

**Funktions- und Strukturanalysen zur
Charakterisierung des murinen GBP9 Proteins
bei Infektionen mit intrazellulären Erregern**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Jens Lichte
aus Aachen

Düsseldorf, Mai 2021

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

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

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Klaus Pfeffer
2. Prof. Dr. Johannes Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VI
TABELLENVERZEICHNIS.....	IX
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XI
ZUSAMMENFASSUNG.....	XIII
SUMMARY.....	XV
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 CRISPR/Cas9 – Vom Schutzmechanismus prokaryotischer Zellen zum genetischen Werkzeug.....	2
1.2 Das Immunsystem der Säugetiere.....	7
1.2.1 Angeborenes Immunsystem	8
1.2.2 Adaptives Immunsystem	11
1.3 Immunologische Signalmoleküle und Interferon-Signalwege.....	12
1.3.1 IFN γ -stimulierte Prozesse und Effektoren	15
1.3.2 Interferon-induzierbare GTPasen	17
1.4 Guanylat-bindende Proteine.....	18
1.4.1 Taxonomie der GBPs.....	19
1.4.2 Strukturelle und biochemische Eigenschaften.....	20
1.4.3 Subzelluläre Lokalisation	22
1.4.4 <i>Chlamydia trachomatis</i> und die Rolle der GBPs in bakteriellen Infektionen	23
1.4.5 <i>Toxoplasma gondii</i> und die Rolle der GBPs in Protozoa-Infektionen	30
1.4.6 Das Murine Cytomegalovirus und die Rolle der GBPs in Virus-Infektionen.....	36
1.5 Zielsetzung.....	41
2 MATERIAL.....	43
2.1 Bezugsquellen.....	43
2.1.1 Chemikalien.....	43
2.1.2 Antikörper.....	45
2.1.3 Fluoreszenzfarbstoffe	46

Inhaltsverzeichnis

2.1.4	Enzyme.....	46
2.1.5	CRISPR/Cas9 Genom-Editierungssystem Komponenten	46
2.1.6	Kits und andere Reagenzien.....	47
2.1.7	Verbrauchsmaterial	48
2.1.8	Geräte.....	49
2.2	Medien und Puffer	51
2.2.1	Puffer und Stammlösungen.....	51
2.2.2	Kulturmedien	54
2.3	Zelllinien, Bakterien- und Toxoplasmenstämme	55
2.3.1	Verwendete Zelllinien.....	55
2.3.2	Verwendete Bakterien-, Virus- und Toxoplasmenstämme	55
2.4	Vektoren, Oligonukleotide und Lentiviren.....	56
2.4.1	Plasmide	56
2.4.2	Verwendete Plasmide.....	56
2.4.3	Hergestellte Plasmide.....	57
2.4.4	Primer - Klonierungen	57
2.4.5	Primer - Sequenzierungen.....	57
2.4.6	Primer und Sonden – RT-PCR.....	58
2.4.7	Weitere Oligonukleotide	59
2.4.8	Lentiviren.....	59
2.4.9	Software	60
2.5	Statistische Analyse.....	60
3	METHODEN	61
3.1	Zellbiologische Methoden.....	61
3.1.1	Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien	61
3.1.2	Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen	62
3.1.3	Transfektion	62
3.1.4	Lentivirale Transduktion zur Herstellung stabiler Zelllinien.....	63
3.1.5	Kultivierung von <i>C. trachomatis</i>	64
3.1.6	<i>In vitro</i> -Infektion mit <i>C. trachomatis</i>	64
3.1.7	Kultivierung von <i>Toxoplasma gondii</i>	65

3.1.8	<i>In vitro</i> -Infektion mit <i>T. gondii</i>	65
3.1.9	Immunfluoreszenzfärbung zur konfokalmikroskopischen Analyse	65
3.1.10	<i>In vitro</i> -Infektion mit MCMV	66
3.1.11	Co-Lokalisationsberechnung mittels ImarisColoc	67
3.2	Molekularbiologische Methoden	67
3.2.1	CRISPR/Cas9 Genom-Editierungssystem.....	67
3.2.2	DNA-Isolation	70
3.2.3	Kryokonservierung von prokaryotischen Zellen	71
3.2.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	71
3.2.5	Restriktionsanalyse.....	72
3.2.6	Ligation.....	73
3.2.7	Agarosegel-Elektrophorese	73
3.2.8	Klonierungsmethoden.....	74
3.2.9	Transformation in <i>E. coli</i>	76
3.2.10	RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen.....	76
3.2.11	cDNA-Synthese	77
3.2.12	Realtime-PCR.....	77
3.2.13	Southern Blot Analyse.....	78
3.2.14	Sanger-Sequenzierung	80
3.3	Proteinbiochemische Methoden	81
3.3.1	Protein-Isolation von Gesamtprotein aus eukaryotischen Zellen	81
3.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	81
3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	81
3.3.4	Western Blot (semidry)	81
3.3.5	Sensitive Coomassie-Färbung	82
3.3.6	Immunopräzipitation mittels GFP-Trap	82
3.3.7	Malachitgrün GTPase Aktivitäts-Test	83
3.3.8	Proteinexpression und Aufreinigung.....	84
3.3.9	Kristallographie	85
3.3.10	SAXS-Analysen.....	85
3.3.11	Generierung eines mGBP9-spezifischen Antikörpers.....	85
4	ERGEBNISSE.....	87

4.1 Etablierung einer mGBP9-Defizienz mittels CRISPR/Cas9 Genom-Editierungssystem.....	87
4.1.1 Generierung einer mGBP9-defizienten, murinen ES Zelllinie: Erste Strategie...	88
4.1.2 Generierung einer mGBP9-defizienten, murinen ES Zelllinie: Zweite Strategie	94
4.1.3 Generierung einer mGBP9-Defizienz in NIH/3T3 Fibroblasten	100
4.2 In vitro Analysen zum Einfluss multipler mGBP-Defizienzen auf die zellintrinsische Immunität von NIH/3T3 Fibroblasten	104
4.2.1 mGBP ^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Fibroblasten im <i>C. trachomatis</i> Infektionsmodell	104
4.2.2 mGBP ^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Fibroblasten im <i>T. gondii</i> Infektionsmodell	109
4.2.3 mGBP ^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Fibroblasten im MCMV Infektionsmodell	111
4.3 Lokalisationsstudie von mGBP9 mit weiteren mGBPs	115
4.3.1 Expressionsanalyse von GFP-mGBP9 und mCherry-mGBP Fusionsproteinen in NIH/3T3 Fibroblasten	115
4.3.2 Co-Lokalisationsanalyse von GFP-mGBP9 und verschiedenen mCherry-mGBP Fusionsproteinen.....	118
4.3.3 Co-Lokalisationsanalyse von mGBP9 mit verschiedenen mGBPs an der chlamydialen Inklusionsmembran.....	130
4.4 Biochemische Analysen von mGBP9.....	135
4.4.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem mGBP9 Protein in nativem Zustand	135
4.4.2 Strukturaufklärung des mGBP9 Proteins.....	137
4.4.3 Generierung eines mGBP9-spezifischen polyklonalen Antikörpers	142
5 DISKUSSION	145
5.1 Etablierung des mGBP9 K.O. Tiermodells	146
5.2 Analysen zur mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} NIH/3T3 Fibroblasten-Linie.....	150
5.2.1 Die kombinierten mGBP6, 9, 10 und 11 Defizienzen resultierten aus einer unspezifischen gRNA-Bindung.....	150
5.2.2 NIH/3T3 Fibroblasten weisen eine reduzierte Adhärenz auf.....	151
5.2.3 NIH/3T3 Fibroblasten weisen eine reduzierte IFN γ -Responsivität auf.....	153
5.3 mGBP9 co-lokalisiert mit verschiedenen mGBPs.....	158

5.3.1	Doppelt-transduzierte NIH/3T3 Fibroblasten weisen veränderte mGBP-Rekrutierung zur Inklusionsmembran auf.....	164
5.3.2	mGBP8 co-lokalisiert mit <i>C. trachomatis</i> im Inklusionslumen	168
5.4	Strukturaufklärung von mGBP9	169
5.4.1	Kristallstruktur von mGBP9	171
5.4.2	Aufgereinigtes mGBP9-Protein zeigt keine Homo-Dimerisierung in Nukleotid-freier Lösung	173
5.5	Polyklonaler mGBP9-Antikörper weist Kreuzreaktivität zu weiteren mGBP-Proteinen auf.....	174
6	LITERATURVERZEICHNIS	177
	ANHANG	207
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	215
	DANKSAGUNG	217

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Struktur und Mechanismen des CRISPR/Cas9 Systems.....	4
Abb. 2	Anwendung des CRISPR/Cas9 Systems in der Gentechnik.	7
Abb. 3	Schematische Darstellung der IFN-Signalwege.....	15
Abb. 4	Lebenszyklus und Taxonomie der Chlamydien.	24
Abb. 5	Rekrutierung der mGBPs an die Inklusion von <i>C. trachomatis</i>	28
Abb. 6	Lebenszyklus des Parasiten <i>T. gondii</i> aus dem Phylum Apicomplexa.	32
Abb. 7	Rekrutierung der mGBPs an die PV von <i>T. gondii</i>	35
Abb. 8	Schematische Darstellung des HCMV-Lebenszyklus.....	38
Abb. 9	Schematische Darstellung der ersten CRISPR/Cas9 Genomeditierungs-Strategie zur Etablierung einer mGBP9-Defizienz.....	90
Abb. 10	Z-Wert Profile der Zielsequenz von Modifikation 2.....	92
Abb. 11	Testverfahren zur Identifikation positiver Klone im ersten CRISPR/Cas9 Genomeditierungs-Ansatz.	93
Abb. 12	Schematische Darstellung des zweiten CRISPR/Cas9 Genomeditierungs-Ansatzes im mGBP9 Genlokus.....	95
Abb. 13	Testverfahren zur Identifikation positiver Klone im zweiten CRISPR/Cas9 Genomeditierungs-Ansatz.	98
Abb. 14	Analyse der mGBP-Expression in der mGBP9 ^{+/-} ES Zelllinie.....	99
Abb. 15	Identifizierung einer multiplen mGBP defizienten NIH/3T3 Fibroblasten Zelllinie.	102
Abb. 16	mGBP-Funktionsanalyse in der <i>C. trachomatis</i> Infektion von NIH/3T3 Fibroblasten.	107
Abb. 17	Proliferationsanalyse von <i>C. trachomatis</i> in infizierten NIH/3T3 Fibroblasten. ..	109
Abb. 18	mGBP-Funktionsanalyse in der <i>T. gondii</i> Infektion von NIH/3T3 Fibroblasten..	110
Abb. 19	mGBP-Funktionsanalyse in der MCMV Infektion von NIH/3T3 Fibroblasten....	112
Abb. 20	Ektopische Expression von GFP- und mCherry-mGBP Konstrukten in NIH/3T3 Fibroblasten.	117
Abb. 21	Konfokalmikroskopische Analyse zur Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 mit mCherry.....	119
Abb. 22	Konfokalmikroskopische Aufnahme zur Expressionsanalyse der GFP-mGBP9 und mCherry-mGBP1 doppelt-transduzierten Zelllinie.	120

Abb. 23	Konfokalmikroskopische Analyse zur Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 mit mCherry-mGBP2.	121
Abb. 24	Konfokalmikroskopische Analyse zur Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 mit mCherry-mGBP3.	122
Abb. 25	Konfokalmikroskopische Analyse zur Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 mit mCherry-mGBP5.	123
Abb. 26	Konfokalmikroskopische Analyse zur Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 mit mCherry-mGBP6.	124
Abb. 27	Konfokalmikroskopische Analyse zur Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 mit mCherry-mGBP7.	125
Abb. 28	Konfokalmikroskopische Analyse zur Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 mit mCherry-mGBP8.	126
Abb. 29	Konfokalmikroskopische Analyse zur Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 mit mCherry-mGBP9.	127
Abb. 30	Konfokalmikroskopische Aufnahme zur Expressionsanalyse der GFP-mGBP9 mit mCherry-mGBP10 doppelt-transduzierten Zelllinie.....	128
Abb. 31	Interaktionsanalyse von GFP-mGBP9 mit mCherry-mGBP Konstrukten.	130
Abb. 32	Konfokalmikroskopische Analyse der Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 und mCherry-mGBP Konstrukten an der chlamydialen Inklusion.....	133
Abb. 33	Konfokalmikroskopische Analyse der Co-Lokalisation von mCherry-mGBP8, GFP-mGBP9 und <i>C. trachomatis</i>	134
Abb. 34	Protein-Biochemische Analysen von mGBP9.	136
Abb. 35	Kristallisation des mGBP9 Proteins.....	138
Abb. 36	Vergleich der Kristallstrukturen von mGBP9 und hGBP1.....	139
Abb. 37	SAXS-Messung von mGBP9.....	141
Abb. 38	Generierung eines mGBP9-spezifischen polyklonalen Antikörpers.	143
Abb. 39	Die HDR-Effizienz ist abhängig von der Insertions-Position auf dem DNA-Template.....	148
Abb. 40	Schematische Darstellung der Co-Lokalisation von mGBP9 mit weiteren mGBPs in IFN γ -stimulierten bzw. unstimulierten NIH/3T3 Fibroblasten.....	162

Abbildungsverzeichnis

AbbS. 1	Sequenzvergleiche von Exon 2 und Exon 3 der Chr5-Cluster mGBPs.....	207
AbbS. 2	Sequenzvergleich der gRNA mit weiteren mGBP-Genen: Strategie 1.....	208
AbbS. 3	Sequenzvergleiche der gRNAs mit weiteren mGBP-Genen: Strategie 2.....	208
AbbS. 4	PCR-Testverfahren zur Identifikation positiver Klone im zweiten CRISPR/Cas9 Genom-editierungs-Ansatz.....	209
AbbS. 5	Sequenzierungsanalyse der heterozygot mGBP9-defizienten ES Zelllinie.....	210
AbbS. 6	Relative Fluoreszenzintensitäten des MCMV Infektionsexperiments.	211
AbbS. 7	Plasmidkarten zur GFP-mGBP9 Fusionskonstrukt-Klonierung.	212
AbbS. 8	Plasmidkarten zur mCherry-mGBP10 Fusionskonstrukt-Klonierung.....	213
AbbS. 9	Plasmidkarten zur His6-mGBP9 Fusionskonstrukt-Klonierung.	214

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Verwendete Chemikalien.....	45
Tab. 2	Verwendete Primär-Antikörper.....	45
Tab. 3	Verwendete Sekundär-Antikörper	46
Tab. 4	Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe	46
Tab. 5	Verwendete Enzyme	46
Tab. 6	Verwendete Restriktionsenzyme.....	46
Tab. 7	Verwendete CRISPR/Cas9 Genom-Editierungssystem Komponenten	47
Tab. 8	Verwendete Kits und Reagenzien.....	48
Tab. 9	Verwendetes Verbrauchsmaterial	49
Tab. 10	Verwendete Geräte.....	51
Tab. 11	Verwendete Puffer und Stammlösungen.....	53
Tab. 12	Verwendete Kulturmedien	55
Tab. 13	Verwendete Zelllinien.....	55
Tab. 14	Verwendete Bakterien-, Virus- und Toxoplasmenstämme.....	56
Tab. 15	Verwendete Plasmide.....	57
Tab. 16	Hergestellte Plasmide.....	57
Tab. 17	Verwendete Primer – Klonierungen	57
Tab. 18	Verwendete Primer – Sequenzierungen.....	58
Tab. 19	Verwendete Primer und Sonden - RT-PCR	59
Tab. 20	Weitere verwendete Oligonukleotide.....	59
Tab. 21	Hergestellte Lentivirus-Überstände	60
Tab. 22	Verwendete Software	60
Tab. 23	Elektroporationsparameter – ES Zellen	63
Tab. 24	Verwendete Plasmide zu Herstellung von Lentivirus-Überstand.....	63
Tab. 25	Arbeitsschritte und Inkubationszeiten zur Immunfluoreszenzfärbung von <i>T. gondii</i>	65
Tab. 26	Arbeitsschritte und Inkubationszeiten zur Immunfluoreszenzfärbung von <i>C. trachomatis</i>	66
Tab. 27	Vol./Konz. der CRISPR/Cas9 Komponenten	68
Tab. 28	Eingesetzte Volumina zur Herstellung des RNP-Komplexes: Strategie 1.	68
Tab. 29	Eingesetzte Volumina zur Herstellung des RNP-Komplexes: Strategie 2	68

Tabellenverzeichnis

Tab. 30	Eingesetzte Volumina der CRISPR/Cas9 Elektroporations-Komponenten in ES Zellen.....	69
Tab. 31	Allgemeiner PCR-Ansatz	72
Tab. 32	Allgemeines PCR-Programm	72
Tab. 33	Allgemeiner DNA-Restriktionsansatz.....	73
Tab. 34	Allgemeiner Ligationsansatz	73
Tab. 35	Allgemeiner Ligationsansatz	75
Tab. 36	Herstellung eines RNA-Primer Mix	77
Tab. 37	Bestandteile des Mastermix aus der cDNA-Synthese	77
Tab. 38	RT-PCR Pipettierschema.....	78
Tab. 39	RT-PCR Programm	78
Tab. 40	Ansatz für die Southern Blot Sondenmarkierung.....	79
Tab. 41	Pipettierschema zum Malachitgrün GTPase Aktivitäts-Test	83
Tab. 42	Allel-Varianten der verschiedenen mGBP Gene des Chromosom 5-Clusters in einer CRISPR/Cas9 Genom-editierten Fibroblasten Zelllinie.	103

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	ER	Endoplasmatisches Retikulum
μF	Mikrofarad	ES Zellen	Embryonale Stammzellen
μg	Mikrogramm	g	Gramm
μl	Mikroliter	GAS	<i>Gamma activated site</i>
μm	Mikrometer	GBP	Guanylat-bindendes Protein
μm	Mikrometer	GDP	Guanosid-di-phosphat
3D	dreidimensional	GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
Å	Ångström	GMP	Guanosid-mono-Phosphat
Abb.	Abbildung	gRNA	<i>guideRNA</i>
Abschn.	Abschnitt	GTP	Guanosid-tri-Phosphat
Amp	Ampicilin	h	Stunde(n)
AS	Aminosäuren	HCMV	humanes CMV
Bp (k)	Basenpaare (Kilo-)	HDR	<i>homology-directed repair</i>
Bq (M)	Bequerel (Mega-)	hGBP	humanes GBP
C.	<i>Chlamydia trachomatis</i>	His6	sechsfach-Histidin
<i>trachomatis</i>			
ca.	circa	hpi	Stunde(n) nach der Infektion
CAM	Chloramphenicol	Hsp	Hitzeschock-Protein
Cas	CRISPR-assoziiert	IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
CD	<i>cluster of differentiaton</i>	IFN	Interferon
cDNA	<i>complementary DNA</i>	IFNγR	IFN gamma Rezeptor
<i>Chlamydia</i>	<i>Chlamydia</i> Spezies	Ig	Immunglobulin
<i>spp.</i>			
Chr3/5	Chromosom 3/5	IL	Interleukin
cm	Zentimeter	Indel	<i>insert-deletion</i>
CMV	Cytomegalovirus	iNOS	induzierbare NO-Synthase
Co-IP	Co-Immunopräzipitation	IRF	Interferon-regulierter Faktor
cpm	<i>Counts per minute</i>	IRG	IFN-regulierte GTPase
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>	ISG	IFN-stimulierte Gene
crRNA	CRISPR-RNA	ISGF	IFN-stimulierter Gen Faktor
C-terminal	Carboxy-terminal	ISRE	IFN-stimuliertes Reaktions-Element
DC	Dendritische Zelle	Jak	Janus Kinase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	kbar	Kilobar
ds	doppelsträngig	l	Liter
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	lat.	lateinisch
EB	Elementarkörperchen	LG-Domäne	große, globuläre Domäne
E-Domäne	Effektor-Domäne	LPS	Lipopolysaccharid
engl.	englisch	M	Molar

Abkürzungsverzeichnis

mA	Milliampere	PTC	<i>Premature termination codon</i>
MCMV	Murines CMV	PV	Parasitophore Vakuole
M-Domäne	Mittel-Domäne	RB	Retikulärkörperchen
MEF	Murine, embryonale Fibroblasten	RNA	Ribonukleinsäure
mg	Milligramm	rpm	<i>Rounds per minute</i>
mGBP	Murines GBP	RT	Raumtemperatur
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>	s. u.	Siehe unten
min	Minute(n)	SAG1	<i>Surface antigen 1</i>
Mio.	Millionen	SAXS	<i>Small angle X-ray scattering</i>
ml	Milliliter	SDS	<i>Sodium dodecyl sulfat</i>
mm	Millimeter	SEC	<i>Size-exclusion chromatography</i>
mM	Millimolar	sek	Sekunde(n)
MOI	<i>multiplicity of infection</i>	sgRNA	<i>single-guide RNA</i>
MOMP	<i>Major outer membrane protein</i>	ss	<i>single-stranded</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>	STAT	Signaltransduzierer und Aktivator der Transkription
Mx-Protein	Myxoma-Resistenz Protein	T. gondii	<i>Toxoplasma gondii</i>
N	Normal	Th	T Helfer
ng	Nanogramm	TLR	Toll-like Rezeptor
NHEJ	<i>Nonhomologous end-joining</i>	TNFα	Tumornekrosefaktor Alpha
NK	Natürliche Killer	tracrRNA	Transaktivierende CRISPR-RNA
NMD	<i>Nonsense-mediated decay</i>	U	Unit
nmol	Nanomol	U. a.	Unter anderem
N-terminal	Amino-terminal	ü. N.	Über Nacht
OD	Optische Dichte	UV	Ultraviolett
ODN	Oligodesoxyribonukleotid	V	Volt
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>	v/v	Volumen/Volumen
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>	VLIG	<i>Very large inducible GTPase</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion	VLS	<i>Vesicular-like structures</i>
PCV	Pathogen-enthaltende Vakuole	w/v	Gewicht/Volumen
PFU	<i>Plaque-forming unit</i>	WT	wildtyp
pg	Picogramm	z. B.	Zum Beispiel
pmol	Picomol		
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>		

Zusammenfassung

Im Kontext der Zell-autonomen Immunität ist IFN γ ein potenter Expressions-Initiator hunderter verschiedener Gene, die die aktivierte Zelle auf Infektionen vorbereiten. Unter diesen Genen stellen insbesondere die Guanylat-bindenden Proteine (GBPs) eine wichtige Effektor-Gruppe dar, deren Funktion bislang noch nicht umfassend erforscht wurde. GBPs sind große GTPasen, die in uninfizierten Zellen in Vesikel-ähnlichen Kompartimenten (VLS) vorkommen. Invadierenden Pathogenen widerfährt eine schnelle GBP-Akkumulierung an deren Art-spezifischen, Pathogen-assoziierten Vakuolen (PCVs) oder aber an deren Plasmamembran selbst. Die Akkumulierung an diesen Membranen, ist für einige der GBPs bereits als relevante Eigenschaft für die Kontrolle beispielsweise von *Chlamydia (C.) trachomatis*- und *Toxoplasma (T.) gondii*-Infektionen beschrieben worden. Viele der bisher nur wenig charakterisierten murinen GBPs (mGBPs) des mGBP-Clusters auf Chromosom 5 der Maus konnten bereits an PCVs beobachtet werden. Von diesen wies mGBP9 die höchsten Frequenzen an den chlamydialen Inklusionsmembranen auf, was auf eine spezifische Funktion von mGBP9 in Chlamydieninfektion hindeutet.

Um die Funktion von mGBP9 detailliert zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zunächst die Vorarbeiten für ein mGBP9-defizientes Mausmodell-System durchgeführt. Dazu wurde das CRISPR/Cas9 Genom-Editierungssystem in murinen embryonalen Stammzellen angewandt. Durch die eingesetzte mGBP9-*Targeting* Strategie konnte eine heterozygote mGBP9-defiziente ES-Zelllinie etabliert werden. Mittels dieser ES-Zelllinie können zukünftig mGBP9-defiziente Mäuse generiert werden, um die Funktion von mGBP9 *in vivo* zu untersuchen.

Des Weiteren sollte die mGBP9-Funktion in NIH/3T3 Fibroblasten *in vitro* analysiert werden. Über eine weitere CRISPR/Cas9 Genom-Editierungsstrategie wurde in dieser Zelllinie ein fast vollständiger Chromosom 5 Cluster *Knockout* generiert (mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO}). *In vitro* Infektionen mit *C. trachomatis* und *T. gondii* zeigten allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Pathogen-Replikation zwischen diesen und wildtypischen Zellen.

In doppelt-transduzierten NIH/3T3 Fibroblastenlinien, die GFP-mGBP9 und weitere mCherry-gekoppelte mGBP-Fusionsproteine exprimierten, konnte eine nur seltene Lokalisation der mGBPs in VLS beobachtet werden. In infizierten Zellen war zudem eine seltene Re-Lokalisierung der mGBPs an die chlamydiale Inklusionsmembran zu erkennen. Dabei konnte neben mGBP9 auch mGBP8 an bereits rupturierten Inklusionsmembranen und in Co-Lokalisation mit intrazellulären Chlamydien beobachtet werden.

Zusammenfassung

Um die Protein-biochemischen Eigenschaften charakterisieren zu können, wurde des Weiteren ein His₆-mGBP9 Fusionsprotein exprimiert und aufgereinigt. Anschließend wurde die GTPase-Aktivität bestimmt ($V_{\max} 275,1 \pm 19,07 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$). Natives Protein wurde zusätzlich in der Kristallographie sowie in Kleinwinkel-Röntgenstreuungs-Analysen eingesetzt, um die mGBP9 Struktur zu lösen. Die Struktur-Analyse ergab bereits erste Ergebnisse und kann zukünftig fortgeführt werden, um eine höhere Auflösung zu erhalten.

Als weiterer Teil wurde in dieser Arbeit ein mGBP9-spezifischer polyklonaler Antikörper generiert. In einem Western Blot mit Zelllysate aus verschiedenen GFP- oder mCherry-mGBP9 Fusionsprotein-exprimierenden NIH/3T3 Fibroblasten konnte eine sehr gute Erkennung von mGBP9 und eine Kreuzreaktivität des polyklonalen Antikörpers gegen mGBP3, 6, 8 und 10 bestimmt werden.

Zusammenfassend konnten mit dieser Arbeit wichtige Schritte zur Charakterisierung der mGBP9-Funktion durchgeführt werden. Insbesondere das in Kürze verfügbare mGBP9-Defizienz-Mausmodell als auch die Auflösung der mGBP9-Proteinstruktur werden wegweisend in der Forschung dieser GTPase sein. Das Verständnis über die Funktion dieser GTPase-Familie könnte zukünftig zu neuen therapeutischen Ansätzen bei verschiedenen Infektionskrankheiten, die durch intrazelluläre Erreger ausgelöst werden, verhelfen.

Summary

In the context of cell-autonomous immunity, IFN γ is a potent expression initiator of hundreds of different genes that prepare the activated cell for infection. Among these genes, guanylate-binding proteins (GBPs), in particular, represent an important effector group whose function has not yet been extensively studied. GBPs are large GTPases found in vesicle-like compartments (VLS) in uninfected cells. Invading pathogens undergo rapid GBP accumulation at their species-specific pathogen containing vacuoles (PCVs) or at their plasma membrane itself. Accumulation at these membranes has already been described for some of the GBPs as a relevant property for the control of, for example, *Chlamydia (C.) trachomatis* and *Toxoplasma (T.) gondii* infections. Many of the previously poorly characterized murine GBPs (mGBPs) of the mouse mGBP cluster on chromosome 5 have already been observed on PCVs. Of these, mGBP9 exhibited the highest frequencies at chlamydial inclusion membranes, suggesting a specific function of mGBP9 in chlamydial infection.

To investigate the function of mGBP9 in detail, the preliminary work for an mGBP9-deficient mouse model system was first performed in this work. For this purpose, the CRISPR/Cas9 genome editing system was applied in murine embryonic stem (ES) cells. By applying this mGBP9 targeting strategy, a heterozygous mGBP9-deficient ES cell line could be established. Using this ES cell line, mGBP9-deficient mice can be generated to study the function of mGBP9 *in vivo* in the future.

Furthermore, mGBP9 functions should be analyzed in NIH/3T3 fibroblasts *in vitro*. Via another CRISPR/Cas9 genome editing strategy, an almost complete chromosome 5 cluster knockout was generated in this cell line (mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO}). However, *in vitro* infections with *C. trachomatis* and *T. gondii* showed no significant differences in pathogen replication between these and wild-type cells.

In double-transduced NIH/3T3 fibroblast lines expressing GFP-mGBP9 and other mCherry-coupled mGBP fusion proteins, only rare localization of mGBPs in VLS was observed. In infected cells, a rare re-localization of mGBPs to the chlamydial inclusion membrane was also evident. Here, in addition to mGBP9, mGBP8 was also observed at already ruptured inclusion membranes and in co-localization with intracellular chlamydiae.

Furthermore, to characterize the protein biochemical properties, a His₆-mGBP9 fusion protein was expressed and purified. Subsequently, GTPase activity was determined (V_{\max} 275,1 \pm 19,07 nmol \times min⁻¹ \times mg⁻¹). Native protein was additionally used in crystallography as well as small angle X-ray scattering analyses to resolve the mGBP9 structure. The structural analysis

Summary

yielded preliminary results in this regard and may be continued in the future to obtain a higher resolution.

As another part, an mGBP9-specific polyclonal antibody was generated in this work. In a western blot with cell lysate from different GFP- or mCherry-mGBP fusion protein-expressing NIH/3T3 fibroblasts a very good recognition of mGBP9 and a cross-reactivity of the polyclonal antibody against mGBP3, 6, 8 and 10 could be determined.

In summary, this work provided important steps towards the characterization of mGBP9 function. In particular, the soon to be available mGBP9 deficiency mouse model as well as the resolution of the mGBP9 protein structure will be groundbreaking in the research of this GTPase. In the future, understanding the function of this GTPase family could lead to new therapeutic approaches for various infectious diseases caused by intracellular pathogens.

1 Einleitung

Der menschliche Organismus wird ständig durch eine Vielzahl von Umweltfaktoren belastet, die ohne geeignete Schutzvorkehrungen gesundheitliche oder sogar lebensbedrohliche Folgen bedeuten würden. Neben abiotischen Faktoren, wie beispielsweise UV-Licht, stellen insbesondere biotische Faktoren ein kritisches Element dar, das die Gesundheit des Menschen stetig beeinflusst. Dabei nehmen vor allem Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Parasiten und Viren eine gewichtige Rolle ein.

Das mikrobielle Ökosystem in und auf dem menschlichen Körper wird auch als das Mikrobiom bezeichnet und setzt sich vornehmlich aus verschiedensten Bakterienspezies zusammen (Barko et al., 2018, Turnbaugh et al., 2007). Viele der zum Mikrobiom zugehörigen Organismen weisen symbiotische Charakteristika auf und werden daher auch Kommensalen (lat. ‚*commensalis*‘, Tischgenosse) genannt. Diese haben meist keine schädliche Auswirkung auf den Organismus, sondern bieten im Gegensatz sogar gesundheitsfördernde Elemente durch ihre diversen Stoffwechselwege und den ständigen Erhaltungskampf gegen Krankheitserreger (Pathogene) (Gill et al., 2006, Kamada et al., 2013, Pflughoeft et al., 2012, Visconti et al., 2019).

Pathogene Mikroorganismen wiederum weisen sich durch ihre parasitären Eigenschaften aus. Viele von ihnen besitzen einen fakultativen oder sogar obligat intrazellulären Lebenszyklus, der oft eine Invasion von Wirtszellen in Pathogen-spezifischem Gewebe voraussetzt (Casadevall, 2008). Innerhalb der Wirtszellen proliferieren Pathogene unter Verbrauch der hier verfügbaren Nährstoffe. Anschließend verlässt die Nachkommenschaft aktiv oder durch den eingeleiteten Zelltod die Wirtszelle, um Zellen im umliegenden Gewebe zu infizieren (Pathogenese). Das dabei entstehende Krankheitsbild kann sich in Abhängigkeit vom Pathogen auf einzelne Organ-/Gewebetypen beschränken oder sich aber auch systemisch entwickeln (Roberts, 1996). Ein unkontrollierter Infektionsverlauf führt häufig zum Tod des gesamten Organismus, wie es u. a. am Beispiel von AIDS-Erkrankten deutlich wird (Armstrong et al., 1985).

