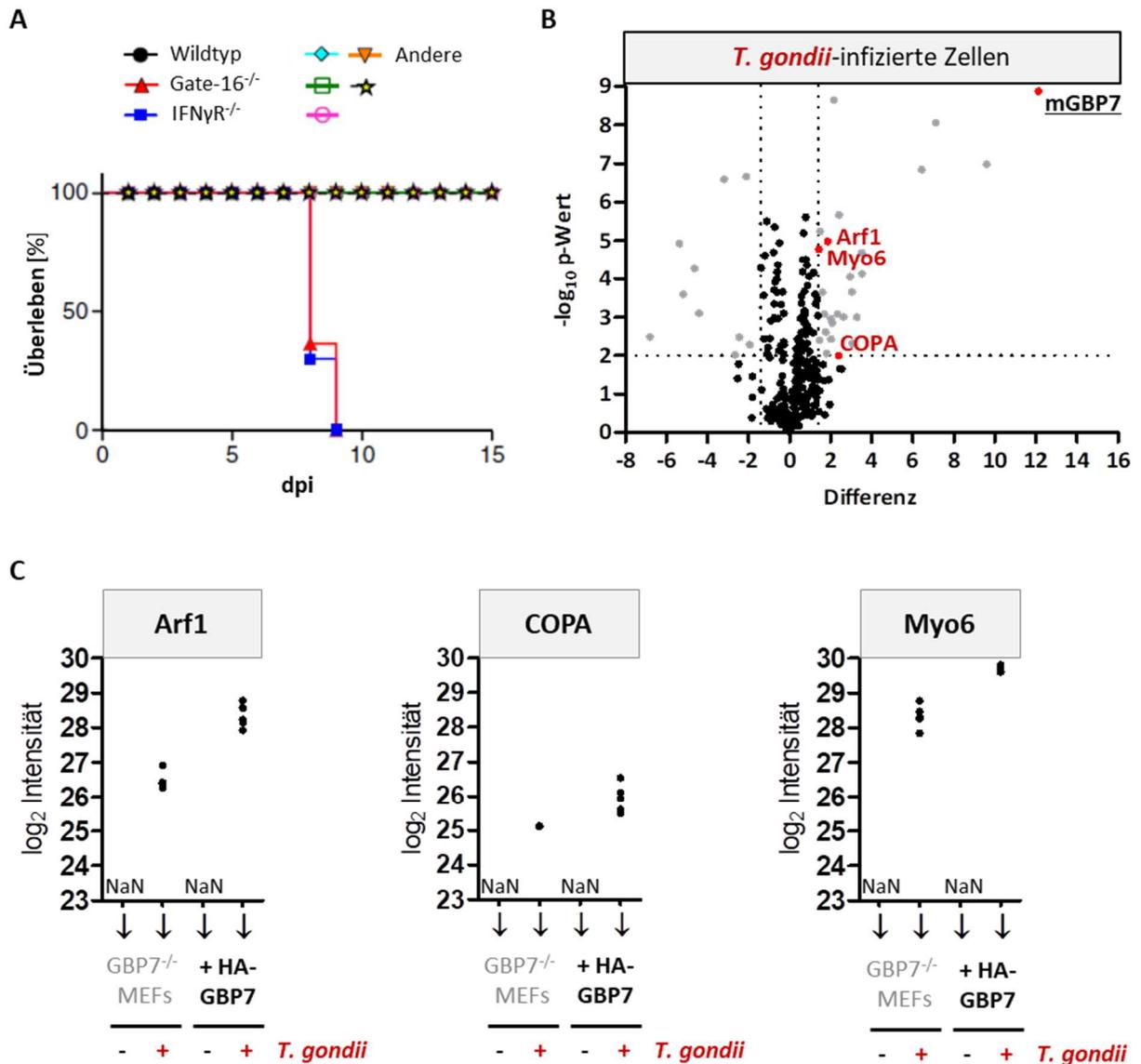
kloniert werden. Insbesondere die Analyse der Funktion der Sytl2 Isoform 6 könnte im Rahmen von *T. gondii*-Infektionen von besonderem Interesse sein, da diese Isoform allein in den mit *T. gondii* infizierten Zellen als Interaktionspartner von mGBP7 identifiziert werden konnte. Um die Funktion der Isoform 6 näher zu evaluieren, könnten beispielsweise mittels der CRISPR (engl.: *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)-Cas9-Methode eine Sytl2 Isoform 6<sup>-/-</sup>-Zelllinie generiert und die *T. gondii* Proliferation in dieser Zelllinie evaluiert werden. Insgesamt demonstrieren die Ko-IP-MS-zusammen mit den Ko-IP-WB-Ergebnissen, dass mGBP7 mit mehreren Sytl2 Isoformen interagiert. Zudem indizieren die Konfokalmikroskopie-Aufnahmen, die eine Kolokalisation der mGBP7- und Sytl2-Fusionsproteine an der *T. gondii* PV zeigen, dass die Isoform 3 von Sytl2 eine Funktion in der mGBP7-vermittelten Immunabwehr von mGBP7 spielen könnte.

## 5.5 Funktionen von Tom1 und Clathrin in der mGBP7-vermittelten Immunabwehr

Anhand der Ko-IP-MS-Daten wurde insbesondere Tom1 im Rahmen von *T. gondii*-Infektionen als besonders signifikanter Interaktionspartner von mGBP7 identifiziert (Abb. 4.16). Die WB-Analyse im Anschluss durchgeführter unabhängiger Ko-IPs konnte diese spezifische Interaktion mit mGBP7 bei *T. gondii*-Infektion weiter bestätigen (Abb. 4.18C). In Übereinstimmung mit den Ko-IP-Daten konnte zudem mittels Konfokalmikroskopie eine nahezu vollständige Kolokalisation von Tom1-GFP und mCherry-mGBP7 an der PV des Parasiten 2,5 h nach der Infektion beobachtet werden. Die Konfokalmikroskopie-Aufnahmen demonstrieren eindrucksvoll, dass beide Proteine an denselben Arealen einzelner *T. gondii* PVs akkumulieren, während andere Parasiten in derselben Zelle keine mGBP7/Tom1-Rekrutierung aufweisen (Abb. 4.23B und S9A).

Tom1 (Abb. 5.5) zählt zur Familie der VHS (Vps27, Hrs und STAM)-Domänen enthaltenden Proteine [241]. Das Akronym VHS rührt von dem Vorkommen dieser Domäne in den Proteinen Vps27 (engl.: *vacuolar protein sorting 27*), Hrs (engl.: *hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*) und STAM (engl.: *signal transducing adapter molecule*) [301]. Proteinen mit dieser Domäne werden insbesondere Funktionen in intrazellulären Transport- und Sortierungsprozessen zugeschrieben [302]. Die VHS-Domäne befindet sich am N-Terminus des Proteins, was mitunter eine Erklärung sein könnte, warum nur in Ausnahmefällen eine Akkumulation von Tom1 mit N-terminalem GFP-Tag an *T. gondii* PVs beobachtet werden konnte. Unterstützt wird diese Annahme durch die WB-Analyse des Zelllysates der mit GFP-Tom1 rekonstituierten Zellen. Diese Analyse ließ bereits aufgrund der detektierten Degradationsbanden auf eine verminderte Integrität des Fusionsproteins schließen (Abb. 4.24B). Neben der N-terminalen VHS-Domäne verfügt Tom1 (und seine beiden Homologe Tom1L1 und Tom1L2) über eine zentrale GAT (GGA und Tom1)-Domäne [303-305]. Diese Domäne reguliert, zumindest bei GGA-Proteinen (engl.: *Golgi-localized  $\gamma$ -ear-containing Arf-binding proteins*), durch Interaktion mit GTP-gebundenem Arf1 die Rekrutierung zu Membranen des trans-Golgi-Netzwerks [305-307]. In einer Studie von Puertollano et al. im Jahr 2001 konnte für humanes Tom1 im Gegensatz zu den GGA-Proteinen keine Interaktion mit Arf1 beobachtet werden [306]. Hier ist jedoch zu erwähnen, dass diese Experimente mit N-terminal GFP-getagtem Tom1, einem Fusionskonstrukt, das auch in dieser Arbeit im Gegensatz zu Tom1 mit CT GFP-Tag nahezu keine Kolokalisation mit mGBP7

oder Akkumulation an *T. gondii* PVs zeigte, durchgeführt wurden. Für eine Interaktion von murinem Tom1 mit Arf1 würden die MS-Daten dieser Arbeit sprechen, da neben Tom1 auch Arf1 durch HA-mGBP7 in *T. gondii*-infizierten mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen kopräzipitiert werden konnte (Abb. 5.4B-C). In diesem Zusammenhang weiterhin interessant ist eine Studie von Sasai et al. im Jahr 2017, die demonstrieren konnte, dass GABARAPL2/Gate-16 durch die Assoziierung mit Arf1 die homogene Verteilung von mGBPs im Zytosol vermittelt [196]. Weitere Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die Rekrutierung von mGBPs, Irga6, p62 und Ubiquitin in Gate-16<sup>-/-</sup>-Zellen signifikant beeinträchtigt ist [196]. Besonders auffällig ist auch der beobachtete Phänotyp bei Infektion von Gate-16<sup>-/-</sup>-Mäusen mit *T. gondii* [196]. Ähnlich zu mGBP7<sup>-/-</sup>- und IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigen diese Mäuse an Tag 7 eine Hochregulierung proinflammatorischer Zytokine (TNF, IL-12 und IFN $\gamma$ ) und sterben ungefähr an Tag 10 nach der Infektion mit *T. gondii* (Abb. 5.4A) [196, 208]. Obwohl mGBP7 in dieser Arbeit nicht mit Gate-16 kopräzipitiert wurde, lassen diese Zusammenhänge die Vermutung zu, dass über Tom1 auch Gate-16/Arf1-vermittelte Prozesse in der Immunabwehr von mGBP7 gegen den Parasiten *T. gondii* eine Rolle spielen könnten. Eine Hypothese wäre, da Arf1 auch in Prozesse der Vesikelabschnürung involviert ist [196, 308], dass Gate-16 in einen Arf1-abhängigen intra-Golgi-Transport von GBPs und/oder der Freisetzung von GBP (VLS) am Golgi-Apparat beteiligt ist. Weiter interessant ist, dass Arf1 als Modulator der Vesikelabschnürung von COPA (engl.: *coatamer subunit alpha*)-enthaltenden Vesikeln vorgeschlagen wurde [308, 309], da COPA ebenfalls mit HA-mGBP7 in *T. gondii*-infizierten Zellen kopräzipitiert werden konnte (Abb. 5.4B-C).

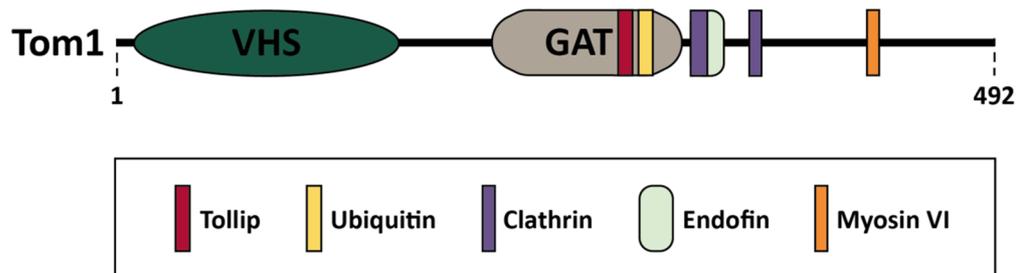


**Abb. 5.4: Weitere potentielle Interaktionspartner von mGBP7.** (A) Gate-16 ist *in vivo* für die akute Resistenz gegen *T. gondii* essentiell. Überleben von Wildtyp (n = 24), Gate-16<sup>-/-</sup> (n = 33) und IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> (n = 10) Mäusen nach Infektion mit Typ-II Pru *T. gondii* (modifiziert nach Sasai et al., 2017, [196]). (B) *Volcano Plot* zu den Ko-IP-MS-Daten von mGBP7 der mit *T. gondii* infizierten Zellen. In dieser Arbeit nicht weiter analysierte, potentielle Interaktionspartner (Arf1, COPA und Myo6) wurden in rot hervorgehoben. Für eine detaillierte Erläuterung siehe Beschriftung der Abb. 4.17. (C) Graphische Darstellung der einzelnen log<sub>2</sub>-Intensitäten der fünf Ko-IP-MS-Replikate für Arf1, Rftn1 und Tom1. NaN, not a number.

Tom1 wurde zunächst als Zielgen für das Myb-Onkogen identifiziert [310]. Erst später wurde das Adaptorprotein durch dessen Eigenschaft ubiquitinierte Proteine und Organellen zu binden und der ESCRT (engl.: *endosomal sorting complexes required for transport*)-Maschinerie zuzuführen seiner Funktion nach auch als alternatives ESCRT-0 Protein bezeichnet [302, 311, 312]. ESCRT-0 Proteine erkennen zu transportierende Moleküle anhand ihrer Ubiquitin-Modifikation und vermitteln zusammen mit anderen ESCRT-Proteinen durch Membraninvagination deren Aufnahme in multivesikuläre, späte Endosomen (MVB; engl.: *multivesicular body*) [313]. Durch Fusion der MVBs mit dem Lysosom erfolgt schließlich die Degradation der aufgenommenen Proteine [313]. Tom1 erkennt

ubiquitinierte Proteine über zwei Ubiquitin-Bindemotive in seiner GAT-Domäne [314], wobei *in vitro*-Studien auf eine gewisse Präferenz von Tom1 zu K63- über K48-Ubiquitinketten hinweisen [315, 316]. Welche ubiquitinierten Proteine von Tom1 gebunden werden, ist bisher noch nicht im Detail bekannt. Der Nachweis der Ubiquitinierung von mGBP7 in dieser Arbeit legt jedoch die Vermutung nahe, dass die GTPase aufgrund dieser PTM durch Tom1 erkannt wird. Um diese Hypothese zu bestätigen, könnten in Zukunft nach Identifikation der modifizierten Lysine von mGBP7 Mutagenese-Studien durchgeführt werden. Sollte nach dem Austausch modifizierter Lysine keine Interaktion mehr mit Tom1 zu beobachten sein, läge eine Erkennung aufgrund von Ubiquitin-PTMs nahe.

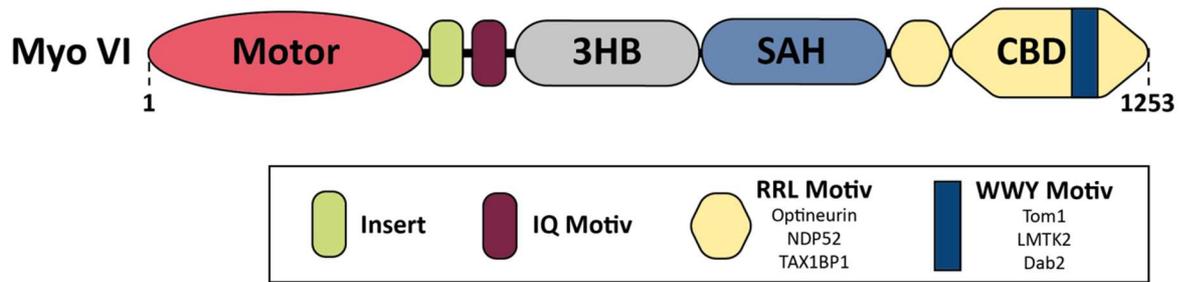
Weitere direkte Interaktionen von Tom1 konnten mit Clathrin, Tollip, Endofin und Myosin 6 nachgewiesen werden (Abb. 5.5) [240, 302, 312, 317, 318]. Clathrin ist vor allem bei der Endozytose von Rezeptoren und deren Liganden beteiligt, indem das Mantelprotein durch die Einstülpung von Zellmembranen Vesikel ausbildet [319, 320]. Dieser wohl bekannteste Mechanismus der Endozytose wird als Clathrin-vermittelte Endozytose (CME) bezeichnet [319, 320]. Jedes Clathrin-Molekül besteht aus drei schweren und drei leichten Untereinheiten, die zusammen ein dreibeiniges Hexamer, das sogenannte Triskelion, bilden [321]. IP-Experimente mit dem C-terminalen Part von Tom1 konnten zeigen, dass die schwere Untereinheit von Clathrin einen der Hauptinteraktionspartner von Tom1 darstellt [240, 303]. Aus diesem Grund wurde auch in dieser Arbeit die Lokalisation von Clathrin in der Zelle bzw. die Kolo-kalisation von Clathrin mit Tom1 und mGBP7 bei *T. gondii*-Infektion untersucht, obwohl das Hüllprotein nicht in den Ko-IP-Experimenten mit HA-mGBP7 kopräzipitiert werden konnte. Beeindruckenderweise zeigte diese Analyse tatsächlich, dass nicht nur Tom1 und mGBP7, sondern auch Clathrin an denselben Arealen der PV von *T. gondii* akkumuliert (s. Abb. 4.25B und S9B). Mit diesen Ergebnissen stellt sich die Frage, ob Clathrin eventuell für eine Membraneinstülpung an der PVM sorgen könnte oder, ob es für den Transport weiterer Effektormoleküle zum Parasiten benötigt wird. Weiter kann spekuliert werden, ob Clathrin im Zusammenspiel mit ATG16L1 für die Bildung und/oder Rekrutierung prä-autophagozytotischer Strukturen/Membranen verantwortlich ist, die nach der Ruptur des Parasiten zur Ausbildung von Autophagosomen und damit dem Abbau parasitärer Komponenten verhelfen könnten. Ansatzpunkte für diese Hypothese liefern Studien aus den letzten 10 Jahren, die demonstrieren konnten, dass die schwere Untereinheit von Clathrin mit ATG16L1 kopräzipitiert und in die Bildung ATG16L1-positiver Autophagosom-Vorläufer involviert ist [322-324]. In Verbindung mit dem Autophagie-Protein ATG16L1 weiter interessant sind Studien von Choi et al. und Ohshima et al. aus dem Jahr 2014, die auf eine kritische Funktion von ATG16L1 im Zusammenspiel mit anderen ATGs in der Rekrutierung von mGBPs zur Parasitenmembran deuten [133, 325]. Studien in der Abwesenheit von Pathogenen zeigen zudem, dass Tom1 durch die Interaktion mit Tollip und/oder Endofin für die Rekrutierung von Clathrin zu Endosomen verantwortlich ist [240, 303, 314].



**Abb. 5.5: Tom1-Domänenstruktur.** Übersicht über die Organisation der Tom1-Domänen und die mit den entsprechenden Domänen interagierenden Proteine (modifiziert nach Tumbarello et al., 2013 und Hu et al., 2019). VHS, Vps27–Hrs–STAM Domäne. GAT, *GGA and target of Myb1 protein* Domäne.