Bereits in einzelligen Organismen entwickelten sich daher evolutionär verschiedenste Mechanismen, die zum Schutz vor Infektionen dienen (Mojica et al., 2005, Ofir et al., 2018). In der Vertebraten-Klasse *Mammalia* entwickelte sich ein komplexes System bestehend aus zellintrinsic Mechanismen, einem spezifischen Kommunikationsnetzwerk sowie spezialisierten Zelllinien, das in seiner Gesamtheit auch als das mammalische Immunsystem bezeichnet wird.

1.1 CRISPR/Cas9 – Vom Schutzmechanismus prokaryotischer Zellen zum genetischen Werkzeug

Bakterien bilden zusammen mit den Archaeen die beiden Domänen der Prokaryoten und weisen gemäß der Definition des Lebens u. a. einen eigenen Stoffwechsel und die Fähigkeit zur Replikation auf (Cypionka, 2010, S. 4, Schleifer, 2009). Damit können auch sie z. B. durch Viren infiziert werden. Bakterien-infizierende Viren werden auch Bakteriophagen genannt und können anhand ihrer Wirtsspezifität und Morphologie in entsprechende taxonomische Gruppen unterteilt werden (Haq et al., 2012, Wichels et al., 1998). Sie besitzen keinen eigenen Stoffwechsel, weshalb ihr Lebenszyklus ausnahmslos obligat intrazellulär verläuft. Dabei erfolgt initial die Anbindung von Viruspartikeln an die bakterielle Zellmembran oder Zellwand. Anschließend wird das virale Erbgut via Injektion in das Zytoplasma der Zelle überführt oder per Endozytose durch die Zelle aufgenommen. Nach mehreren Replikationsrunden werden neue Viruspartikel ausgebildet. In einem finalen Schritt wird schließlich zur Verbreitung der Nachkommenschaft die Bakterienmembran oder Bakterienwand degradiert und somit die Zellyse eingeleitet (Kutter et al., 2004).

Um dem Phagen-induzierten Zelltod zu entgehen, entwickelten sich in Prokaryoten evolutionär verschiedene Mechanismen, die eine Infektion durch Phagen verhindern oder aber eine Bekämpfung dieser ermöglichen (Dy et al., 2014). Der mittlerweile bekannteste, bakterielle Schutzmechanismus ist das ‚*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*‘ (CRISPR, dt. ‚Ansammlung regelmäßiger, in Abständen vorkommende, kurze palindromische Wiederholungssequenzen‘) – CRISPR-assoziierte (Cas) System (CRISPR/Cas-System) (Garneau et al., 2010). Die von Mojica et al. (1995) zunächst als *Tandem-Repeats* beschriebenen CRISPR-Sequenzen zeichneten sich durch nicht zusammenhängende Wiederholungssequenzen aus und konnten in einigen Bakterien und Archaeen-Stämmen identifiziert werden (Ishino et al., 1987, Mojica et al., 2000). Zwischen den Wiederholungssequenzen wurden variable DNA-Abschnitte ähnlicher Länge festgestellt, deren Herkunft nicht-bakteriellen Ursprungs zu sein schien. Vertiefende Analysen identifizierten diese Sequenzen als Teile von übertragbaren, genetischen Elementen, wie sie beispielsweise in Bakteriophagen oder konjugativen Plasmiden zu finden waren (Mojica et al., 2005). Aufgrund dieser Erkenntnis kam erstmals die Vermutung auf, dass CRISPR-Sequenzen möglicherweise Teil eines prokaryotischen Abwehrsystems sind.

In unmittelbarer Nähe der Wiederholungssequenzen konnten des Weiteren CRISPR-zusammenhängende Gen-Cluster festgestellt werden, die daher CRISPR-assoziierte (Cas) Gene genannt wurden (Jansen et al., 2002). Diese Gene kodieren die gleichnamigen Cas-Proteine, die in Abhängigkeit ihrer Funktion in zwei Klassen, sechs Typen und mehrere Subtypen unterteilt wurden (Haft et al., 2005). Cas-Proteine der Klasse I benötigen für ihre Funktionsausübung weitere Co-Faktoren und sind ausschließlich in Proteinkomplexen (Effektorkomplexen) aktiv, während diejenigen der Klasse II einzelne Effektorproteine darstellen (Nishimasu et al., 2017). Die unterschiedlichen Subtypen weisen verschiedene funktionelle Domänen auf. Zu diesen gehören Exo- und Endonuklease-Domänen, Helikase-, Polymerase- sowie Ribonukleinsäure (RNA)- und DNA-Bindedomänen (Haft et al., 2005). Die daraus ableitbaren Funktionen der verschiedenen Cas-Proteine sind demnach eine bindungsabhängige Restriktion, als auch Reparatur von Nukleinsäuren. Im biologischen Kontext agieren sie in zwei verschiedenen Stufen der Adaption und der Interferenz (Makarova et al., 2011). Dabei sind sie für die Isolierung von DNA-Fragmenten, z. B. aus dem Phagen-Erbgut, verantwortlich, die anschließend in den CRISPR-Lokus integriert werden (*Protospacer*) sowie im weiteren Verlauf für die Degradation neuinjizierter Nukleinsäuren (Abb. 1 A-C). Eine der am besten untersuchten Endonukleasen ist das Cas9-Protein der Klasse II (Typ II) aus dem grampositiven Bakterium *Streptococcus pyogenes*. Diese Nuklease bindet und schneidet doppelsträngige (ds)DNA-Moleküle (Jinek et al., 2012). Die HNH- und RuvC-ähnlichen Endonukleasedomänen des Cas9-Proteins induzieren hierbei im Zusammenspiel den Doppelstrangbruch in der Ziel-DNA. Dabei spaltet die HNH-Domäne den durch die guideRNA (s. u.) komplementär gebundenen und die RuvC-Domäne den nicht-komplementär gebundenen DNA-Strang. Eine Restriktion findet hierbei meist zwischen den Positionen -3 und -4 eines sogenannten *Protospacer* angrenzenden Motivs (engl. *protospacer adjacent motif*, PAM) statt (s. u.) (Jiang et al., 2016). Auf Grund ihrer Fähigkeit DNA-Doppelstrangbrüche induzieren zu können, werden Typ II Cas-Proteine mittlerweile als vielseitiges, molekulares Werkzeug in der Genomeditierung verwendet (Mali et al., 2013).

Entscheidend für die Detektion fremden Erbguts durch das CRISPR/Cas-System als auch für die Generierung neuer *Protospacer* ist das Cas-spezifische PAM-Motiv (Deveau et al., 2008, Horvath et al., 2008). Dieses Motiv bestimmt in hohem Maße die Nuklease-Aktivität der Cas-Proteine, sodass fremde DNA- bzw. RNA-Moleküle ausschließlich in unmittelbarer Nähe dieses Motivs restringiert werden können (Anders et al., 2014). Für die verschiedenen Cas-Systeme konnten einige unterschiedliche Motive identifiziert werden (Fischer et al., 2012,

Einleitung

Mojica et al., 2009). Im Falle der Cas9-Nuklease ist die Aktivität abhängig von einem charakteristischen 5'-NGG-3' Motiv (Anders et al., 2014). Für die Adaption neuer *Protospacer* sind neben dem PAM-Motiv des Weiteren auch die Expression der konservierten Gene *Cas1*, *Cas2* und teils auch *Cas3* essenziell, sowie eine *Leader*-Sequenz, die zwischen den Cas-Genen und den CRISPR-Sequenzen lokalisiert ist. Die Cas-Proteine 1 – 3 sind für die Prozessierung der *Protospacer* verantwortlich, während die *Leader*-Sequenz eine polarisierte Integration dieser kontrolliert (Abb. 1A).

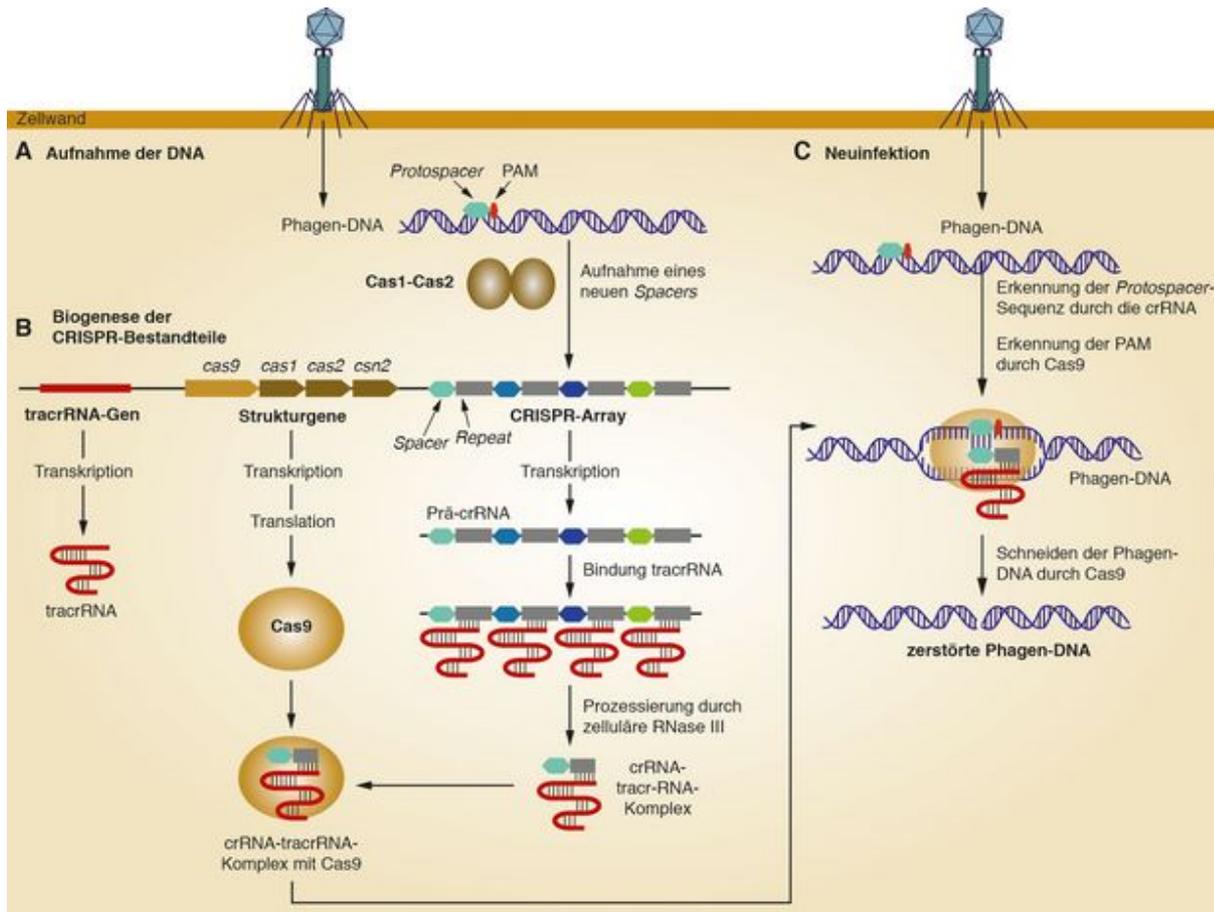


Abb. 1 Struktur und Mechanismen des CRISPR/Cas9 Systems.

(A) Aufnahme eines neuen *Spacers* aus der injizierten Phagen-DNA u. a. mittels des Cas1-Cas2 Komplexes. (B) Genetische Struktur/Anordnung des CRISPR/Cas-Lokus. Die drei genomischen Regionen tracrRNA-Gen, Cas-Lokus und CRISPR-Array liegen dicht nebeneinander. Der neue *Spacer* wird zunächst in das CRISPR-Array/zwischen die Wiederholungssequenzen integriert. Die Expression der verschiedenen Komponenten führt zur Ausbildung eines Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexes bestehend aus crRNA (*Spacer* und *Repeat*), tracrRNA und der Cas9-Nuklease. (C) Der RNP-Komplex detektiert neuinjizierte Phagen-DNA mittels komplementärer Bindung des *Protospacers* und restringiert diese durch die Nukleaseaktivität des Cas9-Proteins. Nach Zündorf und Dingermann (2018).

Die Re-Infektion durch einen Bakteriophagen leitet schließlich den eigentlichen CRISPR/Cas-Schutzmechanismus ein (Abb. 1C). Das Phagenerbgut wird dabei durch einen Ribonukleoprotein-Komplex detektiert, der sich aus einem Cas-Protein(-Komplex) und einer

guideRNA (gRNA) zusammensetzt. Die gRNA wird zum einen aus der CRISPR-RNA (crRNA), bestehend aus *Protospacer* und der CRISPR-Wiederholungssequenz, gebildet (Abb. 1B). Eine 20 Basenpaar (Bp)-lange Sequenz des *Protospacers* dient an dieser Stelle gemeinsam mit dem PAM-Motiv als Erkennungssequenz. Dabei bindet sie im Falle von dsDNA durch die Initiierung eines R-Loops komplementär an die Zielsequenz (Brouns et al., 2008, Jiang et al., 2016). Des Weiteren setzt sich die gRNA in einigen Cas-Systemen aus einer transaktivierenden crRNA (tracrRNA) zusammen (Abb. 1B). Diese ist in einem separaten Gen kodiert und bindet über eine 24 Nukleotid-lange Sequenz an die Wiederholungssequenz der crRNA (Deltcheva et al., 2011). Ihre Sekundärstruktur ermöglicht eine Interaktion mit den entsprechenden Cas-Proteinen und beeinflusst nachweislich deren Konformation und Kinetik (Lim et al., 2016). Sie ist also verantwortlich für die Cas-Aktivität und damit u. a. relevant für die Cas-abhängige Reifung der crRNA, als auch für die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (Deltcheva et al., 2011).

Auf Grund seiner Anpassungsfähigkeit zu neuen Zielsequenzen wird das CRISPR-Cas System daher auch als das adaptive Immunsystem der Prokaryoten beschrieben (Mojica et al., 2009).

Mittels synthetisch hergestellter gRNAs kann das System an spezifische Loci angepasst werden, um Genomeditorierungen oder Expressionsregulierungen in mammalischen Zellen durchzuführen (Jinek et al., 2012, Mali et al., 2013). Dazu werden eine Zielsequenz-spezifische crRNA und die tracrRNA fusioniert (gRNA) und für die Ausbildung des Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexes mit der Cas-Nuklease eingesetzt (Abb. 2A) (Doudna et al., 2014). Insbesondere das CRISPR/Cas9-System wird heutzutage dazu verwendet, Doppelstrangbrüche in den verschiedensten Zelllinien und Organismen zu induzieren (Sander et al., 2014). Obwohl die Cas9-vermittelte Restriktion durch *Protospacer*-Sequenz und PAM-Motiv kontrolliert wird, konnten relativ häufig mutierte Nicht-Zielsequenzen (engl. ‚*off-target*‘) in Genom-weiten *Screenings* beobachtet werden (Zhang et al., 2015). Studien zu Folge werden in Abhängigkeit von Anzahl und Position mitunter Basen-Fehlpaarungen zwischen gRNA und Zielsequenz vom CRISPR/Cas-System akzeptiert (Hsu et al., 2013). Des Weiteren scheint der RNP-Komplex nicht ausschließlich durch das 5'-NGG-3' Motiv aktiviert zu werden, auch wenn die Aktivität der Nuklease im Falle von anderen Motiv-Sequenzen deutlich geringer ist (Kleinstiver et al., 2015).

Zur Vermeidung von *off-target* Effekten müssen daher zunächst geeignete gRNAs identifiziert werden. Stetig optimierte Software-Algorithmen sollen durch Sequenzabgleiche

Einleitung

mit dem Genom dabei helfen diese vorherzusagen und parallel dazu die Ziel-Sequenz (*on-target*)-Effizienz zu bestimmen (Cui et al., 2018). Die *on-target* Effizienz hängt dabei ebenfalls von verschiedenen Faktoren ab. So spielen sterische Elemente wie die Chromatinstruktur, Nukleosomen-Bindestellen und die gRNA-Struktur selbst eine entscheidende Rolle (Hinz et al., 2015, Uusi-Makela et al., 2018, Xu et al., 2017, Xu et al., 2017).

Die CRISPR/Cas9-induzierte Genomeditierung wird häufig auf zweierlei Arten durchgeführt. Der initiale Schritt ist in beiden Fällen die Induktion eines Lokus-spezifischen Doppelstrangbruchs durch die Cas9-Nuklease. Anschließend erfolgt in Abhängigkeit des Verfahrens eine gerichtete oder eine ungerichtete Mutagenese (Abb. 2B) (Sander et al., 2014). Die gerichtete Mutagenese wird durch die Hinzugabe einer einzel- (engl. *„single-stranded“*, ss) oder doppelsträngigen Oligodesoxynukleotid-Vorlage (ODN) induziert (Ran et al., 2013). Dabei wird die ODN-Sequenz mittels des Homologie-gerichteten Reparaturmechanismus (engl. *„homology-directed repair“*, HDR) via homologer Rekombination in das Genom integriert (Liang et al., 1998). Das ODN muss dafür zwei flankierende Sequenzen mit einer Länge von mind. 40 Basen beinhalten, die homolog zu Bereichen in 5'- und 3'-Orientierung des Cas9-induzierten Doppelstrangbruchs sind (Ran et al., 2013). Zwischen den flankierenden Sequenzen können beliebige Sequenzen oder Sequenz-Modifikationen eingebaut und darüber in das Genom integriert werden. Dies können beispielsweise ganze Resistenz- und Reporter-gen-Kassetten oder aber auch mutierte Gen-Abschnitte sein. Häufig werden dabei Gen-Abschnitte mit einzelnen editierten oder deletierten (engl. *„insert-deletion“*, Indel) Basen ausgetauscht. Die Integration der mutierten Gen-Abschnitte führt zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens, die wiederum eine veränderte AS-Sequenz des Proteins zur Folge hat. Dadurch entstehen in den meisten Fällen frühe, terminierende Codons (engl. *„premature termination codon“*, PTC). PTCs induzieren einerseits den verfrühten Abbruch der Translation (Nagy et al., 1998). Andererseits werden PTC-enthaltende mRNAs durch verschiedene Faktoren wie dem Exon-Verbindungs-Komplex detektiert und durch den Nonsense-vermittelten Abbau (engl. *„Nonsense-mediated decay“*)-Mechanismus degradiert (Chang et al., 2007, Le Hir et al., 2001). Das Resultat ist entweder ein nicht-funktionelles Protein oder ein vollständiger Verlust des Proteins.

Im Gegensatz dazu wird die ungerichtete Mutagenese durch den ‚Nicht-homologen Enden-Verknüpfungsmechanismus‘ (engl. *„nonhomologous end-joining“*, NHEJ) vermittelt. Diese Form der DNA-Reparatur ligiert die beiden Enden des Doppelstrangbruchs ohne Vorlage wie

beispielsweise einem ODN (Ran et al., 2013). Daher werden relativ häufig Indel-Mutationen bei der Reparatur in das Genom eingefügt. Anders als über die homologe Rekombination geschieht diese Form der Mutation jedoch zufällig und kann daher in den Locus-spezifischen Allelen diploider Zellen unterschiedlich oder aber nur heterozygot ausgeprägt sein (Miyaoaka et al., 2016).

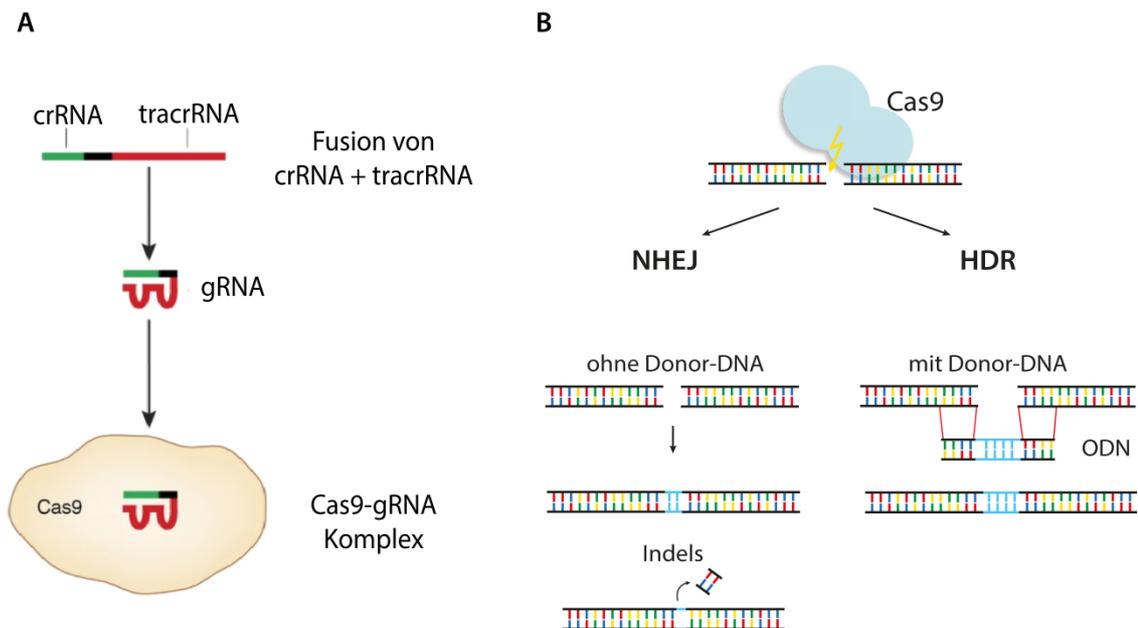


Abb. 2 Anwendung des CRISPR/Cas9 Systems in der Gentechnik.

(A) Das synthetisch hergestellte Fusions-Konstrukt aus crRNA und tracrRNA wird ebenfalls gRNA genannt und rekrutiert die Cas9-Nuklease durch Locus-spezifisch crRNA-Sequenzen (grün) an beliebige Genomsequenzen. Modifiziert nach Sander et al. (2014) (B) Genetische Modifikationen können über zwei Arten induziert werden. NHEJ-Mechanismus: repariert den Cas9-induzierten Doppelstrangbruch ohne Sequenz-Vorlage (Donor) wodurch unspezifische *Indel* (Insertion-Deletion)-Mutationen entstehen können. HDR-Mechanismus: repariert den Cas9-induzierten Doppelstrangbruch mit Hilfe einer Donor-DNA (ODN), die über homologe Sequenzabschnitte zur genomischen DNA mittels homologer Rekombination (rote Linien) integriert wird. Dabei können beliebige Sequenzen (hellblau) in das Genom eingefügt werden.

1.2 Das Immunsystem der Säugetiere

Das Immunsystem dient neben dem Schutz vor Pathogenen auch der Erkennung von körperfremden Substanzen (extrinsische Faktoren) oder krankhaften, körpereigenen Zellen (intrinsische Faktoren). Für extrinsische Faktoren stellen die anatomischen und chemischen Barrieren des Organismus die erste Hürde dar (Schütt et al., 2011, S. 12-13). Zu den anatomischen Barrieren zählen beispielsweise die Haut oder die verschiedenen Schleimhäute des Gastrointestinaltrakts, deren enge Zelladhäsion u. a. ein Eindringen von Mikroorganismen bereits verhindert. Chemische Barrieren wiederum sind vor allem Sekrete verschiedener Gewebe, die eine Adhäsion der Pathogene an Wirtszellen erschweren oder auch direkten Einfluss auf das Überleben der Pathogene selbst haben. Eine Überwindung dieser Barrieren

Einleitung

führt in den häufigsten Fällen schließlich zu einer Immunreaktion (Murphy et al., 2018, S. 8). Eine erste Immunantwort wird dabei zunächst durch das angeborene Immunsystem ausgelöst. Je nach Schweregrad der Infektion werden zusätzlich auch Komponenten des adaptiven Immunsystems aktiviert. Bei angeborener und adaptiver Immunität handelt es sich um zwei verschiedene Zweigsysteme, deren zelluläre Komponenten durch Signalmoleküle sowie durch direkten Zellkontakt stark miteinander interagieren können (Delves et al., 2000).

1.2.1 Angeborenes Immunsystem

Die Komponenten des angeborenen Immunsystems sind namensgebend im Erbgut verankert und für die Detektion allgemeiner Erkennungsmuster verantwortlich (Iriti et al., 2007). Sie induzieren die frühen Immunantworten, sind allerdings in ihrer Anpassungsfähigkeit in Bezug auf neuartige Pathogene und veränderte Erkennungsmuster (Antigendrift) stark eingeschränkt. Die meisten zellulären Komponenten der angeborenen Immunität gehen aus der gemeinsamen myeloiden Vorläufer-Zelle hervor. Zu diesen gehören Makrophagen (Fresszellen), Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile, Basophile) und dendritische Zellen, die zusammen die drei Phagozyten-Arten darstellen, sowie Mastzellen. Makrophagen „fressen“ (phagozytieren) und töten Pathogene durch eine erhöhte Aktivität intrazellulärer, degradativer Prozesse. Des Weiteren können sie auch Entzündungsreaktionen in infizierten Geweben auslösen, um weitere immunologische Prozesse zu initiieren (Murphy et al., 2018, S. 9-12). Eine ähnliche Funktion weisen auch Neutrophile auf. Nach der Internalisierung der Mikroben werden abbauende Enzyme und antimikrobielle Moleküle aus speziellen, intrazellulären Vesikeln freigelassen, die ebenfalls eine Degradation initiieren (Segal, 2005). Eosinophile, Basophile und Mastzellen sind hingegen sezernierende Zelllinien, deren Sekrete eine degradierende Wirkung auf extrazelluläre Pathogene besitzen. Weitere Zelllinien des angeborenen Immunsystems, die jedoch der gemeinsamen lymphoiden Vorgänger-Zelle entspringen, sind die jüngst entdeckten, angeborenen lymphoiden Zellen (engl. *„innate lymphoid cells“*, ILCs) (Colonna, 2018). Anhand der Entwicklung, des Phänotyps und der Produktion spezifischer Signalmoleküle werden ILCs in drei Gruppen unterteilt (Gruppe 1-3 ILC). Im Generellen sind sie an der Regulierung von angeborenen und adaptiven Immunantworten durch die Sekretion von Signalmolekülen verantwortlich. Die Gruppe 1 ILCs beinhaltet neben den ILC1s zudem auch NK Zellen. Diese erkennen infizierte, körpereigene Zellen aufgrund eines „fehlenden Selbst“-Signals (engl. *„missing self“*). Eine Aktivierung der Gruppe 1 ILCs führt zur Freisetzung von IFN γ und TNF α sowie von Perforin- und Granzym-enthaltenden Granula (Zeng et al., 2019). Die beiden zuletzt

genannten Moleküle führen dazu, dass umliegende Zellen lysiert werden oder den programmierten Zelltod einleiten, wodurch eine Replikation des Pathogens inhibiert wird (Murphy et al., 2018, S. 500). Zellen des Typs ILC2 hingegen sind für die Produktion und Ausschüttung von Zytokinen verantwortlich, die vor Parasiten-Infektionen schützen und zudem eine eosinophile Inflammation auslösen (Kabata et al., 2018). Zusätzlich fördern die ILC2-spezifischen Zytokine die Gewebereparatur von beschädigtem Epithelgewebe und regulieren die metabolische Homöostase (Brestoff et al., 2015, Monticelli et al., 2015). Neben diesen sind auch die ILC3 Zellen durch Sekretion von spezifischen Zytokinen an der Homöostase des intestinalen Epithelgewebes beteiligt. Diese regulieren außerdem die Entwicklung von lymphoidem Gewebe und schützen vor intestinalen Bakterien und Pilzen (Murphy et al., 2018, S. 9ff, Zeng et al., 2019).

Im Falle der angeborenen Immunantwort wird auch von einer Antigen-unspezifischen Reaktion auf invadierende Pathogene gesprochen. Eine Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Zellen geschieht dabei über Mustererkennungs-Rezeptoren (engl. ‚*Pattern Recognition Receptor*‘, PRR). Diese können allgemeine, meist Arten-übergreifende Pathogen-assoziierte Erkennungsmuster (engl. ‚*Pathogen-associated molecular pattern*‘, PAMP) detektieren. Die Rezeptoren liegen verteilt auf der Zelloberfläche, in endo-lysosomalen Vesikeln oder als zytosolische Sensoren in der Zelle vor (Murphy et al., 2018, S. 12f).

Eine der am besten untersuchten Rezeptor-Familien sind die Toll-ähnlichen Rezeptoren (engl. ‚*Toll-like receptor*‘, TLR). Diese sind in den Säugetieren vor allem für die Detektion von PAMPs im extrazellulären Raum sowie im Lumen der endozytotischen Vesikel verantwortlich. Sie erkennen beispielsweise allgemeine Oberflächenstrukturen wie die Lipoteichonsäuren der gram-positiven Bakterien (TLR1, 2, 4, 6), dem Lipopolysaccharid (LPS) der gram-negativen Bakterien (TLR4) oder dem Profilin auf der Membran des Parasiten *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) (TLR11, 12; nicht im Menschen vorhanden). Zudem erkennen TLRs auch virale oder bakterielle RNA und DNA (TLR7, 8, 9), die bei einer Degradation der Mikroorganismen und Viren in den endo-lysosomalen Vesikeln freigesetzt werden (Beutler, 2009).

Zu den bekanntesten zytoplasmatischen Rezeptoren zählen beispielsweise NOD- oder RIG-I-ähnliche Rezeptoren. Diese detektieren zum einen Pathogene direkt anhand spezifischer Strukturen oder aber indirekt durch Schäden an körpereigenen Zellen, die durch das Pathogen verursacht wurden (Wu et al., 2014). Die Bindung eines PAMPs an seinen entsprechenden PRR löst ein Signal aus, das in Abhängigkeit der Rezeptor-Art unterschiedliche

Einleitung

Auswirkungen hat. Häufig werden hierbei Signalkaskaden ausgelöst, die wiederum zu einem spezifischen Gen-Expressionsmuster führen (Cao, 2016). Eine Expression und Ausschüttung von Signalmolekülen führt daraufhin zu Entzündungsreaktionen oder zur Expression weiterer intrazellulärer Faktoren, die wiederum am Aufbau einer Zell-autonomen Immunantwort beteiligt sind. Des Weiteren gibt es Rezeptor-spezifische Signalwege, die unterschiedliche Arten des Zelltods (Apoptose, Pyroptose) induzieren können. Dadurch kann eine intrazelluläre Replikation und somit eine Infektionsausbreitung stark eingeschränkt werden (Sellge et al., 2015).

Zu den humoralen Bestandteilen der angeborenen Immunität zählen das Komplementsystem, das Kontaktsystem, Pentraxin-Markermoleküle, als auch natürlich vorkommende Antikörper (Shishido et al., 2012). Das Komplementsystem besteht aus über 30 verschiedenen Proteinen, die größtenteils in der Leber produziert werden. Die Funktion dieser immunologischen Bestandteile liegt in der Opsonierung bzw. Markierung von Pathogenen, in dem sie an spezifische PAMPs binden, wodurch im weiteren Verlauf eine Internalisierung durch phagozytierende Zellen beeinflusst wird (Shishido et al., 2012). Ein weiterer wichtiger, humoraler Faktor sind die immunologischen Signalmoleküle (Zytokine), die für die Rekrutierung und Aktivierung verschiedenster Zelllinien verantwortlich sind. Sie kontrollieren je nach Typ Entzündungsreaktionen, als auch die Wiederherstellung der Homöostase, aktivieren angeborene sowie adaptive Immunantworten und beeinflussen zudem Zell-autonome Abwehr-Prozesse (Murphy et al., 2018, S. 14f).

Die Verknüpfung von angeborenem und adaptivem Immunsystem wird vornehmlich durch eine weitere Zelllinie myeloiden Ursprungs gegeben, den so genannten dendritischen Zellen (DCs). Diese Makropinozytose-betreibende Zelllinie ist ebenfalls dazu in der Lage Mikroben aufzunehmen und zu töten. Ihre Hauptaufgabe besteht dabei in der Prozessierung und Präsentation von Antigenen. Antigene sind Pathogen-assoziierte Strukturen, die nicht durch PRRs detektiert werden, sondern durch spezifische Rezeptoren der Zellen des adaptiven Immunsystems (Lymphozyten). Bei der Antigen-Präsentation werden kurze Moleküle des Pathogens, die beim intrazellulären Degradationsprozess entstehen, auf den Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) geladen. Dieser MHC-Komplex wird an die Oberfläche der DCs transportiert. Dort angelangt kann das Antigen durch Lymphozyten-Rezeptoren detektiert und eine adaptive Immunantwort initiiert werden (Banchereau et al., 1998).

1.2.2 Adaptives Immunsystem

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem weist das adaptive Immunsystem bei Erstkontakt mit einem Pathogen eine verzögerte Reaktionskinetik auf (Schütt et al., 2011, S. 64ff). Der Vorteil dieses Zweigsystems ist jedoch seine Anpassungsfähigkeit und die Spezifität zu neuen Antigenen, als auch sein Vermögen ein sogenanntes immunologisches Gedächtnis ausbilden zu können (Murphy et al., 2018, S. 614ff). Zweit- oder sich mehrfach wiederholende Infektionen durch den gleichen Erreger können daher schneller identifiziert und beseitigt werden. Diese Eigenschaften des adaptiven Immunsystems werden sich beispielsweise bei Vakzinierungen zu Nutze gemacht, um einen präventiven Schutz gegen bestimmte Krankheitserreger aufzubauen (Murphy et al., 2018, S. 16f).

Die zellulären Komponenten des adaptiven Immunsystems gehen aus der gemeinsamen lymphoiden Vorgänger-Zelle hervor und werden in B- und T-Zellen unterteilt (Murphy et al., 2018, S. 15). Beide Zelllinien exprimieren den Lymphozyten-Rezeptor, der in Abhängigkeit der Zelllinie auch B-Zell oder T-Zell Rezeptor genannt wird. Die Besonderheit des Lymphozyten-Rezeptors liegt in seiner Antigen-Bindestelle (Paratop), die sich strukturell zwischen allen Klonen unterscheidet (Schütt et al., 2011, S. 28). Die generelle Struktur des Rezeptors besteht aus zwei schweren und zwei leichten Peptid-Ketten, die jeweils konstante sowie variable Regionen aufweisen (Schütt et al., 2011, S. 7f). Die Rezeptor-Diversität zwischen den verschiedenen Klonen wird durch eine zufällige Umlagerung verschiedener Gensegmente in den Gensequenzen der variablen Regionen erzeugt. Dieser Prozess wird auch V(D)J-Rekombination genannt (Dudley et al., 2005, Murphy et al., 2018, S. 17 ff). Durch die zufällige Rekombination können autoreaktive Lymphozyten entstehen, die durch eine negative Selektion wieder entfernt werden (Nossal, 1994).

Bindet eine naive T-Zelle mit ihrem T-Zell Rezeptor an ein passendes Antigen, werden verschiedene Proliferations- und Differenzierungsprozesse eingeleitet (Starr et al., 2003). Aus der naiven Zelle können im weitesten Sinne drei verschiedene Effektor-T-Zelltypen differenzieren. Die zytotoxischen T-Zellen exprimieren den spezifischen Oberflächenmarker (engl. *cluster of differentiation*, CD (Schütt et al., 2011, S. 4)) CD8 und leiten den programmierten Zelltod infizierter und maligner Zellen ein (Murphy et al., 2018, S. 33). Die beiden anderen Zelltypen sind CD4-exprimierende Zelllinien, welche sich hauptsächlich in der Expression von Signalmolekülen unterscheiden (Murphy et al., 2018, S. 444ff). T-Helferzellen sekretieren vornehmlich Signalmoleküle, um weitere Zellen zu aktivieren oder aber zu inhibieren (Zhu et al., 2010). Regulatorische T-Zellen kontrollieren die Immunantwort

Einleitung

streng um Autoimmunreaktionen zu verhindern und sind außerdem an der Generierung und Reifung neuer Immunzellen beteiligt (Dasgupta et al., 2012).

Binden naive B-Zellen mit ihrem Membran-ständigen Rezeptor an ein passendes Antigen, können diese zu kurzlebigen Plasma- oder langlebigen Gedächtnis B-Zellen ausdifferenzieren (Kurosaki et al., 2015). Diese Zelltypen sezernieren den B-Zell Rezeptor als lösliches Immunglobulin (Ig, Antikörper), welches durch den Blutkreislauf und andere Körperflüssigkeiten zirkuliert und dort an passende Antigene bindet. Die Bindung der Antikörper verhindert die Bindung von Pathogenen an zelluläre Rezeptoren (Opsonierung) und verhilft ähnlich wie bei den Komponenten des Komplementsystems zum Abbau der Pathogene durch eine Aktivierung von Immunzellen (Murphy et al., 2018, S.518ff).

Einige aktivierte T- und B-Zellen differenzieren zu Gedächtniszellen, die teils ein Leben lang im Organismus erhalten bleiben. Durch Kontakt zum passenden Antigen können diese Zellen wieder rasch zu Effektorzellen differenzieren und somit eine schnellere und hoch-spezifische Immunreaktion auslösen. Diese Zellformen machen das immunologische Gedächtnis aus (Gray, 2002).

1.3 Immunologische Signalmoleküle und Interferon-Signalwege

Die Zellen des Immunsystems kommunizieren über einen direkten Zell-Zell-Kontakt als auch über verschiedene Signalmoleküle. Die Signalmoleküle werden im immunologischen Kontext auch Zytokine genannt (Murphy et al., 2018, S. 14). Sie stellen Proteine mit niedriger molekularer Masse dar und nehmen je nach Zytokinart verschiedene immunmodulierende Funktionen ein. Einerseits regulieren sie mitunter die Zellproliferation und -differenzierung von Immunzellen. Andererseits bewirken sie aber auch die Entwicklung von Entzündungen sowie eine Induktion von Zell-autonomen Abwehrmechanismen (Schütt et al., 2011, S. 71ff). Zytokine ermöglichen eine autokrine (selbstaktivierend), eine parakrine (Aktivierung direkter Nachbarzellen) oder eine endokrine Signalgebung (Aktivierung von Zellen z. B. in anderen Geweben) (Zhang et al., 2007). Die Überlebensdauer im extrazellulären Raum hängt dabei stark von der Zytokinart ab (Murphy et al., 2018, S. 132).

Zytokine können strukturell in fünf Familien eingeteilt werden, die IL-1 Familie, die Tumornekrosefaktor- (TNF) und die Hämatopoetinsuperfamilie, die Chemokine und die Interferone (IFN). Die IL-1 Familie umfasst 11 Mitglieder zu denen u. a. auch IL-1 α und IL-1 β gezählt werden. Ihre Funktion besteht darin, im weiteren Verlauf einer Immunreaktion die

Expression von proinflammatorischen und immunmodulatorischen Zytokinen zu induzieren (Fields et al., 2019). Mitglieder der TNF-Familie sind insbesondere an der Eindämmung von lokalen Infektionen beteiligt. Sie stimulieren Zellen zur Expression von Adhäsionsmolekülen und fördern die Extravasation von Immunzellen in infiziertes Gewebe. Außerdem aktivieren sie Endothelzellen zur Expression von Blutgerinnungsfaktoren, um beispielsweise ein Eindringen von Pathogenen in den Blutkreislauf zu verhindern (Aggarwal, 2003). Die Hämatopoetinsuperfamilie beinhaltet Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, die teilweise, aber nicht ausschließlich, Proliferations- und Differenzierungsprozesse von Immunzellen kontrollieren. Bekannte Vertreter sind beispielsweise IL-6 und der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor (Ihle, 1996). Chemokine wiederum sind Faktoren, die durch ihr chemotaktisches Potential die Migration von Immunzellen beeinflussen (Luster, 1998). Außerdem haben sie einen proinflammatorischen Effekt auf Leukozyten (Le et al., 2004).

In Bezug auf diese Arbeit sind vor allem die IFN von besonderem Interesse. Namensgebend sind die „interferierenden“ Eigenschaften dieser Moleküle auf die Replikation von Viren, die in den ersten funktionellen Experimenten festgestellt wurden (Isaacs et al., 1957). Später konnten verschiedene IFN-Gruppen aufgrund struktureller Charakteristika sowie spezifischer Bindungseigenschaften zu unterschiedlichen Rezeptoren klassifiziert werden (Typ I - Typ III IFN) (Bach et al., 1997, Ivashkiv et al., 2014, Kotenko et al., 2003). Typ I und Typ III IFN werden der ersten Verteidigungslinie des Immunsystems zugeordnet, da ihre Expression durch die Aktivierung von PRRs induziert wird. Sie werden dabei in weitere Subtypen unterschieden (Typ I: IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN κ , IFN ω und IFN τ ; Typ III: IFN λ 1, IFN λ 2 und IFN λ 3) und sind maßgeblich für die Induktion antiviraler Prozesse verantwortlich (Ank et al., 2006, Ivashkiv et al., 2014). Typ I und Typ III IFN werden im Menschen durch verschiedenste Zelltypen exprimiert, mitunter auch durch einige Lymphozyten, Makrophagen und Fibroblasten, aber vor allem durch plasmazytoide DCs (Coccia et al., 2004). Die Typ I IFN Subtypen, wie z. B. IFN α und IFN β , binden alle an den gleichen Rezeptor, der sich aus den beiden Untereinheiten IFN α -Rezeptor (IFNAR)1 und IFNAR2 zusammensetzt (Abb. 3). Die jeweiligen Subtypen weisen teils unterschiedliche Bindungsaffinitäten auf, welche maßgeblich die Signal-Aktivierung und damit auch die Stärke antiviraler bzw. antiproliferativer Auswirkungen bestimmen (Lavoie et al., 2011)

Die Typ II IFN Klasse hingegen wird allein durch IFN γ repräsentiert, das einen wichtigen Faktor vor allem gegen intrazelluläre Infektionen darstellt (Murphy et al., 2018, S. 33). Neben der Induktion von antimikrobiellen Abwehrmechanismen besitzt IFN γ auch weitere

Einleitung

immunstimulatorische Eigenschaften. So bewirkt es neben der Rekrutierung von Leukozyten auch Wachstums-, Reifungs- und Differenzierungseffekte auf verschiedenste Immunzelltypen (Young et al., 1995). $\text{IFN}\gamma$ wird hauptsächlich durch Zellen lymphatischen Ursprungs wie NK Zellen und einigen CD4^+ und CD8^+ Effektor T Zellen exprimiert. Eine Expression wird dabei hauptsächlich durch die Zytokine IL-12 und IL-18 induziert, die vornehmlich durch Antigen-präsentierende Zellen sekretiert werden (Akira, 2000). Zudem scheinen Typ I IFN ebenfalls eine $\text{IFN}\gamma$ -Produktion in NK Zellen induzieren zu können, was auf einen gewissen Einfluss von $\text{IFN}\gamma$ in Bezug auf Virusinfektionen hindeutet (Gill et al., 2011, Pegram et al., 2011).

Die immunmodulatorische Bedeutung der IFN konnte durch verschiedene Rezeptor Knockout-Modelle verdeutlicht werden (Arimori et al., 2013, Dalton et al., 1993, Picaud et al., 2002). Wie in Abb. 3 dargestellt binden alle Subtypen der Typ I und Typ III IFN an ihren jeweiligen gleichen Rezeptor und bewirken eine Aktivierung des Janus Kinase (JAK)1/Tyrosin Kinase 2 (TYK2) Signalwegs. Der kanonische Signalweg führt zu einer Phosphorylierung von Signaltransduzierer und Aktivator der Transkription (STAT)1 und STAT2. Zusammen mit dem ‚Interferon-regulierten Faktor‘ (IRF)-Genprodukt 9 bilden diese daraufhin den Interferon-stimulierten Gen Faktor (ISGF)3, der die Expression von mehreren hundert Interferon-stimulierten Reaktions-Elementen (ISRE) auslöst und somit ein antivirales Milieu erzeugt (Schoggins et al., 2011).

$\text{IFN}\gamma$ hingegen signalisiert durch die Bindung an seinen kognaten Rezeptor, den sogenannten $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptor ($\text{IFN}\gamma\text{R}$) (Pestka, 1994). Dieser setzt sich aus zwei Liganden-bindenden Untereinheiten $\text{IFN}\gamma\text{R1}$ und zwei Signal-transduzierenden Untereinheiten $\text{IFN}\gamma\text{R2}$ zusammen (Abb. 3) (Schroder et al., 2004). Eine Bindung löst die zytoplasmatische Phosphorylierung von JAK1 und JAK2 aus. Dadurch kommt es zur Aktivierung, Homo-Dimerisierung und Translokation von STAT1 in den Nukleus. Aktiviertes STAT1 bindet dort an sogenannte GAS (‚*gamma activated sites*‘) Elemente, die in Promotor-Regionen von $\text{IFN}\gamma$ -responsiven Genen liegen, und induziert deren Transkription (Shuai et al., 1992).

Typ I und Typ II IFN-induzierte Signalwege führen teils zur Aktivierung gleicher Signaltransduzierer und daher zur Expression gleicher Zielgene. So kann $\text{IFN}\gamma$ beispielsweise den ISGF3-Komplex aktivieren, während $\text{IFN}\alpha/\beta$ die Homodimerisierung von aktiviertem STAT1 erhöht. Zusammen begünstigen sie somit die Expression von über 2000 Interferon-stimulierten Genen und fördern dadurch die Pathogen-Detektion, die angeborene Immunsignalisierung sowie die Einschränkung der intrazellulären Replikation von Viren, Bakterien und Parasiten (Schneider et al., 2014).

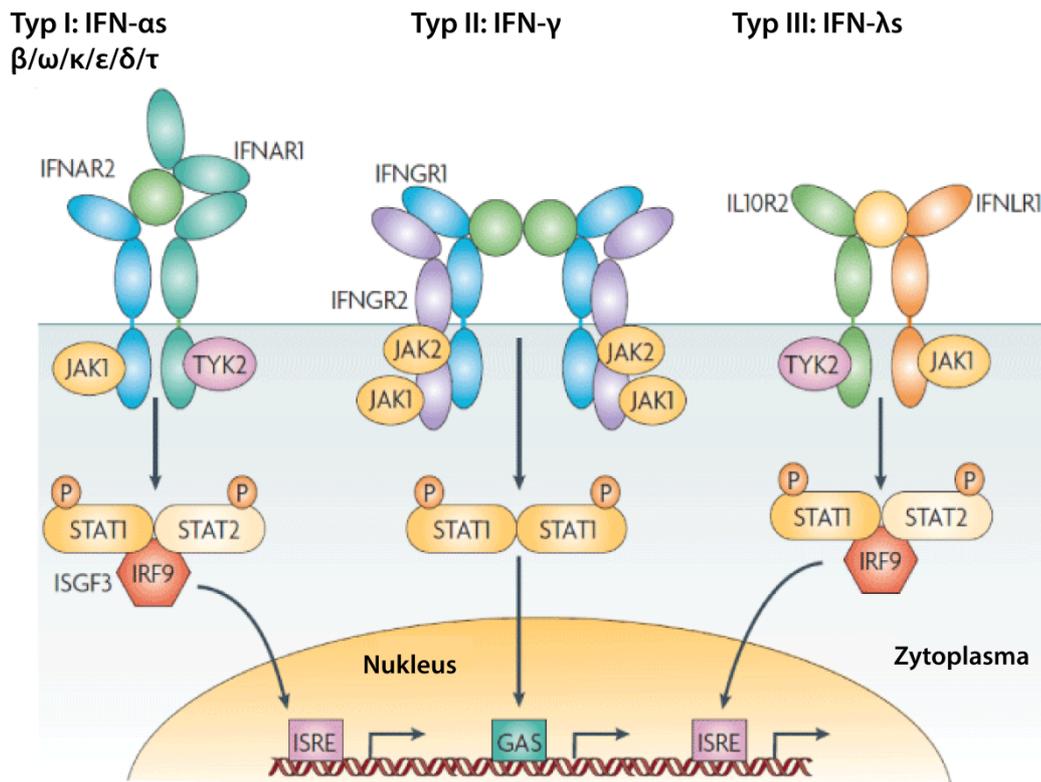


Abb. 3 Schematische Darstellung der IFN-Signalwege.

Typ I und Typ III IFN binden an ihre spezifischen Rezeptoren, die sich aus den Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 bzw. IFNLR1 und IL10R2 zusammensetzen. Rezeptorgebunden signalisieren sie jeweils über den JAK1/TYK2 Signalweg, der zur Aktivierung und Heterodimerisierung von STAT1/STAT2 führt. Zusammen mit IRF9 bildet das Heterodimer den ISGF3 Komplex, der an ISREs bindet und darüber die Gen-Expression induziert. IFN γ löst den JAK1/JAK2 Signalweg aus. Hierbei wird STAT1 aktiviert, sodass dieses homodimerisiert und in den Nucleus relokalisiert. Dort bindet es an GAS Stellen und löst darüber eine IFN γ -spezifische Gen-Expression aus. Modifiziert nach Wang und Zhang (2017).

1.3.1 IFN γ -stimulierte Prozesse und Effektoren

Ein Gen-Verlust von IFN γ , seinem Rezeptor oder verschiedenen IFN γ -aktivierten Genen hat in Mausexperimenten gezeigt, dass die betroffenen Tiere hochsuszeptibel gegenüber Pathogenen, wie Viren, Bakterien oder Protozoen sind (Biron et al., 1995). Die Bedeutung eines funktionellen Signalwegs wird zusätzlich durch die hohe Anzahl der Interferon-stimulierten Gene (ISGs) gezeigt. Nachfolgend werden einige IFN γ -induzierte Prozesse und Effektoren erläutert.

Ein bedeutender Schritt, um einen spezifischen wie auch einen Langzeitschutz gegen Pathogene zu etablieren, ist die Aktivierung von naiven T-Zellen mittels Antigenpräsentation. Wie bereits erwähnt werden Antigene in spezifischen Zelllinien prozessiert und mittels des MHC-Komplexes auf der Oberfläche dieser Zellen präsentiert. Ein IFN γ -Stimulus induziert die Expression von katalytischen Proteasom β -Untereinheiten in Antigen-präsentierenden

Einleitung

Zellen, die die Untereinheiten des klassischen 20S Proteasom-Komplexes ersetzen. Daraus entsteht ein alternativer Komplex der auch als „Immunproteasom“ bezeichnet wird (Groettrup et al., 1996). Durch diesen Komplex wird die Diversität als auch die Generierung von Peptid-Antigenen quantitativ und qualitativ stark erhöht. Zudem wird die Beladung von MHC-Molekülen der Klasse I bzw. der Klasse II gesteigert, was wiederum zu einer erhöhten Peptid-spezifischen Aktivierung von CD8⁺ und CD4⁺ T Zellen führt (Groettrup et al., 2001, Mach et al., 1996). Zusätzlich hat IFN γ auch einen direkten Einfluss auf die Entwicklung einer Th1-Antwort (Schroder et al., 2004). Dadurch werden charakteristische Th1 Effektormechanismen, wie eine Aktivierung von NK Zellen und Makrophagen als auch eine spezifische zytotoxische Immunität begünstigt.

In Virusinfektionen sind vor allem Typ I IFN für die Etablierung einer angeborenen Immunreaktion verantwortlich (Abschn. 1.3). Allerdings spielt auch IFN γ einerseits bei der Koordination einer adaptiven Immunreaktion im späteren Infektionsverlauf und andererseits bei der Etablierung einer Langzeit-Infektionskontrolle eine entscheidende Rolle (Muller et al., 1994).

Neben der Aktivierung adaptiver Immunreaktionen begünstigt IFN γ zudem die Induktion von angeborenen, mikrobiziden Effektorfunktionen in den verschiedensten Zelltypen. In Phagozyten erhöht ein IFN γ -Stimulus die Pinozytose, als auch die Rezeptor-spezifische Phagozytose, um die Internalisierung und das Abtöten von Pathogenen zu beschleunigen (Schroder et al., 2004). Des Weiteren löst es eine gesteigerte Produktion antimikrobieller Faktoren aus, wie beispielsweise reaktive Sauerstoffspezies und reaktive Stickstoff Intermediate, die durch das IFN γ -induzierte NADPH Oxidase System bzw. NO-Synthasen produziert werden (Dupre-Crochet et al., 2013, Michel et al., 1997). Als freie Radikale können reaktive Sauerstoffspezies bzw. Stickstoff Intermediate intra- und extrazelluläre Pathogen-Strukturen oxidieren und damit eine Degradation der Pathogene einleiten.

Eine weitere wichtige IFN γ -induzierte Effektorfunktion ist der intrazelluläre Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan in infizierten Zellen (Byrne et al., 1989). Da viele Mikroorganismen Tryptophan-auxotrophe Lebewesen sind, ist die Bereitstellung der Aminosäure durch den Wirt auch hier essenziell und somit ein guter Angriffspunkt für die Infektionsbeseitigung. Der Abbau wird dabei durch die IFN γ -regulierte Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) induziert, die zum Abbau von Tryptophan zu *N*-formylkynurenin und Kynurenin führt (Daubener et al., 2009, Macchiarulo et al., 2009). Die Relevanz von humanem IDO in Bezug auf seine mikrobizide Funktion ist bislang noch nicht in Gänze

geklärt, konnte jedoch in einigen humanen Zelllinien als antimikrobieller bzw. antiviraler Faktor beschrieben werden (Adams et al., 2004, Daubener et al., 1999).

1.3.2 Interferon-induzierbare GTPasen

In murinen Zellen wird die IFN γ -Antwort vor allem durch die Expression zweier Guanosid-tri-phosphatase (GTPase) Familien bestimmt (Boehm et al., 1998). Dabei handelt es sich zum einen um die 47 kDa oder Interferon-regulierten GTPasen (IRGs) und zum anderen um die 65-73 Kilodalton (kDa) GTPasen oder auch Guanylat-bindenden Proteine (GBPs). Da IRGs im Menschen fast vollständig fehlen, rückten in den letzten Jahren vor allem die GBPs in den Fokus der Forschung (Bekpen et al., 2005, Kresse et al., 2008). Zusammen mit der 72-82 kDa Myxoma-Resistenz (Mx) Protein-Familie sowie den ~200-285 kDa VLIGs (engl. ‚*Very Large Inducible*‘-GTPases) stellen sie die vier Interferon-induzierten, große GTPasen-Familien dar. Aufgrund ihrer Struktur und der enzymatischen Eigenschaft GTP hydrolysieren zu können, werden sie der Membran-deformierenden Dynamin-Superfamilie zugeordnet (Kim et al., 2012). Während die Mx-GTPasen hauptsächlich durch einen Typ I IFN-Stimulus reguliert werden, induziert IFN γ vornehmlich die Expression der übrigen GTPasen (Kim et al., 2012). Jede dieser Familien ist annähernd in der gesamten Vertebraten-Linie konserviert und bietet unterschiedliche Schutzfunktionen im immunologischen Kontext (Kim et al., 2012).

Die Mx-Familie weist als einzige eine relativ stabile Gen-Anzahl in den verschiedenen Vertebraten-Spezies auf (Verhelst et al., 2013). Ihre Funktion ist die Inhibierung der Virus-Replikation insbesondere von RNA-Viren. Entscheidend für die Spezifität ist dabei ihre subzelluläre Lokalisation. In Nagetieren existieren zwei Mx-Isoformen, die die Virusreplikation im Nukleus (Mx1) oder im Zytoplasma (Mx2) inhibieren können (Verhelst et al., 2013, Zimmermann et al., 2011, Zurcher et al., 1992). Die beiden humanen Isoformen MxA und MxB sind hingegen umgekehrt im Zytoplasma und im Nukleus lokalisiert und weisen antivirale Funktionen z. B. gegen Influenza, Hepatitis B (MxA) und HIV-1 (MxB) Viren auf (Verhelst et al., 2013).

VLIGs konnten ausschließlich in Vertebraten nicht aber in anderen Chordata identifiziert werden (Li et al., 2009). Ihre Anzahl unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Vertebraten-Spezies enorm mit lediglich zwei Pseudogenen im menschlichen Genom. In Mäusen induzieren IFN eine äußerst starke VLIG-Expression, weshalb ihnen hier eine besondere immunologische Funktion zugesagt wird (Klamp et al., 2003). Funktionelle Studien zu dieser Protein-Familie wurden jedoch bislang nicht publiziert.

Die IRG-Familie weist ebenfalls Spezies-abhängige Unterschiede in der Anzahl der Gen-Loci innerhalb der Säugetiere auf. Aufgrund von Gen-Duplikationen sowie Gen-Verlusten sind

Einleitung

beispielsweise im murinen Genom 20 *Irg* Gene zu verzeichnen, während das humane Genom lediglich zwei *Irg* Gen-Loci aufweist (Li et al., 2009). In Mäusen unterscheidet man auf Grund von Sequenz- als auch von funktionellen Unterschieden zwischen GKS Effektor-Proteinen und regulatorischen GMS- oder auch *Irgm*-Proteinen. GKS Proteine erkennen und assemblieren an Pathogen-enhaltenden (engl. ‚containing‘) Vakuolen (PCV) (Taylor, 2007). Ihre Assemblierung ist essentiell für den lytischen Abbau dieser PCVs, wie es bereits für die parasitophore Vakuole (PV) des apikomplexen Parasiten *T. gondii* beschrieben wurde (Martens et al., 2005). *Irgms* hingegen lokalisieren an Zell-eigenen Membranen, wie beispielsweise von Organellen, und verhindern dadurch eine *off-target* Aktivierung von GKS-Proteinen (Haldar et al., 2013).

Die für diese Arbeit relevanteste Familie der IFN-induzierten GTPasen, stellen die GBPs dar. Nachfolgend wird diese Protein-Familie daher detaillierter beschrieben.

1.4 Guanylat-bindende Proteine

Die Entdeckung der GBPs ist auf das Jahr 1979 zurückzuführen. Gupta et al. stimulierten humane, als auch murine Zelllinien mit aufgereinigtem IFN zur Charakterisierung des antiviralen IFN-Effekts (Gupta et al., 1979). Bei der Auftrennung der IFN-induzierten Proteine mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese stellten die Forscher eine Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 67 kDa fest. Die anschließend isolierte Proteinfraction wies allerdings keine Bindungsaffinität zu Agarose-*Bead*-gebundenen, synthetischen RNA Molekülen auf. Die fehlende Bindungseigenschaft deutete daher auf eine abweichende Funktion zur antiviralen Immunantwort hin. Wenig später konnte gezeigt werden, dass die Expression der eigentlich 65-73 kDa Protein-Gruppe insbesondere durch IFN γ induziert wird und dass diese außerdem die namensgebende Eigenschaft besitzen Guanylat zu binden (Cheng et al., 1983). Die IFN γ -Abhängigkeit wurde in Analysen zur Charakterisierung des GBP-Promotors bestätigt, in denen GAS als wichtiges Element für die Aktivierung IFN γ -spezifischer Gene determiniert wurde (Lew et al., 1991). Neben der GAS konnte des Weiteren auch ein ISRE in selbigem Promotor festgestellt werden, was auf eine Induzierbarkeit der GBPs sowohl durch Typ II als auch durch Typ I IFN hindeutete (Olszewski et al., 2006).

1.4.1 Taxonomie der GBPs

Nach der Entdeckung des ersten humanen GBPs (hGBP1) wurden weitere verwandte Gene in den verschiedensten Taxa, wie z. B. Cephalochordata, Protisten, Pflanzen und Algen festgestellt (Tretina et al., 2019). Mittels Hidden-Markov-Modellierung konnten schließlich 132 intakte GBP-Gene über 32 verschiedene Taxa identifiziert werden (Shenoy et al., 2012). Viele der GBP-Gene setzen sich dabei aus 11 Exonen zusammen und besitzen ein Start-Codon in Exon 2 (Olszewski et al., 2006). Ihr häufiges Auftreten, als auch die Konservierung der GBPs indizieren, dass die Funktion der Proteine evolutionär gesehen nicht redundant ist. Im Menschen existieren sieben Paraloge und mindestens ein Pseudogen, die in einem einzigen Cluster auf Chromosom 1 vorliegen (Olszewski et al., 2006). Im Mausgenom hingegen sind 11 GBP-Gene und zwei Pseudogene kodiert, die zwei verschiedene Cluster bilden (Degrandi et al., 2007, Kresse et al., 2008, Olszewski et al., 2006). Diese Cluster sind auf Chromosom 3(H1) (Chr3: *mgbp1*, *mgbp2*, *mgbp3*, *mgbp5*, *mgbp7*, *pseudomgbp1*) sowie auf Chromosom 5(E5) (Chr5: *mgbp4*, *mgbp6*, *mgbp8*, *mgbp9*, *mgbp10*, *mgbp11*, *pseudomgbp2*) lokalisiert. In Bezug auf die Phylogenie wird das Ursprungsgen der mGBPs mit großer Wahrscheinlichkeit auf dem Chr3 vermutet, da sich die Gene dieses Clusters am meisten voneinander unterscheiden (Kresse et al., 2008). Des Weiteren wird vermutet, dass die verschiedenen mGBPs durch Gen-Duplikationsprozesse entstanden sind (Olszewski et al., 2006). Insbesondere die sehr ähnlichen Sequenzidentitäten des Chr5-Clusters bekräftigen diese Hypothese, da die Aminosäuresequenzen Übereinstimmungen von 65 – 98 % aufweisen (Kresse et al., 2008). Interspezies-Sequenzvergleiche identifizierten zudem orthologe Gene zwischen den humanen und den mGBPs (z. B. hGBP1 und mGBP2, hGBP5 und mGBP5) (Olszewski et al., 2006).

Die mGBPs des Chr3 Clusters konnten in zwei weitere Homologie-Cluster aufgeteilt werden. Das erste dieser Cluster setzt sich aus den Genen *mgbp1*, *mgbp2* und *mgbp5* zusammen, deren Proteine am jeweiligen Carboxy-terminalen (C-terminalen) Ende eine Isoprenylierungsstelle aufweisen (Degrandi et al., 2007, Kresse et al., 2008, Olszewski et al., 2006). Die mGBPs des zweiten Clusters (*mgbp3*, *mgbp7*) besitzen eine solche Isoprenylierungsstelle nicht und weisen außerdem einen AS-Austausch in einem der vier charakteristischen GTP-Bindemotive auf (Degrandi et al., 2007, Kresse et al., 2008, Olszewski et al., 2006). Die fehlende Isoprenylierungsstelle und die veränderte Bindemotivsequenz kommen des Weiteren im gesamten Chr5-Cluster vor. Phylogenetisch scheinen *mgbp3* und *mgbp7* demnach die möglichen Ursprungs-Gene dieses zweiten Clusters darzustellen (Kresse et al., 2008).

Einleitung

Zwei Besonderheiten stellen die mGBPs 4 und 11 dar. Das *mgbp4* Gen wird in zwei verschiedenen ‚*Splice*‘ Varianten exprimiert (Konermann et al., 2007). Dabei enthält die erste mRNA-Variante im C57BL/6 Genom ein frühes Stopp-Codon, das bereits nach 312 Bp auftritt. Die zweite Variante weist eine defekte GTP-Bindestelle auf. Interessanterweise wurde im Zuge der Gen-Charakterisierung festgestellt, dass während einer Infektion hauptsächlich Variante 1 exprimiert wird (Konermann et al., 2007). Das *mgbp11* Gen weist ebenfalls ein frühes Stopp-Codon im offenen Leserahmen in Exon 8 auf (Kresse et al., 2008). In beiden Fällen werden somit verkürzte Proteine exprimiert, deren Funktion noch nicht genauer beschrieben wurde, sich aber wahrscheinlich von den anderen mGBPs unterscheidet.