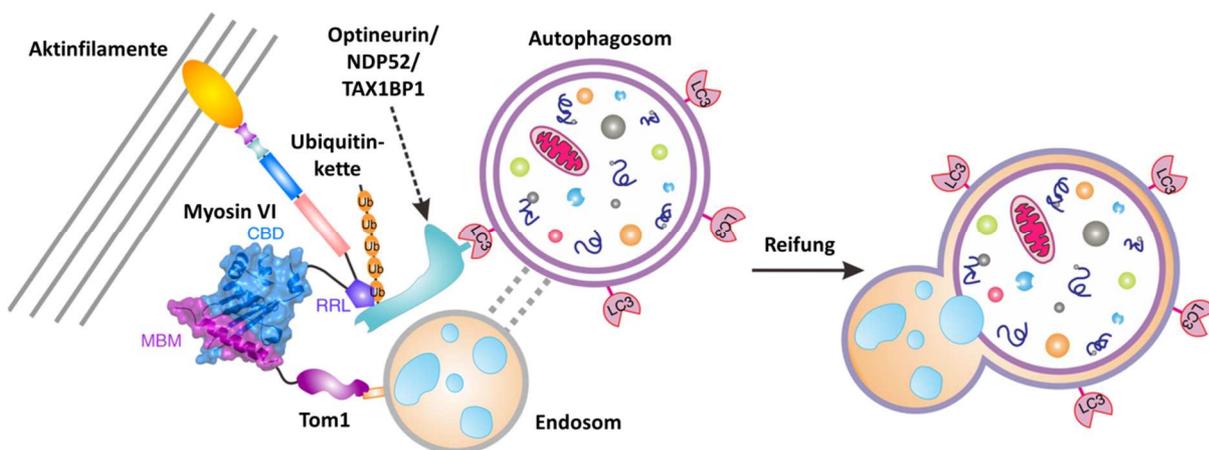
Tollip (engl.: *Toll-interacting protein*) wurde initial als intrazellulärer Regulator von IL-1-Rezeptor- und TLR-Signalwegen identifiziert [326, 327]. Das Protein besitzt eine TBD (engl.: *Tom1-binding domain*)-Domäne für die Interaktion mit Tom1, eine C2-Domäne für die Assoziation mit endosomalen Membranen über die Interaktion mit Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI3P) und eine CUE (engl.: *coupling of ubiquitin conjugation to ER degradation*)-Domäne für die Bindung ubiquitinierten Proteine [302, 312, 328, 329]. Die Assoziation von Tollip mit Endosomen sowie die Interaktion des Proteins mit der GAT-Domäne von Tom1 könnte dazu führen, dass Tollip zusammen mit Tom1 den endosomalen Transport von ubiquitinierten Proteinen und Clathrin reguliert [317]. Dem ebenfalls mit Tom1-interagierenden Protein Endofin werden, wie bereits erwähnt, zu Tollip vergleichbare Funktionen zugeordnet. Endofin bindet an eine weiter C-terminal lokalisierte Region von Tom1 (Abb. 5.5) und besitzt für die Interaktion mit endosomalen PI3P eine FYVE-Domäne [240, 318, 330].

Myosin 6 (Myo VI) ist ein Motorprotein, welches seine Fracht, z. B. Makromoleküle, Organellen oder Vesikel, in Richtung der Minus-Enden von Aktinfilamenten transportiert [331, 332]. Als einziges Myosin mit dieser Direktionalität besitzt es wichtige Funktionen in einer Reihe von zellulären Prozessen wie der CME, der Autophagie und der Exozytose [333-335]. Strukturell lässt sich Myo VI in eine N-terminale Motordomäne, eine für die Rückwärtsbewegung wichtige Insert-Region, ein IQ-Sequenzmotiv, ein 3-Helix-Bündel (3HB), eine  $\alpha$ -Helix Region (SAH) und eine C-terminal globuläre Domäne (CBD) einteilen (Abb. 5.6) [336-338]. Die CBD enthält zwei für Protein-Protein-Interaktionen wichtige Sequenzmotive, das RRL- und das WWY-Motiv [339]. Die Interaktion von der CBD mit verschiedenen Adaptorproteinen wie Tom1, NDP52, TAX1BP1 (engl.: *Tax1-binding protein 1*) und Optineurin ist für die spezifische subzelluläre Lokalisation und Funktion von Myo VI von entscheidender Bedeutung [333, 340-343]. Die Interaktion der CBD mit Tom1 erfolgt über ein C-terminales, in allen drei Tom1-Familienmitgliedern konserviertes IEXWL-Sequenzmotiv [344]. Weitere biochemische Daten legen nahe, dass die Interaktion von Myo VI mit Tom1 auch simultan zu einer Interaktion mit einem der Autophagie-Rezeptoren NDP52, TAX1BP1 oder Optineurin erfolgen kann [337].



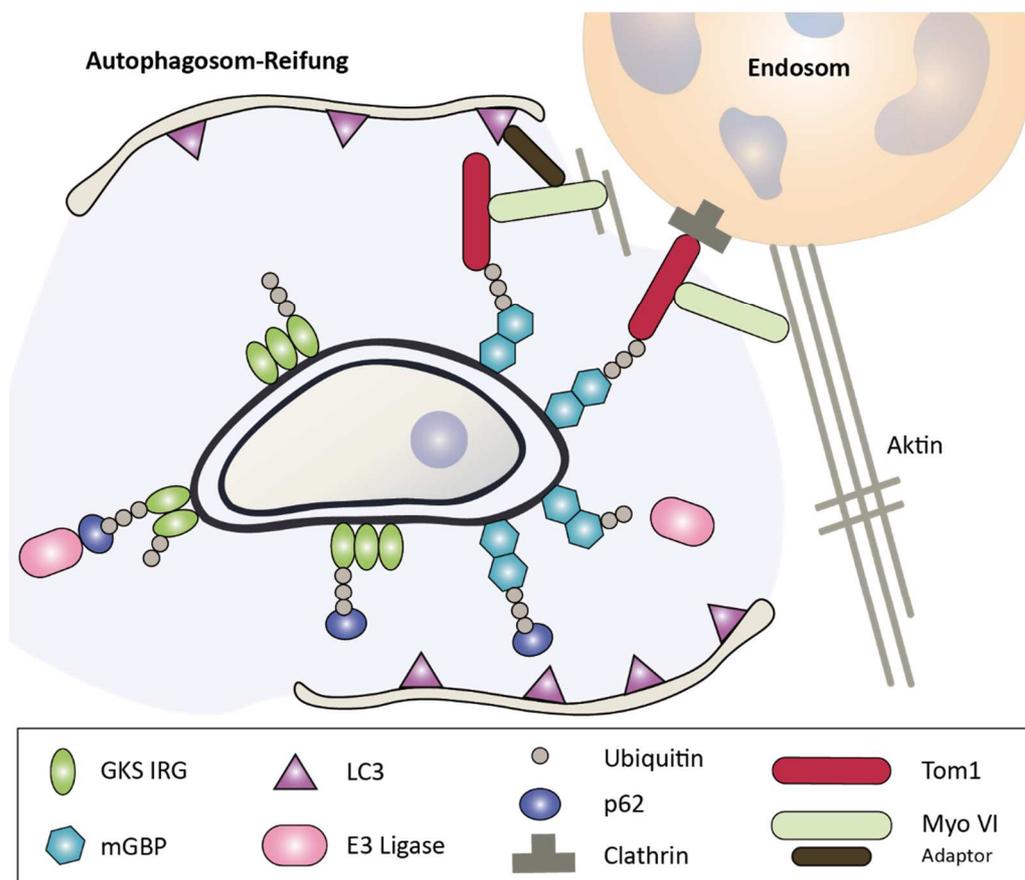
**Abb. 5.6: Myosin 6-Domänenstruktur.** Übersicht über die Organisation der Myosin 6 (Myo VI)-Proteindomänen und die mit den entsprechenden Domänen interagierenden Proteine (modifiziert nach Tumbarello et al., 2013 und Hu et al., 2019). 3HB, *three-helix bundle*. SAH, *stable single  $\alpha$ -helices*. CBD, *cargo-binding domain*.

Insgesamt schlagen die Autoren um Hu et al. unter Berücksichtigung der beschriebenen Myo VI-Interaktionen ein Modell vor (Abb. 5.7), das ein „Tethering“ von Endosomen und Autophagosomen ermöglicht bzw. den Weg für die Reifung von Autophagosomen ebnet [337]. Entsprechend diesem Modell ist Myo VI über seine N-terminale Motordomäne am Aktin-Zytoskelett verankert, während der C-terminale Part von Myo VI mit Tom1, Ubiquitin und einem auf der Oberfläche von Autophagosomen befindlichen Autophagie-Rezeptor assoziiert ist [337]. Der sich bildende Komplex ermöglicht über die Assoziation von Tom1 mit Endosomen den engen Kontakt und damit eine Fusion von Autophagosom und Endosom [337]. Dieses vorgeschlagene Modell und die nachgewiesene Interaktion von Myo VI mit Tom1 ist für diese Arbeit von besonderer Bedeutung, da Myo VI auch durch HA-mGBP7 bei *T. gondii*-Infektion kopräzipitiert werden konnte (Abb. 5.4B-C). Die genaue Evaluation der MS-Daten legt die Vermutung nahe, dass das Motorprotein indirekt über die Interaktion mit Tom1 kopräzipitiert wurde, da es auch mit geringerer Abundanz in den Ko-IP-Kontrollproben ohne mGBP7 identifiziert wurde.



**Abb. 5.7: Modell zur Funktion von Tom1 und Myosin 6 in der Reifung von Autophagosomen.** Autophagie-Adaptorproteine (z. B. Optineurin, NDP52 oder TAX1BP1) binden ubiquitinierte Proteine, Organellen oder Pathogene und rekrutieren LC3-positive Membranen. Das durch die Umhüllung mit LC3-positiven Membranen gebildete Autophagosom bindet über Myosin 6 (VI) an Tom1. Das Adaptorprotein Tom1 bindet wiederum an Endosomen, wodurch die Endosom-Lysosom-Fusion erleichtert wird. Der Transport des Komplexes in Richtung des Minus-Endes von Aktinfilamenten erfolgt über das Motorprotein Myosin 6 (modifiziert nach Hu et al., 2019).

Zusammenfassend liefert die Gesamtheit der Daten zu den mGBP7-Interaktionspartnern und deren Interaktionspartnern starke Indizien dafür, dass mGBP7 über eine spezifische Interaktion mit Tom1 (und Myo VI) in Autophagie-Prozesse an der *T. gondii* PV involviert ist. Denkbar wäre beispielsweise, dass mGBP7 über eine direkte Assoziation mit bestimmten PAMPS oder Lipiden des Parasiten die Rekrutierung des beschriebenen Modellkomplexes initiiert und dadurch die lysosomale Degradation zu degradierender Parasiten-Komponenten vermittelt (Abb. 5.8). Diese Hypothese gilt es jedoch in Folgestudien zu validieren.



**Abb. 5.8: Hypothese zur Funktion von mGBP7 und Tom1 in der Immunabwehr gegen *T. gondii*.** Tom1 bindet an ubiquitiniertes mGBP7 auf der PVM oder dem Parasiten. Die Umhüllung von *T. gondii* mit LC3-positiven Membranen zur Bildung des Autophagosoms erfolgt über Myosin VI und Myosin VI-Adaptorproteine. Zudem wird über Tom1 und von Tom1-gebundenem Clathrin die Fusion mit Endosomen vermittelt. Die anschließende Fusion mit Lysosomen führt zur Degradation der pathogenen Komponenten.

Für ein besseres Verständnis für die Dynamiken in der Zelle bei einer Infektion mit *T. gondii* könnten u. a. 3D-Lebendzell-Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von mCherry-mGBP7 zusammen mit Tom1-GFP dienen. Als nächster Schritt wäre darüber hinaus sinnvoll, die Rekrutierung von Tom1 in An- bzw. Abwesenheit von mGBP7 zu quantifizieren, damit eindeutige Aussagen zur Relevanz von mGBP7 für die Rekrutierung von Tom1 getroffen werden können. Hochauflösende STED-Aufnahmen der mGBP7-Interaktion mit Tom1 und dessen Interaktionspartnern (Clathrin, Myo VI, Tollip und Endofin) könnten zudem hilfreich sein, um die mGBP7-vermittelten Immunabwehrprozesse näher zu definieren. Ein weiteres Ziel sollte es sein z. B. mittels CRISPR-Cas9-Methode eine Tom1<sup>-/-</sup>-Zelllinie zu generieren,

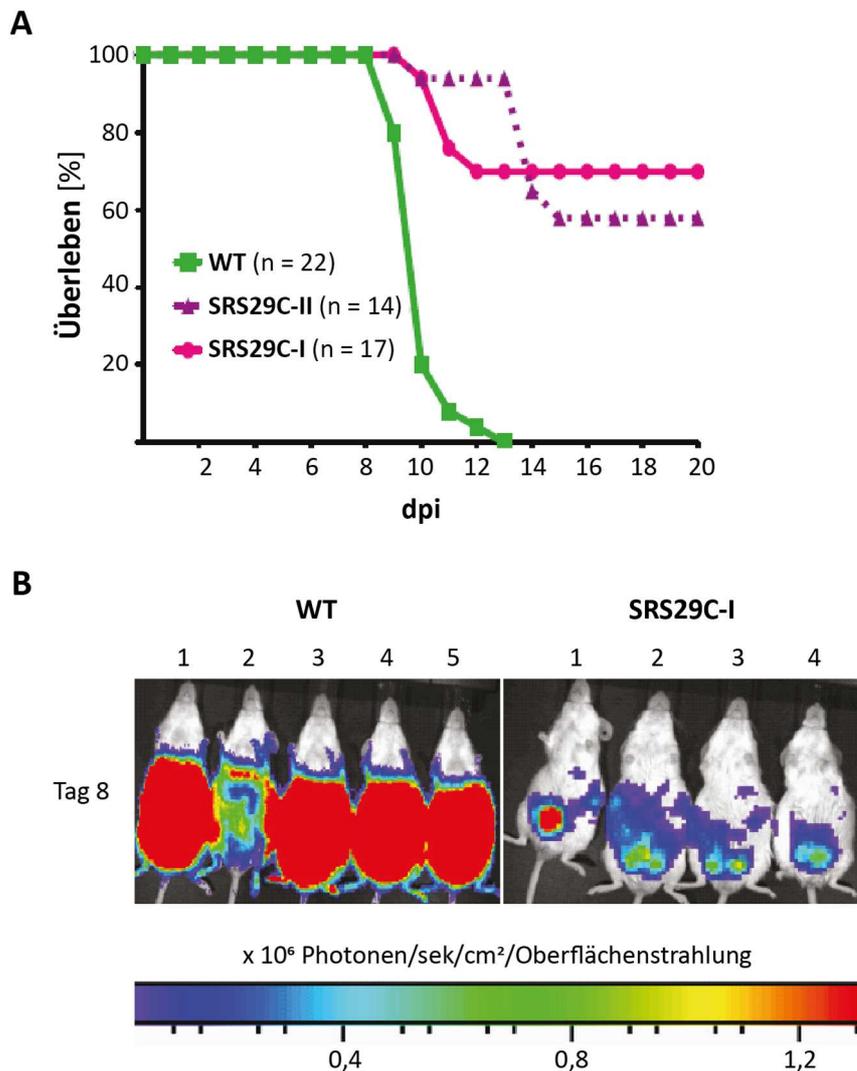
damit in diesen Zellen die mGBP7 Rekrutierung zur PV von *T. gondii* und die Proliferation des Parasiten quantifiziert werden kann.

## 5.6 Funktion von SRS29C in der mGBP7-vermittelten Immunabwehr

Zusätzlich zu Wirtszellproteinen wurde auch das *T. gondii*-Oberflächenprotein SRS29C in den Ko-IP-MS-Experimenten als potentieller Interaktionspartner von mGBP7 identifiziert (Abb. 4.16B). SRS29C gehört zur Toxoplasma SRS (engl.: *SAG1-related sequences*)-Superfamilie, die strukturell mit dem für die Stimulation der Wirtsabwehr wichtigen *T. gondii*-Oberflächenprotein SAG1/SRS29B verwandt ist [91, 345]. Mittels Hidden Markov Modeling konnten insgesamt 144 SRS-Gene (davon 35 Pseudogene) im *T. gondii* ME49 Genom identifiziert werden [91]. SRS-Gensequenzen bestehen typischerweise aus ein bis zwei Domänen mit je vier bis sechs Cysteinen für die Ausbildung von Disulfidbrücken [91, 345]. Zudem verfügen SRS-Proteine über einen GPI-Anker für die Verankerung in der Parasitenmembran [91, 243]. Weiterhin ist die SRS-Genfamilie allgemein polymorph und zeigt eine Entwicklungsstadium- und Stamm-spezifische Expression, die mit der Virulenz verschiedener *T. gondii* Stämme korreliert [91]. Auch SRS29C ist in den verschiedenen *T. gondii*-Stämmen differentiell exprimiert [91, 346]. Die Studie von Wasmuth et al. konnte interessanterweise demonstrieren, dass RH *T. gondii* mit einem Defekt in den hoch immunogenen SRS-Proteinen SAG1/SRS29B und SAG2A/SRS34A eine auffällig starke Hochregulierung von SRS29C zeigen [91]. Darüber hinaus konnte diese Studie im Jahr 2012 zeigen, dass durch die transgene Überexpression von SRS29C im hochvirulenten Typ-I RH Stamm die *T. gondii* Virulenz signifikant attenuiert werden kann (vgl. Abb. 5.9) [91]. Ein Mechanismus für diesen Effekt wurde bisher nicht vorgeschlagen.

Zur Analyse einer potentiellen Interaktion des *T. gondii*-Proteins mit mGBP7 erfolgte in dieser Arbeit die Elektroporation von einem SRS29C-mCherry Fusionskonstrukt in ME49 *T. gondii*. Der Erfolg der Transduktion konnte mittels Konfokalmikroskopie bestätigt werden (Abb. 4.27B). Der Nachweis mittels WB ist hingegen in Folgeexperimenten zu wiederholen, da nach erfolgter Antibiotika-Selektion neben einer geringen AK-Spezifität ein Verlust des mCherry-Fluoreszenzsignals zu beobachten war. Im Allgemeinen ist der Verlust der neu eingeführten DNA nach einigen Replikationszyklen häufig zu beobachten, wenn die DNA nicht in das *T. gondii*-Genom integriert wurde [347]. Anstelle der Antibiotika-Selektion wird für Folgeexperimente daher die Vereinzelmethode vorgeschlagen, um *T. gondii* zu identifizieren, bei denen SRS29C-mCherry stabil ins Genom integriert werden konnte. Wäre die Generation stabil exprimierender SRS29C-mCherry *T. gondii* erfolgreich, könnten z. B. mittels hochauflösender STED (engl.: *stimulated emission depletion*)-Mikroskopie mögliche Interaktionen der beiden Proteine visualisiert werden. Als weiterer Ansatz könnte die Replikation von SRS29C überexprimierenden *T. gondii* in WT- vs. mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen verglichen werden. Ist eine Assoziation von mGBP7 mit SRS29C und/oder ein Effekt von mGBP7 auf die Replikation der SRS29C überexprimierenden *T. gondii* zu beobachten, könnte als potentieller Mechanismus für die attenuierte Virulenz eine verstärkte Erkennung durch mGBP7 vorgeschlagen werden. Funktional würde SRS29C dieser Hypothese nach als PAMP-Molekül agieren, während einem mGBP erstmals PRR-ähnliche Funktionen zugeschrieben würden. Der wohl wichtigste Ansatz zur Bestätigung dieser Hypothese wäre dann die Generierung SRS29C-defizienter ME49 *T. gondii* mittels CRISPR-Cas9-Technologie. Bei

Infektion von mit GFP-mGBP7 rekonstituierten mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen sollte dann keine Rekrutierung der GTPase mehr zu beobachten sein.



**Abb. 5.9: Überexpression von SRS29C in *T. gondii* und Infektion von CD-1-Mäusen** (modifiziert nach Wasmuth et al., 2012, [91]). **(A)** Effekt der SRS29C-I (aus RH Typ-I *T. gondii*) bzw. SRS-29C-II (aus ME49 Typ-II *T. gondii*) Überexpression in transgenen RH Typ-I *T. gondii* auf die akute Virulenz nach Infektion von CD-1-Mäusen. Die Infektion mit SRS29C-I/II RH *T. gondii* führt zu einer signifikant niedrigeren Sterblichkeitsrate als die Infektion mit WT RH *T. gondii*. Für die Infektion wurden je 50 Parasiten verwendet. Die Mortalitätsdaten setzen sich aus sechs unabhängigen Experimenten zusammen. **(B)** Biolumineszenznachweis der Parasitenbelastungen *in vivo*. CD-1-Mäuse wurden mit 50 Luciferase-positiven WT oder SRS29C-I-Parasiten infiziert und an Tag 8 nach der Infektion abgebildet. WT, Wildtyp. n, Anzahl infizierter Mäuse.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass mGBP7 und SRS29C kopräzipitieren. Zudem wurde ein Protokoll zur Elektroporation von *T. gondii* mit SRS29C-mCherry etabliert und Folgeexperimente zur Verifizierung der Interaktion von mGBP7 und SRS29C vorgeschlagen. Das Studium der Interaktion von mGBP7 mit SRS29C ist von besonderem Interesse, da SRS29C als negativer Regulator der *T. gondii* Virulenz beschrieben wurde.