1.4.2 Strukturelle und biochemische Eigenschaften

Die Struktur der GBPs konnte bislang nur durch ein einziges Kristall-Strukturmodell, im spezifischen von hGBP1, genauer beschrieben werden (Prakash et al., 2000). Die Strukturanalyse zeigte, dass sich das Protein aus einer großen (engl. ‚*large*‘), globulären Domäne (LG) und einer elongierten, helikalen Domäne zusammensetzt, die durch eine intermediäre α -Helix Domäne verbunden sind ($\alpha 6$). Die Struktur sowie die biochemischen Eigenschaften sind charakteristisch für Proteine der Dynamin Super-Familie (Ferguson et al., 2012, Schwemmle et al., 1994). Aufgrund ihres relativ hohen Molekulargewichts werden sie außerdem zu den großen, IFN γ -induzierbaren GTPasen gezählt. Die Amino (N)-terminale LG-Domäne der GBPs wird aus acht β -Faltblatt und neun α -Helix Strukturen gebildet (Prakash et al., 2000). Im Gegensatz zu Mitgliedern der kleinen GTPasen, wie z. B. Ras, Rab und Rho, weisen sie fünf zusätzliche Insertionen und weitere Sekundärstrukturen auf. GBPs enthalten neben den drei charakteristischen GTP-Bindungsmotiven der GTPasen außerdem ein viertes, konserviertes Motiv. Die Bindungsmotive sind das G1-Motiv/Phosphat-bindende Schleife (engl. ‚*P-Loop*‘) GxxxxGK(S/T), das G2/Switch1-Motiv, das G3/Switch2-Motiv DxxG und das G4-Motiv x(L/V)RG (Kresse et al., 2008). G3 stellt dabei nicht nur eine Phosphat-, sondern auch eine Mg²⁺-Bindesequenz dar. Das G4-Motiv hingegen ist für die Nukleotid-Spezifität verantwortlich. Dieses unterscheidet sich außerdem im Falle der mGBPs zwischen denjenigen mit (*mgbp1, 2, 5*) bzw. ohne C-terminale Isoprenylierungsstelle. Strukturell unterscheiden sich die GBPs im Vergleich zu weiteren GTPasen durch eine Guanin- sowie durch eine Phosphat-Kappe der G-Domäne (s. u.) (Prakash et al., 2000, Wehner et al., 2012).

Die helikale Domäne wird auch in Mittel- (M) und Effektor-Domäne (E) differenziert. Erste setzt sich aus zwei Helix-Bündeln ($\alpha 7-11$) zusammen, die von der LG-Domäne fortlaufen.

Die E-Domäne wird aus den beiden Helices α -12/13 gebildet und führt entlang der M-Domäne wieder zurück zur LG-Domäne. Sowohl im Menschen als auch in der Maus enthalten die Isoformen GBP1, 2, und 5 ein spezifisches CaaX-Sequenzmotiv am C-terminalen Ende (Olszewski et al., 2006). Diese Sequenz ist essenziell für post-translationale Modifikationen durch Farnesyl- oder Geranylgeranyltransferasen und maßgeblich an einer Interaktion der GBPs mit Lipidmembranen verantwortlich (Nantais et al., 1996, Stickney et al., 2000). MGBP7 hingegen weist an dieser Stelle eine potentielle Transmembran-Region auf, die das fehlende CaaX-Motiv möglicherweise ersetzt (Legewie et al., 2019).

GBPs sind in Abwesenheit von Guanin-Nukleotiden stabil und koordinieren ein Mg^{2+} -Ion als enzymatischen Co-Faktor (Praefcke et al., 2004). Anders als die kleinen Ras-ähnlichen Proteine, deren GTPase-Funktion von weiteren aktivierenden Proteinen abhängt, besitzen GBPs eine hohe intrinsische GTPase-Aktivität sowie ähnliche Affinitäten zu GTP, GDP und GMP im niedrigen mikromolaren Bereich (Kravets et al., 2012, Li et al., 2004, Prakash et al., 2000, Schwemmle et al., 1994). Eine Besonderheit der GBPs ist die seltene Eigenschaft GTP in zwei konsekutiven Hydrolyse-Schritten zu GDP und GMP durch die Abspaltung von einzelnen Phosphat-Gruppen zu hydrolysieren (Schwemmle et al., 1994). Entscheidend für die intrinsische Aktivität sind zum einen die Guanin- (Insertion 5) und Phosphat-Kappen (Switch I Schleife) der LG-Domäne. Die Kappen haben Einfluss auf die Nukleotid-Orientierung in der Nukleotid-Bindetasche und schirmen diese vor der äußeren Umgebung ab (Prakash et al., 2000, Wehner et al., 2012). Diese Strukturen sind vermutlich der Grund für den Ausschluss weiterer Co-Faktoren, die im Falle der kleinen GTPasen benötigt werden. Des Weiteren sind verschiedene GTP-abhängige Konformationsänderungen für die intrinsische Aktivität verantwortlich. Das Protein wird durch eine Interaktion zwischen der LG-Domäne (α 4, Insertion 3 und 4) und der E-Domäne stabilisiert (Ghosh et al., 2006). Diese Interaktion wird durch eine Anbindung von GTP vorübergehend gelockert und ermöglicht dadurch eine Homo-Dimerisierung von zwei GBP-Molekülen, die zudem maßgeblich durch die Konformation der Guanin-Kappe beeinflusst wird (Wehner et al., 2012). Zum anderen führt die Aufhebung der LG-E Verbindung zu einer Konformationsänderung des ausgebildeten GBP-Dimer Komplexes und verlängert diesen von ca. 120 auf ca. 240 Å (Vopel et al., 2014). Lange wurde vermutet, dass es sich bei diesem Komplex um ein ausgebildetes Tetramer handelt. In einer jüngere Studie stellte sich allerdings heraus, dass der vergrößerte hydrodynamische Radius auf einer Konformationsänderung und nicht auf einer erweiterten Oligomerisierung beruht (Ince et al., 2017). Demnach scheinen GBPs lediglich zwischen

Einleitung

einem monomeren und einem GTP-abhängigen dimeren Zustand zu wechseln und keine höheren, GTP-induzierten Polymere auszubilden.

FRET-Analysen wiesen darauf hin, dass GBPs homo- sowie hetero-Multimerisierungskomplexe in Vesikel-ähnlichen Strukturen (VLS) und an zellulären Membranen ausbilden (Kravets et al., 2016). Eine vertiefende Studie zeigte dazu, dass hGBP1 Farnesylierungs-abhängige Polymere in Ring-ähnlichen Strukturen ausbilden kann (Shydlovskyi et al., 2017). Vergleichbare Strukturen wurden bereits für Dynamin-ähnliche Proteine von Bakterien beobachtet (Low et al., 2006, Shydlovskyi et al., 2017). Diese bakteriellen Ring-Polymere wiederum setzten sich nachweislich aus multiplen Dimeren zusammen. Aufgrund der ähnlichen Protein-Konstitutionen kann daher ein ähnlicher Aufbau der hGBP1 Ring-Struktur und eventuell weiterer GBPs vermutet werden. Inwiefern Akkumulationen beispielsweise von geranylgeranylierten GBPs oder GBPs ohne Isoprenylierungsstelle zustande kommen, ist bislang noch nicht bekannt.

1.4.3 Subzelluläre Lokalisation

Die Forschungsarbeiten der letzten Jahre konnten bereits ein grobes Bild über die physiologische Funktion der GBPs verschaffen. In Abhängigkeit der GTP-Bindungseigenschaft sowie der Isoprenylierung konnten Interaktionen mit verschiedenen zellulären und Pathogen-assoziierten Membranen beobachtet werden. Dies steht im Einklang mit den Eigenschaften der Atlastine, den nahestehendsten GBP-Homologen innerhalb der Dynamin-Superfamilie. Atlastine sind ebenfalls hochkonservierte Proteine innerhalb der Metazoa und regulieren die Dynamik des endoplasmatischen Retikulums (ER) durch Verknüpfung und Fusionierung von ER Tubuli (Hu et al., 2016, McNew et al., 2013). Solche Fusions-, aber auch Fissions-Eigenschaften konnten ebenfalls den GBPs zugeschrieben werden (Daumke et al., 2016). Der exakte Mechanismus ist allerdings noch nicht aufgeklärt.

Sowohl hGBPs als auch mGBPs zeigen in IFN γ -induzierten, uninfizierten Zellen (murin, human) eine granulare, zytosolische Verteilung und akkumulieren an den bereits erwähnten VLS (Britzen-Laurent et al., 2010, Kravets et al., 2012). Die VLS-Lokalisation ist dabei abhängig von der Dimerisierung, der Isoprenylierung, als auch von der GTP-Bindung und – Hydrolyse (Britzen-Laurent et al., 2010, Kravets et al., 2016, Kravets et al., 2012). Neben Homo-Dimeren können GBPs auch Hetero-Dimere ausbilden. Diese Eigenschaft erklärt, weshalb GBPs ohne Isoprenylierungsstelle ebenfalls an PCVs rekrutiert werden und lässt zudem eine Rekrutierungshierarchie vermuten (Britzen-Laurent et al., 2010, Steffens et al., 2020). Die meisten hGBPs lokalisieren im Zytoplasma. Einige dieser konnten jedoch zudem

im Nukleus beobachtet werden (Tripal et al., 2007). Eine Translokation in den Golgi-Apparat konnte hauptsächlich für die GBP5 Isoformen beobachtet oder in einigen anderen Fällen durch Inhibition der Guanosid-di-phosphat (GDP)-Hydrolyse erreicht werden (Tripal et al., 2007). In IFN γ -stimulierten, murinen, embryonalen Fibroblasten (MEFs) wiesen die meisten mGBPs ebenfalls eine zytoplasmatische Verteilung auf. Im Gegensatz zu den hGBPs konnten sie jedoch nicht im Zellkern detektiert werden (Degrandi et al., 2007). Die von den GBPs ausgebildeten Multimersierungskomplexe stellen zytoplasmatische GBP-Reservoirs dar. Im Falle einer intrazellulären Infektion findet nachweislich eine schnelle Re-Akkumulation der GBPs an Pathogen-assoziierte Membranen statt (Kravets et al., 2016, Meunier et al., 2014, Santos et al., 2018).

GBPs haben u. a. Einfluss auf die Proliferation und Migration beispielsweise von Epithelzellen (Britzen-Laurent et al., 2016). Aufgrund ihrer IFN γ -abhängigen Expressions-Induktion werden sie jedoch in erster Linie den Effektoren des angeborenen Immunsystems zugeschrieben. Mittlerweile konnten verschiedene antimikrobielle GBP-Funktionen in Bakterien-, Protozoa- und Virus-Infektionen bestimmt werden und die nun für diese Arbeit relevanten Pathogene erläutert werden (Degrandi et al., 2013, Kravets et al., 2012, Man et al., 2017, Meunier et al., 2016, Pilla-Moffett et al., 2016, Steffens et al., 2020).

1.4.4 *Chlamydia trachomatis* und die Rolle der GBPs in bakteriellen Infektionen

Chlamydien sind gram-negative, obligat intrazelluläre Bakterien mit einem einzigartigen biphasischen Lebenszyklus (Bastidas et al., 2013, Elwell et al., 2016). Ihre extrazellulären, infektiösen Partikel, auch Elementarkörperchen (EBs) genannt, sind metabolisch weitestgehend inaktiv und für die Transmission der Infektion verantwortlich. Durch Adhäsion an eine Wirtszelle und mit Hilfe injizierter Effektorproteine induzieren Chlamydien aktiv ihre Invasion durch Endozytose (Abb. 4A (A)) (Mehlitz et al., 2013, Moelleken et al., 2008). Während des endozytotischen Vorgangs umschließt die Zellmembran das Bakterium, wodurch schließlich ein Chlamydien-spezifisches Kompartiment entsteht, die sogenannte Inklusion (Abdelrahman et al., 2005). Die Inklusionsmembran wird unmittelbar durch frühe chlamydiale Effektoren modifiziert. Dadurch wird eine Detektion/Degradation der Inklusion, z. B. durch das Autophagiesystem oder andere Immunmechanismen, verhindert und Wirtspathogen Interaktionen ermöglicht (Moore et al., 2014). Innerhalb der Inklusion

Einleitung

differenzieren EBs zu metabolisch hochaktiven Retikulärkörperchen (RBs) (Abb. 4A (B)). Da Chlamydien kein ATP synthetisieren können, greifen sie durch weitere Effektoren auf die Energieressourcen der Wirtszelle zurück, um proliferieren zu können (Elwell et al., 2016). Die Proliferation findet in mehreren Replikationsrunden in Form von binärer Teilung statt (Abb. 4A (C-D)). In Abhängigkeit des Serovars redifferenzieren die RBs nach 24-72 h wieder in EBs und verlassen die Zelle durch Lyse der Zellmembran oder in Vesikel-verpackter Form mittels des sogenannten Extrusionsmechanismus (Hybiske et al., 2007) (Abb. 4A (E-F)). Unter unvorteilhaften Bedingungen, wie beispielsweise bei Nährstoffmangel, einem aktivierten Immunsystem des Wirtsorganismus oder simultanen, konkurrierenden Infektionen, kann der Replikationszyklus reversibel angehalten werden (Witkin et al., 2017). Die Chlamydien gehen hier in einen persistenten Zustand über und können somit ungünstige Bedingungen über lange Zeiträume überdauern (Abb. 4A (G)).

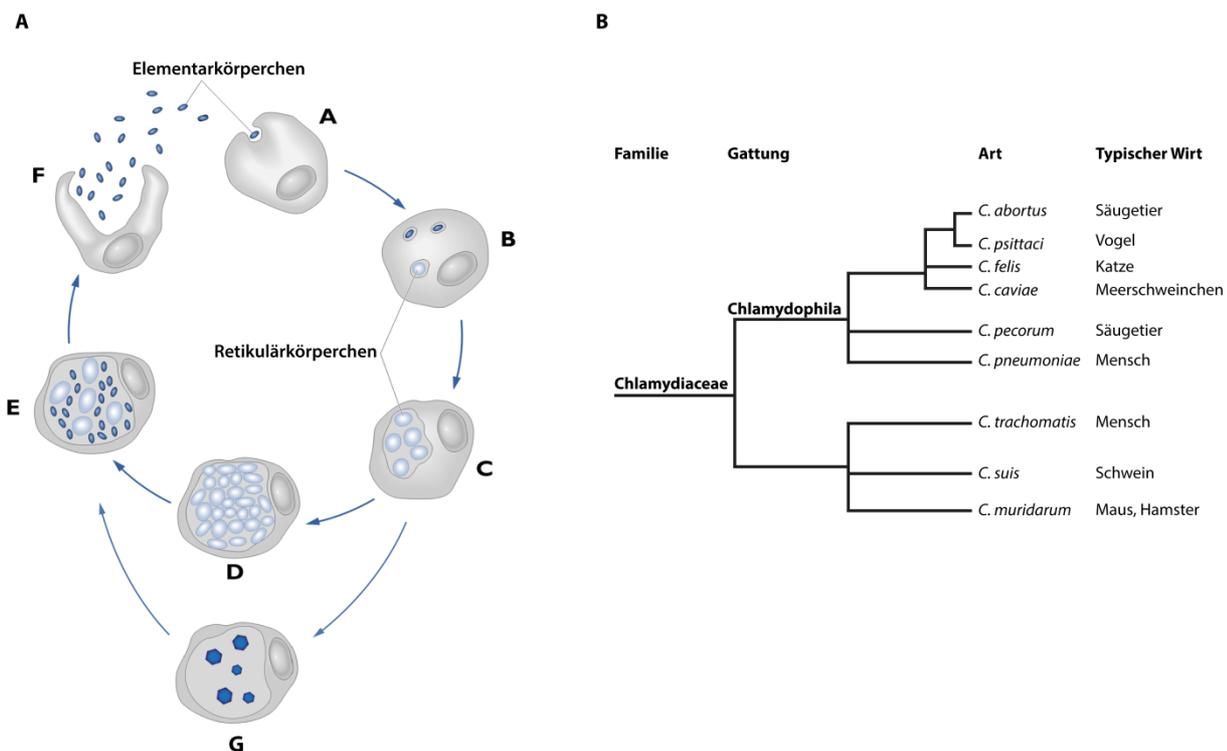


Abb. 4 Lebenszyklus und Taxonomie der Chlamydien.

(A) Der Lebenszyklus beginnt mit (A) der Infektion einer Wirtszelle durch infektiöse Elementarkörperchen (EBs). (B, C) Bei der Invasion werden Inklusionen ausgebildet, in denen die EBs verweilen. Anschließend differenzieren diese zu uninfektiösen, metabolisch aktiven Retikulärkörperchen (RBs) und verschiedene Inklusionen fusionieren zu einer gemeinsamen. (D, E) Im weiteren Verlauf proliferieren und redifferenzieren die Chlamydien zu EBs, die schließlich (F) die Zellen mittels Lyse oder Extrusion (hier nicht gezeigt) verlassen. (G) Unter Stress können Chlamydien auch in eine persistierende Form übergehen, die resistenter gegenüber Immunreaktionen ist. Modifiziert nach www.ppdictionary.com (2020). (B) Taxonomie nach Bush et al. (2001). Es fehlen *C. avium* und *C. gallinaceae*.

Chlamydia bilden zusammen mit den *Chlamydophila* die Familie der *Chlamydiaceae* und umfassen 9 verschiedene Arten (Sachse et al., 2015). Sie stellen Pathogene von verschiedensten Wirtsorganismen dar und können beispielsweise den Menschen (*C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*), die Maus (*C. muridarum*) oder auch Vögel (*C. psittaci*) infizieren (Abb. 4B) (Elwell et al., 2016). Das Mauspathogen ist dabei ein häufig genutztes Modell für Studien von Genitaltrakt-Infektionen (Elwell et al., 2016). *C. trachomatis* hingegen ist ein relevantes Pathogen in Bezug auf Erkrankungen des Menschen (Malhotra et al., 2013). Die *C. trachomatis*-Art wird in drei Biovars aufgeteilt, die wiederum in verschiedene Serovare unterschieden werden können (Harris et al., 2012). In Abhängigkeit des Bio- bzw. Serovars können Infektionen unterschiedliche Pathologien hervorrufen. Die Serovare A-C (Trachoma Biovar) infizieren das Auge und verursachen das, vor allem in tropischen Regionen auftretende, Trachom. Sie sind die Hauptursache für nicht-vererbliche Erblindungen in Entwicklungsländern (Malhotra et al., 2013). Die Serovare D-K (Genitaltrakt Biovar) können zu einer akuten Konjunktivitis und häufig vor allem zu Infektionen und Entzündungskrankheiten in den Geweben des Urogenitaltrakts führen (Malhotra et al., 2013). Die Serovare L1-L3 (*Lymphogranuloma venereum* Biovar) hingegen verursachen invasive urogenitale und anorektale Infektionen (Elwell et al., 2016). Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gehören *Chlamydia*-Infektionen mit 131 Mio. Neufällen (in 2012) zu den global am häufigsten sexuell übertragbaren Krankheiten. Dabei sind Männer zwischen 20 und 24 Jahren sowie Frauen zwischen 16 und 19 Jahren am häufigsten betroffen (Newman et al., 2015). Da ein Großteil der Erstinfektionen mit *Chlamydia* bei Frauen asymptomatisch verlaufen (ca. 70 %) (Rucks et al., 2017), bleiben viele Infektionen unbehandelt. Unbehandelte Infektionen können beispielsweise zu Entzündungen und im weiteren Verlauf zu Erkrankungen mit schwerwiegenden Folgen führen (Peipert, 2003). Zu diesen gehören u. a. ektopische Schwangerschaften, Unfruchtbarkeit und chronische Beckenschmerzen.

Die initiale Immunantwort gegen eine Chlamydien-Infektion wird durch infizierte als auch beschädigte Epithelzellen vermittelt. Infizierte Zellen detektieren Chlamydien mittels Oberflächen- (TLR2, TLR4) oder endosomalständigen Rezeptoren sowie durch zytosolische Sensoren (Finethy et al., 2016). Dadurch wird die Expression und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen induziert (z. B. IL-1, IL-6, IL-8, TNF α) (Rasmussen et al., 1997). Diese wiederum initiieren eine Reihe an Folgemechanismen, die zu einer ausgeprägten zellulären und humoralen Immunantwort führen. U. a. aktivieren sie umliegende, uninfizierte Zellen zur weiteren Zytokinexpression. Außerdem bewirken sie eine

Einleitung

Vasodilation sowie eine erhöhte endotheliale Permeabilität und sind für die Rekrutierung von Neutrophilen, Monozyten und T-Lymphozyten in das betroffene Gewebe verantwortlich (Malhotra et al., 2013). Ein weiterer wichtiger Faktor in der frühen Infektionsphase sind Chlamydien-spezifische Antigen-aktivierte Th1 Lymphozyten, die verantwortlich für die IFN γ -Sekretion sind (Roan et al., 2006). IFN γ spielt eine entscheidende Rolle für die Bekämpfung der akuten Infektion, als auch für die Einleitung der Chlamydien-Persistenz (Beatty et al., 1994, Gondek et al., 2009, Wyrick, 2010).

Die ausgeprägte Immunantwort ist neben der Bekämpfung der Infektion jedoch ebenso Ursache für die Pathogenese. Persistierende Chlamydien regulieren die Expression von Stress-induzierten Genen hoch und somit auch die Expression des Hitzeschock-Proteins 60 (Hsp60) (Beatty et al., 1993). *Hsp60* ist ein hochkonserviertes Gen in vielen Organismen. Sogar die pro- und eukaryotischen Proteine weisen teils ähnliche AS-Sequenzabschnitte auf (Karlin et al., 2000). Somit können beispielsweise Antigen-spezifische Immunantworten entstehen, die sich gegen das Körper-eigene Hsp60 und während einer Schwangerschaft sogar gegen den Fötus richten. Ebenso konnte eine Neutrophile-induzierte Immunantwort mit einer Pathogenese assoziiert werden. So wurde eine positive Korrelation zwischen zervikalen Neutrophilen und der Sekretion von neutrophilen Defensinen bei der Entstehung von Endometritiden festgestellt (Peipert, 2003, Wiesenfeld et al., 2002). Sich wiederholende Entzündungsreaktionen können zur Okklusion der Eileiter und damit schlussendlich zur Infertilität der betroffenen Frauen führen. Die Behandlung einer akuten Chlamydien-Infektion ist mit den heutigen medizinischen Mitteln einfach und effektiv (WHO, 2016). Da viele akute Infektionen jedoch unbemerkt bleiben, wäre ein effektives Vakzin von Vorteil, um das Risiko einer persistierenden Infektion zu minimieren. Für die Generierung eines solchen Vazins müssen jedoch zunächst die bakteriellen Infektions- und Effektormechanismen, als auch die Chlamydien-spezifische Immunantwort besser verstanden werden. Des Weiteren ist eine Behandlung persistierender Chlamydien noch nicht möglich. Auch hier gilt es über vertiefende Analysen die Wirts-Pathogen Interaktionen besser zu verstehen, um mögliche Angriffspunkte für die Infektionsbeseitigung zu identifizieren. In diesem Zusammenhang sollte mit dieser Arbeit u. a. der GBP-spezifische Einfluss auf die Chlamydien-Replikation untersucht werden. Dafür werden nun folgend die bisherigen Kenntnisse zu den antibakteriellen Eigenschaften der GBPs in Chlamydien- und anderen bakteriellen Infektionen zusammengefasst.

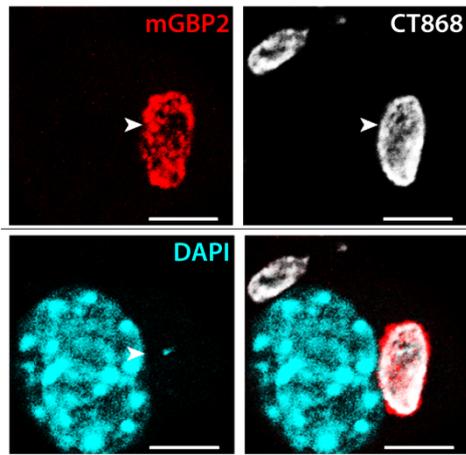
GBPs sind wichtige Resistenz-Faktoren und indirekte Auslöser von Entzündungsreaktionen während einer bakteriellen Infektion (Kim et al., 2012). Ihre antimikrobiellen und

proinflammatorischen Eigenschaften werden vor allem durch die Relokalisierung an und die Zerstörung von PCV- sowie Plasmamembranen der Bakterien gegeben (Man et al., 2015, Meunier et al., 2014, Meunier et al., 2015). Die Bedeutung der Lokalisierung wurde durch Mutationen in GTPase-Motiven sowie der Isoprenylierungsstelle einiger GBPs verdeutlicht, die eine reduzierte antimikrobielle Aktivität zur Folge hatten (Tripal et al., 2007). Für hGBPs konnte in Bezug auf eine Chlamydien-Infektion ein aktivierender Einfluss auf Autophagie-abhängige Degradationsprozesse beschrieben werden. Die Rekrutierung der hGBPs induzierte dabei eine Fusion von Vesikeln des endolysosomalen Systems mit den chlamydialen Inklusionen, die daraufhin degradiert wurden (Al-Zeer et al., 2013). In murinen Zellen ist vor allem die Kooperation von GBPs und IRGs als auch die Expression einiger spezifischer Autophagie-Faktoren Voraussetzung für einen effektiven Schutz gegen *C. trachomatis*. Zu diesen Autophagie-Faktoren gehören beispielsweise ATG3, ATG5, die durch weitere Faktoren des Ubiquitinierungssystems, wie dem E2 Enzym und einer E3-Untereinheit, unterstützt werden (Al-Zeer et al., 2009, Haldar et al., 2015, Haldar et al., 2013). Im Zusammenspiel mit den IRGs induzieren sie zunächst eine Ubiquitinierung der Inklusion. Dadurch werden Bindestellen für p62/SQSTM1 generiert, die zu einer erhöhten Ubiquitinierung und einer damit einhergehenden mGBP-Rekrutierung zur Inklusion führen (Haldar et al., 2015). Der Mechanismus, mit dem PCV-akkumulierte GBPs die Zielmembranen aufschließen, ist bislang jedoch nicht bekannt. Obwohl die meisten IRGs in Humanzellen fehlen, konnte auch hier eine Ubiquitinierungs-abhängige Rekrutierung der GBPs an die Inklusion von *C. muridarum* detektiert werden (Haldar et al., 2016). Der initiale Schritt des Rekrutierungsmechanismus scheint sich demnach in Maus und Mensch zu unterscheiden. Eine Rekrutierung der GBPs ist jedoch in beiden Fällen von elementarer Bedeutung für die Inhibierung einer Chlamydien-Infektion.

In einer quantitativen Analyse wurden die Rekrutierungsfrequenzen einzelner mGBPs zur Inklusionsmembran untersucht (Lindenberg et al., 2017) (Abb. 5A). Die Ergebnisse dieser Studie konnten zeigen, dass sowohl Chr3-, als auch Chr5-Cluster mGBPs an die bakterielle PCV rekrutiert werden und dass im spezifischen die mGBPs 1, 2 und 9 die häufigsten Vertreter darstellten (Abb. 5B). Aufgrund der hohen Frequenzen wird vermutet, dass diese mGBPs eine besondere Funktion in der Bekämpfung einer Chlamydien-Infektion einnehmen.

Einleitung

A



B

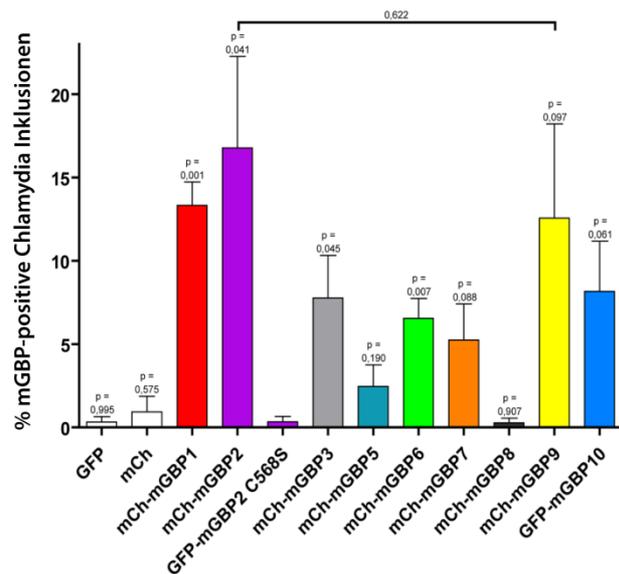


Abb. 5 Rekrutierung der mGBPs an die Inklusion von *C. trachomatis*.

(A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Rekrutierung eines mCherry-mGBP2 Fusionskonstrukts an die Inklusionsmembran. Modifiziert nach Lindenberg et al. (2017). (B) Rekrutierungsfrequenzen der einzelnen mCherry- oder GFP-fusionierten mGBPs an die Inklusionsmembran. Modifiziert nach Lindenberg et al. (2017)

Einigen *Chlamydia spp.* gelingt es in Spezies-typischen Wirtszellen eine GBP-Rekrutierung zu unterdrücken. So wird *C. trachomatis* vom humanen und *C. muridarum* vom murinen GBP-System nicht attackiert (Finethy et al., 2015, Haldar et al., 2016). Ursache dafür sind evolutionär entwickelte Effektormechanismen, die eine Ubiquitinierung der Inklusionsmembranen und eine damit einhergehende Rekrutierung der GBPs verhindern (Haldar et al., 2016). Einige Studien zur Charakterisierung der GBPs in *C. trachomatis*-Infektionen, und so auch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, wurden daher in murinen Zellen durchgeführt, da die chlamydialen Effektormechanismen gegen mGBPs nicht wirksam sind.

In einigen Zelllinien wird ein rekrutierungsunabhängiger GBP-Mechanismus induziert. Beispielsweise führt eine *C. muridarum*-Infektion in humanen Makrophagen zu einer GBP-abhängigen NLRP3- und AIM2-Inflammasom-Aktivierung (Man et al., 2016). Dadurch werden inflammatorische Zytokine freigesetzt und der pyroptotische Zelltod der infizierten Makrophagen eingeleitet. Die GBP-induzierte Pyroptose ist dabei von einer LPS-Freisetzung in das Zytoplasma abhängig.

Neben den antibakteriellen Funktionen der GBPs gegen *C. trachomatis* wurde außerdem ein Einfluss dieser auf *Legionella*, *Salmonella*, *Francisella*, *Yersinia*, *Shigella*, *Listeria* und *Mycobacteria*-Infektionen beschrieben (Meunier et al., 2015, Pilla et al., 2014, Wandel et al., 2017). Die Ergebnisse einiger Studien stehen im Widerspruch zueinander, weshalb die genaue

Funktion der GBPs in diesen Fällen zunächst noch unklar bleibt. So beschrieben Kim et al. (2011) u. a. antibakterielle Funktionen der mGBPs 1 und 7 gegen *Listeria monocytogenes*- und *Mycobacterium bovis*-Infektionen. Die GBPs sollen hierbei eine Rekrutierung von NADPH Oxidasen an Phagosomen beeinflussen und somit zu einer erhöhten Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies führen. Die gleiche Arbeitsgruppe beschrieb außerdem eine NLRP3 Inflammasom-Aktivierung durch mGBP5 in einer *Listeria monocytogenes*-Infektion. In Experimenten mit mGBP-Chr3 Cluster deletierten Mäusen bzw. mGBP2-defizienten MEFs konnte jedoch kein Einfluss auf die Listerien-Infektion beobachtet werden (Degrandi et al., 2013, Yamamoto et al., 2012).

Weitere Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen Galectin-positiven PCVs und einer Rekrutierung von GBPs. Die spezifisch an β -Galactosid Zucker-bindenden Proteine erkennen u. a. Glykolysierungen, die vornehmlich in endozytotischen Vesikeln vorkommen. Solche Vesikel können beispielsweise durch den Ausstieg einiger zytoplasmatischer Bakterien oder andere Membran-beeinflussende Faktoren beschädigt werden. Die Freilegung der Glykolysierungen führt zu einer Detektion durch Galectine (Chen et al., 2014). Im weiteren Verlauf rekrutieren Galectine andere Adaptermoleküle, die zu einer Aktivierung der antibakteriellen Autophagie führen (Thurston et al., 2012). Im Spezifischen scheinen insbesondere Galectin-3, -8 und -9 eine Rolle bei der Aktivierung dieser Prozesse zu spielen (Jia et al., 2018, Jia et al., 2019). In *Salmonella*-infizierten, *mGBP^{Chr3}*-KO Knochenmarks-Makrophagen, konnte ein signifikant reduzierter Anteil Galectin-8-positiver *Salmonella* PCVs beobachtet werden (Meunier et al., 2014). Galectin-3 hingegen erkennt *Yersinia*- und *Legionella*-spezifische PCVs, deren Membranintegrität durch die bakteriellen Sekretionssysteme beeinflusst wird (Feeley et al., 2017). In diesem Fall konnte eine Galectin-3-abhängige Rekrutierung von GBP1 und GBP2 identifiziert werden. In *Shigella*-Infektionen war eine beobachtete hGBP1-Rekrutierung hingegen Galectin-unabhängig und konnte vor dem Auftreten von Galectin-8 detektiert werden. Die Akkumulierung beruht dabei auf der GTPase-Aktivität sowie der C-terminalen Isoprenylierung von hGBP1 (Piro et al., 2017). Die dadurch entstehenden Multimersierungskomplexe beeinflussen die Aktin-basierte Motilität und damit die Verteilung der Bakterien (Piro et al., 2017).

1.4.5 *Toxoplasma gondii* und die Rolle der GBPs in Protozoa-Infektionen

T. gondii ist ein obligat intrazelluläres Protozoon mit einer parasitären Lebensweise. Es stellt den einzigen Vertreter seiner Art dar und wird aufgrund der charakteristischen Merkmale den Apikomplexa zugeordnet. *T. gondii* weist einen charakteristischen Generationenwechsel auf, bei dem zwischen sexuell und asexuell replizierenden Formen unterschieden wird (Miller et al., 1972). Die beiden Vermehrungsphasen des Lebenszyklus finden in unterschiedlichen Wirten, dem End- und dem Zwischenwirt, statt (Ferguson, 2004). Der Parasit kann als einziges Mitglied der Gruppe der *Coccidia* aber auch parallel von End- zu End- sowie von Zwischen- zu Zwischenwirt übertragen werden (Tenter et al., 2000). Den Endwirt des Parasiten stellen Organismen der Unterordnung *Felidae* dar, wie z. B. Hauskatzen. Ausschließlich in Katzenartigen konnte eine geschlechtliche Fortpflanzung beobachtet werden (Dubey et al., 1972, Frenkel et al., 1970, Hutchison et al., 1969). Die geschlechtliche Fortpflanzung findet dabei im enteroepithelialen Gewebe statt (Dubey et al., 1972). Dabei werden die Epithelzellen von der sich ungeschlechtlich replizierenden Form, den Bradyzoiten, invadiert (Abb. 6A). Diese können eine selbst-limitierende Anzahl an Zellteilungen durchführen (Robert-Gangneux et al., 2012). Die daraufhin durch Schizogonie entstehenden Merozoiten durchlaufen eine sexuelle Entwicklung, aus der in einem ungleichen Geschlechterverhältnis vor allem weibliche (Makro-) und nur wenige männliche (Mikro-) Gameten (Gamogonie) hervorgehen (Dubey, 1998, Ferguson, 2002, West et al., 2000). Ein Mikrogamet scheint dabei in der Lage zu sein, mehrere Makrogameten zu fertilisieren (Ferguson, 2002, West et al., 2000). Gamogonie und Fertilisation finden dabei ausschließlich in den Intestinalzellen der Katzenartigen nach der primären Infektion statt (3 – 15 Tage) (Dubey et al., 1972). Die aus der Fertilisation entstehenden Zygoten (diploid) reifen daraufhin zu einer unsporolierten Oozyste heran, die mit dem Kot aus dem Endwirt ausgeschieden werden kann (Dubey et al., 1970). Oozysten durchlaufen anschließend eine Sporulation und beinhalten schließlich zwei Sporozysten mit je vier Sporozoiten (haploid) (Abb. 6B), die über einen langen Zeitraum infektiös bleiben können. Sporozysten sind dazu in der Lage nahezu alle warmblütigen Vertebraten als Zwischenwirt zu infizieren. Durch die Aufnahme in den Zwischenwirt werden die Sporozoiten freigesetzt (Jones et al., 2012, Su et al., 2003). Im Dünndarm infizieren sie die Epithelzellen des Zwischenwirtes und differenzieren zu den sogenannten Tachyzoiten, die die akute Phase der Infektion dominieren (Abb. 6C) (Cornelissen et al., 1984). Tachyzoiten vermehren sich asexuell über Endodyogenie, bei der innerhalb von sechs Stunden zwei neue Tochterzellen gebildet werden, während die

Mutterzelle vollständig aufgelöst wird (Goldman et al., 1958). Die sehr schnelle, intrazelluläre Replikation findet dabei so lange statt, bis die infizierte Zelle aufzuplatzen scheint. Der Ausstieg findet allerdings kontrolliert durch einen lytischen Prozess statt. Die neuen Tachyzoiten infizieren anschließend die umliegenden Zellen und gelangen dabei ebenfalls in die Blutbahn des Organismus (Weiss et al., 2009). Die Folge ist eine Verbreitung des Parasiten in die meisten Gewebe. In immunkompetenten Individuen wird die Replikation des Parasiten schließlich durch eine entsprechende Immunantwort verlangsamt (Cornelissen et al., 1984). Ca. eine Woche nach Einsetzen der Immunantwort erfolgt schließlich eine Konversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten, die aufgrund ihres langsamen Wachstums auch als Ruheform bezeichnet werden (Cornelissen et al., 1984). Bradyzoiten sind für die Ausbildung von Gewebezysten verantwortlich und bilden eine ca. 2 – 3 µm dicke Zystenwand aus. Die Zysten können ein Leben lang in einem infizierten Organismus persistieren und beinhalten tausende Bradyzoiten (Dubey et al., 1976). Sie treten in fast jedem Gewebe auf, insbesondere jedoch im Gehirn, im Retinaepithel oder der Herz- und Skelettmuskulatur (Frenkel et al., 1951). Zysten sind über viele Jahre überlebensfähig und halten die latente Infektionsphase aufrecht (Tenter et al., 2000). Wird der Zwischenwirt (z. B. die Maus) vom Endwirt gefressen, so durchläuft der Parasit schließlich eine neue Runde des Lebenszyklus.

T. gondii ist die einzige Spezies seiner Art und existiert vorwiegend in drei verschiedenen klonalen Linien (Typ I – Typ III), die nur wenige genetische Polymorphismen aufweisen (Howe et al., 1995, Saadatnia et al., 2012). Stämme der Typ I Linie sind äußerst virulent und verursachen im Vergleich zu weiteren Typen eine signifikant höhere Parasitämie (Derouin et al., 1991, Sumyuen et al., 1995). Typ II Stämme sind deutlich weniger virulent. Allerdings verursachen sie eine hohe Zystenlast in Mäusen und neigen in immunsupprimierten Individuen zu einer starken Reaktivierung aus der Latenzphase (McLeod et al., 1989, Suzuki et al., 1994). Typ III Stämme sind ursprünglich als avirulent kategorisiert worden. Neuere Studien zeigten jedoch, dass auch einige dieser Stämme virulent sein können (Taniguchi et al., 2018).

Einleitung

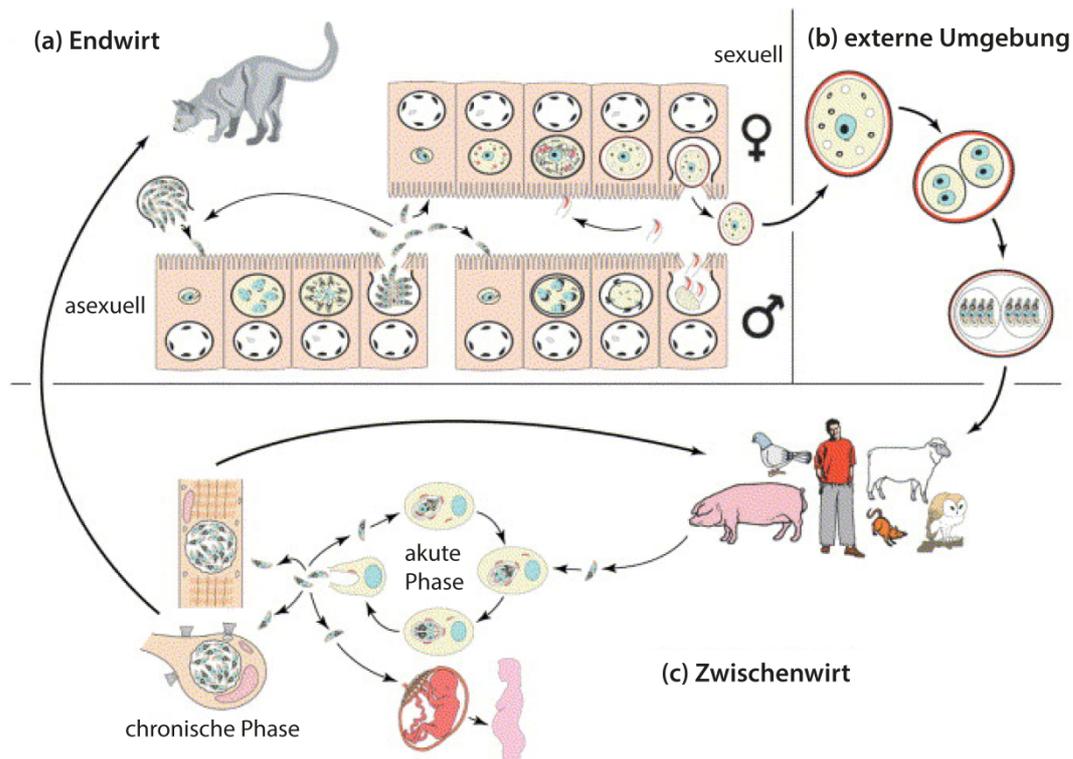


Abb. 6 Lebenszyklus des Parasiten *T. gondii* aus dem Phylum Apicomplexa.

Schema mit der Darstellung des Replikations- und Infektionsverlaufs von *T. gondii* (a) im Endwirt, (b) in der externen Umgebung und (c) im Zwischenwirt. Modifiziert nach Ferguson (2002).

Die Hauptursache einer *T. gondii*-Infektion im Menschen ist die Aufnahme des Parasiten über die Nahrung oder durch engen Kontakt zu Katzen-Haustieren (Zoonose) (Frenkel, 1988, Saadatnia et al., 2012). Im europäischen und im asiatischen Raum sowie in den USA werden die meisten Infektionen durch Typ II Stämme verursacht (Saadatnia et al., 2012). Typ I und III Stämme hingegen treten vermehrt im mittel- und südamerikanischen Raum auf. Schätzungen zu Folge sind mindestens ein Drittel der Weltbevölkerung mit dem Parasiten befallen, was die Infektion zu einer der effektivsten parasitären Infektionen macht. In Deutschland liegt die durchschnittliche Seroprävalenz von Erwachsenen bei ca. 50 % (RKI, 2018). Natürlicherweise wird *T. gondii* nicht direkt vom adulten zum adulten Menschen übertragen. Allerdings kann der Parasit in schwangeren Frauen auf den Fötus übergehen (Desmots et al., 1974). Dabei steht das Risiko einer transplazentalen Transmission im proportionalen Zusammenhang mit der Höhe der Parasitenlast in der Mutter (Howe et al., 1995). Die Pathogenese einer *T. gondii* Infektion äußert sich in einer sogenannten Toxoplasmose. Die kongenitale Toxoplasmose kann dabei zum Tod des Fötus führen oder auch Syndrome mit neuronalen und neurokognitiven Defiziten sowie eine mögliche Chorioretinitis zur Folge haben (Torgerson et al., 2013). Im adulten Menschen verläuft die Infektion meist asymptomatisch, kann jedoch auch selten zu leichtem Fieber,

Lymphknotenschwellungen im Halsbereich oder zu Kopf- und Gliederschmerzen führen. Problematisch wird eine Infektion oder eine bereits bestehende Infektion in immundefizienten Individuen wie z. B. AIDS-Patienten (Bhopale, 2003). Hier kommt es zu einer Reaktivierung der latenten Infektion und einer Distribution des Parasiten u. a. in das Gehirn. Unbehandelt kann dies eine schwerwiegende Toxoplasmose-Enzephalitis verursachen, die innerhalb weniger Wochen zum Tod führt (Tenter et al., 2000).

Da die Beseitigung einer latenten Infektion aufgrund der widerstandsfähigen Zysten sehr schwierig ist, ist vor allem die akute Phase (Tachyzoiten) der Infektion ein relevanter Eingriffspunkt in der Behandlung der Infektion. Daher ist es wichtig, die daran beteiligten Infektions- und Effektormechanismen des Parasiten sowie die Immunantwort des Wirtsorganismus zu verstehen. Tachyzoiten adhären in einem initialen Schritt der Infektion/Zellinvasion an die Oberfläche einer Wirtszelle. Hierbei spielen Laminin, Lectine und Hauptoberflächenproteine wie dem ‚*Surface antigen 1*‘ (SAG1) eine entscheidende Rolle (Kasper et al., 1994, Manger et al., 1998). Darauf folgend penetriert der Parasit die Wirtszelle mit Hilfe von Effektorproteinen aus den Rhoptrien- und Micronemen-Organellen und umstülpt sich während dieses Prozesses mit der Wirtszellmembran (Bhopale, 2003). Die daraus entstehende PV fungiert ebenso wie die Inklusion der Chlamydien als Replikationsnische des Parasiten. Die durch Effektormoleküle modifizierte PV ist vom Vesikeltransport isoliert und fusioniert weder mit endozytotischen noch mit biosynthetischen Organellen (Joiner et al., 1990).

Eine erste Immunantwort wird durch extrazelluläre Tachyzoiten ausgelöst. In Säugetieren hat sich das Immunsystem dahingehend entwickelt, dass eine Reihe einzigartiger, Protozoa-spezifischer Moleküle detektiert werden können (Yarovinsky, 2014). Im Mausmodell wird *T. gondii* dabei hauptsächlich durch die Bindung des Aktin-bindenden Proteins Profilin an die endosomalständigen Rezeptoren TLR11 und TLR12 erkannt (Yarovinsky et al., 2005). Im Menschen ist TLR11 ein nicht-funktionelles Pseudogen und bislang ist unklar welche Rezeptoren für die Parasiten-Detektion verantwortlich sind (Sasai et al., 2018). Die Erkennung von *T. gondii* z. B. durch DCs oder Makrophagen führt zur Sekretion von IL-12, das die Aktivierung und Proliferation sowohl von NK als auch von *T. gondii*-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen induziert (Gazzinelli et al., 1993, Hunter et al., 1994). Die lymphoiden Zellen wiederum produzieren IFN γ und TNF α . Diese Moleküle induzieren synergistisch den Tod der Tachyzoiten durch die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Mechanismen (Daubener et al., 1996, Sibley et al., 1991). *T. gondii* stimuliert außerdem die

Einleitung

Produktion von IgG, IgM, IgA und IgE Antikörpern gegen verschiedenste Antigene des Parasiten. Zusammen mit dem Komplementsystem bilden Antikörper die humorale Immunantwort gegen *T. gondii* (Schreiber et al., 1980).

Insbesondere die Expression von IFN γ und seine vermittelten Effektormechanismen scheinen die Wirtsresistenz gegen *T. gondii* zu bestimmen. Dies wurde in einigen Tier-Experimenten mit IFN γ -defizienten Zelllinien (NK Zellen, CD4⁺/CD8⁺ T Lymphozyten) deutlich (Sasai et al., 2018). Das Ausschalten der IFN γ -Expression einzelner Immun-Zelllinien konnte dabei durch die jeweils anderen Linien kompensiert und eine entsprechende Immunantwort aufgebaut werden (Sasai et al., 2018). Zudem sind *Ifny*- und *IfnyR*-defiziente Mäuse hochsuszeptibel gegenüber einer *T. gondii*-Infektion (Deckert-Schluter et al., 1996, Hunter et al., 1994). Wie auch bei den Chlamydien scheinen die IFN γ -induzierten, Zell-autonomen Effektormechanismen von hoher Relevanz für die Eindämmung einer *T. gondii*-Infektion zu sein. Zu den pleiotropischen Effekten von IFN γ auf *T. gondii*-infizierte Zellen gehört u. a. die Expressionsinduktion der inhibitorischen Proteine IDO und induzierbarer NO Synthase (iNOS) (Daubener et al., 2009, Michel et al., 1997). Die Proteine induzieren den Hungertod des Arginin- und Tryptophan-auxotrophen Parasiten durch den Abbau der beiden AS (Fox et al., 2004, Pfefferkorn, 1984). Des Weiteren hat die Produktion von mikrobizidem NO inhibitorische Effekte auf die *T. gondii*-Proliferation (Adams et al., 1990).

Zusätzlich konnten die IFN γ -induzierbaren IRGs und GBPs als wichtige Faktoren zur Aufrechterhaltung des anti-parasitären Milieus identifiziert werden. Initiale Analysen zeigten zunächst eine Co-Lokalisation zwischen GBPs und der *T. gondii*-PV, die von einer Isoprenylierung sowie der GTPase-Aktivität der GBPs abhängig war (Degrandi et al., 2007, Kravets et al., 2012). Funktionelle Eigenschaften in Bezug auf die Parasitenproliferation konnten schließlich in Studien mit verschiedenen GBP einzel-defizienten Mauslinien sowie einer Chr3 Cluster-Deletion verifiziert werden (Degrandi et al., 2013, Selleck et al., 2013, Yamamoto et al., 2012). Die mGBP-Rekrutierung an die PV ist scheinbar von den GKS IRG Proteinen abhängig, die ebenso wie in der Chlamydien-Infektion zuerst an die PV-Membran rekrutiert werden (Hunn et al., 2008, Khaminets et al., 2010). Zusätzlich werden Proteine des Autophagie-Systems rekrutiert, die zu einer Beladung der Vakuole mit dem Molekül LC3 führen. Die darauffolgende Rekrutierung verschiedener Ubiquitin-Ligasen wie beispielsweise TRAF6 oder TRIM21 leitet die Ubiquitinierung von M1 linearen, K48- und K63-verbundenen Polyubiquitinierungsketten ein (Clough et al., 2016, Foltz et al., 2017, Haldar et al., 2013). Eine Ubiquitinierung induziert gleichermaßen wie an der chlamydialen Inklusion eine Relokalisierung des Ubiquitin-bindenden Adapterproteins p62, das u. a. GBP2 mit an die

PV eskortiert (Pilla-Moffett et al., 2016). Neben mGBP2 konnte in murinen Zellen eine Vielzahl der mGBPs an der PV-Membran beobachtet werden (Abb. 7 A, B) (Lindenberg et al., 2017). Anders als in der Chlamydien-Infektion wurden an der Protozoon-spezifischen Membran neben mGBP1 und mGBP2 hohe Frequenzen mGBP6, nicht aber mGBP9 identifiziert. Die Pathogen-spezifischen Muster deuten demnach auf spezifische Funktionen der mGBPs in unterschiedlichen Infektionsmodellen hin. In einer jüngsten Studie wurde außerdem festgestellt, dass insbesondere mGBP7 für die Immunität gegenüber einer Toxoplasma-Infektion verantwortlich ist (Steffens et al., 2020). *T. gondii*-infizierte, mGBP7-defiziente Tiere waren vergleichbar suszeptibel, wie IFN γ R-defiziente Kontrolltiere (Steffens et al., 2020). Dieselbe Studie zeigte, dass eine Rekrutierung von mGBP7 an die PV mit hoher Wahrscheinlichkeit mGBP2-abhängig ist. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass zwischen mGBPs Rekrutierungshierarchien existieren, durch die die intermediären Frequenzen von mGBP7 trotz seiner hohen Relevanz erklärt werden könnten (Abb. 7B).

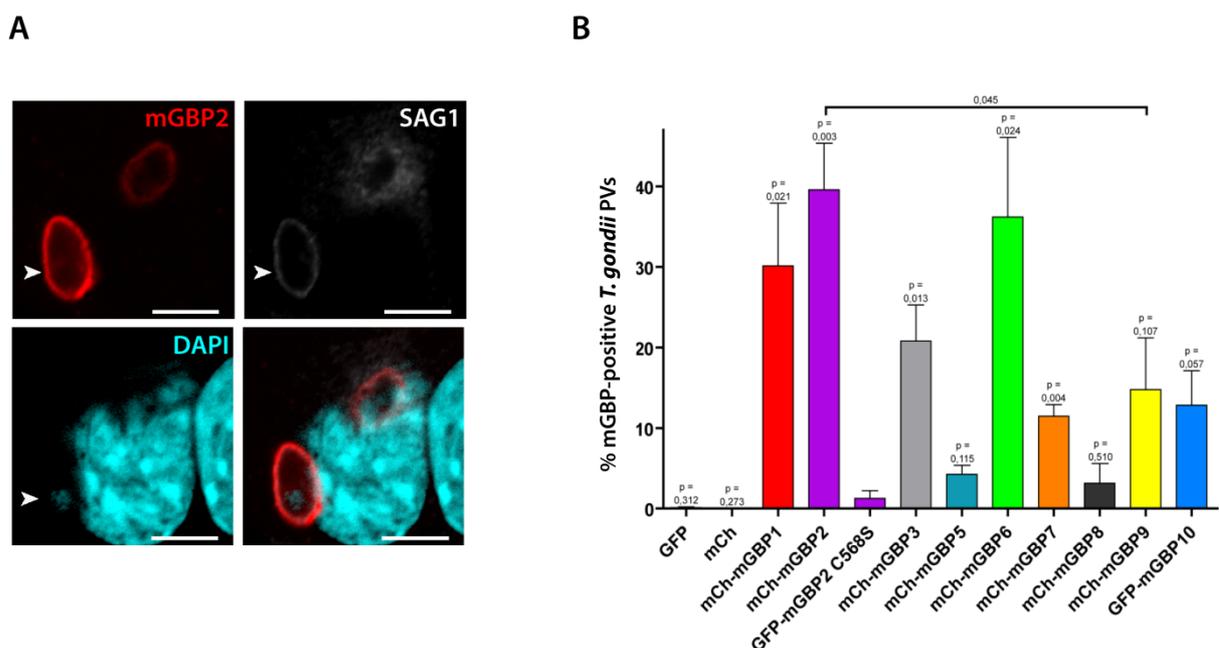


Abb. 7 Rekrutierung der mGBPs an die PV von *T. gondii*.

(A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Rekrutierung eines mCherry-mGBP2 Fusionskonstrukts an die *T. gondii* PV. Modifiziert nach Lindenberg et al. (2017). (B) Rekrutierungsfrequenzen der einzelnen mCherry- oder GFP-fusionierten mGBPs an die *T. gondii* PV. Modifiziert nach Lindenberg et al. (2017)

In humanen Zellen hingegen konnte in Abhängigkeit der Zelllinien und der verwendeten *T. gondii*-Stämme eine große Variabilität im Einfluss der IFN γ -vermittelten Effektormechanismen auf die Infektion festgestellt werden (Praefcke, 2018). Auch die GBPs scheinen hier unterschiedliche Funktionen zu erfüllen. So schränkt hGBP1 eine *T. gondii*-Infektion in Epithelzellen ein, wird dazu allerdings nicht an die PV rekrutiert (Johnston et al., 2016). In der haploiden HAP1 Zelllinie wiederum akkumulieren GBPs an der PV-Membran,

Einleitung

haben jedoch keinen Einfluss auf die Parasiten-Replikation (Ohshima et al., 2014). Für hGBP1 konnten für verschiedene *T. gondii*-Stämme PV-Rekrutierungsfrequenzen zwischen 10 und 20 % festgestellt werden. Das murine Ortholog mGBP2 wurde in Fibroblasten hingegen mit einer Frequenz von ca. 40% an der PV beobachtet (Lindenberg et al., 2017). Dies deutet ebenfalls auf Organismus-spezifische Funktionen im Kontext der IFN γ -vermittelten, Zell-autonomen Immunabwehr hin.

1.4.6 Das Murine Cytomegalovirus und die Rolle der GBPs in Virus-Infektionen

Das Cytomegalovirus (CMV) ist ein Mitglied der Betaherpesviren aus der Familie der *Herpesviridae* (Adams et al., 2012). CMV besitzt ein etwa 230 kBp großes, dsDNA-Genom mit ca. 192 offenen Leserahmen. Damit besitzt es eines der größten Genome unter den Herpesviren (Murphy et al., 2003). Die DNA liegt in einem sogenannten Kapsid vor, das aus verschiedenen Verpackungsprotein-Untereinheiten (Kapsomeren) gebildet wird (Spaete et al., 1994). Zusätzlich ist das Kapsid von einer mit Glykoprotein-beladenen Lipidmembran umschlossen. Zwischen Kapsid und Lipidhülle werden Tegument-Proteine eingelagert, die als Effektoren in der frühen Infektion benötigt werden (Spaete et al., 1994). Die infektiösen Viruspartikel werden auch Virion-Partikel genannt (Jean Beltran et al., 2014).

CMV zeichnet sich durch eine hohe Replikationsrate aus mit einer ca. eintägigen Verdoppelungszeit in der Virämie (Emery et al., 2002). Zudem weist es einen breit gefächerten Zell-Tropismus auf (Jean Beltran et al., 2014, Sinzger et al., 1996). Für die Replikation invadiert CMV im Allgemeinen differenzierte Zellen des Endo-, Meso- und Ektoderms, was verschiedene Zelllinien wie Epithel- und Endothelzellen, Fibroblasten, aber auch Makrophagen, DCs, sowie weitere Linien mit einschließt (Sinzger et al., 1996). In nicht-ausdifferenzierten Zellen, so wie Vorläufer-Zellen aus dem Knochenmark und Monozyten, findet hingegen keine Virus-Replikation statt (Sinclair et al., 1996). In myeloiden Zellen kann das Virus zudem in eine Latenz übergehen und damit eine lebenslange, normalerweise Symptom-freie Infektion verursachen (Hahn et al., 1998, Sinclair et al., 1996). Unter bestimmten Bedingungen wird CMV dabei sporadisch reaktiviert (Reeves et al., 2008).

Der Lebenszyklus von CMV wird in eine frühe und eine späte Phase unterteilt und beginnt mit der Adhäsion eines Virions an die Oberfläche einer Wirtszelle (Abb. 8). Für den ersten Kontakt sind die hüllenständigen Glykoproteine verantwortlich, die an spezifische Wirtsrezeptoren binden und somit eine Endozytose oder eine Fusion des Viruspartikels mit

der Plasmamembran begünstigen (Compton et al., 1993). Anschließend bzw. währenddessen kommt es zur Freisetzung des Kapsids und der Tegument-Proteine in das Zytoplasma der Wirtszelle (Jean Beltran et al., 2014). Das Kapsid wird an den Nukleus rekrutiert und injiziert die virale DNA in den nukleären Raum (Ogawa-Goto et al., 2003). Die Tegument-Proteine hingegen inhibieren zunächst die angeborene Immunantwort durch Inhibierung der PAMP-Erkennung und steuern mitunter die Expression weiterer viraler Gene (Li et al., 2013, Stamminger et al., 2002). Andere Virus-Proteine induzieren zusätzlich Veränderungen in verschiedensten zellulären Syntheseprozessen und Signalwegen, um ein provirales Milieu zu erzeugen (Yu et al., 2011, Yurochko, 2008). Die Expression dieser Proteine ist zeitlich streng kontrolliert und wird in drei Phasen, der sehr frühen, der frühen und der späten Expressionsphase unterteilt (Chambers et al., 1999, DeMarchi et al., 1980). Im Laufe der Infektion werden schließlich neue Kapside gebildet, die den Nukleus wieder verlassen (Milbradt et al., 2014). Sind die Kapside im Zytoplasma angelangt, werden neue Virionen in einem sogenannten Assemblierungskomplex gebildet (späte Phase) (Alwine, 2012). Dabei handelt es sich um verschiedene Zell-Kompartimente wie dem ER, dem Golgi-Apparat und der endosomalen Maschinerie, die durch spezielle Virus-Faktoren manipuliert wurden (Alwine, 2012). Die im Assemblierungskomplex neugenerierten Viruspartikel werden anschließend wieder in den extrazellulären Raum freigesetzt (Abb. 8). Über den Blutstrom kann CMV durch den Organismus zirkulieren, Organe wie beispielsweise die Lunge, die Leber, die Retina oder den Gastrointestinaltrakt befallen und dabei verschiedenste Erkrankungen auslösen (Stinski et al., 2008).

Einleitung

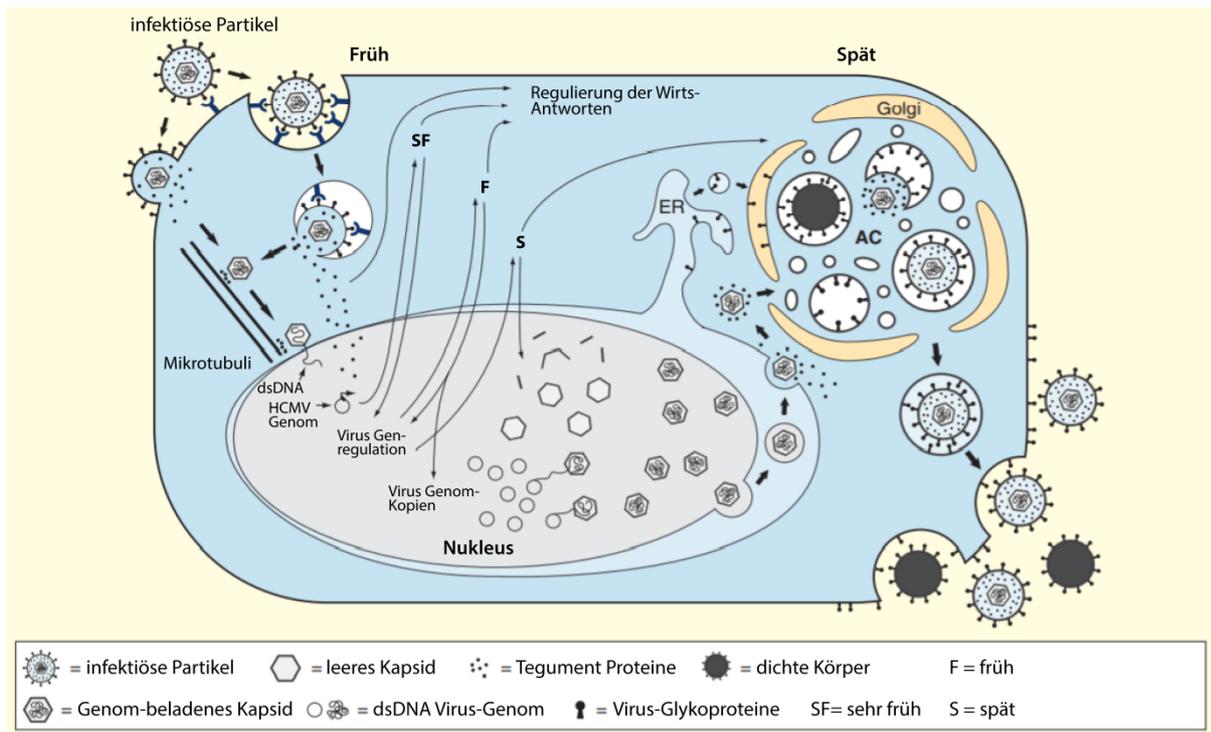


Abb. 8 Schematische Darstellung des HCMV-Lebenszyklus.

Modifiziert nach Beltran et al. (2014).

Humanes CMV (HCMV) ist unter homöostatischen Bedingungen kein lebensbedrohliches Pathogen. Allerdings kann es eine chronisch, latente Infektion etablieren, die ein Leben lang persistiert (Sinclair et al., 1996). Im Vergleich zu allen anderen Viren verwendet das Immunsystem die meisten Ressourcen, um eine HCMV-Infektion einzudämmen (Griffiths et al., 2015). Dies äußert sich u. a. darin, dass gesunde, seropositive Individuen oft einen hohen Anteil (>1 %) HCMV-Antigen-spezifischer T Zellen im peripheren Blut aufweisen. Kritisch wird eine HCMV-Infektion daher in immundefizienten Individuen oder denjenigen Organismen mit unausgereiftem Immunsystem. Mit der Entwicklung moderner, diagnostischer Verfahren konnte HCMV als opportunistische Infektion in Föten, Allotransplantat-Empfängern, Knochenmarkstransplantations-Patienten sowie AIDS-Patienten bestätigt und als signifikante Ursache für Morbidität und Mortalität beschrieben werden (Griffiths et al., 2015, Loh et al., 2005, Mori et al., 2010). Zu den häufigsten Todesursachen zählen insbesondere CMV-induzierte Pneumonien (80 – 90 %), die ein Lungenversagen zur Folge hatten. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass CMV außerdem zu denjenigen Pathogenen zählt, die zur Ausbildung einer Arteriosklerose beitragen und damit ein erhöhtes Herzinfarkt-Risiko verursachen (Du et al., 2018).