## 5.7 Ausblick

Zur detaillierten Strukturanalyse von mGBP7 wird es in zukünftigen Arbeiten ein Ziel sein die Kristallisationsbedingungen zu optimieren, um einen Proteinkristall zu erhalten, der in der Röntgenkristallstrukturanalyse mit einer höheren Auflösung gemessen werden kann. Durch die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von mGBP7 könnten weitere Einblicke in den GTP-Hydrolysemechanismus und die Struktur des biologisch wichtigen CT-Parts von mGBP7 gewonnen werden. Eine umfassende Analyse der PTMs von mGBP7, d. h. der Ubiquitinierung und der ISGylierung, wird weiterhin dazu verhelfen die Regulation der GTPase-Aktivität und der molekularen Funktionen des Proteins besser zu verstehen. Nach der Identifikation modifizierter Lysine mittels MS könnten entsprechende Mutanten von mGBP7 generiert werden und diese auf ihre Fähigkeit der Rekrutierung zur PV von *T. gondii* analysiert werden. Um den Effekt der ISGylierung auf mGBP7 und dessen Rekrutierung zur PV des Parasiten zu ermitteln, wird es zudem ein Ziel sein, die Rekrutierung von N- und C-terminal mCherry-getagtem ISG15 in infizierten mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen mit und ohne Rekonstitution von GFP-mGBP7 sowie die Funktion von mGBP7 in ISG15<sup>-/-</sup>-Zellen zu untersuchen.

Eine weitere anspruchsvolle und zugleich spannende Aufgabe wird die weitere Validierung der identifizierten mGBP7-Interaktionspartner bzw. deren funktionelle Charakterisierung im Rahmen der mGBP7-vermittelten Immunabwehr darstellen. Für Clca1, Jup, Rftn1 und Sytl2 ist hierzu zunächst mittels AK-Färbung eine Kolo-kalisation mit GFP-mGBP7 in uninfizierten bzw. *T. gondii*-infizierten mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen zu bestätigen. Aufgrund der wiederholt vielversprechenden Ko-IP-Ergebnisse für Sytl2 sollte insbesondere auch ein Hauptaugenmerk auf die Identifikation der mit mGBP7-interagierenden Sytl2 Isoformen gelegt werden. Darüber hinaus wird es von besonderem Interesse sein, die Interaktion von mGBP7 mit dem Adapterprotein Tom1 im Detail zu analysieren. Um ein besseres Verständnis für die molekulare Interaktion von mGBP7 mit Tom1 und deren Dynamik zu erhalten, sollten 3D-Lebendzell-Konfokalmikroskopie- bzw. hochauflösende STED-Aufnahmen von mCherry-mGBP7 und Tom1-GFP anvisiert werden. Weiterhin wäre es aufschlussreich, die für die Interaktion mit mGBP7 erforderliche Domäne zu identifizieren. Hierzu wird vorgeschlagen in Folgestudien die Kolo-kalisation von GFP-Tom1 mit mCherry-getagten mGBP7-Trunkationsmutanten zu evaluieren und die Ergebnisse durch Ko-IP-Experimente zu validieren. Weiterhin wird es in künftigen Studien ein Hauptziel sein, eine Tom1<sup>-/-</sup>-Zelllinie zu generieren, um die Funktion von Tom1 in der Immunabwehr gegen *T. gondii* aufzuklären. Durch die Analyse der *T. gondii* Proliferation und der Rekrutierung von mGBP7 in dieser Zelllinie werden entscheidende Aussagen über den Effekt von Tom1 in der mGBP7-vermittelten Immunabwehr getroffen werden können. Ein Vergleich der quantitativen Daten zur Rekrutierung von mGBP7 in der Abwesenheit von Tom1 und umgekehrt von Tom1 in der Abwesenheit von mGBP7 könnte zudem Hinweise auf eine potentielle Rekrutierungshierarchie geben. Ebenfalls wird auch die Analyse bereits in der Literatur beschriebener Interaktionspartner von Tom1 helfen, einen Gesamtüberblick über die an der PV von *T. gondii* ablaufenden zellulären Prozesse zu erhalten. Zum intensiven Studium eines sich potentiell formierenden Tom1-mGBP7-Effektorkomplexes könnten in ferner Zukunft auch die Effekte beider Proteine in Infektionsexperimenten mit anderen Pathogenen untersucht werden.

Ein weiteres Hauptaugenmerk wird in Folgestudien auf die Aufklärung der Bedeutung des *T. gondii*-Proteins SRS29C auf die Proliferation des Parasiten im Zusammenhang mit der Funktion von mGBP7 gelegt werden. In einem ersten Schritt wird für die Validierung der SRS29C-mGBP7-Interaktion ein Nachweis über die Analyse der Kollokalisierung der beiden Proteine an der *T. gondii* PV vorgeschlagen. Erforderlich wären hierfür STED-Aufnahmen der mit GFP-mGBP7 rekonstituierten mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen bei Infektion mit mCherry-SRS29C exprimierenden *T. gondii*. Sollte eine Kollokalisierung der beiden Proteine beobachtet werden, wäre die Generation von SRS29C defizienten ME49 *T. gondii* mittels CRISPR-Cas9-Technologie ein erstrebenswerter nächster Schritt. Die mit GFP-mGBP7 rekonstituierten mGBP7<sup>-/-</sup>-Zellen könnten dann genutzt werden, um zu evaluieren, ob die Rekrutierung von mGBP7 bei Infektion mit diesen genetisch veränderten *T. gondii* beeinflusst wird. Weiterhin wäre es ein spannender Ansatz, die Rekrutierung von GFP-mGBP7 zu SRS29C-überexprimierenden *T. gondii* zu analysieren.

Weitblickend gesehen wird die Aufklärung der mGBP7-vermittelten Immunabwehr gegen *T. gondii* und andere Pathogene ein besseres Verständnis für die generelle biologische Funktion von GBPs im Rahmen von Infektionen und anderen Entzündungsreaktionen ermöglichen. Erstrebenswert wäre, wenn dieses Wissen bereits in nicht allzu ferner Zukunft genutzt werden könnte, um neue klinische Therapieansätze für die Behandlung schwer heilbarer Infektionskrankheiten zu definieren.



## 6 Zusammenfassung

Die Guanylat-bindenden Proteine (GBPs) bilden eine Familie von IFN-induzierbaren GTPasen, die eine Schlüsselrolle in der zellautonomen Immunität gegen intrazelluläre Pathogene wie *T. gondii* spielen. Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass Mitglieder der murinen GBP-Familie direkt an der *T. gondii* PVM akkumulieren, deren Ruptur vermitteln und somit letztendlich zur Eliminierung des Parasiten bzw. zur Immunkontrolle beitragen. Insbesondere mGBP7 wird eine essentielle Funktion in der Immunabwehr gegen *T. gondii* zugeschrieben, da mGBP7<sup>-/-</sup>-Mäuse ca. an Tag 10 nach einer Infektion mit Typ-II Toxoplasmen versterben, während bei gleicher Infektionsdosis nur ca. 10 – 15 % der WT-Mäuse sterben. Die zu Grunde liegenden biochemischen und molekularen Mechanismen der mGBP7-vermittelten Immunität sind jedoch bisher nur wenig verstanden.

Bislang wurden sowohl humanes GBP1 und GBP5 als auch murines GBP2 biochemisch detailliert charakterisiert. Mit murinem GBP7 wird in dieser Arbeit ein mGBP-Familienmitglied mit einem unkonventionellen und verlängerten C-Terminus analysiert. Die vorliegende Studie zeigt, dass mGBP7 eine konzentrationsabhängige GTPase-Aktivität ( $k_{\text{cat, app}} = 20 \text{ min}^{-1}$ ) aufweist und, dass das Lysin an Position 51 für dessen Enzymaktivität essentiell ist. Fluoreszenzspektroskopische Analysen demonstrieren weiterhin, dass mGBP7 mit hoher Affinität an GTP ( $K_D = 0,22 \text{ mM}$ ) bindet und die K51A-Mutation die GTP-Bindung stark beeinträchtigt. GTPase-Aktivitätsmessungen belegen, dass vorwiegend GTP als Substrat für die mGBP7-Hydrolysereaktion dient und dass mGBP7 das Nukleotid GTP zu GDP und GMP hydrolysiert. Die Inkubation mit  $\gamma$ -Phosphatanaloga wie Orthovanadat,  $\text{AlF}_x$  und  $\text{BeF}_x$  in Komplex mit GDP führt zu einer Hemmung der GTPase-Aktivität. SEC-MALS- und SAXS-Analysen zeigen zudem, dass mGBP7 transiente Dimere bildet und dass dieses Oligomerisierungsverhalten überraschenderweise nicht durch die Anwesenheit von Nukleotiden beeinflusst wird.

Bisher ist nur wenig zu Interaktionen von mGBPs mit anderen zellulären Molekülen beschrieben und vor allem für mGBP7 sind noch keine Protein-Interaktionen bekannt. In dieser Arbeit konnten erstmalig mGBP7-Interaktionspartner mittels Ko-IP- und MS-Analyse ermittelt und anschließend durch unabhängige Ko-IP-Experimente verifiziert werden. Die Ko-IP-Ergebnisse zeigen, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Cl-Kanalregulator Clca1, das in Zellkontakten vorhandene Strukturprotein Jup und das Lipid Raft Protein Rftn1 Interaktionspartner von mGBP7 darstellen. Zudem belegen die unabhängig durchgeführten Ko-IP-Analysen eine spezifische Interaktion von mGBP7 mit dem Synaptotagmin-ähnlichen Protein Sytl2 sowie dem Adaptorprotein Tom1. Mittels Konfokalmikroskopie konnte zusätzlich eine Kolokalisation von mCherry-mGBP7 mit generierten GFP-Fusionskonstrukten von Sytl2 und Tom1 an der *T. gondii* PV gezeigt werden. Mittels Antikörperfärbung konnte demonstriert werden, dass auch das Hüllprotein Clathrin an exakt denselben Arealen der *T. gondii* PV akkumuliert wie mGBP7 und Tom1. Des Weiteren konnten im Rahmen der Interaktionsstudien durch WB-Analysen gezeigt werden, dass mGBP7 sowohl in An- als auch in Abwesenheit einer *T. gondii*-Infektion ubiquitiniert sowie ISGyliert wird. Diese Beobachtungen, zusammen mit der Kolokalisation von mGBP7, Tom1 und Clathrin, lassen die Hypothese zu, dass ein für die Reorganisation von Membranen während der Autophagie erforderliches Tom1-Ubiquitin-„Konjugationssystem“ dafür verantwortlich sein könnte, dass mGBPs als Effektorproteine gezielt auf intrazelluläre Membranen von Pathogenen wie der PVM

von *T. gondii* gelenkt werden. Interessanterweise wurde auch ein *T. gondii*-Protein, das SAG1-ähnliche SRS29C, in den MS-Analysen als potentieller Interaktionspartner von mGBP7 identifiziert.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit die biochemische und funktionelle Charakterisierung von mGBP7 durchgeführt, durch die neue Erkenntnisse zu den molekularen Funktionen dieser GTPase in der Infektabwehr gegen einen intrazellulären pathogenen Parasiten gewonnen werden konnten.

## 7 Summary

Guanylate-binding proteins (GBPs) comprise a family of interferon-inducible GTPases that play a key role in the cell-autonomous immunity against intracellular pathogens such as *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Previous studies have shown that members of the murine GBP (mGBP) family directly accumulate at intracellular *T. gondii* and by disruption of the parasitophorous vacuole membrane (PVM) mediate killing of the parasite. In particular mGBP7 plays an important role in the innate immune defense against *T. gondii*, since mGBP7<sup>-/-</sup> mice die around day 10 post infection with type-II toxoplasma whereas only 10 – 15 % of wildtype mice die. However, the underlying biochemical and molecular mechanisms of the mGBP7-mediated effector functions are poorly understood.

So far, human GBP1 and GBP5 as well as murine GBP2 have been biochemically characterized in detail. Here, with murine GBP7, a GBP family member with an unconventional and elongated C-terminus is analyzed. This study demonstrates that mGBP7 exhibits a concentration-dependent GTPase activity ( $k_{\text{cat, app}} = 20 \text{ min}^{-1}$ ) and that the lysine at position 51 is essential for enzyme activity. In addition, fluorescence spectroscopy analyses reveal that mGBP7 binds GTP with high affinity ( $K_D = 0.22 \text{ mM}$ ) and that the K51A mutation strongly impairs GTP binding. GTPase activity measurements indicate that mainly GTP serves as substrate for the mGBP7 hydrolysis reaction and that mGBP7 hydrolyzes the GTP nucleotide to GDP and GMP. The mGBP7 GTPase activity is inhibited by incubation with  $\gamma$ -phosphate analogs such as orthovanadate,  $\text{AlF}_x$  and  $\text{BeF}_x$  in complex with GDP. Furthermore, SEC-MALS and SAXS analyses provide evidence that mGBP7 forms transient dimers and that, surprisingly, this oligomerization pattern is not influenced by the presence of nucleotides.

To date, only scarce data is available with regard to interactions of mGBPs and, especially for mGBP7, no protein interactions are known yet. In this study, interaction partners of mGBP7 could be identified for the first time by co-immunoprecipitation (co-IP) and mass spectrometry (MS) analysis and were verified by independent co-IP experiments. The co-IP results indicate that the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive chloride channel regulator Clca1, the structural protein Jup and the lipid raft protein Rftn1 interact with mGBP7. Furthermore, the independently performed co-IP analyses strongly indicate a specific interaction of mGBP7 with the synaptotagmin-like protein Sytl2 and the adaptor protein Tom1. In addition, confocal microscopy analyses revealed a colocalization of mCherry-mGBP7 with newly generated GFP fusion constructs of Sytl2 and Tom1 at *T. gondii* PVs. Antibody staining demonstrated that the coat protein clathrin also accumulates at exactly the same areas of the *T. gondii* PV as mGBP7 and Tom1. Moreover, Western Blot analyses of co-immunoprecipitated mGBP7 showed that the protein is ubiquitinated and ISGylated both in the presence and in the absence of *T. gondii* infection. This observation, along with the colocalization of the proteins mGBP7, Tom1 and clathrin allows the hypothesis that a Tom1-ubiquitin "conjugation system" required for membrane reorganization during autophagy may be responsible for targeting mGBPs as effector proteins to intracellular membranes of pathogens such as the *T. gondii* PVM. Interestingly, in MS analyses the SAG1-like *T. gondii* protein SRS29C was identified as potential interaction partner of mGBP7.

In summary, this doctoral thesis focused on the biochemical and functional characterization of mGBP7, which provided new insights into the molecular functions of this GTPase in the host defense against an intracellular pathogenic parasite.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Murphy, K.M., P. Travers, and M. Walport, *Janeway Immunologie*. Vol. 7 pp. 3-7, 12-17, 19-24, 34-37, 119-121, 481-483. 2014: Springer.
2. Löffler, G. and P.E. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*. Vol. 7 pp. 1122-1124. 2019: Springer.
3. Black, M.W. and J.C. Boothroyd, *Lytic Cycle of Toxoplasma gondii*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000. **64**(3): p. 607-623.
4. Katris, N.J., et al., *The Apical Complex Provides a Regulated Gateway for Secretion of Invasion Factors in Toxoplasma*. 2014. **10**(4): p. e1004074.
5. Howe, D.K. and L.D. Sibley, *Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease*. J Infect Dis, 1995. **172**(6): p. 1561-6.
6. Sibley, L.D. and J.W. Ajioka, *Population structure of Toxoplasma gondii: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps*. Annu Rev Microbiol, 2008. **62**: p. 329-51.
7. Barragan, A. and L.D. Sibley, *Migration of Toxoplasma gondii across biological barriers*. Trends Microbiol, 2003. **11**(9): p. 426-30.
8. Saeij, J.P.J., et al., *Polymorphic Secreted Kinases Are Key Virulence Factors in Toxoplasmosis*. 2006. **314**(5806): p. 1780-1783.
9. Behnke, M.S., et al., *Virulence differences in Toxoplasma mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases*. 2011. **108**(23): p. 9631-9636.
10. Taylor, S., et al., *A Secreted Serine-Threonine Kinase Determines Virulence in the Eukaryotic Pathogen Toxoplasma gondii*. 2006. **314**(5806): p. 1776-1780.
11. Dubey, J.P., *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. 2000, CRC Press.
12. Dubey, J.P., N.L. Miller, and J.K. Frenkel, *Toxoplasma gondii life cycle in cats*. J Am Vet Med Assoc, 1970. **157**(11): p. 1767-70.
13. Jones, J.L. and J.P. Dubey, *Foodborne toxoplasmosis*. Clin Infect Dis, 2012. **55**(6): p. 845-51.
14. Frenkel, J.K., *Pursuing toxoplasma*. J Infect Dis, 1970. **122**(6): p. 553-9.
15. Su, C., et al., *Recent expansion of Toxoplasma through enhanced oral transmission*. Science, 2003. **299**(5605): p. 414-6.
16. Weiss, L.M. and J.P. Dubey, *Toxoplasmosis: A history of clinical observations*. International Journal for Parasitology, 2009. **39**(8): p. 895-901.
17. Kieffer, F. and M. Wallon, *Chapter 112 - Congenital toxoplasmosis*, in *Handbook of Clinical Neurology*, O. Dulac, M. Lassonde, and H.B. Sarnat, Editors. 2013, Elsevier. p. 1099-1101.
18. *Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data*. The Lancet, 2007. **369**(9556): p. 115-122.
19. Mamidi, A., J.A. Desimone, and R.J. Pomerantz, *Central nervous system infections in individuals with HIV-1 infection*. Journal of Neurovirology, 2002. **8**(3): p. 158-167.
20. Kim, K. and L.M. Weiss, *Toxoplasma: the next 100years*. 2008. **10**(9): p. 978-984.
21. Robert-Gangneux, F. and M.L. Dardé, *Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis*. Clin Microbiol Rev, 2012. **25**(2): p. 264-96.

22. Dubey, J.P., *Advances in the life cycle of Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol, 1998. **28**(7): p. 1019-24.
23. Ferguson, D.J.P., *Toxoplasma gondii and sex: essential or optional extra?* 2002. **18**(8): p. 351-355.
24. Dubey, J.P., *Isolation of Toxoplasma gondii from a naturally infected beef cow*. J Parasitol, 1992. **78**(1): p. 151-3.
25. Jones, J.L. and J.P. Dubey, *Foodborne Toxoplasmosis*. Clinical Infectious Diseases, 2012. **55**(6): p. 845-851.
26. Hiepe, T., R. Lucius, and B. Gottstein, *Allgemeine Parasitologie*. 2006.
27. Lau, Y.-L., et al., *Deciphering the Draft Genome of Toxoplasma gondii RH Strain*. PLOS ONE, 2016. **11**(6): p. e0157901.
28. Moore, R.B., et al., *A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites*. Nature, 2008. **451**(7181): p. 959-963.
29. Janouskovec, J., et al., *A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids*. 2010. **107**(24): p. 10949-10954.
30. Fichera, M.E. and D.S. Roos, *A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites*. Nature, 1997. **390**(6658): p. 407-409.
31. He, C.Y., et al., *A plastid segregation defect in the protozoan parasite Toxoplasma gondii*. The EMBO journal, 2001. **20**(3): p. 330-339.
32. Moreno, S.N.J. and Z.-H. Li, *Anti-infectives Targeting the isoprenoid pathway of Toxoplasma gondii*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2008. **12**(3): p. 253-263.
33. Nair, S.C., et al., *Apicoplast isoprenoid precursor synthesis and the molecular basis of fosmidomycin resistance in <em>Toxoplasma gondii</em>*. The Journal of Experimental Medicine, 2011. **208**(7): p. 1547.
34. Van Dooren, G.G., L.M. Stimmler, and G.I. McFadden, *Metabolic maps and functions of the Plasmodium mitochondrion*. 2006. **30**(4): p. 596-630.
35. Weiss, L.M., *Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods*. 2013: Elsevier Science.
36. Dubey, J.P., D.S. Lindsay, and C.A. Speer, *Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts*. Clinical microbiology reviews, 1998. **11**(2): p. 267-299.
37. Kong, P., et al., *Lipid analysis of Eimeria sporozoites reveals exclusive phospholipids, a phylogenetic mosaic of endogenous synthesis, and a host-independent lifestyle*. Cell Discovery, 2018. **4**(1).
38. Hehl, A.B., et al., *Asexual expansion of Toxoplasma gondii merozoites is distinct from tachyzoites and entails expression of non-overlapping gene families to attach, invade, and replicate within feline enterocytes*. BMC Genomics, 2015. **16**(1): p. 66.
39. Hu, K., et al., *Cytoskeletal Components of an Invasion Machine—The Apical Complex of Toxoplasma gondii*. PLoS Pathogens, 2006. **2**(2): p. e13.
40. Melo, E.J.L., M. Attias, and W. De Souza, *The Single Mitochondrion of Tachyzoites of Toxoplasma gondii*. Journal of Structural Biology, 2000. **130**(1): p. 27-33.

41. Morisaki, J.H., J.E. Heuser, and L.D. Sibley, *Invasion of Toxoplasma gondii occurs by active penetration of the host cell*. Journal of Cell Science, 1995. **108**(6): p. 2457.
42. Hill, D.E., S. Chirukandoth, and J.P. Dubey, *Biology and epidemiology of Toxoplasma gondii in man and animals*. Anim Health Res Rev, 2005. **6**(1): p. 41-61.
43. Sibley, L.D., *Intracellular Parasite Invasion Strategies*. Science, 2004. **304**(5668): p. 248.
44. Carruthers, V.B., S.N. Moreno, and L.D. Sibley, *Ethanol and acetaldehyde elevate intracellular [Ca<sup>2+</sup>] and stimulate microneme discharge in Toxoplasma gondii*. The Biochemical journal, 1999. **342 ( Pt 2)**(Pt 2): p. 379-386.
45. Mital, J., et al., *Conditional expression of Toxoplasma gondii apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion*. Molecular biology of the cell, 2005. **16**(9): p. 4341-4349.
46. Lamarque, M., et al., *The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites*. PLoS pathogens, 2011. **7**(2): p. e1001276-e1001276.
47. Besteiro, S., et al., *Export of a Toxoplasma gondii Rhoptry Neck Protein Complex at the Host Cell Membrane to Form the Moving Junction during Invasion*. 2009. **5**(2): p. e1000309.
48. Guérin, A., et al., *Efficient invasion by Toxoplasma depends on the subversion of host protein networks*. Nature Microbiology, 2017. **2**(10): p. 1358-1366.
49. Huynh, M.-H., et al., *Rapid invasion of host cells by Toxoplasma requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex*. The EMBO journal, 2003. **22**(9): p. 2082-2090.
50. Meissner, M., et al., *A family of transmembrane microneme proteins of <em>Toxoplasma gondii</em> contain EGF-like domains and function as escorters*. Journal of Cell Science, 2002. **115**(3): p. 563.
51. Reiss, M., et al., *Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in Toxoplasma gondii*. The Journal of cell biology, 2001. **152**(3): p. 563-578.
52. Mordue, D.G., et al., *Invasion by Toxoplasma gondii Establishes a Moving Junction That Selectively Excludes Host Cell Plasma Membrane Proteins on the Basis of Their Membrane Anchoring*. The Journal of Experimental Medicine, 1999. **190**(12): p. 1783-1792.
53. Charron, A.J. and L.D. Sibley, *Molecular Partitioning during Host Cell Penetration by Toxoplasma gondii*. 2004. **5**(11): p. 855-867.
54. Coppens, I., *Host but Not Parasite Cholesterol Controls Toxoplasma Cell Entry by Modulating Organelle Discharge*. 2003. **14**(9): p. 3804-3820.
55. Schwab, J.C., C.J. Beckers, and K.A. Joiner, *The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular Toxoplasma gondii functions as a molecular sieve*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(2): p. 509-513.
56. Daniel, et al., *The Toxoplasma Dense Granule Proteins GRA17 and GRA23 Mediate the Movement of Small Molecules between the Host and the Parasitophorous Vacuole*. 2015. **17**(5): p. 642-652.
57. Jones, T.C., *THE INTERACTION BETWEEN TOXOPLASMA GONDII AND MAMMALIAN CELLS: II. THE ABSENCE OF LYSOSOMAL FUSION WITH PHAGOCYTTIC VACUOLES CONTAINING LIVING PARASITES*. 1972. **136**(5): p. 1173-1194.

58. Sinai, A.P., P. Webster, and K.A. Joiner, *Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the Toxoplasma gondii parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction*. Journal of Cell Science, 1997. **110**(17): p. 2117.
59. Crawford, M.J., et al., *Toxoplasma gondii scavenges host-derived lipoic acid despite its de novo synthesis in the apicoplast*. 2006. **25**(13): p. 3214-3222.
60. Wang, Y., L.M. Weiss, and A. Orlofsky, *Intracellular parasitism with Toxoplasma gondii stimulates mammalian-target-of-rapamycin-dependent host cell growth despite impaired signalling to S6K1 and 4E-BP1*. Cellular microbiology, 2009. **11**(6): p. 983-1000.
61. Sibley, L.D., et al., *Invasion and Intracellular Survival by Toxoplasma*. 2006.
62. Sasai, M., A. Pradipta, and M. Yamamoto, *Host immune responses to Toxoplasma gondii*. International Immunology, 2018. **30**(3): p. 113-119.
63. Sasai, M. and M. Yamamoto, *Pathogen Recognition Receptors: Ligands and Signaling Pathways by Toll-Like Receptors*. International Reviews of Immunology, 2013. **32**(2): p. 116-133.
64. Yarovinsky, F., *TLR11 Activation of Dendritic Cells by a Protozoan Profilin-Like Protein*. 2005. **308**(5728): p. 1626-1629.
65. Raetz, M., et al., *Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-dependent IL-12 response to Toxoplasma gondii profilin*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2013. **191**(9): p. 4818-4827.
66. Pifer, R., et al., *UNC93B1 Is Essential for TLR11 Activation and IL-12-dependent Host Resistance to Toxoplasma gondii*. 2011. **286**(5): p. 3307-3314.
67. Debierre-Grockiego, F., et al., *Activation of TLR2 and TLR4 by Glycosylphosphatidylinositols Derived from Toxoplasma gondii*. 2007. **179**(2): p. 1129-1137.
68. Gazzinelli, R.T. and E.Y. Denkers, *Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism*. Nature Reviews Immunology, 2006. **6**: p. 895.
69. Melo, M.B., et al., *UNC93B1 Mediates Host Resistance to Infection with Toxoplasma gondii*. 2010. **6**(8): p. e1001071.
70. Scanga, C.A., et al., *Cutting Edge: MyD88 Is Required for Resistance to *Toxoplasma gondii* Infection and Regulates Parasite-Induced IL-12 Production by Dendritic Cells*. The Journal of Immunology, 2002. **168**(12): p. 5997.
71. Arancibia, S.A., et al., *Toll-like Receptors are Key Participants in Innate Immune Responses*. 2007. **40**(2).
72. Khan, I.A., T. Matsuura, and L.H. Kasper, *Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis*. Infection and immunity, 1994. **62**(5): p. 1639-1642.
73. Gazzinelli, R.T., et al., *Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. **90**(13): p. 6115-6119.
74. Mashayekhi, M., et al., *CD8 $\alpha$ (+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by Toxoplasma gondii tachyzoites*. Immunity, 2011. **35**(2): p. 249-259.

75. Goldszmid, R.S., et al., *NK cell-derived interferon- $\gamma$  orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection*. *Immunity*, 2012. **36**(6): p. 1047-1059.
76. Robben, P.M., et al., *Production of IL-12 by Macrophages Infected with *Toxoplasma gondii* Depends on the Parasite Genotype*. *The Journal of Immunology*, 2004. **172**(6): p. 3686.
77. Bliss, S.K., Y. Zhang, and E.Y. Denkers, *Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12*. *J Immunol*, 1999. **163**(4): p. 2081-8.
78. Bliss, S.K., B.A. Butcher, and E.Y. Denkers, *Rapid Recruitment of Neutrophils Containing Prestored IL-12 During Microbial Infection*. *The Journal of Immunology*, 2000. **165**(8): p. 4515.
79. Gazzinelli, R.T., et al., *Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation*. *The Journal of Immunology*, 1993. **151**(7): p. 3672.
80. Bliss, S.K., et al., *Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 1999. **162**(12): p. 7369-7375.
81. Denkers, E.Y., et al., *Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma**. *International Journal for Parasitology*, 2004. **34**(3): p. 411-421.
82. Chang, H.R., G.E. Grau, and J.C. Pechère, *Role of TNF and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii**. *Immunology*, 1990. **69**(1): p. 33-37.
83. Abi Abdallah, D.S., et al., **Toxoplasma gondii* Triggers Release of Human and Mouse Neutrophil Extracellular Traps*. *Infection and Immunity*, 2012. **80**(2): p. 768.
84. Blanchard, N. and N. Shastri, *Topological journey of parasite-derived antigens for presentation by MHC class I molecules*. *Trends in Immunology*, 2010. **31**(11): p. 414-421.
85. LÜder, et al., *Down-regulation of MHC class II molecules and inability to up-regulate class I molecules in murine macrophages after infection with *Toxoplasma gondii**. *Clinical & Experimental Immunology*, 1998. **112**(2): p. 308-316.
86. Tait, E.D., et al., *Virulence of *Toxoplasma gondii* Is Associated with Distinct Dendritic Cell Responses and Reduced Numbers of Activated CD8<sup>+</sup> T Cells*. *The Journal of Immunology*, 2010. **185**(3): p. 1502.
87. Frickel, E.-M., et al., *Parasite Stage-Specific Recognition of Endogenous *Toxoplasma gondii*-Derived CD8<sup>+</sup> T Cell Epitopes*. *The Journal of Infectious Diseases*, 2008. **198**(11): p. 1625-1633.
88. Blanchard, N., et al., *Immunodominant, protective response to the parasite *Toxoplasma gondii* requires antigen processing in the endoplasmic reticulum*. *Nature Immunology*, 2008. **9**(8): p. 937-944.

89. Hunter, C.A. and L.D. Sibley, *Modulation of innate immunity by Toxoplasma gondii virulence effectors*. Nature Reviews Microbiology, 2012. **10**(11): p. 766-778.
90. Lekutis, C., et al., *Surface antigens of Toxoplasma gondii: variations on a theme*. International Journal for Parasitology, 2001. **31**(12): p. 1285-1292.
91. Wasmuth, J.D., et al., *Integrated Bioinformatic and Targeted Deletion Analyses of the SRS Gene Superfamily Identify SRS29C as a Negative Regulator of *Toxoplasma* Virulence*. mBio, 2012. **3**(6): p. e00321-12.
92. Gazzinelli, R.T., et al., *Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with Toxoplasma gondii*. The Journal of Immunology, 1994. **153**(6): p. 2533.
93. Johnson, L.L. and P.C. Sayles, *Deficient humoral responses underlie susceptibility to Toxoplasma gondii in CD4-deficient mice*. Infection and immunity, 2002. **70**(1): p. 185-191.
94. Dupont, C.D., D.A. Christian, and C.A. Hunter, *Immune response and immunopathology during toxoplasmosis*. Seminars in immunopathology, 2012. **34**(6): p. 793-813.
95. Hunter, C.A., et al., *Production of gamma interferon by natural killer cells from Toxoplasma gondii-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha*. Infection and immunity, 1994. **62**(7): p. 2818-2824.
96. Scharton-Kersten, T.M., et al., *In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to Toxoplasma gondii while failing to control acute infection*. The Journal of Immunology, 1996. **157**(9): p. 4045.
97. Yap, G., M. Pesin, and A. Sher, *Cutting Edge: IL-12 Is Required for the Maintenance of IFN- Production in T Cells Mediating Chronic Resistance to the Intracellular Pathogen, Toxoplasma gondii*. 2000. **165**(2): p. 628-631.
98. Yap, G.S. and A. Sher, *Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-gamma- and tumor necrosis factor (TNF)-alpha-dependent host resistance to the intracellular pathogen, Toxoplasma gondii*. The Journal of experimental medicine, 1999. **189**(7): p. 1083-1092.
99. Gay, G., et al., *Toxoplasma gondii TgIST co-opts host chromatin repressors dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN-γ-mediated host defenses*. 2016. **213**(9): p. 1779-1798.
100. Olias, P., et al., *Toxoplasma Effector Recruits the Mi-2/NuRD Complex to Repress STAT1 Transcription and Block IFN-γ-Dependent Gene Expression*. 2016. **20**(1): p. 72-82.
101. Stutz, A., et al., *Cell invasion and strain dependent induction of suppressor of cytokine signaling-1 by Toxoplasma gondii*. Immunobiology, 2012. **217**(1): p. 28-36.
102. Zimmermann, S., et al., *Induction of Suppressor of Cytokine Signaling-1 by Toxoplasma gondii Contributes to Immune Evasion in Macrophages by Blocking IFN- Signaling*. 2006. **176**(3): p. 1840-1847.
103. Ryan, et al., *A Critical Role for SOCS3 in Innate Resistance to Toxoplasma gondii*. 2011. **10**(3): p. 224-236.
104. Pfefferkorn, E.R., *Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1984. **81**(3): p. 908-912.

105. Pfefferkorn, E.R., S. Rebhun, and M. Eckel, *Characterization of an Indoleamine 2,3-Dioxygenase Induced by Gamma-Interferon in Cultured Human Fibroblasts*. Journal of Interferon Research, 1986. **6**(3): p. 267-279.
106. Divanovic, S., et al., *Opposing Biological Functions of Tryptophan Catabolizing Enzymes During Intracellular Infection*. 2012. **205**(1): p. 152-161.
107. Ufermann, C.-M., et al., *Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity During Acute Toxoplasmosis and the Suppressed T Cell Proliferation in Mice*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2019. **9**.
108. Adams, L.B., et al., *Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for Toxoplasma gondii. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine*. The Journal of Immunology, 1990. **144**(7): p. 2725.
109. Schariton-Kersten, T.M., et al., *Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen Toxoplasma gondii*. The Journal of experimental medicine, 1997. **185**(7): p. 1261-1273.
110. Yarovinsky, F., *Innate immunity to Toxoplasma gondii infection*. Nature Reviews Immunology, 2014. **14**(2): p. 109-121.
111. Fang, F.C., *Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies*. Nature Reviews Microbiology, 2004. **2**(10): p. 820-832.
112. Murray, H.W., et al., *Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. II. The role of oxygen intermediates*. The Journal of experimental medicine, 1979. **150**(4): p. 950-964.
113. Chang, H.R. and J.-C. Pechère, *Macrophage oxidative metabolism and intracellular Toxoplasma gondii*. Microbial Pathogenesis, 1989. **7**(1): p. 37-44.
114. Martens, S., et al., *Disruption of Toxoplasma gondii parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases*. PLoS pathogens, 2005. **1**(3): p. e24.
115. Khaminets, A., et al., *Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the Toxoplasma gondii parasitophorous vacuole*. 2010. **12**(7): p. 939-961.
116. Zhao, Y.O., et al., *Disruption of the Toxoplasma gondii Parasitophorous Vacuole by IFN $\gamma$ -Inducible Immunity-Related GTPases (IRG Proteins) Triggers Necrotic Cell Death*. 2009. **5**(2): p. e1000288.
117. Howard, J.C., J.P. Hunn, and T. Steinfeldt, *The IRG protein-based resistance mechanism in mice and its relation to virulence in Toxoplasma gondii*. Current Opinion in Microbiology, 2011. **14**(4): p. 414-421.
118. Hunn, J.P., et al., *Regulatory interactions between IRG resistance GTPases in the cellular response to Toxoplasma gondii*. The EMBO journal, 2008. **27**(19): p. 2495-2509.
119. Papic, N., et al., *Inactive and active states of the interferon-inducible resistance GTPase, Irga6, in vivo*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(46): p. 32143-32151.
120. Haldar, A.K., et al., *IRG and GBP Host Resistance Factors Target Aberrant, "Non-self" Vacuoles Characterized by the Missing of "Self" IRGM Proteins*. 2013. **9**(6): p. e1003414.
121. Yamamoto, M., et al., *A Cluster of Interferon- $\gamma$ -Inducible p65 GTPases Plays a Critical Role in Host Defense against Toxoplasma gondii*. Immunity, 2012. **37**(2): p. 302-313.

122. Selleck, E.M., et al., *Guanylate-binding protein 1 (Gbp1) contributes to cell-autonomous immunity against Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog, 2013. **9**(4): p. e1003320.
123. Clough, B. and E.-M. Frickel, *The Toxoplasma Parasitophorous Vacuole: An Evolving Host-Parasite Frontier*. Trends in Parasitology, 2017. **33**(6): p. 473-488.
124. Steinfeldt, T., et al., *Phosphorylation of Mouse Immunity-Related GTPase (IRG) Resistance Proteins Is an Evasion Strategy for Virulent Toxoplasma gondii*. 2010. **8**(12): p. e1000576.
125. Fentress, S.J., et al., *Phosphorylation of Immunity-Related GTPases by a Toxoplasma gondii-Secreted Kinase Promotes Macrophage Survival and Virulence*. 2010. **8**(6): p. 484-495.
126. Etheridge, R.D., et al., *The Toxoplasma pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice*. Cell host & microbe, 2014. **15**(5): p. 537-550.
127. Behnke, M.S., et al., *The Polymorphic Pseudokinase ROP5 Controls Virulence in Toxoplasma gondii by Regulating the Active Kinase ROP18*. PLOS Pathogens, 2012. **8**(11): p. e1002992.
128. Reese, M.L., et al., *Polymorphic family of injected pseudokinases is paramount in Toxoplasma virulence*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(23): p. 9625-9630.
129. Mizushima, N., Y. Ohsumi, and T. Yoshimori, *Autophagosome Formation in Mammalian Cells*. Cell Structure and Function, 2002. **27**(6): p. 421-429.
130. Randow, F., *How cells deploy ubiquitin and autophagy to defend their cytosol from bacterial invasion*. Autophagy, 2011. **7**(3): p. 304-309.
131. Ligia and I. Dikic, *Autophagy in Antimicrobial Immunity*. 2014. **54**(2): p. 224-233.
132. Zhao, Z., et al., *Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens*. Cell host & microbe, 2008. **4**(5): p. 458-469.
133. Choi, J., et al., *The Parasitophorous Vacuole Membrane of Toxoplasma gondii Is Targeted for Disruption by Ubiquitin-like Conjugation Systems of Autophagy*. Immunity, 2014. **40**(6): p. 924-935.
134. Haldar, A.K., et al., *The E2-Like Conjugation Enzyme Atg3 Promotes Binding of IRG and Gbp Proteins to Chlamydia- and Toxoplasma-Containing Vacuoles and Host Resistance*. 2014. **9**(1): p. e86684.
135. Park, S., et al., *Targeting by Autophagy proteins (TAG): Targeting of IFNG-inducible GTPases to membranes by the LC3 conjugation system of autophagy*. Autophagy, 2016. **12**(7): p. 1153-1167.
136. Haldar, A.K., et al., *Ubiquitin systems mark pathogen-containing vacuoles as targets for host defense by guanylate binding proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(41): p. E5628-37.
137. Lee, Y., et al., *p62 Plays a Specific Role in Interferon- $\gamma$ -Induced Presentation of a Toxoplasma Vacuolar Antigen*. 2015. **13**(2): p. 223-233.
138. Encheva, V., et al., *Murine Gbp1 and Gbp2 are ubiquitinated independent of Toxoplasma gondii infection*. BMC research notes, 2018. **11**(1): p. 166-166.