CMV weist eine hohe Spezies-Spezifität auf und kann daher nicht auf andere Wirtsarten übertragen werden. Aufgrund dieser Spezifität wurden *in vivo* Studien zu CMV-Infektionen

vor allem mittels des murinen CMVs (MCMV) im Kleintier-Modell durchgeführt. MCMV und HCMV sind biologisch sehr ähnlich, weshalb das murine Modell das am häufigsten verwendete ist, um die HCMV Immunbiologie zu analysieren (Mitrovic et al., 2012). In C57BL/6 Mäusen wird eine MCMV-Infektion insbesondere durch eine bestimmte NK Zell-Subpopulation eingedämmt. Diese Subpopulation exprimiert den Ly49H-aktivierenden Rezeptor, über den das MCMV-Protein m157 detektiert wird (Voigt et al., 2003). Die m157-spezifische Immunreaktion verläuft äußerst effektiv. Dabei aktivieren NK Zellen eine äußerst starke T Zell-Antwort sowie eine IFN-vermittelte Immunabwehr (Voigt et al., 2003). Um *in vivo* Analysen zu weiteren immunologischen Prozessen durchführen zu können, werden daher häufig MCMV-Infektionen mit $\Delta M157$ -MCMV Stämmen oder Mäusen mit entsprechend insuffizienten NK Zelllinien verwendet (Hanley et al., 2014, Voigt et al., 2003).

Obwohl einige immunologische Prozesse zwischen Maus und Mensch ähnlich sind, ist gerade die NK Zell-Antwort gegen HCMV nicht so ausgeprägt, wie die im Mausmodell (Wilkinson et al., 2008). Allerdings konnten angeborene, humorale und weitere zelluläre Faktoren in der antiviralen Immunität beschrieben werden, die insgesamt einen dauerhaft effektiven Schutz gegen schwerwiegende Krankheitsverläufe vermitteln (Hanley et al., 2014).

Ähnlich wie in den bakteriellen und parasitären Infektionen gilt es auch hier Effektor-Prozesse und Immunreaktionen bis ins Detail zu verstehen, mit dem Ziel mögliche Therapieansätze in der akuten oder latenten Infektionsphase zu identifizieren.

In einer MCMV-Infektion scheinen die Expression von Perforin und insbesondere von IFN γ während der akuten Infektions-Phase von großer Bedeutung zu sein (Heise et al., 1995). IFN γ schützt zum einen vor einer MCMV-Infektion *in vitro*. IFN γ prä-behandelte, infizierte Mäuse zeigen zudem eine stark reduzierte Letalität und Pathogenese (Fennie et al., 1988, Presti et al., 2001). Außerdem scheint IFN γ einen Einfluss auf die persistente Infektion zu haben und eine Reaktivierung aus der Latenz zu unterdrücken. Die breitgefächerte Wirkweise von IFN γ auch in Bezug auf Virus-Infektionen könnte vermuten lassen, dass GBPs ebenso zum antiviralen Arsenal der Wirtsabwehr gehören.

Obwohl die antivirale Wirkung der GBPs nicht so ausgeprägt ist, wie die der Mx-Proteine, konnte ein Einfluss der GBPs auf verschiedene Virus-Infektionen bereits beschrieben werden (Haller et al., 2015, Praefcke, 2018). Das hGBP1 besitzt beispielsweise antivirale Eigenschaften in Bezug auf Infektionen mit dem Vesicular stomatitis Virus und dem Encephalomyocarditis-Virus. Auch auf die Hepatitis C-Virusreplikation scheint hGBP1 eine inhibierende Wirkung zu haben, die über eine Protein-Interaktion mit dem nicht-strukturellen Protein 5B vermittelt wird (Itsui et al., 2009). Neben diesen beiden Flaviviren zeigt hGBP1

Einleitung

auch inhibierende Eigenschaften auf das Dengue-Virus (Pan et al., 2012). Andere hGBP-vermittelte Interferenzen konnte in ‚Human immunodeficiency virus‘-sowie Influenza A Virus-Infektionen beobachtet werden (hGBP1, hGBP3, hGBP5) (Krapp et al., 2016, Nordmann et al., 2012). Dabei konnte in den jeweiligen Studien gezeigt werden, dass in Abhängigkeit der Virus-Art GTP-Bindung bzw. eine Isoprenylierung der GBPs die entscheidenden Faktoren sind. Die bisher genannten Viren besitzen alle ein ssRNA-Genom. Antivirale Eigenschaften der GBPs gegen DNA-Viren konnten bislang nur in einer einzigen Studie gezeigt werden (Praefcke, 2018). Dabei scheint eine hGBP1-Expression zu einer Inhibierung der Virion-Rekrutierung zum Nukleus und damit zu einer Inhibierung der Replikation des Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus zu führen (Zou et al., 2017). Der verantwortliche Mechanismus für die Inhibierung ist eine hGBP1-induzierte Proteolyse der Aktin-Filamente, über die der Virion-Transport normalerweise verlaufen würde.

In murinen Zellen konnten lediglich für mGBP2 inhibitorische Eigenschaften auf das Vesicular stomatitis Virus und das Encephalomyocarditis-Virus in murinen Infektionsmodellen beobachtet werden (Carter et al., 2005). Des Weiteren werden einige IRGs und GBPs an das Replikationszentrum des murinen Norovirus rekrutiert (Biering et al., 2017). In den bisherigen Analysen wurden die mGBPs des Chr5-Clusters jedoch nicht mit einbezogen, sodass Aussagen zur antiviralen Funktion dieser mGBPs nicht möglich sind.

1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der biologischen Funktionen des mGBP9 Proteins bei Infektionen mit intrazellulären Erregern. Um dieses Ziel zu erreichen, sollen verschiedene Funktions- und Strukturanalysen von mGBP9 durchgeführt werden.

Zur Charakterisierung der Funktion des mGBP9 Proteins bei der Abwehr intrazellulärer Erreger soll eine mGBP9-Defizienz in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus sowie in NIH/3T3 Fibroblasten mittels des CRISPR/Cas9 Genom-Editierungssystems induziert werden. Mit Hilfe einer mGBP9-defizienten ES-Zelllinie soll ein Mausmodell generiert werden, welches zur Untersuchung der systemischen Relevanz und der *in vivo* Funktion des mGBP9 Proteins eingesetzt werden kann. Mittels mGBP9-defizienter NIH/3T3 Fibroblasten soll vorab die *in vitro* Funktion von mGBP9 im Kontext zweier Infektionsmodelle, *C. trachomatis* und *T. gondii*, analysiert werden.

In einem zweiten Teil der Arbeit soll die Co-Lokalisation von mGBP9 mit verschiedenen mGBP Familienmitgliedern in uninfizierten NIH/3T3 Fibroblasten sowie an der Inklusionsmembran von *C. trachomatis* untersucht werden, um Hinweise auf mögliche, funktions-relevante Interaktionen zwischen den mGBP- Molekülen zu erhalten. Hierzu sollen NIH/3T3 Fibroblasten-Zelllinien mittels lentiviraler Transduktion generiert werden, die zum einen GFP-mGBP9 und zum anderen jeweils ein mCherry-mGBP Fusionskonstrukt (mCherry-mGBP1, -mGBP2, -mGBP3, -mGBP5, -mGBP6, -mGBP7, -mGBP8, -mGBP9, -mGBP10) exprimieren. Die Co-Lokalisation der mGBP Familienmitglieder in uninfizierten Fibroblasten sowie an der chlamydialen Inklusion in mit *C. trachomatis* infizierten Fibroblasten soll anschließend konfokalmikroskopisch analysiert und die Image Daten sollen mit Hilfe der Imaris Bitplane-Software ausgewertet werden.

In einem dritten Teil sollen Protein-biochemische und Struktur Analysen zur Charakterisierung des mGBP9 Proteins durchgeführt werden. Hierzu soll zunächst ein His₆-mGBP9 Fusionskonstrukt kloniert und nach Expression in Bakterien nativ aufgereinigt werden. Anschließend soll das native Protein zur Bestimmung der GTPase-Aktivität mittels des Malachitgrün-Phosphat-Assays sowie, in Kooperationen, zur Ermittlung der Proteinstruktur mittels Kristallographie und SAXS-Analysen verwendet werden.

In einem anderen Projektteil soll in dieser Arbeit ein mGBP9-spezifischer Antikörper generiert werden. Hierzu soll das aufgereinigte His₆-mGBP9-Protein als Antigen zur Immunisierung von Kaninchen verwendet werden und das Antiserum auf seine Spezifität für mGBP9 geprüft werden.

2 Material

2.1 Bezugsquellen

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Aluminiumsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniummolybdat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloramphenicol (CAM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid Hybri-Max TM (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Destilliertes H ₂ O (steril)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Dulbecco's Modified Eagle's – Medium DMEM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Fibronectin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ficoll Typ 400	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FKS (Fötale Kälberserum)	PAN-Biotech, Aidenbach
FKS ES Zellen	PAN-Biotech, Aidenbach
Fluormount-G	SouthernBiotech, Birmingham, Alabama, USA
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Gelatine	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
(L-)Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt (pulverisiert)	Roth, Karlsruhe
HEPES	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Imidazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Immersionsöl 518F	Zeiss, Jena

Material

Interferon- α , murin	PBL Assay Science, Piscataway, New Jersey, USA
Interferon- β , murin	PBL Assay Science, Piscataway, New Jersey, USA
Interferon- γ , murin	
○ AG Pfeffer	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
○ AG Trilling	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopopyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid (CaCl)	Merck, Darmstadt
LB-Agar	Roth, Karlsruhe
LIF (Leukämiehemmender Faktor)	Selbsthergestellt, AG Pfeffer, UK Düsseldorf
Magermilchpulver Oxoid™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Malachitgrün	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
(Di-)Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumziträt	Merck, Darmstadt
P ³² dCTP	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Pefabloc SC	Roche, Mannheim
Penicillin	Biochrom GmbH, Berlin
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Basel, Schweiz
Polybren	Merck, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Merck, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ruxolitinib	Cell Guidance Systems LLC, St. Louis, Missouri, USA
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Saponin	Calbiochem, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Sucrose	Roth, Karlsruhe
Stickstoff	Merck, Darmstadt
Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Trypanblau	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Trypsin/EDTA	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Trypton/Pepton	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Ziegenserum	DaKoCytomation, Glostrup, Dänemark

Tab. 1 Verwendete Chemikalien

2.1.2 Antikörper

Alle Primär-Antikörper wurden in 5 % (w/v) Milchpulver (MP) oder in 3 % (w/v) BSA in TBS-T oder in 0,0002 % (w/v) Saponin-Antikörperlösung verwendet (s. 2.2.1).

Primär-Antikörper und verwendete Konzentrationen	Generierung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Anti-Maus- β -Aktin, (1:5000, MP)	Maus, monoklonal	3700	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-GFP, (1:1000, MP)	Maus, monoklonal	11814460001	ROCHE, Basel, Schweiz
Anti-His ₃	Maus, monoklonal	34670	Qiagen, Hilden
Anti-mCherry, (1:1000, MP)	Maus, monoklonal	ab167453	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-mGBP2 (mGBP2.1), (1:1000, BSA)	Kaninchen, polyklonal	Degrandi	Eurogentec, Lüttich, Belgien
Anti-mGBP9, (1:5000, MP)	Kaninchen, polyklonal	Degrandi	Eurogentec, Lüttich, Belgien
Anti-MOMP (1:50)	Maus, monoklonal	MA1-10665	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Anti- <i>Toxoplasma gondii</i> [TP3], (Sag1) (1:700, Saponin)	Maus, monoklonal	ab8313	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

Tab. 2 Verwendete Primär-Antikörper

Alle Sekundär-Antikörper wurden in der gleichen Lösung wie der Primär-Antikörper verwendet.

Sekundär-Antikörper/ Verw. Konzentration	Generierung	Bestellnr.	Bezugsquelle
Anti-Maus IgG, AlexaFluor [®] 647-konjugiert (1:200)	Ziege	A32728	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert, (1:2500)	Ziege	7076	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA

Material

Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert, (1:2500)	Ziege	7074	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
--	-------	------	---

Tab. 3 Verwendete Sekundär-Antikörper

2.1.3 Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Bezugsquelle
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) (1:2500 in PBS)	Roche, Basel, Schweiz

Tab. 4 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

2.1.4 Enzyme

Enzyme	Bezugsquelle
DNA High Fidelity Polymerase	Roche, Basel, Schweiz
DNA Taq Polymerase	Selbsthergestellt, AG Pfeffer, HHU
DNase I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
ProteinaseK (10 mg/ml)	Roche, Basel, Schweiz

Tab. 5 Verwendete Enzyme

2.1.4.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme	Erkennungssequenz und Verdau	Bezugsquelle
BamHI	5'-G*GATCC-3'	New England Biolabs, Frankfurt am Main
EcoRI	5'-GAA*TTC-3'	Sigma-Aldrich, Roche, Basel, Schweiz
HindIII	5'-A*AGCTT-3'	New England Biolabs, Frankfurt am Main
PstI (1000 U/ml oder 10000 U/ml)	5'-C*TGCA-3'	New England Biolabs, Frankfurt am Main
SmaI	5'-GGG*CCC-3'	New England Biolabs, Frankfurt am Main

Tab. 6 Verwendete Restriktionsenzyme

2.1.5 CRISPR/Cas9 Genom-Editierungssystem Komponenten

Die CRISPR/Cas9-Komponenten wurden von der Firma Integrated DNA-Technology (IDT), Corlville, Iowa, USA bezogen. Sequenzen der spezifischen Syntheseprodukte s. 2.4.7.

Komponente	Katalog-Nr.	Spezifische Syntheseprodukte
Alt-R® Cas9 Elektroporations-Enhancer	1075916	
Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA		guideRNA
Alt-R® CRISPR-Cas9 sgRNA		guideRNA.1 guideRNA.2
Alt-R® CRISPR-Cas9 tracrRNA		
Alt-R® S.p. HiFi Cas9 Nuklease 3NLS	1081061	
HDR-Enhancer	1081073	
Ultramer/Megamer ssDNA Donor		ssDNA Fragment (1. Ansatz) ssDNA Fragment (2. Ansatz)

Tab. 7 Verwendete CRISPR/Cas9 Genom-Editierungssystem Komponenten

2.1.6 Kits und andere Reagenzien

Reagenzien	Bezugsquelle
Complete Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-frei	Roche, Basel, Schweiz
Coomassie SimplyBlue™ SafeStain	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
ECL (Enhanced Chemiluminescence)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
ECL SuperSignal™ West Pico PLUS	Thermo Scientific, Braunschweig
Expand™ High Fidelity PCR System	Merck, Darmstadt
GFP-Trap Kit	Chromotek, Planegg-Martinsried
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche, Basel, Schweiz
jetPRIME® Reagenz/Puffer	Polyplus, Illkirch, Frankreich
Ladderman Labeling Kit	TAKARA, Kusatsu, Japan
Ligase T4-Kit	
Loading Dye Solution, orange (6x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
MassRuler™ DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ni-NTA-Agarose (25 ml)	Qiagen, Hilden
NucleoBond Xtra Maxi	Macherey-Nagel, Düren
NuPAGE™ Bis-Tris Gele (4-12 %)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NuPAGE™ SDS Laufpuffer (20x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NuPAGE™ Transferpuffer (20x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Orange G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
qPCR Mastermix	Takyon, Eurogentec, Lüttich, Belgien
Quick-Load Purple 2-Log DNA Ladder	New England BioLabs, Frankfurt am Main

Material

Re-Blot Plus Strong Solution	Merck	Millipore,	Burlington,
	Massachusetts,	USA	
SuperScript™ III Reverse Transcriptase	Invitrogen,	Thermo Fisher	Scientific,
	Waltham,	Massachusetts,	USA
TA Cloning Kit 2.1	Thermo Fisher	Scientific,	Waltham,
	Massachusetts,	USA	
TRIzol™ RNA Isolation Reagent	Thermo Fisher	Scientific,	Waltham,
	Massachusetts,	USA	
Zyppy Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research,	Freiburg	

Tab. 8 Verwendete Kits und Reagenzien

2.1.7 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Beads: GFP-Trap	Chromotek, Planegg-Martinsried
Bis-Tris Gele (4-12 %) 10-Well, 15-Well	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Cellview Zellkultur Deckgläser	Greiner Bio-One, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Deckgläschen, 35 mm, unbeschichtet, No. 1,5	MatTek Corporation, Ashland, Massachusetts, USA
Elektroporationsküvetten, <i>Gene Pulser</i> 0,2 cm	Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, Kalifornien, USA
Erlenmeyerkolben	Laborbedarf, Köln
Filterpapier: Whatman, Grade 3 CHR, 460 × 570 mm	GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, Großbritannien
Frischhaltefolie (ALIO)	Wentus Kunststoff GmbH, Höxter
Handschuhe, Micro-Touch Nitra-Tex	Ansell, Brüssel, Belgien
Kryo-Röhrchen 1 ml, 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
MicroSpin S-200 HR Säulen	GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, Großbritannien
Nitrozellulose-Membran, Amersham™ Protran®, 0,45 µm Porengröße	GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, Großbritannien
NuPAGE™ Bis-Tris Gele (4-12 %)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Nylon-Membran (Amersham Hybond- XL)	GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, Großbritannien
Objektträger	Engelbrecht GmbH, Medizin- und Labortechnik, Edermünde
Parafilm M	American National Can, Chicago, USA
Pasteurpipetten	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Pipettenspitzen (steril und unsteril): 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Starlab International, Hamburg
Reagenzgefäße Eppendorf 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reagenzröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenzgläser, steril mit Korken	Laborglasshop, Schöps bei Jena

Spinning Columns (Zentrifugationssäulen)	Chromotek, Planegg-Martinsried
Stripetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Costar, Corning, New York, USA
Twist Top Gefäße	Roth, Karlsruhe
Twist Top Gefäßkappen	Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen mit Filter T25, T75, T175	Falcon, Costar, Corning, New York, USA
Zellkultur-Mikroplatte, 96-Well, PS, F-Boden	Greiner Bio-One, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zellkulturschalen	
o 5 cm, 10 cm	Corning, New York, USA
o 15 cm	Falcon, Costar, Corning, New York, USA
Zellkultur Well Platten, steril 6-Well, 12-Well, 24-Well, 48-Well, 96-Well	Costar, Corning, New York, USA
Zellschaber	Greiner Bio-One, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Tab. 9 Verwendetes Verbrauchsmaterial

2.1.8 Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Absaugpumpe, Integra Vacusafe	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Abzug	Wrt-Laborbau, Stadtlohn
Analysenwaage Precisa Balances	Precisa Gravimetrics, Aldingen
BioReader - 7000 Fz	BIO-SYS GmbH, Karben
Brutschrank BBD6220, Hera Cell 240	Früher Heraeus Instruments Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Chemolumineszenz-Imager iNTAS ECL Chemostar	iNTAS Science Imaging Instruments, Göttingen
Dewargefäß	KGW Isotherm, Karlsruhe
Digital Graphic Printer für Agarosegele	SONY, Minato, Japan
Dispenser Handystep	BRAND GmbH und Co. KG, Wertheim, Deutschland
Elektrophoresekammer XCell Sure Lock Electrophoresis Cell	Novex by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Elektroporationsgerät, Gene Pulser II	Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, Kalifornien, USA
ELISA Lesegerät, Sunrise	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Eismaschine	Nordcap, Bremen
FACS Aria™ IIu	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Feuchte-Kammer (Plastikbox)	Keine Herstellerangaben gefunden
Folienschweißgerät Severin Folio	Severin Elektrogeräte, Sundern
Gefrierschrank -20°C	Bosch, Stuttgart
Gefrierschrank -80°C	Liebherr, Bulle, Schweiz

Material

Geldokumentationssystem Gel Doc™ XR+	Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, Kalifornien, USA
Heizblock Techne® Dri-Block® DB-3D	Merck, Darmstadt
Inkubator, Binder	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Kühlschrank	Bosch, Stuttgart
Magnetrührer IKA® RH basic2	IKA®-Werke GmbH, Staufen
Mikroskope:	
Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen
Axio Observer	Zeiss, Oberkochen
Primo Vert	Zeiss, Oberkochen
Zeiss LSM780	Zeiss, Oberkochen
Mikrowelle	Bosch, Erlangen
Multikanalpipette (12) Research plus	Eppendorf, Hamburg
Multimode Reader	Berthold
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop 1000	VWR International GmbH, Langenfeld
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
pH Meter MP225	Mettler-Toledo, Columbus, Ohio, USA
Photometer, UV 1240 mini	Shimadzu, Maryland, USA
Pipetten 0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipet-Boy, accu-jet	Brand, Wertheim
qRT-PCR Maschine, CFX96	Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, Kalifornien, USA
Roller Mixer	Ratek, Victoria, Australien
Rotierapparat SB3-Stuart	Stuart, Cole-Parmer, Staffordshire, Großbritannien
Schüttler	
Polymax	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
GFL Kreis-Schüttler 3019	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Spannungsquellen	
Power 250	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Power Ease 90W	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Consort E861	Merck, Darmstadt
Consort EV243	Merck, Darmstadt
Sterilbank HeraSafe	Früher Heraeus Instruments, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Stickstofftank	Air Liquide, Paris, Frankreich
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler T1, T3 und T-gradient	Biometra, Göttingen
Tischzentrifugen	
MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
Spectrafuge Mini	Labnet International, Edison, New Jersey, USA
Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Systeme	
Vortex VWR	VWR International GmbH, Langenfeld
Vortex Labinco BV L46	Labinco, Breda, Niederlande
IKA® MS3 digital	IKA®-Werke GmbH, Staufen

Wasseraufbereitungssystem Milli-Q Millipore Elix	Merck, Darmstadt
Wasserbad Medingen W6	Köttermann GmbH & Co KG Labortechnik, Uetze
VWB 6	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Western Blot, Semi-Dry Blotter	VWR International GmbH, Langenfeld
Zentrifugen Alegra X-15R	Beckmann Coulter, Brea, Kalifornien, USA
Biofuge fresco	Früher Heraeus Instruments, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Megafuge 1.0R	Früher Heraeus Instruments, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Sorvall RC-4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Tab. 10 Verwendete Geräte

2.2 Medien und Puffer

2.2.1 Puffer und Stammlösungen

Puffer und Stammlösungen	Konzentration/ Menge	Inhaltstoffe
Antibiotika		
○ Amp Stammlösung	100 µg/ml	in dH ₂ O
○ CAM Stammlösung	34 µg/ml	in EtOH
Gelelektrophorese		
○ Agarosegel	0,8 – 2 % (w/v)	Agarose in 1x TAE-Puffer
○ 50x TAE-Puffer	2 M	Tris pH 8
	1 M	Eisessig
	0,1 M	EDTA
○ 5x DNA Ladepuffer	15 % (v/v)	Glycerin
	0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,05 % (w/v)	Xylencyanol
○ 10x DNA Ladepuffer	1 mg/ml	Orange G
	10 mM	Tris/HCl pH 7,5
	30 %	Gelatine
○ TE-Puffer	10 mM	
	1 mM	Tris/HCl pH 8
		EDTA
GFP-Trap Kit		
○ RIPA Puffer	10 mM	Tris/HCl pH 7,5
	150 mM	NaCl
	0,5 mM	EDTA
	0,1 % (w/v)	SDS
	1 % (v/v)	Triton-X100

Material

	1 % (v/v)	Desoxycholsäure Zusätzlich eine <i>Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail</i> – Tablette pro 10 ml
○ Dilution/Wasch Puffer	10 mM 150 mM 0,5 mM	Tris/HCl pH 7,5 NaCl EDTA Zusätzlich eine <i>Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail</i> – Tablette pro 10 ml
○ Glycerin-Elution Puffer	200 mM	Glycerin pH 2,5
○ Neutralisationspuffer	1 M	Tris/HCl pH 10,4
DNA Isolation		
○ Lysepuffer	200 µl 4,8 ml	ProteinaseK (10 mg/ml) Laird's <i>Tail-Buffer</i>
○ Laird's <i>Tail-Buffer</i>	100 mM 5 mM 0,2 % (w/v) 200 mM	Tris/HCl pH 8,5 EDTA pH 8,0 SDS NaCl
Immunfluoreszenz		
<i>T. gondii</i> -Färbung		
○ Fixierungslösung	4 % (w/v)	PFA in PBS pH 7,4
○ Permeabilisierungslösung	0,02 % (w/v)	Saponin (in PBS)
○ Blockierungslösung	0,002 % (w/v)	Saponin (in PBS)
	2 % (v/v)	Ziegen Serum
○ Antikörperlösung	0,0002 % (w/v)	Saponin (in PBS)
	0,2 % (v/v)	Ziegen Serum
○ Waschlösung	0,0002 % (w/v)	Saponin (in PBS)
○ DAPI-Lösung	1:2500	DAPI (in PBS)
Malachitgrün GTPase-Aktivitätsassay		
○ Stopplösung	220 mM	Schwefelsäure (96 %)
○ Färbelösung	1 ml 250 µl 20 µl	Malachitgrün-Stammlösung Ammoniummolybdat-Lösung Tween-20 Lösung
○ Ammoniummolybdat-Lösung	7,5 % (w/v)	Ammoniummolybdat
○ Malachitgrün-Stammlösung	0,122 % (w/v) 20 % (v/v)	Malachitgrün H ₂ SO ₄
○ Tween-20 Lösung	11 % (w/v)	Tween-20
PCR		
○ PCR-Puffer (10x)	500 mM 100 mM 15-25 mM	KCl, Tris/HCl pH 8,3 MgCl ₂ 0,1 % Gelatine
○ dNTP-Mix	1 mM	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Phosphate Buffer Saline (PBS)		
		Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Protein-Aufreinigung		
IMAC:		
○ Puffer A (Lysepuffer für Ni-NTA)	50 mM 300 mM	Tris/HCl, pH 8,0 NaCl

	5 mM	MgCl ₂
	10 mM	Imidazol
	1 mM	β-Mercaptoethanol
	250 μM	Pefabloc SC
○ Puffer B (Waschpuffer für Ni-NTA)	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	250 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
	10 mM	Imidazol
	1 mM	β-Mercaptoethanol
○ Puffer C (Elutionspuffer für Ni-NTA)	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	150 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
	300 mM	Imidazol
	1 mM	β-Mercaptoethanol
○ GFPA (Gelfiltrationspuffer)	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	5 mM	MgCl ₂
	2 mM	DTT

Protein-Detektion

SDS-PAGE und Western Blot:

- | | | |
|---------------------------|--------------|------------------------|
| ○ Protein Ladepuffer (5x) | 10 % (w/v) | SDS |
| | 25 % (w/v) | β-Mercaptoethanol |
| | 30 mM | Tris/HCl pH 6,8 |
| | 0,15 % (w/v) | Bromphenolblau |
| | 45 % (w/v) | Glycerin |
| ○ NuPage-Laufpuffer | 50 mM | MOPS |
| | 1 mM | EDTA |
| | 50 mM | Tris pH 7,7 |
| ○ NuPage-Transferpuffer | 0,1 % (w/v) | SDS |
| | 1x | aus Stammlösung (20x) |
| ○ TBS-T | 20 % (v/v) | Methanol |
| | 150 mM | NaCl |
| | 10 mM | Tris/HCl pH 8 |
| | 0,1 % (v/v) | Tween-20 |
| ○ Blockierungslösungen | 5 % (w/v) o. | Milchpulver (in TBS-T) |
| | 3 % (w/v) | BSA (in TBS-T) |

Southern Blot

HCl	0,25 N	konz. Salzsäure
NaOH	0,4 M	NaOH
	1 M	NaCl
SSC (20x), pH 7,0 (Saline Sodium Citrate)	0,3 M	Natirumzitat
	3 M	NaCl
Wasch1 Puffer		SSC (2x)
	0,05 % (w/v)	SDS
Wasch2 Puffer		SSC (0,1x)
	0,1 % (w/v)	SDS

SPG-Puffer

	220 mM	Sucrose
	3,8 mM	KH ₂ PO ₄
	10,8 mM	Na ₂ HPO ₄
	4,9 mM	L-Glutamin in dH ₂ O

Tab. 11 Verwendete Puffer und Stammlösungen

Material

2.2.2 Kulturmedien

Medium verwendet für:	Konzentration/ Menge	Zusammensetzung
<i>C. trachomatis</i>	10 % (v/v)	DMEM FKS (Hitze-inaktiviert für 30 min bei 56°C)
	1 % (v/v)	MEM Vitamine, nicht-essentielle AS
	1,2 mg/ml	Cycloheximid
<i>E. coli</i> :		
○ Klonierungen (Erhitzt 121°C, 2 bar, 20 min, LB-Medium)	25 g auf 1 l 13,5 g 100 µg/ml	LB (Lysogeny broth) Medium dH ₂ O Agar (nur für Platten) Ampicillin (Bakterien-Selektion)
○ Protein-Expression (Erhitzt 121°C, 2 bar, 20 min, 2xYT)	16 g/l 10 g/l 5 g/l 100 µg/ml 34 µg/ml	Trypton Hefeextrakt NaCl Ampicillin (Bakterien-Selektion) Chloramphenicol (Bakterien-Selektion)
Embryonale Stammzellen (JM8.a3)	15 % (v/v)	DMEM FKS (Pansera, Hitze-inaktiviert für 30 min bei 56°C)
	0,1 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	100 U/ml	Penicillin, Streptomycin
	2,5 mM	Glutamin
	12 U/ml	LIF
MEF Zellen (Feeder)		
○ Kulturmedium	5 % (v/v)	DMEM (Sigma Aldrich) FKS (Hitze-inaktiviert für 30 min bei 56°C)
	0,1 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	100 U/ml	Penicillin, Streptomycin
	2,5 mM	Glutamin
○ Mitomycin C	500 ml 4 µg/ml	MEF-Kulutrmedium Mitomycin C (sterilfiltriert)
293FT Zellen		DMEM
NIH/3T3 Fibroblasten	10 % (v/v)	FKS (Hitze-inaktiviert für 30 min bei 56°C)
	0,1 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
Einfrriermedium:		
○ 293FT, NIH/3T3	18 % (v/v)	DMEM FKS (Hitze-inaktiviert für 30 min bei 56°C)
	0,1 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	10 % (v/v)	DMSO

○ Jm8.a3		DMEM
	15 % (v/v)	FKS (Pansera, Hitze-inaktiviert für 30 min bei 56°C)
	0,1 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	100 U/ml	Penicillin, Streptomycin
	2,5 mM	Glutamin
	12 U/ml	LIF
	10 % (v/v)	DMSO

Tab. 12 Verwendete Kulturmedien

2.3 Zelllinien, Bakterien- und Toxoplasmenstämme

2.3.1 Verwendete Zelllinien

Zellen	Eigenschaften	Referenzen
JM8.a3 ES Zellen	Murine embryonale Stammzellen, pluripotent, wächst in Kolonien	KOMP Repository, www.komp.org
293FT	Humane primäre embryonale Nierenzelllinie, schnellwachsend, SV40 large T-Antigen	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
HS27	Humane Vorhaut Fibroblasten	ATCC#CRL-1634 TM
MEF (Feeder)	Murine embryonale Fibroblasten, isoliert an Tag 14,5 p.c. aus C57BL/6 Embryonen	frisch isoliert (Nicole Küpper, AG Pfeffer)
NIH/3T3	Murine embryonale Fibroblasten, immortalisiert	ATCC#CRL-1658 TM

Tab. 13 Verwendete Zelllinien

2.3.2 Verwendete Bakterien-, Virus- und Toxoplasmenstämme

Spezies	Stamm/Genotyp	Referenzen
<i>C. trachomatis</i>	L2/434/Bu (LGV), ATCC#VR-902B	AG Hegemann, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
<i>E. coli</i> DH5α	supE44, ΔlacU169, (Φ80lacZΔM15), relA1; hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA; Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> Rosetta	Rosetta 2(DE3)pLysS, Chloramphenicol	Novagen, Merck, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ΔM157-eGFP-MCMV	ΔM157, exprimiert GFP unter Kontrolle des minimal CMV Promotors innerhalb der m157 Genomregion, zuvor beschrieben von Doring <i>et al.</i> (2014)	AG Trilling, Universitätsklinikum Essen
ΔM27-eGFP-MCMV	ΔM27 (Zimmermann <i>et al.</i> , 2005), exprimiert GFP unter Kontrolle des minimal CMV Promotors innerhalb der	AG Trilling, Universitätsklinikum Essen

Material

m27 Genomregion		
<i>Toxoplasma gondii</i>	ME49, Typ II Stamm, wildtyp	ATCC, Manassas, Virginia, USA; Parmley et al., 1994

Tab. 14 Verwendete Bakterien-, Virus- und Toxoplasmenstämme

2.4 Vektoren, Oligonukleotide und Lentiviren

2.4.1 Plasmide

Die erfolgreiche Klonierung generierter Plasmide wurde mittels Restriktions- und Sequenzierungsanalysen überprüft. Die Sequenzierung zur Überprüfung wurde vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt.