139. Traver, M.K., et al., *Immunity-related GTPase M (IRGM) Proteins Influence the Localization of Guanylate-binding Protein 2 (GBP2) by Modulating Macroautophagy*. 2011. **286**(35): p. 30471-30480.
140. Andrade, R.M., et al., *CD40 induces macrophage anti-Toxoplasma gondii activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes*. 2006. **116**(9): p. 2366-2377.
141. Andrade, R.M., et al., *CD40 Signaling in Macrophages Induces Activity against an Intracellular Pathogen Independently of Gamma Interferon and Reactive Nitrogen Intermediates*. 2005. **73**(5): p. 3115-3123.
142. Subauste, C.S., *CD40, autophagy and Toxoplasma gondii*. 2009. **104**(2): p. 267-272.
143. Liu, E., et al., *Identification of Signaling Pathways by Which CD40 Stimulates Autophagy and Antimicrobial Activity against Toxoplasma gondii in Macrophages*. 2016. **84**(9): p. 2616-2626.
144. Muniz-Feliciano, L., et al., *Toxoplasma gondii-Induced Activation of EGFR Prevents Autophagy Protein-Mediated Killing of the Parasite*. 2013. **9**(12): p. e1003809.
145. Roach, J.C., et al., *The evolution of vertebrate Toll-like receptors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005. **102**(27): p. 9577-9582.
146. Bekpen, C., et al., *The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage*. Genome Biology, 2005. **6**(11): p. R92.
147. Santos, J.C. and P. Broz, *Sensing of invading pathogens by GBPs: At the crossroads between cell-autonomous and innate immunity*. Journal of Leukocyte Biology, 2018. **104**(4): p. 729-735.
148. Cheng, Y.S., R.J. Colonno, and F.H. Yin, *Interferon induction of fibroblast proteins with guanylate binding activity*. J Biol Chem, 1983. **258**(12): p. 7746-50.
149. Boehm, U., et al., *Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma*. J Immunol, 1998. **161**(12): p. 6715-23.
150. Pilla-Moffett, D., et al., *Interferon-Inducible GTPases in Host Resistance, Inflammation and Disease*. 2016. **428**(17): p. 3495-3513.
151. Kim, B.H., et al., *IFN-inducible GTPases in host cell defense*. Cell Host Microbe, 2012. **12**(4): p. 432-44.
152. Shenoy, A.R., et al., *GBP5 promotes NLRP3 inflammasome assembly and immunity in mammals*. Science, 2012. **336**(6080): p. 481-5.
153. Tretina, K., et al., *Interferon-induced guanylate-binding proteins: Guardians of host defense in health and disease*. The Journal of Experimental Medicine, 2019. **216**(3): p. 482.
154. Degrandi, D., et al., *Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense*. J Immunol, 2007. **179**(11): p. 7729-40.
155. Kresse, A., et al., *Analyses of murine GBP homology clusters based on in silico, in vitro and in vivo studies*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 158.
156. Shenoy, A.R., et al., *Emerging themes in IFN- $\gamma$ -induced macrophage immunity by the p47 and p65 GTPase families*. Immunobiology, 2008. **212**(9-10): p. 771-784.

157. Olszewski, M.A., J. Gray, and D.J. Vestal, *In Silico Genomic Analysis of the Human and Murine Guanylate-Binding Protein (GBP) Gene Clusters*. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2006. **26**(5): p. 328-352.
158. Kim, B.H., et al., *A family of IFN- $\gamma$ -inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection*. Science, 2011. **332**(6030): p. 717-21.
159. Meunier, E., et al., *Guanylate-binding proteins promote activation of the AIM2 inflammasome during infection with Francisella novicida*. Nat Immunol, 2015. **16**(5): p. 476-484.
160. Kim, B.H., et al., *Interferon-induced guanylate-binding proteins in inflammasome activation and host defense*. Nat Immunol, 2016. **17**(5): p. 481-9.
161. Ramachandran, R. and S.L. Schmid, *The dynamin superfamily*. Current Biology, 2018. **28**(8): p. R411-R416.
162. Vestal, D.J. and J.A. Jeyaratnam, *The Guanylate-Binding Proteins: Emerging Insights into the Biochemical Properties and Functions of This Family of Large Interferon-Induced Guanosine Triphosphatase*. 2011. **31**(1): p. 89-97.
163. Praefcke, G.J.K., et al., *Identification of Residues in the Human Guanylate-binding Protein 1 Critical for Nucleotide Binding and Cooperative GTP Hydrolysis*. Journal of Molecular Biology, 2004. **344**(1): p. 257-269.
164. Fres, J.M., S. Müller, and G.J. Praefcke, *Purification of the CaaX-modified, dynamin-related large GTPase hGBP1 by coexpression with farnesyltransferase*. J Lipid Res, 2010. **51**(8): p. 2454-9.
165. Wehner, M. and C. Herrmann, *Biochemical properties of the human guanylate binding protein 5 and a tumor-specific truncated splice variant*. 2010. **277**(7): p. 1597-1605.
166. Prakash, B., et al., *Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins*. Nature, 2000. **403**(6769): p. 567-71.
167. Cheng, Y.S., C.E. Patterson, and P. Staeheli, *Interferon-induced guanylate-binding proteins lack an N(T)KXD consensus motif and bind GMP in addition to GDP and GTP*. 1991. **11**(9): p. 4717-4725.
168. Praefcke, G.J., et al., *Nucleotide-binding characteristics of human guanylate-binding protein 1 (hGBP1) and identification of the third GTP-binding motif*. J Mol Biol, 1999. **292**(2): p. 321-32.
169. Prakash, B., *Triphosphate structure of guanylate-binding protein 1 and implications for nucleotide binding and GTPase mechanism*. 2000. **19**(17): p. 4555-4564.
170. Abdullah, N., et al., *Role of Individual Domains and Identification of Internal Gap in Human Guanylate Binding Protein-1*. Journal of Molecular Biology, 2009. **386**(3): p. 690-703.
171. Ghosh, A., et al., *How guanylate-binding proteins achieve assembly-stimulated processive cleavage of GTP to GMP*. Nature, 2006. **440**(7080): p. 101-4.
172. Kravets, E., et al., *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, 2012. **287**(33): p. 27452-66.

173. Wehner, M., S. Kunzelmann, and C. Herrmann, *The guanine cap of human guanylate-binding protein 1 is responsible for dimerization and self-activation of GTP hydrolysis*. 2012. **279**(2): p. 203-210.
174. Vöpel, T., et al., *Triphosphate Induced Dimerization of Human Guanylate Binding Protein 1 Involves Association of the C-Terminal Helices: A Joint Double Electron–Electron Resonance and FRET Study*. *Biochemistry*, 2014. **53**(28): p. 4590-4600.
175. Tripathi, R., R. Glaves, and D. Marx, *The GTPase hGBP1 converts GTP to GMP in two steps via proton shuttle mechanisms*. 2017.
176. Vöpel, T., et al., *Mechanism of GTPase-activity-induced self-assembly of human guanylate binding protein 1*. *J Mol Biol*, 2010. **400**(1): p. 63-70.
177. Kravets, E., et al., *Guanylate binding proteins directly attack Toxoplasma gondii via supramolecular complexes*. *Elife*, 2016. **5**.
178. Man, S.M., et al., *The transcription factor IRF1 and guanylate-binding proteins target activation of the AIM2 inflammasome by Francisella infection*. *Nature Immunology*, 2015. **16**(5): p. 467-475.
179. Low, H.H., et al., *Structure of a Bacterial Dynamin-like Protein Lipid Tube Provides a Mechanism For Assembly and Membrane Curving*. *Cell*, 2009. **139**(7): p. 1342-1352.
180. Prakash, B., et al., *Triphosphate structure of guanylate-binding protein 1 and implications for nucleotide binding and GTPase mechanism*. *EMBO J*, 2000. **19**(17): p. 4555-64.
181. Barz, B., J. Loschwitz, and B. Strodel, *Large-scale, dynamin-like motions of the human guanylate binding protein 1 revealed by multi-resolution simulations*. *bioRxiv*, 2019: p. 676981.
182. Nantais, D.E., et al., *Prenylation of an interferon- $\gamma$ -induced GTP-binding protein: the human guanylate binding protein, huGBP1*. *Journal of Leukocyte Biology*, 1996. **60**(3): p. 423-431.
183. Lane, K.T., *Thematic review series: Lipid Posttranslational Modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I*. 2006. **47**(4): p. 681-699.
184. Shydlovskiy, S., et al., *Nucleotide-dependent farnesyl switch orchestrates polymerization and membrane binding of human guanylate-binding protein 1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. **114**(28): p. E5559-E5568.
185. Finethy, R., et al., *Inflammasome Activation by Bacterial Outer Membrane Vesicles Requires Guanylate Binding Proteins*. *mBio*, 2017. **8**(5).
186. Santos, J.C., et al., *LPS targets host guanylate-binding proteins to the bacterial outer membrane for non-canonical inflammasome activation*. *EMBO J*, 2018. **37**(6).
187. Mostafavi, S., et al., *Parsing the Interferon Transcriptional Network and Its Disease Associations*. *Cell*, 2016. **164**(3): p. 564-578.
188. Cheng, Y.S., et al., *Affinity purification of an interferon-induced human guanylate-binding protein and its characterization*. *J Biol Chem*, 1985. **260**(29): p. 15834-9.
189. Darnell, J., I. Kerr, and G. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. *Science*, 1994. **264**(5164): p. 1415-1421.
190. Beuter-Gunia, C., *Identifizierung und Charakterisierung von IFN $\gamma$  regulierten Effektormolekülen (mGBP7, SSP11) in der antimikrobiellen Immunantwort* 2008.

191. Yamagata, T., C. Benoist, and D. Mathis, *A shared gene-expression signature in innate-like lymphocytes*. Immunological Reviews, 2006. **210**(1): p. 52-66.
192. Vestal, D.J., V.Y. Gorbacheva, and G.C. Sen, *Different subcellular localizations for the related interferon-induced GTPases, MuGBP-1 and MuGBP-2: implications for different functions?* J Interferon Cytokine Res, 2000. **20**(11): p. 991-1000.
193. Praefcke, G.J.K., *Regulation of innate immune functions by guanylate-binding proteins*. Int J Med Microbiol, 2018. **308**(1): p. 237-245.
194. Lindenberg, V., et al., *Broad recruitment of mGBP family members to Chlamydia trachomatis inclusions*. PLoS One, 2017. **12**(9): p. e0185273.
195. Man, S.M., et al., *IRGB10 Liberates Bacterial Ligands for Sensing by the AIM2 and Caspase-11-NLRP3 Inflammasomes*. Cell, 2016. **167**(2): p. 382-396.e17.
196. Sasai, M., et al., *Essential role for GABARAP autophagy proteins in interferon-inducible GTPase-mediated host defense*. Nature Immunology, 2017. **18**(8): p. 899-910.
197. Degrandi, D., et al., *Murine guanylate binding protein 2 (mGBP2) controls Toxoplasma gondii replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(1): p. 294-9.
198. Feeley, E.M., et al., *Galectin-3 directs antimicrobial guanylate binding proteins to vacuoles furnished with bacterial secretion systems*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(9): p. E1698-E1706.
199. Thurston, T.L.M., et al., *Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion*. Nature, 2012. **482**(7385): p. 414-418.
200. Anderson, S.L., et al., *Interferon-Induced Guanylate Binding Protein-1 (GBP-1) Mediates an Antiviral Effect against Vesicular Stomatitis Virus and Encephalomyocarditis Virus*. 1999. **256**(1): p. 8-14.
201. Itsui, Y., et al., *Antiviral effects of the interferon-induced protein guanylate binding protein 1 and its interaction with the hepatitis C virus NS5B protein*. 2009. **50**(6): p. 1727-1737.
202. Nordmann, A., et al., *A new splice variant of the human guanylate-binding protein 3 mediates anti-influenza activity through inhibition of viral transcription and replication*. The FASEB Journal, 2011. **26**(3): p. 1290-1300.
203. Krapp, C., et al., *Guanylate Binding Protein (GBP) 5 Is an Interferon-Inducible Inhibitor of HIV-1 Infectivity*. 2016. **19**(4): p. 504-514.
204. Carter, C.C., V.Y. Gorbacheva, and D.J. Vestal, *Inhibition of VSV and EMCV replication by the interferon-induced GTPase, mGBP-2: differential requirement for wild-type GTP binding domain*. Arch Virol, 2005. **150**(6): p. 1213-20.
205. Pan, W., et al., *Guanylate-binding protein 1 participates in cellular antiviral response to dengue virus*. 2012. **9**(1): p. 292.
206. Biering, S.B., et al., *Viral Replication Complexes Are Targeted by LC3-Guided Interferon-Inducible GTPases*. Cell Host & Microbe, 2017. **22**(1): p. 74-85.e7.
207. Virreira Winter, S., et al., *Determinants of GBP recruitment to Toxoplasma gondii vacuoles and the parasitic factors that control it*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24434.
208. Steffens, N., et al., *Essential Role of mGBP7 for Survival of Toxoplasma gondii Infection*. mBio, 2020. **11**(1).

209. Foltz, C., et al., *TRIM21 is critical for survival of Toxoplasma gondii infection and localises to GBP-positive parasite vacuoles*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 5209.
210. Komander, D. and M. Rape, *The Ubiquitin Code*. Annual Review of Biochemistry, 2012. **81**(1): p. 203-229.
211. Swatek, K.N. and D. Komander, *Ubiquitin modifications*. Cell Research, 2016. **26**(4): p. 399-422.
212. Li, P., et al., *Ubiquitination and degradation of GBPs by a Shigella effector to suppress host defence*. Nature, 2017. **551**(7680): p. 378-383.
213. Wandel, M.P., et al., *GBPs Inhibit Motility of Shigella flexneri but Are Targeted for Degradation by the Bacterial Ubiquitin Ligase IpaH9.8*. Cell host & microbe, 2017. **22**(4): p. 507-518.e5.
214. Selleck, E.M., et al., *Guanylate-binding Protein 1 (Gbp1) Contributes to Cell-autonomous Immunity against Toxoplasma gondii*. 2013. **9**(4): p. e1003320.
215. Gordon, J.A., [41] *Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor*, in *Methods in Enzymology*. 1991, Academic Press. p. 477-482.
216. Kluth, M., et al., *A Mutation within the Extended X Loop Abolished Substrate-induced ATPase Activity of the Human Liver ATP-binding Cassette (ABC) Transporter MDR3*. Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(8): p. 4896-4907.
217. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nature Methods, 2012. **9**(7): p. 676-682.
218. Herrmann, C. and N. Nassar, *Ras and its effectors*. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 1996. **66**(1): p. 1-41.
219. Blanchet, C.E., et al., *Versatile sample environments and automation for biological solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY)*. Journal of Applied Crystallography, 2015. **48**(2): p. 431-443.
220. Svergun, D.I., M.V. Petoukhov, and M.H.J. Koch, *Determination of Domain Structure of Proteins from X-Ray Solution Scattering*. 2001. **80**(6): p. 2946-2953.
221. Franke, D., et al., *ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions*. Journal of Applied Crystallography, 2017. **50**(4): p. 1212-1225.
222. Kozin, M.B. and D.I. Svergun, *Automated matching of high- and low-resolution structural models*. 2001. **34**(1): p. 33-41.
223. Grube, L., et al., *Mining the Secretome of C2C12 Muscle Cells: Data Dependent Experimental Approach To Analyze Protein Secretion Using Label-Free Quantification and Peptide Based Analysis*. Journal of Proteome Research, 2018. **17**(2): p. 879-890.
224. Cox, J., et al., *Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ*. Molecular & Cellular Proteomics, 2014. **13**(9): p. 2513-2526.
225. Ince, S., et al., *The human guanylate-binding proteins hGBP-1 and hGBP-5 cycle between monomers and dimers only*. FEBS J, 2017. **284**(14): p. 2284-2301.

226. Legewie, L., et al., *Biochemical and structural characterization of murine GBP7, a guanylate binding protein with an elongated C-terminal tail*. *Biochemical Journal*, 2019. **476**(21): p. 3161-3182.
227. Schwemmle, M. and P. Staeheli, *The interferon-induced 67-kDa guanylate-binding protein (hGBP1) is a GTPase that converts GTP to GMP*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(15): p. 11299-305.
228. Wyatt, P.J., *Submicrometer Particle Sizing by Multiangle Light Scattering following Fractionation*. *J Colloid Interface Sci*, 1998. **197**(1): p. 9-20.
229. Perng, Y.-C. and D.J. Lenschow, *ISG15 in antiviral immunity and beyond*. *Nature Reviews Microbiology*, 2018. **16**(7): p. 423-439.
230. Zhang, D. and D.-E. Zhang, *Interferon-Stimulated Gene 15 and the Protein ISGylation System*. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2011. **31**(1): p. 119-130.
231. Fulzele, A. and E.J. Bennett, *Ubiquitin diGLY Proteomics as an Approach to Identify and Quantify the Ubiquitin-Modified Proteome*. *Methods Mol Biol*, 2018. **1844**: p. 363-384.
232. Tumbarello, D.A., et al., *Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome*. *Nat Cell Biol*, 2012. **14**(10): p. 1024-35.
233. Yin, T., *Mechanisms of Plakoglobin-dependent Adhesion: DESMOSOME-SPECIFIC FUNCTIONS IN ASSEMBLY AND REGULATION BY EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR*. 2005. **280**(48): p. 40355-40363.
234. Tatematsu, M., et al., *Raftlin Controls Lipopolysaccharide-Induced TLR4 Internalization and TICAM-1 Signaling in a Cell Type-Specific Manner*. 2016. **196**(9): p. 3865-3876.
235. Holt, O., et al., *Slp1 and Slp2-a Localize to the Plasma Membrane of CTL and Contribute to Secretion from the Immunological Synapse*. 2008. **9**(4): p. 446-457.
236. Mundhenk, L., et al., *Interspecies diversity of chloride channel regulators, calcium-activated 3 genes*. *PLOS ONE*, 2018. **13**(1): p. e0191512.
237. Tuvim, M.J., et al., *Synaptotagmin 2 Couples Mucin Granule Exocytosis to Ca<sup>2+</sup> Signaling from Endoplasmic Reticulum*. 2009. **284**(15): p. 9781-9787.
238. Gandhi, R., et al., *Molecular and Functional Characterization of a Calcium-sensitive Chloride Channel from Mouse Lung*. 1998. **273**(48): p. 32096-32101.
239. Katoh, Y., et al., *Recruitment of clathrin onto endosomes by the Tom1-Tollip complex*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **341**(1): p. 143-9.
240. Seet, L.F., *Endofin recruits clathrin to early endosomes via TOM1*. *Journal of Cell Science*, 2005. **118**(3): p. 575-587.
241. Yamakami, M., T. Yoshimori, and H. Yokosawa, *Tom1, a VHS Domain-containing Protein, Interacts with Tollip, Ubiquitin, and Clathrin*. 2003. **278**(52): p. 52865-52872.
242. Wasmuth, J.D., et al., *Integrated bioinformatic and targeted deletion analyses of the SRS gene superfamily identify SRS29C as a negative regulator of Toxoplasma virulence*. *MBio*, 2012. **3**(6).
243. Manger, I.D., A.B. Hehl, and J.C. Boothroyd, *The surface of Toxoplasma tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1*. *Infection and immunity*, 1998. **66**(5): p. 2237-2244.

244. MacMicking, J.D., *IFN-inducible GTPases and immunity to intracellular pathogens*. Trends Immunol, 2004. **25**(11): p. 601-9.
245. Kunzelmann, S., G.J. Praefcke, and C. Herrmann, *Nucleotide binding and self-stimulated GTPase activity of human guanylate-binding protein 1 (hGBP1)*. Methods Enzymol, 2005. **404**: p. 512-27.
246. Traut, T.W., *Physiological concentrations of purines and pyrimidines*. Molecular and Cellular Biochemistry, 1994. **140**(1): p. 1-22.
247. Ford, B., et al., *Characterization of a Ras mutant with identical GDP- and GTP-bound structures*. Biochemistry, 2009. **48**(48): p. 11449-11457.
248. Zera, E.M., *High Affinity Interactions of GTPgamma S with the Heterotrimeric G Protein, Transducin. EVIDENCE AT HIGH AND LOW PROTEIN CONCENTRATIONS*. 1996. **271**(22): p. 12919-12924.
249. Vestal, D.J. and J.A. Jeyaratnam, *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, 2011. **31**(1): p. 89-97.
250. Bigay, J., et al., *Fluoroaluminates activate transducin-GDP by mimicking the  $\gamma$ -phosphate of GTP in its binding site*. FEBS Letters, 1985. **191**(2): p. 181-185.
251. Ahmadian, M.R., et al., *Aluminium fluoride associates with the small guanine nucleotide binding proteins*. FEBS Letters, 1997. **408**(3): p. 315-318.
252. Steffens, N., *Analyse der dynamischen mGBP-Rekrutierung zu Pathogen-enthaltenden Membrankompartimenten, in Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*. 2020.
253. Britzen-Laurent, N., et al., *Intracellular Trafficking of Guanylate-Binding Proteins Is Regulated by Heterodimerization in a Hierarchical Manner*. 2010. **5**(12): p. e14246.
254. Daumke, O. and G.J. Praefcke, *Invited review: Mechanisms of GTP hydrolysis and conformational transitions in the dynamin superfamily*. Biopolymers, 2016. **105**(8): p. 580-93.
255. Byrnes, L.J. and H. Sondermann, *Structural basis for the nucleotide-dependent dimerization of the large G protein atlastin-1/SPG3A*. 2011. **108**(6): p. 2216-2221.
256. Bian, X., et al., *Structures of the atlastin GTPase provide insight into homotypic fusion of endoplasmic reticulum membranes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(10): p. 3976-3981.
257. Liu, Z., et al., *Ubiquitylation of Autophagy Receptor Optineurin by HACE1 Activates Selective Autophagy for Tumor Suppression*. Cancer Cell, 2014. **26**(1): p. 106-120.
258. Saeij, J.P. and E.-M. Frickel, *Exposing Toxoplasma gondii hiding inside the vacuole: a role for GBPs, autophagy and host cell death*. Current Opinion in Microbiology, 2017. **40**: p. 72-80.
259. Groettrup, M., *Conjugation and Deconjugation of Ubiquitin Family Modifiers*. 2011: Springer.
260. Bade, V.N., et al., *Covalent Protein Modification with ISG15 via a Conserved Cysteine in the Hinge Region*. PLoS ONE, 2012. **7**(6): p. e38294.
261. Haas, A.L., et al., *Interferon induces a 15-kilodalton protein exhibiting marked homology to ubiquitin*. J Biol Chem, 1987. **262**(23): p. 11315-23.
262. Narasimhan, J., et al., *Crystal Structure of the Interferon-induced Ubiquitin-like Protein ISG15*. 2005. **280**(29): p. 27356-27365.

263. Jentsch, S., *THE UBIQUITIN-CONJUGATION SYSTEM*. Annual Review of Genetics, 1992. **26**(1): p. 179-207.
264. Skaug, B. and Z.J. Chen, *Emerging Role of ISG15 in Antiviral Immunity*. Cell, 2010. **143**(2): p. 187-190.
265. Malakhov, M.P., et al., *High-throughput Immunoblotting*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(19): p. 16608-16613.
266. Giannakopoulos, N.V., et al., *Proteomic identification of proteins conjugated to ISG15 in mouse and human cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. **336**(2): p. 496-506.
267. Durfee, L.A. and J.M. Huibregtse, *Identification and Validation of ISG15 Target Proteins*. Sub-cellular biochemistry, 2010. **54**: p. 228-237.
268. Zou, W., et al., *ISG15 modification of ubiquitin E2 Ubc13 disrupts its ability to form thioester bond with ubiquitin*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. **336**(1): p. 61-68.
269. Zhao, C., et al., *ISG15 conjugation system targets the viral NS1 protein in influenza A virus-infected cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(5): p. 2253-2258.
270. Kim, M.J., et al., *Negative Feedback Regulation of RIG-I-Mediated Antiviral Signaling by Interferon-Induced ISG15 Conjugation*. 2008. **82**(3): p. 1474-1483.
271. Albert, M., et al., *ISG15, a Small Molecule with Huge Implications: Regulation of Mitochondrial Homeostasis*. Viruses, 2018. **10**(11): p. 629.
272. Napolitano, A., et al., *Cysteine-Reactive Free ISG15 Generates IL-1 $\beta$ -Producing CD8 $\alpha$ +Dendritic Cells at the Site of Infection*. The Journal of Immunology, 2018. **201**(2): p. 604-614.
273. Gruber, A.D., et al., *Genomic Cloning, Molecular Characterization, and Functional Analysis of Human CLCA1, the First Human Member of the Family of Ca<sup>2+</sup>-Activated Cl<sup>-</sup>Channel Proteins*. Genomics, 1998. **54**(2): p. 200-214.
274. Sala-Rabanal, M., et al., *Secreted CLCA1 modulates TMEM16A to activate Ca<sup>2+</sup>-dependent chloride currents in human cells*. eLife, 2015. **4**.
275. Moreno, N.J.S., et al., *Vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase regulates cytoplasmic pH in Toxoplasma gondii tachyzoites*. 1998. **330**(2): p. 853-860.
276. Hortua Triana, M.A., et al., *Calcium signaling and the lytic cycle of the Apicomplexan parasite Toxoplasma gondii*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2018. **1865**(11, Part B): p. 1846-1856.
277. Lourido, S. and S.N.J. Moreno, *The calcium signaling toolkit of the Apicomplexan parasites Toxoplasma gondii and Plasmodium spp.* Cell Calcium, 2015. **57**(3): p. 186-193.
278. Zhurinsky, J., et al., *Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles*. Journal of Cell Science, 2000. **113**(18): p. 3127.
279. Palka, H.L. and K.J. Green, *Roles of plakoglobin end domains in desmosome assembly*. Journal of Cell Science, 1997. **110**(19): p. 2359.

280. Lie, P.P.Y., C.Y. Cheng, and D.D. Mruk, *Chapter five - The Biology of the Desmosome-Like Junction: A Versatile Anchoring Junction and Signal Transducer in the Seminiferous Epithelium*, in *International Review of Cell and Molecular Biology*, K.W. Jeon, Editor. 2011, Academic Press. p. 223-269.
281. Yin, T., et al., *Plakoglobin suppresses keratinocyte motility through both cell-cell adhesion-dependent and -independent mechanisms*. 2005. **102**(15): p. 5420-5425.
282. Weiske, J., et al., *The Fate of Desmosomal Proteins in Apoptotic Cells*. 2001. **276**(44): p. 41175-41181.
283. He, H., et al., *Characterization of a Toxoplasma effector uncovers an alternative GSK3/ $\beta$ -catenin-regulatory pathway of inflammation*. eLife, 2018. **7**: p. e39887.
284. Capaldo, C.T., et al., *IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ -induced GBP-1 inhibits epithelial cell proliferation through suppression of  $\beta$ -catenin/TCF signaling*. 2012. **5**(6): p. 681-690.
285. Matsumoto, M. and M. Tatematsu, *Conference Proceedings: Cell type-specific role of Raftlin in the regulation of endosomal TLR signaling*. 2016, Inflamm Cell Signal.
286. Saeki, K., *The B cell-specific major raft protein, Raftlin, is necessary for the integrity of lipid raft and BCR signal transduction*. 2003. **22**(12): p. 3015-3026.
287. Thomas, S., et al., *Analysis of lipid rafts in T cells*. Molecular Immunology, 2004. **41**(4): p. 399-409.
288. Korade, Z. and A.K. Kenworthy, *Lipid rafts, cholesterol, and the brain*. Neuropharmacology, 2008. **55**(8): p. 1265-1273.
289. Watanabe, A., et al., *Raftlin Is Involved in the Nucleocapture Complex to Induce Poly(I:C)-mediated TLR3 Activation*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(12): p. 10702-10711.
290. Fukuda, M., C. Saegusa, and K. Mikoshiba, *Novel Splicing Isoforms of Synaptotagmin-like Proteins 2 and 3: Identification of the Slp Homology Domain*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **283**(2): p. 513-519.
291. Kuroda, T.S. and M. Fukuda, *Rab27A-binding protein Slp2-a is required for peripheral melanosome distribution and elongated cell shape in melanocytes*. Nature Cell Biology, 2004. **6**(12): p. 1195-1203.
292. Fukuda, M. and K. Mikoshiba, *Synaptotagmin-like Protein 1-3: A Novel Family of C-Terminal-Type Tandem C2 Proteins*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **281**(5): p. 1226-1233.
293. Kuroda, T.S., et al., *The Slp Homology Domain of Synaptotagmin-like Proteins 1-4 and Slac2 Functions as a Novel Rab27A Binding Domain*. 2002. **277**(11): p. 9212-9218.
294. Fukuda, M., *Synaptotagmin-like Protein (Slp) Homology Domain 1 of Slac2-a/Melanophilin Is a Critical Determinant of GTP-dependent Specific Binding to Rab27A*. 2002. **277**(42): p. 40118-40124.
295. Yu, M., et al., *Exophilin4/Slp2-a targets glucagon granules to the plasma membrane through unique Ca<sup>2+</sup>-inhibitory phospholipid-binding activity of the C2A domain*. Molecular biology of the cell, 2007. **18**(2): p. 688-696.
296. Fukuda, M., T.S. Kuroda, and K. Mikoshiba, *Slac2-a/Melanophilin, the Missing Link between Rab27 and Myosin Va*. 2002. **277**(14): p. 12432-12436.

297. Strom, M., *A Family of Rab27-binding Proteins. MELANOPHILIN LINKS Rab27a AND MYOSIN Va FUNCTION IN MELANOSOME TRANSPORT*. 2002. **277**(28): p. 25423-25430.
298. Fukuda, M., *Slac2-c (Synaptotagmin-like Protein Homologue Lacking C2 Domains-c), a Novel Linker Protein that Interacts with Rab27, Myosin Va/VIIa, and Actin*. 2002. **277**(45): p. 43096-43103.
299. Chavas, L.M.G., et al., *Elucidation of Rab27 Recruitment by Its Effectors: Structure of Rab27a Bound to Exophilin4/Slp2-a*. 2008. **16**(10): p. 1468-1477.
300. Fukuda, M., *Versatile Role of Rab27 in Membrane Trafficking: Focus on the Rab27 Effector Families*. *The Journal of Biochemistry*, 2005. **137**(1): p. 9-16.
301. Schultz, J., et al., *SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998. **95**(11): p. 5857-5864.
302. Yamakami, M., T. Yoshimori, and H. Yokosawa, *Tom1, a VHS Domain-containing Protein, Interacts with Tollip, Ubiquitin, and Clathrin*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(52): p. 52865-52872.
303. Wang, T., et al., *The Emerging Role of VHS Domain-Containing Tom1, Tom1L1 and Tom1L2 in Membrane Trafficking*. 2010. **11**(9): p. 1119-1128.
304. Takatsu, H., et al., *GGA proteins associate with Golgi membranes through interaction between their GGAH domains and ADP-ribosylation factors*. *Biochemical Journal*, 2002. **365**(2): p. 369-378.
305. Bonifacino, J.S., *The GGA proteins: adaptors on the move*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004. **5**(1): p. 23-32.
306. Puertollano, R., et al., *The GGAs Promote ARF-Dependent Recruitment of Clathrin to the TGN*. 2001. **105**(1): p. 93-102.
307. Dell'Angelica, E.C., et al., *Ggas: A Family of Adp Ribosylation Factor-Binding Proteins Related to Adaptors and Associated with the Golgi Complex*. *The Journal of Cell Biology*, 2000. **149**(1): p. 81-94.
308. Serafini, T., et al., *ADP-Ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: A novel role for a GTP-binding protein*. *Cell*, 1991. **67**(2): p. 239-253.
309. Spang, A., *ARF1 regulatory factors and COPI vesicle formation*. *Current Opinion in Cell Biology*, 2002. **14**(4): p. 423-427.
310. Burk, O., *tom-1, a novel v-Myb target gene expressed in AMV- and E26-transformed myelomonocytic cells*. 1997. **16**(6): p. 1371-1380.
311. Blanc, C., et al., *Dictyostelium Tom1 Participates to an Ancestral ESCRT-0 Complex*. 2009. **10**(2): p. 161-171.
312. Katoh, Y., et al., *Tollip and Tom1 Form a Complex and Recruit Ubiquitin-conjugated Proteins onto Early Endosomes*. 2004. **279**(23): p. 24435-24443.
313. Schmidt, O. and D. Teis, *The ESCRT machinery*. *Current Biology*, 2012. **22**(4): p. R116-R120.
314. Akutsu, M., et al., *Structural basis for recognition of ubiquitinated cargo by Tom1-GAT domain*. 2005. **579**(24): p. 5385-5391.

315. Ren, X. and J.H. Hurley, *VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo*. The EMBO Journal, 2010. **29**(6): p. 1045-1054.
316. Nathan, J.A., et al., *Why do cellular proteins linked to K63-polyubiquitin chains not associate with proteasomes?* 2013. **32**(4): p. 552-565.
317. Katoh, Y., et al., *Recruitment of clathrin onto endosomes by the Tom1–Tollip complex*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006. **341**(1): p. 143-149.
318. Seet, L.F., *Endofin Recruits TOM1 to Endosomes*. 2003. **279**(6): p. 4670-4679.
319. Kaksonen, M. and A. Roux, *Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2018. **19**(5): p. 313-326.
320. Royle, S.J., *The cellular functions of clathrin*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2006. **63**(16): p. 1823-1832.
321. Kirchhausen, T., *Clathrin*. Annual Review of Biochemistry, 2000. **69**(1): p. 699-727.
322. Ravikumar, B., K. Moreau, and D.C. Rubinsztein, *Plasma membrane helps autophagosomes grow*. 2010. **6**(8): p. 1184-1186.
323. Ravikumar, B., et al., *Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures*. 2010. **12**(8): p. 747-757.
324. Puri, C., et al., *ATG16L1 meets ATG9 in recycling endosomes*. Autophagy, 2014. **10**(1): p. 182-184.
325. Ohshima, J., et al., *Role of Mouse and Human Autophagy Proteins in IFN- $\gamma$ -Induced Cell-Autonomous Responses against Toxoplasma gondii*. 2014. **192**(7): p. 3328-3335.
326. Burns, K., et al., *Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor*. Nature Cell Biology, 2000. **2**(6): p. 346-351.
327. Zhang, G. and S. Ghosh, *Negative Regulation of Toll-like Receptor-mediated Signaling by Tollip*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(9): p. 7059-7065.
328. Shih, S.C., *A ubiquitin-binding motif required for intramolecular monoubiquitylation, the CUE domain*. 2003. **22**(6): p. 1273-1281.
329. Lo, Y.-L.S., et al., *Diversification of TOLLIP isoforms in mouse and man*. Mammalian Genome, 2009. **20**(5): p. 305-314.
330. Seet, L.F., *Endofin, an Endosomal FYVE Domain Protein*. 2001. **276**(45): p. 42445-42454.
331. Wells, A.L., et al., *Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards*. Nature, 1999. **401**(6752): p. 505-508.
332. Sweeney, H.L. and A. Houdusse, *Myosin VI Rewrites the Rules for Myosin Motors*. 2010. **141**(4): p. 573-582.
333. Tumbarello, D.A., et al., *Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome*. 2012. **14**(10): p. 1024-1035.
334. Buss, F., G. Spudich, and J. Kendrick-Jones, *MYOSIN VI: Cellular Functions and Motor Properties*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2004. **20**(1): p. 649-676.
335. Sweeney, H.L. and A. Houdusse, *What can myosin VI do in cells?* Current Opinion in Cell Biology, 2007. **19**(1): p. 57-66.

- 
336. Ménétrey, J., et al., *The structure of the myosin VI motor reveals the mechanism of directionality reversal*. 2005. **435**(7043): p. 779-785.
337. Hu, S., et al., *Structure of Myosin VI/Tom1 complex reveals a cargo recognition mode of Myosin VI for tethering*. Nature Communications, 2019. **10**(1).
338. Mukherjea, M., et al., *Myosin VI Must Dimerize and Deploy Its Unusual Lever Arm in Order to Perform Its Cellular Roles*. Cell Reports, 2014. **8**(5): p. 1522-1532.
339. Spudich, G., et al., *Myosin VI targeting to clathrin-coated structures and dimerization is mediated by binding to Disabled-2 and PtdIns(4,5)P2*. 2007. **9**(2): p. 176-183.
340. Sahlender, D.A., et al., *Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis*. The Journal of cell biology, 2005. **169**(2): p. 285-295.
341. Morris, S.M., et al., *Myosin VI Binds to and Localises with Dab2, Potentially Linking Receptor-Mediated Endocytosis and the Actin Cytoskeleton*. Traffic, 2002. **3**(5): p. 331-341.
342. Morriswood, B., et al., *T6BP and NDP52 are myosin VI binding partners with potential roles in cytokine signalling and cell adhesion*. Journal of Cell Science, 2007. **120**(15): p. 2574.
343. He, F., et al., *Myosin VI Contains a Compact Structural Motif that Binds to Ubiquitin Chains*. Cell reports, 2016. **14**(11): p. 2683-2694.
344. Tumbarello, D.A., J. Kendrick-Jones, and F. Buss, *Myosin VI and its cargo adaptors - linking endocytosis and autophagy*. 2013. **126**(12): p. 2561-2570.
345. Boothroyd, J.C., et al., *The surface of Toxoplasma: more and less*. International Journal for Parasitology, 1998. **28**(1): p. 3-9.
346. Manger, I.D., et al., *Expressed sequence tag analysis of the bradyzoite stage of Toxoplasma gondii: identification of developmentally regulated genes*. Infection and immunity, 1998. **66**(4): p. 1632-1637.
347. Wang, J.-L., et al., *The Past, Present, and Future of Genetic Manipulation in Toxoplasma gondii*. Trends in Parasitology, 2016. **32**(7): p. 542-553.

## 9 Anhang

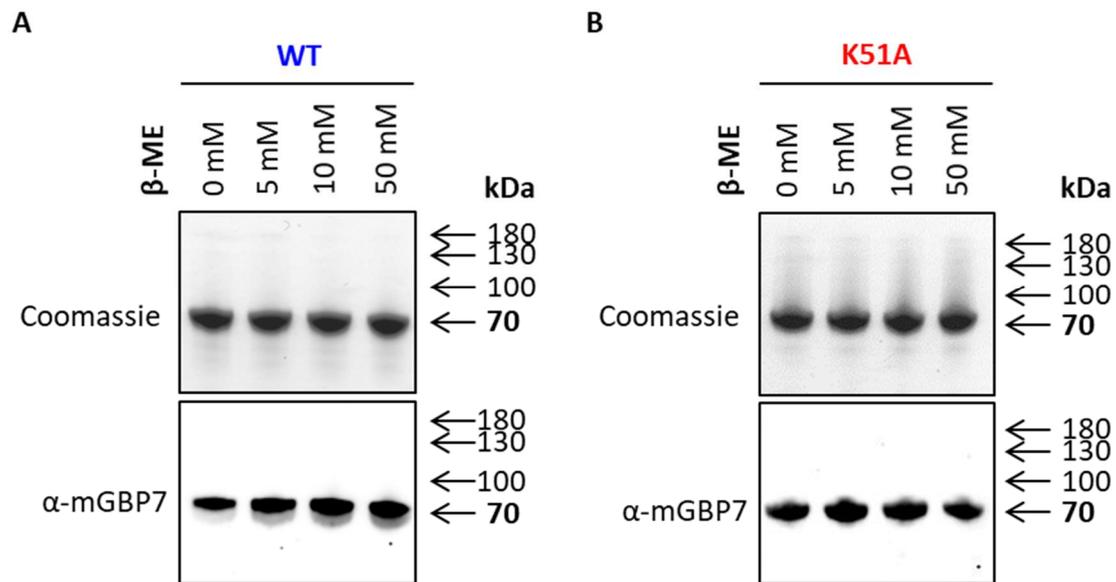


Abb. S1: SDS-PAGE-Analysen von WT und K51A mGBP7. 5  $\mu\text{g}$  des aufgereinigten WT (A) oder des K51A (B) mGBP7 Proteins wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME: 0, 5, 10 und 50 mM) inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben mit Auftragspuffer ohne Reduktionsmittel versetzt und auf einem 4 – 12 %igem SDS-Gel aufgetrennt. Die Gele wurden entweder mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt (oberes Panel) oder mGBP7 mittels Immunoblot mit einem polyklonalen anti-mGBP7 Antikörper detektiert (unteres Panel). Aufgrund des His<sub>6</sub>-Tags besitzt das mGBP7-Fusionsprotein eine theoretische Masse von 73,9 kDa.