2.4.2 Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pLP/VSVG	kodiert Hüll VSV-G Glykoprotein für Lentivirus-Herstellung, CMV-Promotor, Amp ^R	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
pPAX2	Verpackungsvektor: kodiert Gag, Env und Pol für Lentivirus-Herstellung, CAG-Promotor, Amp ^R	(Zufferey et al., 1998), Trono Lab
pQE80L	Expressionsvektor: T5 Promotor, lac-Operator, Amp ^R	Qiagen, Hilden
pWPXL-GFP w/o stop	GFP ohne Stopp-Codon, EF1-Promotor, Amp ^R	(Konermann, 2008)
pWPXL-mCherry	mCherry mit Stopp-Codon, EF1-Promotor, Amp ^R	(Kravets et al., 2016), AG Pfeffer, Düsseldorf
pWPXL-mCherry w/o stop	mCherry ohne Stopp-Codon, EF1-Promotor, Amp ^R	(Kravets et al., 2016), AG Pfeffer, Düsseldorf
pWPXL-mCherry-mGBP1	EF1-Promotor, Amp ^R	(Kravets et al., 2016), AG Pfeffer, Düsseldorf
pWPXL-mCherry-mGBP2	zwei stille Mutationen, EF1-Promotor, Amp ^R	(Kravets et al., 2016), AG Pfeffer, Düsseldorf
pWPXL-mCherry-mGBP3	EF1-Promotor, Amp ^R	(Kravets et al., 2016), AG Pfeffer, Düsseldorf
pWPXL-mCherry-mGBP5	EF1-Promotor, Amp ^R	(Kravets et al., 2016), AG Pfeffer, Düsseldorf
pWPXL-mCherry-mGBP6	EF1-Promotor, Amp ^R	(Kravets et al., 2016), AG Pfeffer, Düsseldorf
pWPXL-mCherry-mGBP7	EF1-Promotor, Amp ^R	AG Pfeffer, Düsseldorf
pWPXL-	EF1-Promotor, Amp ^R	AG Pfeffer, Düsseldorf

mCherry-mGBP8		
pWPXL-mCherry-mGBP9	EF1-Promotor, Amp ^R	AG Pfeffer, Düsseldorf
pPX458-mGBP9	pSpCas9(BB)-2A-GFP mit mGBP9-spezifischer sgRNA, CBh-Promotor, Selektionsmarker: Amp ^R , GFP	Feng Zhang Lab Plasmids (Addgene Plasmid ID: 48138)

Tab. 15 Verwendete Plasmide

2.4.3 Hergestellte Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Hergestellt durch
pQE80L-mGBP9	T5-Promotor, lac-Operator, Amp ^R	Lichte J.
pWPXL-GFP-mGBP9	EF1-Promotor, Amp ^R	Lichte J.
pWPXL-mCherry-mGBP10	EF1-Promotor, Amp ^R	Lichte J.

Tab. 16 Hergestellte Plasmide

2.4.4 Primer - Klonierungen

Primer-Name	Sequenz (5' - 3')
Ex3Del Primer Fw5	CTTCTTATAGCTTGGAATCCATCATTATG
Ex3Del Primer Rev8	CTCTCACTCTCTTGCTATCTTGCC
Fw Primer mGBP9 Aqua Cloning	CAAGTCCGACTCAGATCTGAGCTCAACTTCGAT ACCCAACCACAAATGGC
Fw Primer mGBP10 Aqua Cloning	CGGCATGGACGAGCTGTACAAGGAATCCCGGGT AACCCAACCACAAATGGCTC
mGBP6/10 Fw.2	CATGCTGCCATTTGAGGCTATG
mGBP6/10 Rev.1	GCCAATGTGTATATGAGTGT
mGBP8 Fw.1	GCCAGATGAAGCTACACAATGC
mGBP8 Rev.1	GTGGGTGCCAATAGTCAAAC
mGBP9 TA Fw	GTGAAGAAAGAGAAGGAGGCCACTGC
mGBP9 TA Rev	CCTTTGGCTGATACACAGCGTGCC
mGBP11 Fw.2	GTGAAAATACAGGCTGCCAGA
mGBP11 Rev.1	TCGAGAACCCAACTTCGCC
Rev Primer mGBP9 Aqua-Cloning	CAGAGGTTGATTATCATATGACTAGTCCCGGGTC ATTCCTTAAAAGTGAAGG
Rev Primer mGBP10 Aqua-Cloning	CCAGAGGTTGATTATCATATGACTAGTCCCTCATA AATGCTTTAGATAACGG

Tab. 17 Verwendete Primer – Klonierungen

2.4.5 Primer - Sequenzierungen

Primer-Name	Sequenz (5' - 3')
CRISPR-mGBP9 Fw	GTGAAGAAAGAGAAGGAGGCCACTGC
CRISPR-mGBP9 Rev2	CCTTTGGCTGATACACAGCGTGCC

Exon3Del Fw.5	CTTCTTATAGCTTGGAATCCATCATTATG
Exon3Del Rev_Mitte.2	GGTTATCTAGACGATGTAGCATGG
Exon3Del Rev.8	CTCTCACTCTCTTGCTATCTTGCC
M13 Fw	GTAAAACGACGGCCAG
M13 Rev	GGAAACAGCTATGACCATG
mGBP9 Oligo Primer Fw.4	GAGCATGTAGTTACCTTGATG
mGBP9 Oligo Primer Rev.2	CAAATAGGACTTCCCTGTACG
mGBP9Rev2	CAATAGCCACGACTACCACTGG
mGBP10 Seqfor2	CTGGTGACAACCTATGTGGATGC
middle_Fw	GATTGAACGTGACTACTGGC
middle_Rev	GCTCTATCTGCCTGCAGGATGG
pQE_Fwd	CGGATAACAATTTACACACAG
pQE_Rev	GTTCTGAGGTCATTACTGG
Seq_pWPXL/GFP Fw	GATCACTCTCGGCATGGACG
Seq_pWPXL/mCherry Fw	CCACAACGAGGACTACACCATCG
Seq_pWPXL/WPRE Rev.1	CCACATAGCGTAAAAGGAGC

Tab. 18 Verwendete Primer – Sequenzierungen

2.4.6 Primer und Sonden – RT-PCR

Alle Primer wurden von Metabion International AG synthetisiert, als aufgereinigte, entsalzene und lyophilisierte Stocks geliefert und mit einer finalen Konzentration von 100 pmol/ μ l in ddH₂O gelöst. Die Sonden wurden aus der Universal Probe Library der Firma Roche (Sonden-Nr.) bezogen oder ebenfalls von Metabion International AG synthetisiert.

Primer/ Sonde	Sequenz (5'-3')	Zugehörige Sonden
β-Aktin Fw	TGA CAG GAT GCA GAA GGA GA	#106
β-Aktin Rev	CGC TCA GGA GGA GCA ATG	
CT-Fw omp1	GGT TTC GGC GGA GAT CCT	CT-Probe
CT-Rev2 omp1	AGT AAC CCA TAC GCA TGC TGA T	omp1 FAM
CT-Probe omp1 FAM	6-Fam-CTT GCA CCA CTT GGT GTG ACG C- BHQ-1	
mIFNβ Fw	CAG GCA ACC TTT AAG CAT CAG	#95
mIFNβ Rev	CCT TTG ACC TT CAA ATG CAG	
mGBP1 Fw	CAG ACT CCT GGA AAG GGA CTC	#41
mGBP1 Rev	CTT GGA CCT GGA ACA TTC ACT GAC	
mGBP2 Fw	TGA GTA CCT GGA ACA TTC ACT GAC	#17
mGBP2 Rev	AGT CGC GGC TCA TTA AAG C	
mGBP3 Fw	GGC TGA GGA CTG TCC CTG T	#21
mGBP3 Rev	CAT GGT CCA CTC GGA AGC	
mGBP5 Fw	TCA CTG AAG CTG AAG CAA GG	#48
mGBP5 Rev	GCG TCA AAA ACA AAG CAT TTC	
mGBP6/10 Fw	ATA TTT CAA CAT TTT TTG TTC CTT GT	#6TM
mGBP6/10 Rev	GAA ATG GGA GAA AAA ATA AAT GAA GC	
mGBP7 Fw	GCA GAG AAT CCG GTG CAG	#93
mGBP7 Rev	TTT CCA CTA GGC ACA CAG GA	

mGBP8 Fw	AAG AAG CTG AAG GAA CAA AAG GC	#8TM
mGBP8 Rev	GAA ATG GGA GAA AAA ATA AAT GAA GC	
mGBP9 Fw	TTC CAA AAC TTT CTC CAG TCA CAG TA	#9TM
mGBP9 Rev	GGC ACG CTC CTC TGC AA	

Tab. 19 Verwendete Primer und Sonden - RT-PCR

2.4.7 Weitere Oligonukleotide

Oligonukleotide	Sequenz
guideRNA	TTTGCAGGGGTAGTCTACCA
guideRNA.1	TGAACAGCTGTTGGTGAACC
guideRNA.2	CCAATTGTTGTTCTGTCCAA
mGBP9 Sonde Southernblot	CTCCTGCCACTAGAAGTGCTGCCCGCCTACATGAGGTAGCC ATTCAGGCTCCATATCCCTCCCTGCTAGGAGTCTCAGCTA GGGTCACCCCTGTGTCCTCCTAGGAATCTCCCCTATCTGTC TCCAGCTTGTCCAAGAGATGCTGCCCCCTAAGTTTACCTT CTCTTTCTCCCACCCCTCTTATCCCCCACACCCGATCCCCTA CAACTGAACTCCTGCACACCTGATCCCCAACCTGATCCCC ACATATGATTTCCACACCTGATTCCCCAACCTGTTCTTCC CATCCCCATCCCCATCCCCATCCCCATCCCCCTTTCCACCC AGTTCCCTCTCTCCATCTACTTCTGATTTCTAATTTATGTCT CCTTCTGAGTGAGAGTCAAGCATC
ssDNA Fragment (1. Ansatz)	GAGAGTAGCCCATGTGTTACCAAATCTTCTTTAGAACATTG AAGAATAGTGAAGAAAGAGAAGGAGGCCACTGCAGACTG GAGGTTACACACTGCCATGGTAGACTACCCCTGCAAAGAG GAAATCTACAAAGGTGAATTCGTCGGCATCAGTGGCACCA ACTGGTCTTAGCTGCTGAGCCATTGGGTGTCTGTGAGGCAG AGAATGACTTTAGACTCTTTCTCCTATCATAGATTTGTGTA TGTTGGCAGATTGCTATGACCCAACCACAAATGGCTCCATT TGTCTTGTGGAAAACCACAATGAACAGCTGTTGGTGAACC AGGAAGCCATAGAGATTCTGGAGAAGATTTCTCAGCCAGT GGTAGTC
ssDNA Fragment (2. Ansatz)	CATCCTGACATAGATTTTACCCCATAGTTCTTGGTTCATTG ATCTTCGGACTGGCTTCAACAATGGCACACAGGGTGTGTTT TTAAACTCCCATCATCAAACCTGTTATTGATTGTCTT

Tab. 20 Weitere verwendete Oligonukleotide

2.4.8 Lentiviren

Hergestellte Lentivirus-Überstände wurden für die lentivirale Transduktion der hier genannten Zielgene verwendet.

Spender	Empfänger	Ausgangsvektor	Insert
Aequorea victoria	Lentivirus	pWPXL-GFP-mGBP9	GFP- mGBP9
Mus Musculus			
Discosoma sea anemonas	Lentivirus	pWPXL-mCherry	mCherry

Material

Discosoma sea anemonas Mus Musculus	Lentivirus	pWPXL-mCherry-mGBP1	mCherry- mGBP1
Discosoma sea anemonas Mus Musculus	Lentivirus	pWPXL-mCherry-mGBP2	mCherry- mGBP2
Discosoma sea anemonas Mus Musculus	Lentivirus	pWPXL-mCherry-mGBP3	mCherry- mGBP3
Discosoma sea anemonas Mus Musculus	Lentivirus	pWPXL-mCherry-mGBP5	mCherry- mGBP5
Discosoma sea anemonas Mus Musculus	Lentivirus	pWPXL-mCherry-mGBP6	mCherry- mGBP6
Discosoma sea anemonas Mus Musculus	Lentivirus	pWPXL-mCherry-mGBP7	mCherry- mGBP7
Discosoma sea anemonas Mus Musculus	Lentivirus	pWPXL-mCherry-mGBP8	mCherry- mGBP8
Discosoma sea anemonas Mus Musculus	Lentivirus	pWPXL-mCherry-mGBP9	mCherry- mGBP9
Discosoma sea anemonas Mus Musculus	Lentivirus	pWPXL-mCherry-mGBP10	mCherry- mGBP10

Tab. 21 Hergestellte Lentivirus-Überstände

2.4.9 Software

Software
Adobe Illustrator
Bio-Rad CFX Manager 3.1 & 2.1
EndNote X9
GASBOR
GelDoc
Geneious 5.5.6
Graphpad Prism 5/8
HEXplorer Score Tool
Imaris Bitplane
Microsoft Office 2010
Phyre2
PyMOL
Zen 3.0 (blue, grey)

Tab. 22 Verwendete Software

2.5 Statistische Analyse

Die Ergebnisse sind wie im Einzelnen beschrieben als Mittelwerte \pm SD oder SEM dargestellt. Der Two-way ANOVA Test oder der ‚*Multiple t-test*‘ wurden verwendet, um die statistische Signifikanz zu ermitteln. Statistische Tests wurden mittels GraphPad Prism 8.4.3 durchgeführt und Signifikanzen folgendermaßen festgelegt (p-Wert Stil: NEJM):

$p < 0,033$ entspricht *

$p < 0,002$ entspricht **

$p < 0,001$ entspricht ***

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien

Für die Kultivierung adhärenter Zelllinien wurden Oberflächen-beschichtete Zellkulturgefäße (Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen oder X-Well Platten) verwendet. Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen gehalten und bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 10 % CO₂ inkubiert.

3.1.1.1 Fibroblasten

Bei einer Konfluenz von 80 – 100 % der Zellen (murine embryonale Fibroblasten (MEFs), NIH/3T3 Fibroblasten) wurde das Medium dekantiert und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Behandlung mit Trypsin/EDTA (0,25 %) für 3 min bei 37°C. Nach dem Ablösen der Zellen wurde das Trypsin durch die Zugabe von FKS-haltigem Medium inaktiviert und die Zellen vereinzelt. Zum Entfernen des Trypsins erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm. Das Trypsin-haltige Medium wurde dekantiert und die Zellen in frischem Medium vorsichtig resuspendiert. Je nach Konfluenz und Kulturgefäß wurden die Zellen 1:5 – 1:20 ausgesät.

3.1.1.2 Mitomycin C-Behandlung von murinen embryonalen Fibroblasten

Die Behandlung der Fibroblasten erfolgte bei einer Konfluenz von 80 – 100 %. Dazu wurde das Medium dekantiert und 2 mg/500 ml Mitomycin C-haltiges EF-Medium auf die Zellen gegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 2½ h bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 10 % CO₂. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Je nach Bedarf wurden die Mitomycin C-behandelten Zellen nach 3.1.1.1 auf Zellkulturschalen oder X-Well Platten verteilt. MEFs können nach der Behandlung 7 – 8 Tage verwendet werden.

3.1.1.3 Murine Embryonale Stammzellen

Murine embryonale Stammzellen (ES Zellen) wurden auf einer mit Mitomycin C vorbehandelten (s. 3.1.1.2) MEF-„Füttererschicht“ (engl. ‚Feederlayer‘) ausgesät. Ab dem

Methoden

Tag des Auftauens der ES Zellen erfolgte ein Mediumwechsel bzw. ein Resplitten der Zellen im täglichen Wechsel. Dafür wurde das Medium zunächst von den Zellen abgesaugt. Für das Resplitten wurden die ES Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,05 % Trypsin/EDTA behandelt. Nach wenigen Sekunden Inkubationszeit wurde das Trypsin wieder von den Zellen abgesaugt und die Zellkulturgefäße für ca. 3 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde das restliche Trypsin durch die Zugabe von FKS-haltigem ES Zell-Medium inaktiviert und die Zellen durch vorsichtiges Resuspendieren vereinzelt. Die Zellen konnten in demselben Gefäß kultiviert oder auf ein neues Zellkulturgefäß mit einem frischen *Feederlayer* überführt werden.

3.1.2 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Das Einfrieren der Zellen erfolgte in entsprechendem Einfriermedium (ES Zellen: 80 % ES Medium + 10 % FCS + 10 % DMSO; alle anderen Zelllinien: 90 % FCS + 10 % DMSO). Die Zellen wurden dafür nach 3.1.1.1 vereinzelt und anschließend $1 - 2 \times 10^6$ Zellen pro 1 ml Einfriermedium aufgenommen. Für den Einfrierprozess wurden je 1 ml der Zellsuspension in ein vorgekühltes Kryogefäß überführt und für 30 min bei -20°C und anschließend ü. N. bei -80°C eingefroren. Schließlich wurden die Zellen für die Langzeitkonservierung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Der Auftauprozess erfolgte zügig bei RT durch das Pipettieren von PBS auf die Zellen. Um das toxische DMSO zu entfernen, wurden die Zellen für 5 min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert, das Medium dekantiert und schließlich frisches Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden auf ein entsprechendes Zellkulturgefäß überführt.

3.1.3 Transfektion

3.1.3.1 Transfektion von ES Zellen mittels Elektroporation

JM8.a3 ES Zellen wurden trypsiniert (3.1.1.3) und in frischem Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, das Medium abgenommen und die Zellen in frisches Medium überführt. Mittels Neubauer-Zählkammer wurde die Konzentration der Zellsuspension bestimmt und eine Zellzahl von 5×10^4 oder 1×10^5 in 75 µl ES Medium aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend zusammen mit den Komponenten des CRISPR/Cas9 Genom-Editierungssystems in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette

überführt. Die Elektroporation wurde am Bio-Rad Gene Pulser II mit folgenden Parametern durchgeführt:

Spannung	300 V
Kapazität	250 μ F
Puls	1x
Polarität	unipolar

Tab. 23 Elektroporationsparameter – ES Zellen

Unmittelbar nach der Elektroporation wurden die Zellen pro Küvette auf zehn 10 cm Schalen mit frischen *Feeder*-Zellen und komplettem ES Zell Medium überführt.

3.1.3.2 Transfektion von NIH/3T3 Fibroblasten mittels jetPRIME®

Zur Transfektion von NIH/3T3 Fibroblasten wurden die kultivierten Zellen zunächst trypsiniert (3.1.1.1) und mit Hilfe einer Neubauerzählkammer die Zellzahl bestimmt. Je $1 - 2 \times 10^6$ Zellen wurden auf zwei 10 cm Zellkulturschalen in 10 ml Medium ausgesät. Anschließend wurden pro Schale 490 μ l jetPRIME® Puffer mit 10 μ l Plasmid-DNA (ca. 10 μ g) in einem Eppendorf-Reagenzgefäß für 10 sek. kurz gevortext und abzentrifugiert. Danach wurden 20 μ l jetPRIME® Reagenz hinzugegeben, der Ansatz erneut gevortext und wieder abzentrifugiert. Zuletzt erfolgte eine Inkubation von 10 min, bevor der Ansatz in das Medium der 10 cm Zellkulturschalen verteilt wurde. Die Zellen wurden für 48 h, bei 37°C inkubiert.

3.1.4 Lentivirale Transduktion zur Herstellung stabiler Zelllinien

Zur Generierung der Lentiviren wurden ca. 1×10^6 Zellen 293FT HEK Zellen nach zweimaligem Passagieren auf einer T75 Zellkulturflasche ausgesät. Bei einer Konfluenz von 60 – 80 % wurden die HEK Zellen mit den folgenden drei Plasmiden mittels jetPRIME® (3.1.3.2) transient transfiziert und von nun an unter S-2 Bedingungen kultiviert:

Vektor mit Zielgen	5 μ g
pLP/VSVG Plasmid	3,75 μ g
psPAX2 Plasmid	1,25 μ g

Tab. 24 Verwendete Plasmide zu Herstellung von Lentivirus-Überstand

Am Folgetag wurden die Ziel-Zellen (NIH/3T3 Fibroblasten: 3×10^4 Zellen) auf zwei Wells einer 24-Well Platte ausgesät. Bei einer Konfluenz von 100 % wurden die Ziel-Zellen stabil

Methoden

transduziert. Dafür wurde der Virus-haltige Überstand der 293FT HEK Zellen zunächst abgenommen, in ein 15 ml Falcon-Reagenzröhrchen überführt und für 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Danach wurden 500 µl des Überstands mit 2,5 µl Polybrene gemischt, auf die Zielzellen pipettiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Der übrige Virusüberstand wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur nächsten Verwendung bei -80°C gelagert. Die 24-Well Platten wurden anschließend für 99 min bei 1200 rpm und 30°C zentrifugiert. Darauf folgte eine 5 – 6stündige Inkubation bei 37°C. Schließlich wurde der Überstand abgenommen, durch 1 ml frisches Medium ersetzt und die Zellen für 72 h bei 37°C inkubiert. Die Transduktion wurde via Analyse am Fluoreszenzmikroskop überprüft. Nach zweimaligem Passagieren war die Kultivierung wieder unter BSL-1 Bedingungen möglich. Die positiven Zellen wurden dann mittels BD FACS Aria™ IIu selektioniert, anschließend weiterkultiviert und für die Langzeitkonservierung eingefroren.

3.1.5 Kultivierung von *C. trachomatis*

C. trachomatis Serovar L2 wurde von Katja Mölleken aus der AG Hegemann (HHU) zur Verfügung gestellt (Moelleken et al., 2008). Aufgereinigte chlamydiale Elementarkörperchen wurden nach der Übergabe direkt in SPG Puffer aufgenommen und bei -80°C in Aliquoten gelagert.

3.1.6 *In vitro*-Infektion mit *C. trachomatis*

C. trachomatis Infektionen wurden mit NIH/3T3 Fibroblasten (WT, mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO}, doppelt-transduziert) durchgeführt. 1×10^5 Zellen wurden dazu auf Deckgläschen (Ø 13mm, No 1.5) oder 5×10^5 Zellen in Wells einer 6-Well Platte ausgesät. In einigen Durchführungen wurden die Deckgläschen zunächst mit Fibronectin beschichtet. Dazu wurden 10 – 40 µg/100 µl PBS einer Fibronectin-Lösung auf die Deckgläschen pipettiert und für mind. 30 min inkubiert. Vor dem Aussäen der Zellen wurden die Deckgläschen 3× mit PBS gewaschen. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen mit *C. trachomatis* mit einer nominellen Infektionsvielfzahl (engl. ‚multiplicity of infection‘, MOI) von 0,25 oder 0,5 infiziert. Danach wurden die Zellen für 3 h bei 37°C und 6 % CO₂ in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre inkubiert. Ca. 3 h nach der Infektion wurden die Zellen mit 100 – 400 U/ml IFN γ stimuliert und bei 37°C inkubiert. Die Infektion wurde nach 12, 24 oder 42 h durch Fixierung der Zellen (3.1.9) oder Zelllyse (3.2.2.2) gestoppt.

3.1.7 Kultivierung von *Toxoplasma gondii*

Zur Kultivierung des intermediär virulenten *T. gondii* Typ II Stamms ME49 wurden humane HS27 Fibroblasten in einer T25 Zellkulturflasche mit 1×10^6 Tachyzoiten infiziert. Nach Erreichen des lytischen Stadiums wurde der Überstand mit den ausgestiegenen Parasiten abgenommen und für 5 min bei 700 rpm zentrifugiert. Die abzentrifugierten Zellrückstände wurden verworfen und der Überstand mit den Parasiten nochmals für 15 min bei 1400 rpm abzentrifugiert. Das Medium wurde dekantiert und *T. gondii* anschließend in frischem Medium aufgenommen. Schließlich wurde die Parasitenzahl per Neubauer Zählkammer bestimmt und für die Infektion neuer HS27 Fibroblasten zur Weiterkultivierung oder für weitere Experimente verwendet.

3.1.8 *In vitro*-Infektion mit *T. gondii*

1×10^4 NIH/3T3 Fibroblasten wurden am Vortag auf Deckgläschen in Wells einer 24-Well Platte ausgesät und mit 100 U/ml IFN γ ü. N. stimuliert. Die Zellen wurden schließlich mit einer MOI von 1 für 24 h infiziert und bei 37°C inkubiert. Die Infektion wurde schließlich durch Fixierung der Zellen gestoppt (3.1.9).

3.1.9 Immunfluoreszenzfärbung zur konfokalmikroskopischen Analyse

Infizierte NIH/3T3 Fibroblasten (3.1.6, 3.1.8) wurden vorsichtig mit PBS gewaschen und mit PFA (4 %) für 10 min fixiert. In Abhängigkeit der Infektion wurden folgende Färbeprotokolle durchgeführt:

Färbung von *T. gondii* infizierten Zellen:

(Nach jedem Schritt wurden die Zellen 2 – 3 \times sehr vorsichtig mit PBS gewaschen.)

Zeit	Arbeitsschritt
15 min	Permeabilisierung mittels Permeabilisierungslösung
20 min	Blockierung mittels Blockierlösung
45 min	Antikörperlösung mit prim. Antikörper SAG1 (1:700)
45 min	Antikörperlösung mit sek. Antikörper AlexaFluor633 (1:200)
3 min	DAPI (1:1000) in PBS
	Eindeckeln mit Fluoromount-G TM
ü. N.	Trocknen lassen

Tab. 25 Arbeitsschritte und Inkubationszeiten zur Immunfluoreszenzfärbung von *T. gondii*

Methoden

Färbung von *C. trachomatis* infizierten Zellen:

(Nach jedem Schritt wurden die Zellen 2 – 3× sehr vorsichtig mit PBS gewaschen.)

Zeit	Arbeitsschritt
5 min	Permeabilisierung mittels Methanol
1 h	Blockierung mittels 2 % Ziegen-Serum in PBS
1 h	Prim. Antikörper Maus-anti-MOMP (1:50) in PBS
45 min	Sek. Antikörper Ziege-anti-Maus-AlexaFluor647 (1:100) in PBS, im Dunkeln
3 min	DAPI (1:1000) in PBS Eindeckeln mit Fluoromount-G™
ü. N.	Trocknen lassen

Tab. 26 Arbeitsschritte und Inkubationszeiten zur Immunfluoreszenzfärbung von *C. trachomatis*

3.1.10 *In vitro*-Infektion mit MCMV

NIH/3T3 Fibroblasten wurden nach 3.1.1 kultiviert. 96-Well Mikroplatten wurden mit ca. 50 µl einer 0,01 %igen Poly-L-Lysin Lösung beschichtet. Die Wells wurden mit der Lösung für mind. 30 min bei RT inkubiert und das Poly-L-Lysin anschließend abgenommen. Danach erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils 100 µl PBS. Zuletzt wurden die Platten bei RT getrocknet. Vorbereitend für das Aussäen der Zellen wurde die Konfluenz der NIH/3T3 Fibroblasten in den Zellkulturgefäßen bestimmt, die Zellen nach 3.1.1.1 gelöst und auf eine Konzentration von 10 – 20 % Konfluenz/Well einer 96-Well Mikroplatte/50 µl herunterverdünnt. Danach wurden 50 µl Zellsuspension pro Well ausplattiert und für ca. 1 – 2 h bei 37°C im Inkubator zum langsamen Sedimentieren stehen gelassen. Anschließend wurden die Fibroblasten mit murinem Typ I oder Typ II Interferon stimuliert oder blieben unstimuliert. 50 µl Medium mit IFN α (U/ml), IFN β (U/ml) oder IFN γ (500 U/ml) wurden dafür auf die ausgesäten Zellen pipettiert und diese für 12 – 24 h oder 36 – 48 h vor der Infektion prä-inkubiert. Je ein Well pro Zelllinie, Virus und Viruskonzentration wurde mit Ruxolitinib oder mit Ruxolitinib und IFN γ (500 U/ml) parallel dazu prä-inkubiert. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurden die Zellen mit 1000 Plaque-formierenden Einheiten (engl. ‚*plaque-forming units*‘, PFU) Δ M157-eGFP-MCMV oder Δ M27-eGFP-MCMV infiziert. Dafür wurden 50 µl Medium mit 1000 PFU des jeweiligen Virus auf die Zellen pipettiert und die Platten für 2 × 15 min bei 2000 rpm (931× g) zentrifugiert. Zwischen den Zentrifugationsschritten wurden die 96-Well Mikroplatten um 180° in der Zentrifuge gedreht. Die Infektion wurde danach über 72 h beobachtet und alle 24 h Fluoreszenzaufnahmen mittels

BioReader 7000 Fz von den Mikroplatten erstellt. Abschließend wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und die Fluoreszenzintensität mittels Multimode Reader gemessen.

3.1.11 Co-Lokalisationsberechnung mittels ImarisColoc

In der Fluoreszenzmikroskopie beschreibt die Co-Lokalisation die gleiche räumliche Lokalisation z. B. zweier Fluorochrome oder Fluorophor-markierter Proteine. ImarisColoc verwendet einen Algorithmus zur Quantifizierung dieser Co-Lokalisation (Costes et al., 2004), führt automatisch statistische Analysen durch und visualisiert die Co-Lokalisation in einem separaten Coloc-Kanal. Für die Berechnung der Co-Lokalisation wurde die Hintergrundfluoreszenz zunächst maskiert, um falsch-positive Ereignisse zu vermeiden. Die Strahlungsgrenzwerte der verschiedenen Fluoreszenzsignale aus den Multikanal-Datensätzen wurden danach für den jeweiligen Vergleich durch den Algorithmus berechnet. Die in dieser Forschungsarbeit vorgestellten Co-Lokalisationsanalysen wurden alle mittels ImarisColoc durchgeführt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 CRISPR/Cas9 Genom-Editierungssystem

Zur Induktion einer mGBP9-Defizienz wurde das CRISPR/Cas9 Genom-Editierungssystem verwendet. Die CRISPR/Cas9-Komponenten wurden entweder als Synthese-Produkte, hergestellt durch die Firma IDT-DNA, oder auf einem Plasmid kodiert in die entsprechenden Zelllinien transfiziert (3.1.3.1 o. 3.1.3.2).

3.2.1.1 CRISPR/Cas9 in murinen ES Zellen

Für die Experimentalansätze in ES Zellen wurden die synthetisierten CRISPR/Cas9-Komponenten und ein an die Zelllinie angepasstes Protokoll der Firma IDT-DNA verwendet.

Zur Herstellung des RNA-Duplex (gRNA) wurden 10 µl Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA (200 µM) und 10 µl Alt-R CRISPR-Cas9 tracrRNA (200 µM) zusammen pipettiert (Endkonz. der RNAs: 100µM), für 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend wieder auf RT abkühlen gelassen. Der frisch hergestellte RNA-Duplex wurde mit Alt-R S.p. HiFi Cas9 Nuklease 3NLS (Konz.: 61 µM) in einem molaren Verhältnis von 1:1,2 gemischt. Zusätzlich wurde ein

Methoden

in PBS gelöstes, einzelsträngiges Oligo-DNA-Fragment (engl. ‚*single-stranded*‘, ssDNA-Fragment) hinzu pipettiert.

Ansatz:

RNA-Duplex (gRNA)	12 µl	(20 µM)
Cas9-Nuklease	16,7 µl	(24 µM)
ssDNA	21,3 µl	(70 nM)

Tab. 27 Vol./Konz. der CRISPR/Cas9 Komponenten

Der Ansatz wurde für 20 min bei RT zur Ausbildung des Ribonukleoprotein-Komplexes (RNP-Komplex) inkubiert und anschließend bis zur Elektroporation auf Eis gelagert.