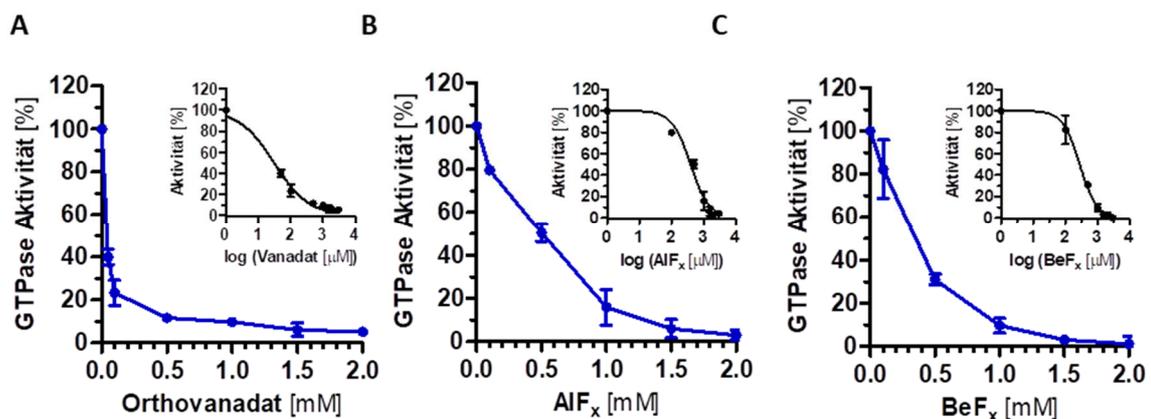
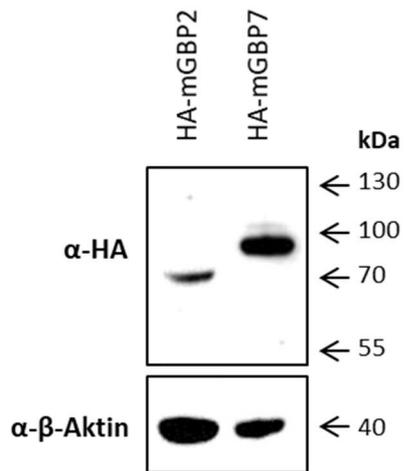
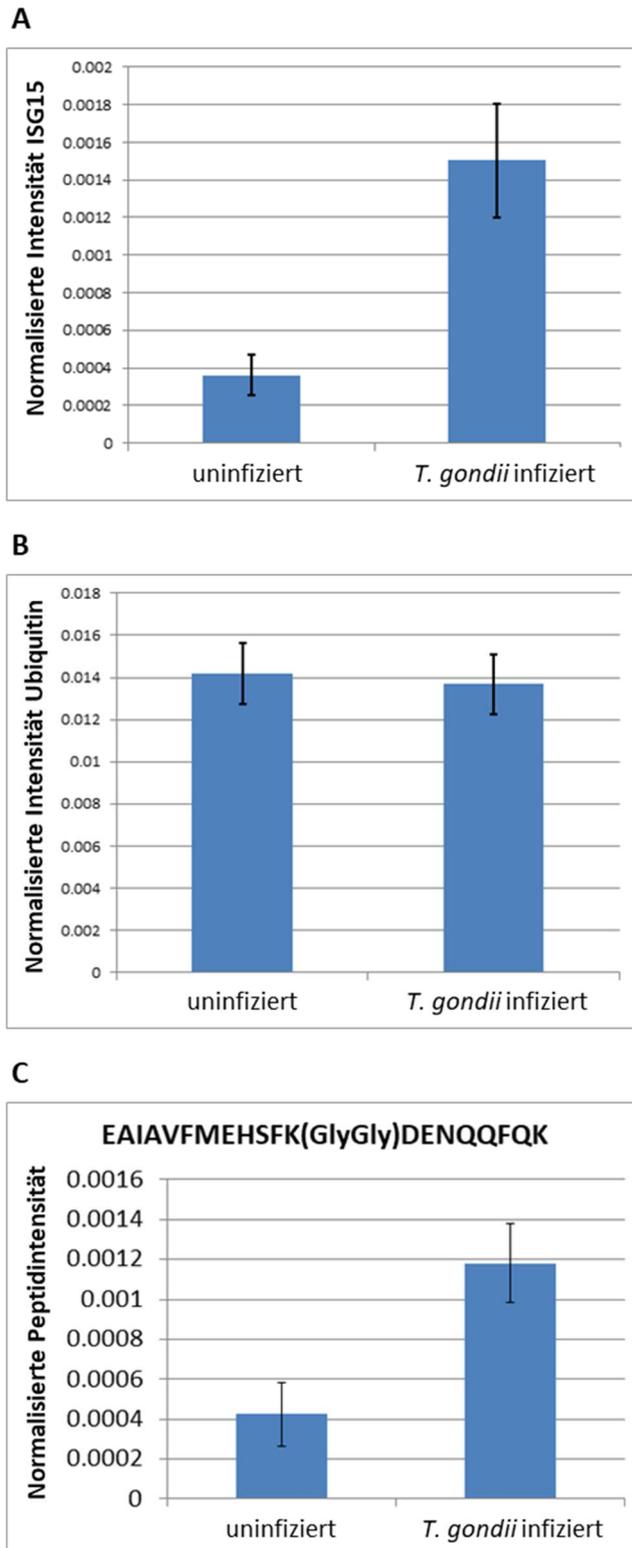


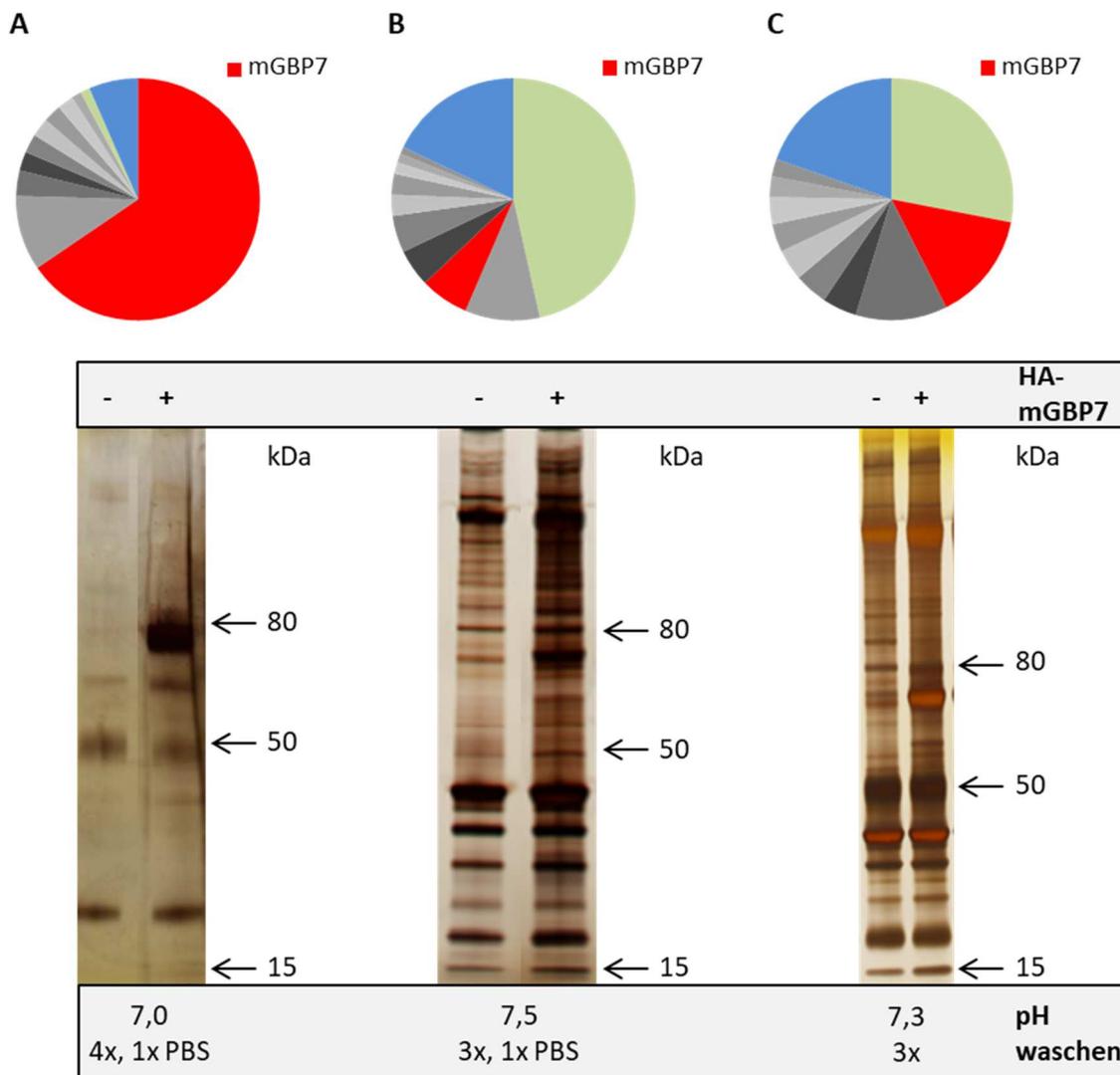
Abb. S2: Inhibition von mGBP7 durch GDP-Inhibitor Komplexe. Die GTPase-Aktivität von WT mGBP7 wurde in der Gegenwart von 0,01, 0,1, 0,5, 1,0 und 2,0 mM Orthovanadat (A) oder 0,1, 0,5 1,0 und 2,0 mM AIF<sub>x</sub> bzw. BeF<sub>x</sub> (B und C) gemessen. Zudem waren in den Proben jeweils 2 mM GTP, 4 mM GDP und 2,5  $\mu\text{M}$  (totale Menge an Protein: 18,5  $\mu\text{g}$ ) mGBP7 WT Protein enthalten. Die Daten wurden entsprechend der zweiten Gleichung in Abschnitt 3.3.7 gefittet. Zusätzlich sind die entsprechenden  $IC_{50}$ -Kurven (schwarz) gezeigt. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  S.D. von je drei unabhängigen Experimenten.  $IC_{50}$ , mittlere inhibitorische Konzentration.



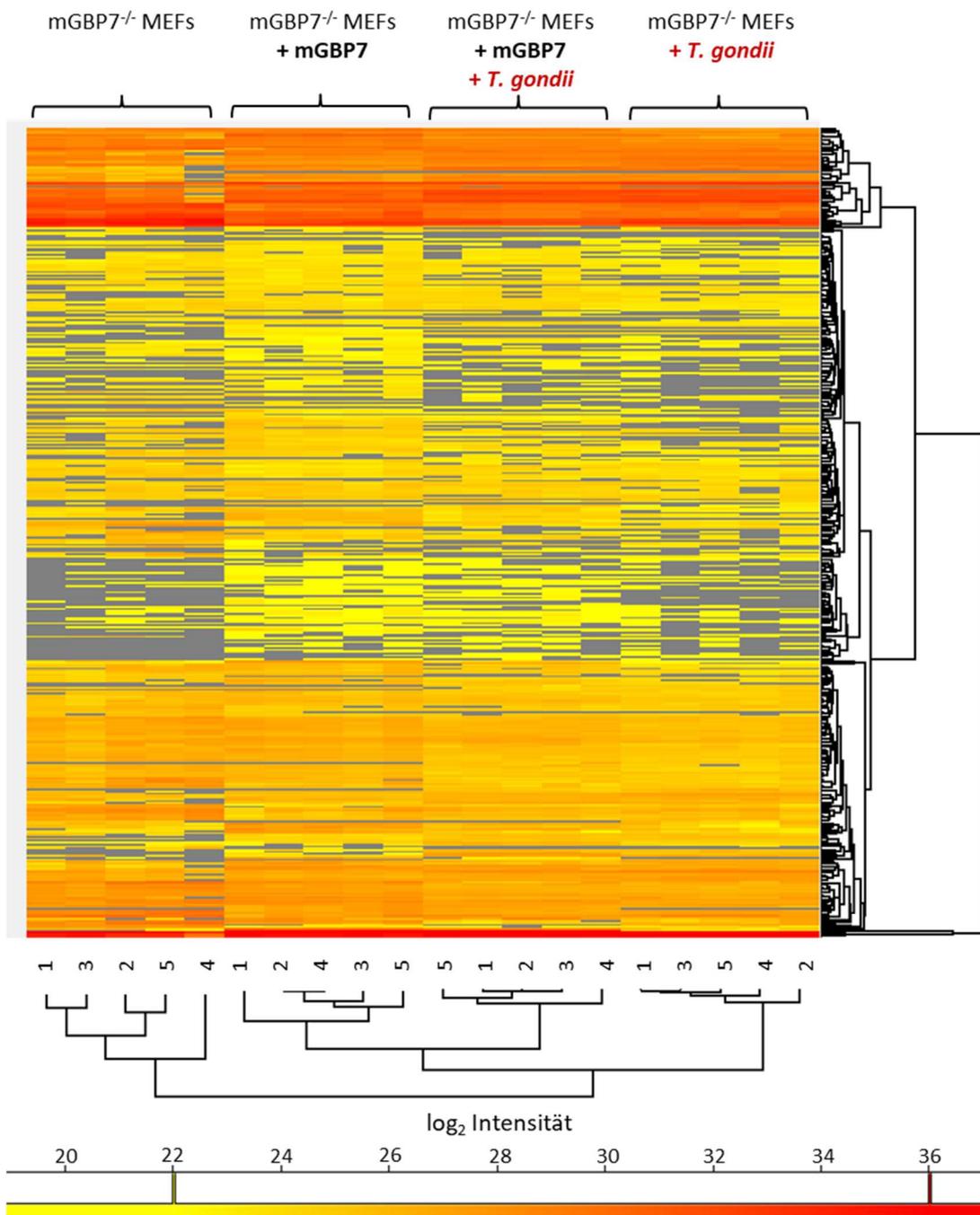
**Abb. S3: Western Blot Analyse von HA-mGBP rekonstituierten Zelllinien.** Die Zelllysate der mit HA-mGBP2 oder HA-mGBP7 rekonstituierten mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs wurden auf einem 4 – 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Immunoblot mit dem monoklonalen anti-HA Antikörper (HA-7, oberes Panel) oder dem monoklonalen anti- $\beta$ -Aktin Antikörper (AC-74, Ladekontrolle, unteres Panel) analysiert. Inklusive des HA-Tags hat das mGBP2-Fusionsprotein eine theoretische Masse von 68,0 kDa und das mGBP7-Fusionsprotein eine theoretische Masse von 73,8 kDa.



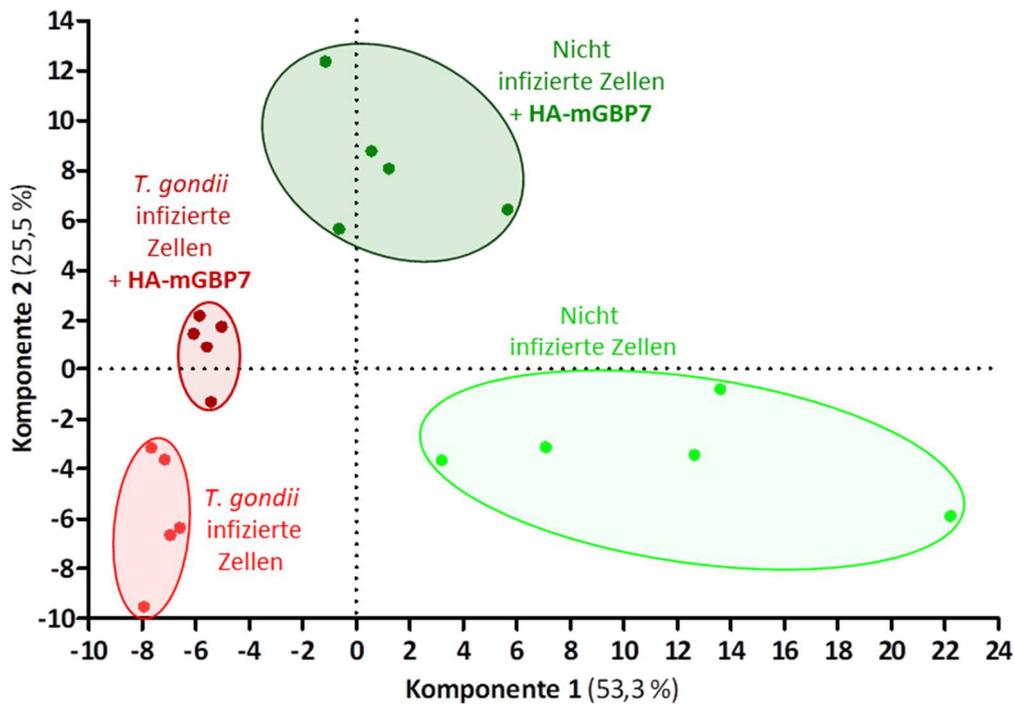
**Abb. S4:** Normalisierte Intensitäten von ISG15, Ubiquitin und dem Peptid EIAIAVMEHSFKDENQQFQK. Stabil HA-mGBP7 exprimierende mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs wurden für 16 h mit IFN $\gamma$  induziert und dann entweder für weitere 2,5 h inkubiert oder mit einer MOI von 10 mit *T. gondii* infiziert (2,5 h). Die Ko-IPs wurden mit anti-HA-Agarose wie in Abschnitt 3.1.8 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die Ko-IP-Proben im MPL (Abschnitt 3.3.14) weiter aufbereitet und mittels MS analysiert. Die ermittelten, normalisierten Intensitäten des in den Proben enthaltenen ISG15 (**A**), Ubiquitin (**B**) und des Peptids EIAIAVMEHSFK(Gly-Gly)DENQQFQK (**C**) sind graphisch dargestellt.



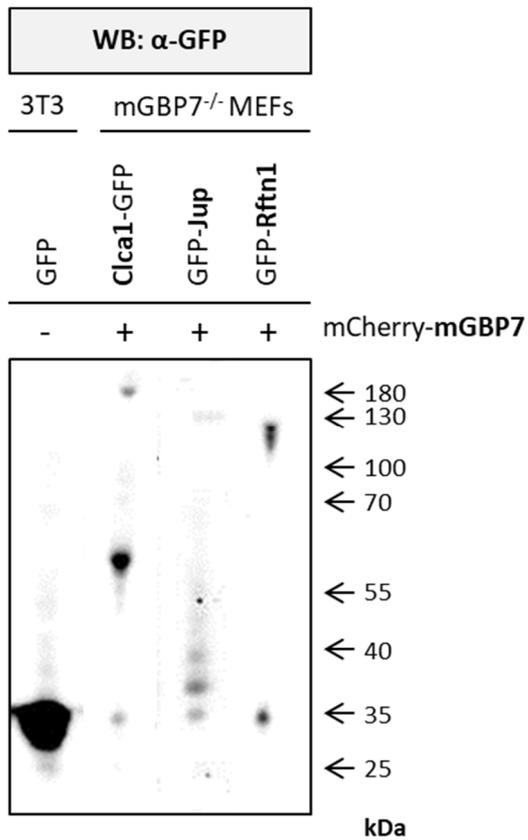
**Abb. S5: Optimierung der Ko-IP-Konditionen.** Um bei der Ko-IP nicht nur HA-mGBP7 sondern auch direkte Interaktionspartner von mGBP7 zu präzipitieren, wurden verschiedene Ko-IP-Bedingungen getestet. Es wurden sowohl verschiedene pH-Werte als auch eine unterschiedliche Anzahl an Waschschritten verglichen. Auch das Volumen der Waschkomponenten (Ko-IP-Puffer vs. PBS, engl.: *phosphate buffered saline*) wurde angepasst (nicht gezeigt). Die Ko-IP-Eluate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch eine Silberfärbung visualisiert. Anhand der Kreisdiagramme (**A-C**, oberhalb) ist eine Übersicht über das Verhältnis von präzipitiertem HA-mGBP7 (rot) zu ko-immunpräzipitierten Proteinen (alle anderen Farben) für die angegebenen Konditionen (**A**: pH 7,0; 4 Waschschr. mit Ko-IP-Puffer; 1 Waschschr. mit PBS; **B**: pH 7,5; 3 Waschschr. mit Ko-IP-Puffer; 1 Waschschr. mit PBS; **C**: pH 7,3; 3 Waschschr. mit Ko-IP-Puffer) illustriert. Als jeweilige Kontrolle zu den Ko-IP-Eluaten der mit HA-mGBP7 rekonstituierten mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs (+) wurden die Ko-IP-Eluate von mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs (-), welche kein HA-mGBP7 exprimieren, aufgetragen. Als finale Ko-IP-Konditionen für alle weiteren Experimente wurden die in (**C**) gezeigten Bedingungen gewählt. Alle MS-Analysen wurden wie in Abschnitt 3.3.14 beschrieben durchgeführt.



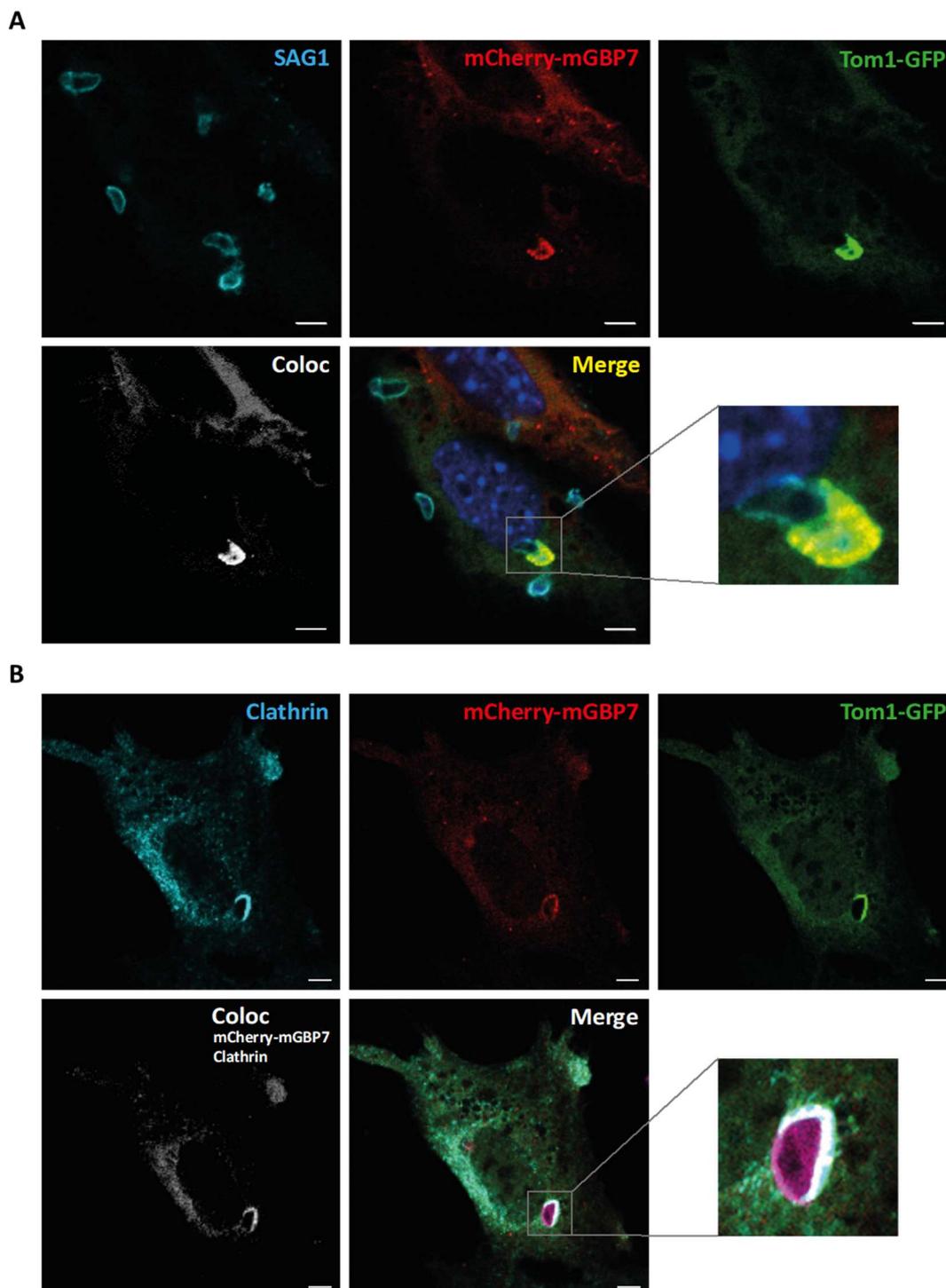
**Abb. S6: Heatmap Darstellung der MS-Daten.** Darstellung der Proteinquantifizierungsdaten in einer *Heatmap*. Jede Spalte in der *Heatmap* repräsentiert eines der jeweiligen fünf biologischen Replikate (nicht infizierte mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs; stabil HA-mGBP7 exprimierende, nicht infizierte mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs; stabil HA-mGBP7 exprimierende, *T. gondii*-infizierte mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs oder *T. gondii*-infizierte mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs) und jede Reihe stellt eine unterschiedliche Proteingruppe dar. Die Ko-IPs wurden wie in Abschnitt 3.1.8 beschrieben durchgeführt und anschließend massenspektrometrisch (Abschnitt 3.3.14) analysiert. Das Clustering an den Seiten der *Heatmap* indiziert welche Replikate (Proteingruppen) basierend auf den relativen Intensitäten der quantifizierten Proteingruppen (Replikate) eine hohe Ähnlichkeit zueinander aufweisen. Das hierarchische Clustering bestätigt, dass die Replikate der einzelnen Gruppen eine hohe Ähnlichkeit zueinander aufweisen und sich von den Replikaten der anderen Gruppen stärker unterscheiden. Die *Heatmap* wurde von Gereon Poschmann (MPL, HHU) erstellt.



**Abb. S7: Hauptkomponentenanalyse.** PCA-Analyse der Ko-IP-MS-Daten. Aufgetragen sind die Komponenten 1 und 2 mit ihren entsprechenden prozentualen Anteilen an der Gesamtvarianz von 53,3 % und 25,5 %. Die jeweiligen Cluster der fünf Replikate wurden farblich hervorgehoben (nicht infizierte Zellen: hellgrün; nicht infizierte Zellen + HA-mGBP7: dunkelgrün; *T. gondii*-infizierte Zellen: rot; *T. gondii*-infizierte Zellen + HA-mGBP7: dunkelrot). Die MS-Analysen wurden wie in Abschnitt 3.3.14 beschrieben durchgeführt.

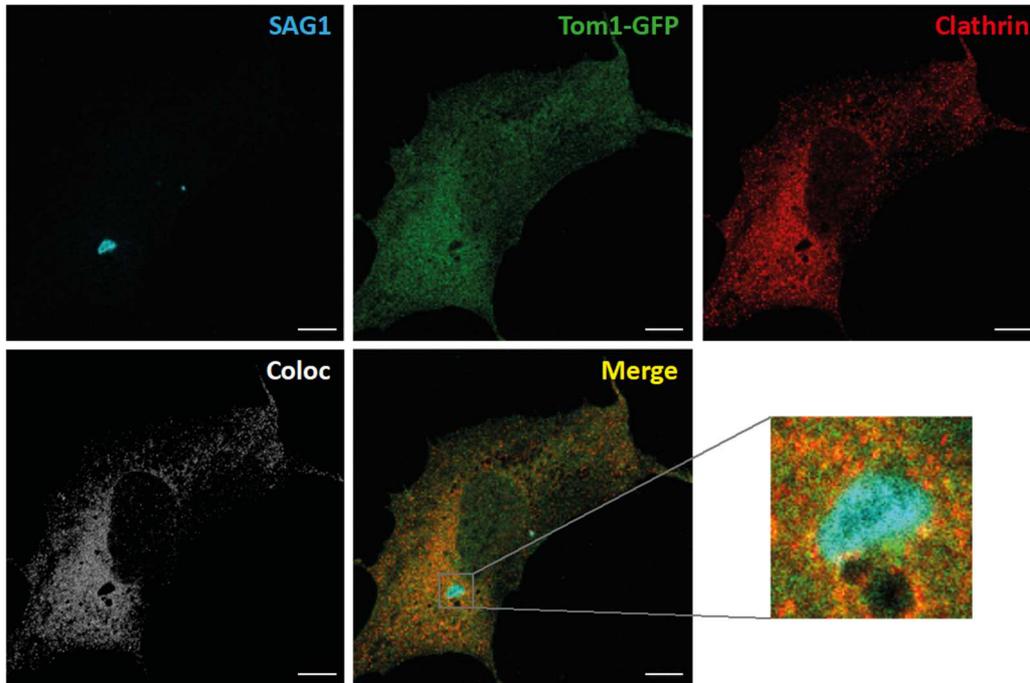


**Abb. S8: Western Blot Analyse von mit GFP-Fusionskonstrukten rekonstituierten Zelllinien.** Die Zelllysate der mit GFP, Clca1-GFP, GFP-Jup, GFP-Rftn1 und/oder mCherry-mGBP7 rekonstituierten 3T3 (GFP) oder mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs wurden auf einem 4 – 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Immunoblot mit dem monoklonalen anti-GFP Antikörper (Klon 7.1 und 13.1) analysiert. Theoretische Massen: GFP: 27 kDa; Clca1-GFP: 59-65 kDa und 152/157 kDa; GFP-Jup: 109 kDa; GFP-Rftn1: 89 kDa.

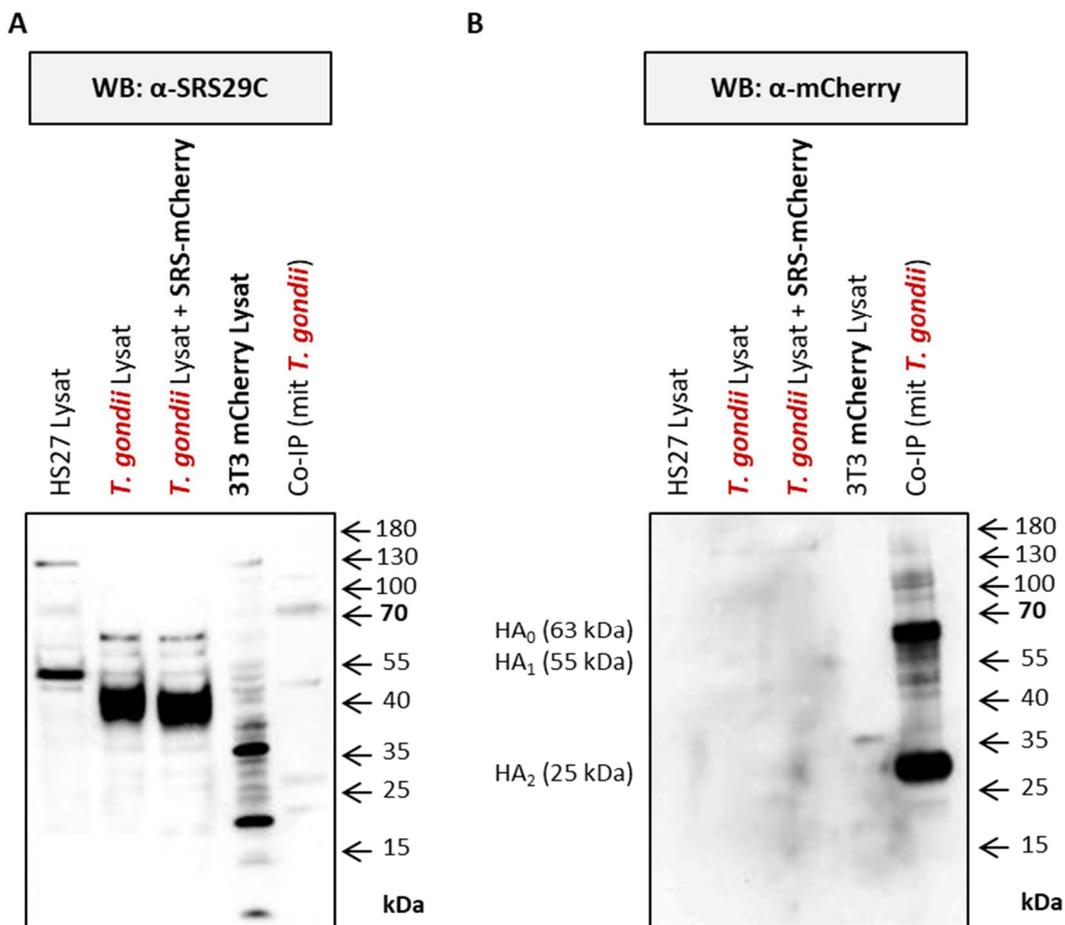


**Abb. S9: Subzelluläre Lokalisation von mCherry-mGBP7, Tom1-GFP und Clathrin.** Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von Clathrin, mGBP7 mit N-terminalem mCherry- und Tom1 mit CT GFP-Tag in mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs. Die Zellen wurden 16 h vor der Fixierung mit IFN $\gamma$  stimuliert und dann einer MOI von 10 mit *T. gondii* infiziert (2,5 h). Kolokalisierende Voxel beider Proteine (Coloc, ImarisColoc Kanal) werden je als weiße Punkte dargestellt. **(A)** Nach der Fixierung wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt und *T. gondii* wurde durch AK-Färbung von SAG1 (mAB gegen TP3) visualisiert (Sekundärantikörper: Alexa Fluor 633, cyan). Tom1 weist eine eher homogene Verteilung im Zytosol aufweist, wohingegen mGBP7 distinkte, subzelluläre VLS ausbildet (n $\geq$ 3). Tom1 und mGBP7 akkumulieren an der PV eines Parasiten und zeigen eine starke Kolokalisation. Maßstabsbalken, 5  $\mu$ m. **(B)** *T. gondii* SAG1 (mAB gegen TP3;

Sekundärantikörper: Alexa Fluor 633, violett) und Clathrin wurden durch AK-Färbung (AS1650 bis C-Terminus, Sekundärantikörper: Alexa Fluor 405, cyan) visualisiert. Clathrin und mCherry-mGBP7 kolokalisieren an der PV eines Parasiten ( $n \geq 3$ ). Maßstabsbalken, 5  $\mu\text{m}$ .



**Abb. S10: Subzelluläre Lokalisation von Tom1-GFP und Clathrin in mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs bei einer Infektion mit *T. gondii*.** Konfokalmikroskopie-Aufnahme von Clathrin und Tom1 mit CT GFP-Tag in mGBP7<sup>-/-</sup> MEFs. Die Zellen wurden mit einer MOI von 10 mit *T. gondii* infiziert (2,5 h) und nach der Fixierung wurde *T. gondii* durch AK-Färbung des Oberflächenmarkers SAG1 (mAB gegen TP3; Sekundärantikörper: Alexa Fluor 633, violett) und Clathrin durch AK-Färbung des C-Terminus (AS1650 bis C-Terminus; Sekundärantikörper: Alexa Fluor 405, cyan) visualisiert. Kolokalisierende Voxel von Tom1-GFP und Clathrin (Coloc, ImarisColoc Kanal) werden je als weiße Punkte dargestellt. Tom1 und Clathrin zeigen eine starke Kolokalisation im Zytosol, aber nur eine schwache Akkumulation an der PV des Parasiten ( $n \geq 3$ ). Maßstabsbalken, 10  $\mu\text{m}$ .



**Abb. S11: Western Blot Analyse von *T. gondii*- und Zelllysaten.** Zum Nachweis von SRS29C-mCherry *T. gondii* wurden verschiedene Zelllysate (H27-Zellen, mCherry exprimierende 3T3-Zellen) und Lysate von *T. gondii* (WT ME49 *T. gondii*, mit SRS29C-mCherry transduzierte ME49 *T. gondii*) sowie eine HA-mGBP7 Ko-IP-Probe auf einem 4 – 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. **(A)** Detektion mit einem polyklonalen, im Rahmen dieser Arbeit generierten anti-SRS29C Antikörper (Eurogentec). **(B)** Detektion mit einem monoklonalen anti-mCherry Antikörper. Theoretische Massen: mCherry: 26,6 kDa; SRS29C: 39,1 kDa, SRS29C-mCherry: 65,7 kDa.

## 10 Publikationen

Auszüge dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

**Legewie L**, Loschwitz J, Steffens N, Prescher M, Wang X, Smits SHJ, Schmitt L, Strodel B, Degrandi D, Pfeffer K; Biochemical and structural characterization of murine GBP7, a guanylate binding protein with an elongated C-terminal tail. *Biochem J* (2019); 476 (21): 3161–3182. doi: 10.1042/BCJ20190364

Weitere Publikationen:

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* (2020); 11: e02993-19. doi: 10.1128/mBio.02993-19.

## 11 Eidesstattliche Versicherung

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

Ich erkläre weiterhin, dass die Dissertation weder in der vorgelegten noch in einer ähnlichen Form bereits bei einer anderen Institution eingereicht wurde.

Düsseldorf, der 05. März 2020

---

(Larissa Legewie)

## 12 Danksagung

An erster Stelle gilt mein herzlicher Dank Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Bereitstellung eines interessanten Forschungsthemas, für die exzellente Betreuung während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit und für seine stetige Unterstützung.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Lutz Schmitt für die freundliche Betreuung im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 1208, seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und die Übernahme des Korreferats.

„Hochgradig“ bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Daniel Degrandi für die freundschaftliche Betreuung, sein Vertrauen und die kreativen Gespräche und die Ideen.

Vielen Dank an alle Mitglieder des Sonderforschungsbereichs 1208 für die vielen anregenden Diskussionen, Seminare und Konferenzen. Ein lieber Dank geht in diesem Sinne auch an Dr. Cordula Kruse und Katherina Lanzer für ihre Hilfe mit den alltäglichen „Doktoranden-Belangen“. Allen voran möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Birgit Strodel, Prof. Dr. Kai Stühler, Dr. Gereon Poschmann, Dr. Sander Smits und Jennifer Loschwitz für die enge Zusammenarbeit, die große Hilfsbereitschaft und die erfolgreiche Umsetzung von gemeinsamen Ideen und Projekten bedanken.

Ein Dankeschön geht weiterhin an Dr. Astrid Port und Stefanie Kobus für die Übernahme der Kristallisation von mGBP7.

Insbesondere möchte ich mich herzlich bei dem „Besten Schreibraum ever“, dem „Brunch & Escape Room“-Team, den „AA's“ und – nicht zu vergessen – Uschi :-)) für das grandiose, leicht „verrückte“ Arbeitsklima, die Unterstützung im Laboralltag und die zahlreichen gemeinsamen Unternehmungen (u. a. Grill-, HP-Party-, Keramik-Workshop-, Festival-, Kirmes- und Weihnachtsmarkt-Abende) außerhalb des Laborbetriebs bedanken.

Ein großes Dankeschön geht darüber hinaus an alle Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene sowie die Virologen für die stete Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Atmosphäre bei unseren Seminaren, den Institutsfeiern und dem Mittagessen.

Vom ganzen Herzen danke ich meinen Eltern, Großeltern und Freunden, die mich stets unterstützt und motiviert haben und mir den Blick für das Wesentliche geben! Ein besonderer Dank geht an Magdalena für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinem Freund Steffen danke ich für seine unendliche Geduld mit mir, dass er mein Interesse an dieser Arbeit teilt und er es immer schafft – auch wenn Experimente anfangen „eine eigene Meinung zu entwickeln“ – mir wieder ein Lächeln aufs Gesicht zu zaubern.