1×10^5 ES Zellen wurden nach 3.1.3.1 vorbereitet, zusammen mit dem CRISPR/Cas9-Ansatz in eine vorgekühlte Kuvette überführt und elektroporiert. Schließlich wurden die ES Zellen auf zehn 10 cm Schalen mit *Feeder*-Zellen überführt.

Vorbereitung zur ersten CRISPR/Cas9-Strategie (4.1.1):

Zur Herstellung des RNA-Duplex (sgRNA) wurden in separaten Reaktionsgefäßen 5 µl zweier crRNAs mit jeweils 5 µl tracrRNA zusammen pipettiert (Endkonz. der RNAs: 100µM), für 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend wieder auf RT abkühlen gelassen.

Die RNA-Duplex wurden mit der Cas9-Nuklease (Enzym-Konz.: 61 µM) in einem molaren Verhältnis von 1:1,2 vermischt.

Ansatz:

sgRNA	13,5 µl
Cas9-Nuklease	18 µl

Tab. 28 Eingesetzte Volumina zur Herstellung des RNP-Komplexes: Strategie 1.

Vorbereitung zur zweiten CRISPR/Cas9-Strategie (4.1.2):

Die bereits synthetisierten sgRNAs (sgRNA.1, sgRNA.2) wurden mit der Cas9-Nuklease (Enzym-Konz.: 61 µM) in einem molaren Verhältnis von 1:1,2 vermischt.

Ansatz:

sgRNA.1	6,75 µl
sgRNA.2	6,75 µl
Cas9-Nuklease	18 µl

Tab. 29 Eingesetzte Volumina zur Herstellung des RNP-Komplexes: Strategie 2

Parallel dazu wurden 2 μ l HDR-Enhancer (3 mM) in 173 μ l ES Zell Medium auf 37°C vorgewärmt.

5×10^4 Zellen wurden nach 3.1.3.1 vorbereitet und folgender Transfektionsansatz hergestellt:

RNP-Komplex	30 μ l
ssDNA (100 μ M)	3,6 μ l
Elektroporations-Enhancer (100 μ M)	3,6 μ l
Zellsuspension (5×10^4 Zellen)	60 μ l
Medium	17,8 μ l

Tab. 30 Eingesetzte Volumina der CRISPR/Cas9 Elektroporations-Komponenten in ES Zellen

Die ES Zellen wurden nach 3.1.3.1 elektroporiert, anschließend zusammen mit dem vorgewärmten HDR-Enhancer in ein Reaktionsgefäß überführt und für ca. 30 min bei 37°C inkubiert. Schließlich wurden die ES Zellen auf zwölf 10 cm Schalen mit *Feeder*-Zellen überführt.

3.2.1.2 CRISPR/Cas9 in NIH/3T3 Fibroblasten

Die NIH/3T3 Fibroblasten wurden zunächst nach 3.1.1.1 in einer T25 Zellkulturflasche kultiviert und nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 90 % mit dem Plasmid PX458-mGBP9 mittels jetPRIME® transfiziert (3.1.3.2). Am Folgetag wurden die Plasmid-tragenden Zellen über den GFP-Selektionsmarker mittels des FACS Aria™ IIu sortiert und in Medium aufgenommen. Danach wurde die Zellzahl der GFP-positiven, sortierten Zellen in der Suspension bestimmt und auf 1 Zelle/100 μ l Medium herunterverdünnt. Anschließend wurden je 100 μ l der Verdünnung auf Wells einer 96-Well Platte verteilt. Die Wells wurden täglich mikroskopisch untersucht und Wells mit mehr als einer Start-Zelle oder keiner Zelle aus dem Screening genommen. Die übrigen Wells wurden weiterkultiviert und auf 48- und schließlich auf 24-Well Platten angezogen. Jeder Klon wurde nach Erreichen einer Konfluenz von 100 % auf zwei verschiedenen 24-Well Platten eingefroren und bei -80°C gelagert. Währenddessen wurde die genomische DNA jedes Klons aus Zellen auf einer 96-Well Platte isoliert (3.2.2.1), die DNA-Konzentration mittels NanoDrop 1000 bestimmt und schließlich per Sanger-Sequenzierung analysiert (3.2.14).

3.2.2 DNA-Isolation

3.2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen im CRISPR/Cas9 Screening

Zunächst wurde das Medium von den ES Zellen (Gelatine-beschichtete 96-Well Platte) abgesaugt. Anschließend wurden die ES Zellen 2x mit PBS (mind. 150 μ l) gewaschen, das PBS abgenommen und die Platten bei RT zum Antrocknen stehen gelassen. (Alternativ: bereits eingefrorene 96-Well Platten bei RT auftauen lassen). 50 μ l Lyse-Puffer (200 μ l ProteinaseK pro 5 ml *Tail-Buffer*) pro Well hinzugeben und ü. N. bei 56°C in einer Feuchte-Kammer (Plastikbox, ausgelegt mit feuchten Papiertüchern) unter Schütteln inkubieren lassen. Die Platten wurden am nächsten Tag aus der Feuchte-Kammer herausgenommen und für 30 min bei RT abkühlen gelassen. 100 μ l eiskaltes abs. EtOH wurden zum Fällern der genomischen DNA pro Well hinzugeben und für 1 h bei RT inkubiert. Auf Grund der Gelatine-Beschichtung konnte das EtOH anschließend ohne Zentrifugation wieder abgekippt werden. Danach wurde 2 \times mit 100 μ l eiskaltem EtOH (70 %) gewaschen und die Restflüssigkeit gut auf einem Stapel Papiertücher ausgeklopft. Die Platte wurde ca. 10 min. trocknen gelassen. In Abhängigkeit von der Größe des entstandenen DNA-Pellets wurden zunächst ca. 20-50 μ l dH₂O auf die DNA geben und für mindestens eine halbe Stunde bei 37°C schütteln gelassen. Wells mit ungelöster DNA wurden mit zusätzlichem dH₂O herunterverdünnt (ca. 50 – 100 μ l). Zuletzt wurde die DNA-Konzentration pro Well mittels NanoDrop 1000 bestimmt.

3.2.2.2 Isolierung genomischer DNA aus NIH/3T3 Fibroblasten

Zunächst wurde das Medium von kultivierten/infizierten NIH/3T3 Fibroblasten abgesaugt und diese zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Lyse-Puffer gelöst (ca. 500 μ l pro T25 Zellkulturflasche oder Well einer 6-Well Platte), in ein Eppendorfgefäß überführt und für 4 h, bei 37°C, unter Schütteln inkubiert. Danach wurde der Zelldebris abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die DNA wurde mit 500 μ l Isopropanol gefällt und für 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, die DNA mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Zuletzt wurde das Ethanol dekantiert, die Reste des Ethanols mit der Pumpe abgesaugt und schließlich das DNA-Pellet je nach Größe in 50 – 150 μ l dH₂O gelöst. Die Konzentration wurde mittels NanoDrop 1000 bestimmt.

3.2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien

Für die Isolierung wurden 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einem Zielploid-tragenden Bakterienstamm angeimpft und ü. N., bei 37°C, unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde entweder für die Plasmid-Isolierung im kleinen Maßstab (Mini Plasmid-Isolierung) oder aber zum Animpfen einer 200 ml Hauptkultur verwendet (Maxi Plasmid-Isolierung). Die Plasmid-DNA wurde entsprechend mit dem ZR Miniprep Kit oder dem Macherey-NagelTM NucleobondTM Xtra Maxi-Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die DNA-Sequenz wurde schließlich mittels Restriktionsanalyse (3.2.5) und Sanger-Sequenzierung (3.2.14) überprüft.

3.2.3 Kryokonservierung von prokaryotischen Zellen

Für die Langzeitkonservierung von *E. coli* Bakterien wurden 850 µl einer frischen Bakterienkultur mit 150 µl sterilem Glycerol (Endkonzentration 15 % v/v) gemischt und bei -80°C eingefroren.

3.2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden DNA-Moleküle oder genomische Sequenzabschnitte nach Mullis et al. (1987) vervielfältigt. Die PCRs wurden alle mit der High-Fidelity Polymerase durchgeführt. PCR-Ansätzen für die TA-Vektor Klonierung wurde zusätzlich Taq-Polymerase hinzugegeben (3.2.8.2). Folgende Komponenten wurden für die PCR-Reaktionen gekühlt in PCR-Reaktionsgefäße vor pipettiert.

Methoden

PCR-Ansatz:

DNA-Template	x μ l (100-400 ng)
Reaktion-Puffer (5x)	10 μ l
Primer Fw (10-20 pmol)	1 μ l
Primer Rev (10-20 pmol)	1 μ l
dNTP-Mix (10 mM)	1 μ l
DNA-Polymerase	0,5 μ l
ddH ₂ O	auf 50 μ l

Tab. 31 Allgemeiner PCR-Ansatz

Folgendes Standard-Programm wurde für die PCR-Reaktion verwendet. Die Temperatur der Primerhybridisierung musste entsprechend den verwendeten Primern angepasst werden. Die Elongationszeit wurde ebenfalls entsprechend der PCR-Produkt Größe angepasst mit $x = 1$ min pro 1000 Bp.

PCR-Programm:

PCR-Schritt	Temp. [°C]	Zeit [min]	Zyklen
DNA-Denaturierung	95	4	
DNA-Denaturierung (Folgezyklen)	95	0,5	25
Primerhybridisierung	55 – 65	0,5	
Elongation	72	x	
Finale Elongation	72	7-10	
Abkühlung/Lagerung	4	∞	

Tab. 32 Allgemeines PCR-Programm

Das jeweilige PCR-Produkt wurde schließlich mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert (3.2.7). PCR-Ansätze wurden ggf. mittels High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) umgepuffert oder Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigt und schließlich für Klonierungen (3.2.8) weiterverwendet.

3.2.5 Restriktionsanalyse

Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkt wurden durch die jeweils beschriebenen Restriktionsenzyme linearisiert oder fragmentiert. Die Restriktionen wurden dabei nach den Herstellerangaben des jeweiligen Restriktionsenzym durchgeföhrt.

Allgemeiner Restriktions-Ansatz:

DNA	x μ l
Puffer (10x)	2 μ l
Enzym	2-5 U / μ g DNA
dH ₂ O	auf 20 μ l

Tab. 33 Allgemeiner DNA-Restriktionsansatz

Mittels Agarosegel-Elektrophorese (3.2.7) wurden die Restriktionen schließlich analysiert.

3.2.6 Ligation

Die Ligation wurde als Teilprotokoll in der klassischen Klonierung durchgeführt. Dabei wurden DNA-Moleküle nach Restriktion mittels T4-Ligase Kit miteinander ligiert. Folgender Reaktionsansatz wurde dafür ü. N. bei 4°C inkubiert:

DNA-Fragment	3 μ l
lin. Vektor	1 μ l
Ligase-Puffer	2 μ l
T4-Ligase	1 μ l
dH ₂ O	20 μ l

Tab. 34 Allgemeiner Ligationsansatz

Das Ligationsprodukt wurde danach in *E. coli* DH5 α Zellen transformiert (3.2.9)

3.2.7 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Auftrennung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde eine analytische Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. In Abhängigkeit der Größe der Zielfragmente wurden dafür die jeweils angegebenen Agarose-Prozentigkeiten verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 50 ml, 150 ml oder 300 ml 1 \times TAE-Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Nachdem die gelöste Agarose auf handwärme abgekühlt war, wurden 2 μ l Ethidiumbromid pro 100 ml Agaroselösung hinzu pipettiert. Der Ansatz wurde in eine Gelkammer mit Kamm gegossen, für mind. 30 min bei RT aushärten gelassen. Die Auftrennung der DNA-Proben wurde anschließend in einer Elektrophoresekammer mit 1 \times TAE-Puffer durchgeführt. Dafür wurde der Kamm aus dem ausgehärteten Gel herausgezogen und das Gel in die Elektrophoresekammer überführt. Die DNA-Proben wurden mit 5 \times oder 10 \times DNA Ladepuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenkontrolle wurden 5 μ l des Markers ‚2-Log DNA Ladder‘ in mindestens

Methoden

eine Tasche pro Kamm pipettiert. Die Auftrennung erfolgte schließlich bei 90-120 V über 45 min bis 1,5 h.

- Das Gel wurde zuletzt im Gel Doc™ XR+ unter UV-Licht (325 nm) mittels integrierter Digitalkamera fotografiert.
- Um DNA-Fragmente aus dem Agarosegel zu isolieren, wurde das Gel auf eine Hand-UV-Lampe mit niedriger Intensität gelegt und die Ziel-Fragmente mittels eines Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Über das *Gel Extraction Kit* (ROCHE) konnte die DNA schließlich aus der Agarose aufgereinigt werden.

3.2.8 Klonierungsmethoden

3.2.8.1 Klassische Klonierung

Zur Generierung eines His₆-mGBP9 Fusionskonstrukts wurde die klassische Klonierungsmethode angewandt. Dafür wurde die mGBP9-Sequenz mittels der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Hind*III nach 3.2.5 aus dem pWPXL-GFP-mGBP9 Vektor und der Leervektor pQE80L nach gleichem Protokoll restringiert. Die Restriktionsverdau wurden überprüft und aufgereinigt (3.2.7). Die Ziel-Fragmente konnten über die klebrigen Enden (engl. ‚sticky ends‘) aneinander anlagern und anschließend mittels Ligation (3.2.6) zusammengefügt werden. Danach wurden die neugenerierten Plasmide zur Amplifizierung in den *E. coli* DH5α Stamm transformiert (3.2.9), wieder isoliert (3.2.2.3) und mittels Restriktionsverdau (3.2.5) und Sanger-Sequenzierung (3.2.14) nach positiven Klonen gescreent.

3.2.8.2 Klonierung von PCR-Fragmenten in den TA-Vektor

Bei dieser Art der Klonierung wurde ein PCR-Fragment mittels T(hymin)-Überhänge in den kommerziell erwerblichen pCR®2.1 Vektor integriert. Der Vektor wurde linearisiert geliefert und besitzt am 5‘- sowie am 3‘-Ende A(denin)-Überhänge. Ein Ziel-PCR-Fragment wurde wie in 3.2.4 beschrieben amplifiziert. Vor Beginn des letzten Elongationsschritts wurde dem Ansatz Taq-Polymerase hinzugegeben, um T-Überhänge an den Amplifikaten zu generieren. Danach wurde das PCR-Fragment mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigt. Nach folgender Gleichung wurde die Menge an PCR-Fragment für die anschließende Ligation berechnet:

$$x \text{ ng PCR Produkt} = \frac{y(\text{Bp PCR} - \text{Produkt}) \times (50 \text{ ng pCR}®2.1 \text{ Vektor})}{(\text{Größe in Bp des pCR}®2.1 \text{ Vektors: } \sim 3900)}$$

Anschließend wurde folgender Ligationsansatz zusammen pipettiert:

Isoliertes PCR-Produkt	x μ l
T4 Ligase Reaktionspuffer (5x)	2 μ l
pCR®2.1 Vektor (25 ng/ μ l)	2 μ l
dH ₂ O	auf 9 μ l
ExpressLink™ T4 DNA Ligase (5 Units)	1 μ l

Tab. 35 Allgemeiner Ligationsansatz

Der Ansatz wurde für 30 min – 1 h bei RT inkubiert und anschließend zur Amplifizierung des neugenerierten Plasmids in *E. coli* transformiert, wieder isoliert (3.2.2.3) und mittels Restriktionsverdau (3.2.5) und Sanger-Sequenzierung (3.2.14) nach positiven Klonen gescreent.

3.2.8.3 Klonierung mittels AQUA-Cloning

Die nach Beyer et al. (2015) entwickelte Klonierungsmethode stellte eine kostengünstigere Alternative im Vergleich zur klassischen Klonierung dar. Der Unterschied zwischen den Methoden besteht darin, dass im AQUA-Cloning keine Ligase verwendet wird. Die Integration eines PCR-Fragments in einen Vektor geschieht durch homologe Rekombination über homologe Sequenzbereiche jeweils am 5'- und am 3'-Ende des linearisierten Vektors bzw. des PCR-Fragments. Die homologe Rekombination wird durch die Zell-eigenen Enzyme der transformierten *E. coli* Bakterien durchgeführt.

Für das AQUA-Cloning wurde zunächst eine Ziel-DNA mittels spezifischer Primer amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden nach nachfolgendem Schema generiert. Die ca. 20 Basen langen Bereiche am 3'-Ende der Primer stellten den komplementären Bindungsbereich zum Ziel-Gen dar. Die ca. 30 Basen langen Bereiche am 5'-Ende der Primer stellten hingegen die homologen Bereiche zum jeweiligen 5'- und 3'-Enden des linearisierten Zielvektors dar. Für das AQUA-Cloning wurden PCR-Fragment und 12 ng/1000 Bp linearisierter Vektor in dH₂O (auf 10 μ l) und einem molaren Verhältnis von 3:1 (PCR: Vektor) gemischt und für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde der Ansatz in den *E. coli* DH5 α Stamm transformiert (3.2.9), die neugenerierten, amplifizierten Plasmide isoliert (3.2.2.3) und mittels Restriktionsverdau (3.2.5) und Sanger-Sequenzierung (3.2.14) auf positive Klone gescreent.

3.2.9 Transformation in *E. coli*

Für die Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* wurden chemo-kompetente Bakterien der Stämme DH5 α oder Rosetta verwendet. 10 μ l Zellsuspension wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Die zu integrierende Plasmid-DNA bzw. fragmentierte DNA wurden hinzugegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 45 s bei 42°C (Hitzeschock) inkubiert und unmittelbar danach wieder auf Eis gelegt. Anschließend wurden 250 μ l LB-Medium auf den Ansatz pipettiert und die Bakterien für 1 h bei 37°C unter schütteln (700 rpm) inkubiert. Zuletzt wurde der Ansatz auf eine LB-Agar Platte mit Antibiotikum entsprechend dem auf dem Plasmid kodierten Selektionsmarker ausgestrichen und bei 37°C ü. N. inkubiert.

3.2.10 RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen

ES Zellen oder NIH/3T3 Fibroblasten wurden nach entsprechendem Protokoll kultiviert. Bei ausreichend vielen ES Zell-Kolonien bzw. einer Konfluenz von 50 – 60 % der NIH/3T3 Fibroblasten wurden die Zellen für mindestens 16 h mit IFN γ stimuliert oder blieben unstimuliert. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert, in frischem Medium vereinzelt und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Trypsin-haltige Medium wurde dekantiert, die Zellen 1 \times mit PBS gewaschen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen in 1,2 ml Trizol lysiert und für 5 min bei RT inkubiert. 200 μ l Chloroform wurden hinzugefügt, die Ansätze vorsichtig geschüttelt und für 3 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Ansätze für 15 min bei 8000 rpm und RT zentrifugiert. Die obere Phase wurde daraufhin vorsichtig abgenommen und in ein frisches Eppi überführt. Zum Fällen der RNA wurde ca. das 0,7-fache Volumen an Isopropanol zu der abgenommenen Phase hinzugegeben. Die RNA wurde für 10 min bei 8000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 75%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 6000 rpm). Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und restliches Ethanol an der Luft evaporieren lassen. Das Pellet wurde schließlich in 100 μ l dH $_2$ O aufgenommen und die RNA für 10 min bei 56°C gelöst. Die RNA-Konzentration wurde am Nanodrop bestimmt und die RNA direkt für die cDNA-Synthese eingesetzt oder bei -80°C eingefroren.

3.2.11 cDNA-Synthese

Die cDNA wurde mittels SuperScript™ III Reverse Transcriptase Kit hergestellt. Für jeden RNA-Ansatz (3.2.10) wurde zunächst ein Mix aus RNA und Primern hergestellt:

RNA	10 µl (3 µg)
oligo dT Primer (10µM)	1 µl

Tab. 36 Herstellung eines RNA-Primer Mix

Die Ansätze wurden für 2 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Anschließend wurden zu jedem RNA-Oligo-Ansatz 9 µl eines Mastermix hinzugeben.

Mastermix:

cDNA dNTPs (10 mmol each)	1 µl
5x First Strand Buffer (Transkriptionspuffer)	4 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
RNase out	1 µl
Reverse Transcriptase (M-MLV, 200 units/µl)	1 µl

Tab. 37 Bestandteile des Mastermix aus der cDNA-Synthese

Die RNA-Mastermix Ansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Transcriptase durch Erhitzen der Ansätze auf 95°C für 5 min. Die Ansätze wurden auf Eis abgekühlt. Schließlich wurden 80 µl DEPC-H₂O hinzugegeben. Die finalen Ansätze wurden für die RT-PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

3.2.12 Realtime-PCR

Die Realtime-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode von Nukleinsäuren, die zeitgleich die Möglichkeit zur Quantifizierung in Echtzeit (*realtime*) bietet. Dafür werden u. a. Fluorophor-gekoppelte Sonden verwendet, deren Fluorophore zunächst gequencht vorliegen (TaqMan Sonden). Die Sonden binden komplementär an ssDNA Moleküle und werden durch die 5' – 3' Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Dadurch wird das gequenchte Fluorophor freigesetzt und kann als Reporter-Fluoreszenz gemessen werden. Die hier durchgeführten PCRs wurden nach nachfolgendem Schema durchgeführt.

Methoden

Pipettierschema:

Mastermix	12,5 µl
PrimerFw	0,3 µl
PrimerRev	0,3 µl
Sonde	0,5 µl
Wasser	6,4 µl
cDNA/DNA	5 µl

Tab. 38 RT-PCR Pipettierschema

Für Gen-Expressionsanalysen wurde für den Pipettieransatz die in 2.2.11 generierte cDNA verwendet. Analysen zur Chlamydien-Proliferation wurden mit isolierter DNA aus Chlamydien-infizierten Zellen durchgeführt (2.2.2.2).

PCR-Programm:

PCR-Schritt	Temp. [°C]	Zeit	Zyklen
DNA-Denaturierung	95	7 min	40
DNA-Denaturierung (Folgezyklen)	95	20 sek	
Primerhybridisierung u. Elongation	60	1 min	
Abkühlung/Lagerung	4	∞	

Tab. 39 RT-PCR Programm

3.2.13 Southern Blot Analyse

Mittels Southern Blot Analyse wurde in dieser Arbeit eine mGBP9-spezifische Deletionsmutation untersucht. Dafür wurde die genomische DNA zunächst aus zwei verschiedenen JM8.a3 ES Zelllinien isoliert (3.2.2.1) und nach nachfolgendem Protokoll fortgeföhren.

Verdau:

20 µg genomische DNA wurden mit hochkonzentriertem PstI Restriktionsenzym ü. N. restringiert (3.2.5).

Agarosegel-Auftrennung:

Der Restriktionsverdau wurde anschließend auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetragen und ü. N. bei 30 V aufgetrennt. Das Gel wurde mittels Gel Doc™ XR+ unter UV-Licht aufgenommen. Um die Abstände später auf dem Blot zwischen Geltasche, Marker und den Banden messen zu können, wurde vor der Aufnahme ein Lineal an das Gel angelegt.

Alkalischer Blot:

Das Gel wurde danach für 15 min in 0,25 N HCl auf einem Schüttler inkubiert, um größere DNA-Fragmente (>15 kbp) zusätzlich zu verdauen. Anschließend wurde das HCl abgekippt und das Gel für 30 min in 0,4 M NaOH auf einem Schüttler inkubiert, um die DNA zu denaturieren. Für die Übertragung der DNA aus dem Agarosegel auf eine Nylon-Membran wurde ein abwärtsgehender Blot aufgebaut. Dafür wurden zwei Papierstapel zwischen zwei Wannen mit 0,4 M NaOH platziert und 3x Whatmanpapier auf die Papierstapel gelegt. Auf das Whatmanpapier wurde eine in 0,4 M NaOH aktivierte Nylon-Membran (Hybond-N⁺) gelegt. Auf die Membran wurde das Agarosegel platziert und mit drei weiteren Whatmanpapieren bedeckt. Anschließend wurde ein querliegendes Whatmanpapier (Brücke) auf den Stapel aufgelegt, das in die beiden Wannen mit 0,4 M NaOH reichte. Zuletzt wurde eine Glasplatte auf dem Stapel platziert und mit einem Gewicht beschwert. Der DNA-Transfer wurde ü. N. (mind. 4 h) durchgeführt. Anschließend wurde das Konstrukt wieder abgebaut. Auf der beladenen Membran wurden mit einem Bleistift die Taschen durch das Gel hindurch markiert. Danach erfolgte eine kurze Inkubation der Nylon-Membran in 2x SSC auf einem Schüttler. Anschließend wurde die Nylon-Membran in Whatmanpapier getrocknet und für 30 min bei 80°C inkubiert, um die DNA auf der Membran quer zu vernetzen. Die Nylon-Membran konnte hiernach bei 4°C gelagert werden.

Hybridisierung:

Die Nylon-Membran wurde für die Hybridisierung mit etwas 2x SSC angefeuchtet. Zusätzlich wurden 5 – 10 ml ExpressHybTM Hybridisierungslösung hinzugegeben und die Membran für mind. 1 h bei 60°C prä-hybridisiert.

Sondenmarkierung:

Für die radioaktive Markierung der Sonde wurden zunächst 25 ng DNA-Sonde mit 2 µl Random-Primer (Ladderman Labeling Kit) vermischt und mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 16,5 µl gebracht. Der Ansatz wurde für 5 min auf 95 – 100°C erhitzt und direkt danach auf Eis abgekühlt. Danach wurde der Ansatz kurz herunterzentrifugiert und folgende Reagenzien hinzugegeben:

10x Puffer	2,5 µl
dNTP-Mix	2,5 µl
P ³² dCTP (1 MBq)	2,5 µl
Bca DNA-Polymerase	1 µl

Tab. 40 Ansatz für die Southern Blot Sondenmarkierung

Methoden

Der neue Ansatz wurde für 10 – 30 min bei 50 – 55°C inkubiert und zuletzt 100 µl ddH₂O hinzugegeben.

Abtrennung freier, ungebundener Nukleotide:

MicroSpin S-200 HR-Säulen wurden kurz gevortext, der Deckel angedreht und die Kappe an der Unterseite abgebrochen. Die Säule wurde in ein Eppendorf-Reagenzgefäß gestellt und für 3 min, bei 3000 rpm und RT zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein Twist Top Gefäß überführt und der Sonden-Ansatz mittig auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde erneut für 3 min, bei 3000 rpm und RT zentrifugiert.

Membranmarkierung:

Die Sonde wurde danach für 10 min auf 95°C erhitzt und dann auf Eis gestellt. Die ExpressHyb™ Lösung wurde teilweise von der Membran abgekippt und die Sonde in die restliche ExpressHyb™ Lösung gegeben. Die Nylon-Membran wurde schließlich mit der radioaktiv-markierten Sonde ü. N, bei 60°C inkubiert.

Waschen:

Die Hybridisierungslösung wurde danach in den Radioaktivmüll entsorgt, ca. 20 ml Wash1 Puffer (2x SSC, 0,05 % SDS) hinzugefügt, kurz geschwenkt und wieder abgekippt. Danach wurden erneut 20 ml Wash1 Puffer hinzugegeben und alles für 20 – 30 min bei 50°C inkubiert. Der Wash1 Puffer wurde abgekippt, Wash2 Puffer (0,1x SSC, 0,1 % SDS) hinzugegeben und die Membran für 20 min bei 55°C inkubiert. In einem letzten Waschschrift wurde der Wash2 Puffer ausgewechselt und die Membran für ca. 2 h bei 55°C inkubiert. Die Radioaktivität auf der Membran wurde gemessen (max. 30 – 80 cpm), die Membran in Frischhaltefolie eingepackt und mit einem Film in einer Licht-isolierten Filmkassette für 2 Tage bei -80°C gelagert.

Filmentwicklung:

In einer Dunkelkammer wurde der Film aus der Filmkassette entnommen und bis zum gewünschten Entwicklungsgrad in Entwicklerlösung geschwenkt. Danach wurde der Film in H₂O kurz gewaschen, anschließend in Fixierlösung überführt und dort für ca. 10 min unter Schwenken inkubiert. Zuletzt wurde der Film in frischem H₂O für ca. 10 min unter Schwenken gewaschen und für mind. 20 min im Trockenschrank getrocknet.

3.2.14 Sanger-Sequenzierung

DNA-Sequenzanalysen wurden vom Genomics & Transcriptomics Laboratory des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität (HHU) Düsseldorf mittels Sanger-Sequenzierung (Sanger et al., 1975) durchgeführt.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Protein-Isolation von Gesamtprotein aus eukaryotischen Zellen

Um die Gesamtproteine aus eukaryotischen Zellen zu isolieren, wurden die jeweiligen Zelllinien (NIH/3T3 Fibroblasten, ES Zellen) zunächst nach 3.1.1 kultiviert und entsprechend den Angaben mit Typ II IFN behandelt oder unbehandelt gelassen. Für die Lyse wurden die Zellen trypsiniert, mit PBS gewaschen und in 30 – 50 µl DISC-Lysepuffer aufgenommen. Nach dem Transfer der Lysepuffer-Zell-Suspension in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß wurde der Ansatz gut resuspendiert. Daraufhin wurde der Ansatz für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde im nächsten Schritt in ein neues Eppendorfgefäß überführt und der Zelldebris verworfen. Die Proteinproben wurden entweder weiterverwendet, bei 4°C für einige Tage oder bei -20°C für einen längeren Zeitraum gelagert.

3.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde entweder mittels NanoDrop 1000 oder zur präziseren Bestimmung mittels Pierce BCA Protein Assay Kit gemessen. Das Kit wurde nach Angaben des Herstellers verwendet und die Proben mittels Photometer gemessen.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Protein-Proben wurden mit einem 5× Protein-Ladepuffer gemischt (Protein-Endkonz.: 3-5 µg/10 µl) und für 10 min bei 95°C erhitzt. In der Zwischenzeit wurden 4-12 % Bis-Tris-Gradientengele in einer vertikalen Gelkammer aufgebaut und die Gelkammer bis zur Hälfte mit 1× Laufpuffer gefüllt. Nachdem die Proben aus dem Heizblock genommen und auf RT abgekühlt waren, wurde die entsprechend angegebene Menge der Proteinprobe sowie 5 µl des Größenmarkers PAGE Ruler™ Prestained in separaten Taschen auf das Gel aufgetragen. Die Proben wurden unter konstanter Stromstärke (100-150 mA) aufgetrennt.

3.3.4 Western Blot (semidry)

Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteinproben auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dafür wurden drei 9 × 7 cm Whatman-Papiere kurz in 1-fach NuPage-Transferpuffer (20 % Methanol) äquilibriert und in eine Blotkammer überführt. Danach

Methoden

wurde eine $8,5 \times 6,5$ cm Nitrozellulose-Membran ebenfalls in Transferpuffer aktiviert und auf die Whatman-Papiere gelegt. Das SDS-Gel wurde aus der Gelkammer und dem Plastikrahmen genommen und gefolgt von drei weiteren Whatman-Papieren oben auf den Blotstapel geschichtet. Die Blotkammer wurde fest verschlossen und der Transfer gestartet (110 mA/Blot, für 1,5 h). Der Transfer auf die Membran wurde mittels der reversiblen PonceauS-Färbung überprüft und das PonceauS wieder mit H₂O abgewaschen. Die Membran wurde anschließend in ein Falcon-Reaktionsgefäß überführt und für 1 h bei RT mit ca. 5 ml 5 % Milchpulver in TBS-T oder 3 % BSA in TBS-T auf einem Rotierapparat geblockt. Die Blocklösung wurde danach dekantiert und die Membran kurz mit TBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte wie jeweils angegeben die Inkubation der Membran ü. N. mit einem primären Antikörper in der entsprechenden Blockierlösung, bei 4°C auf einem Rotierapparat. Danach wurde die Membran $3 \times$ für 5 min mit TBS-T gewaschen. Es folgte eine Inkubation der Membran mit einem sekundären Antikörper in der jeweils entsprechenden Blockierlösung für 1 h, bei RT, im Dunkeln auf einem Rotierapparat. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-T für 5 min wurde das Zielprotein mit dem ECL Detektions-Kit detektiert.

3.3.5 Sensitive Coomassie-Färbung

Um die aufgetrennten Proteinproben aus der SDS-PAGE (3.3.3) sichtbar zu machen und die Reinheit analysieren zu können, wurden die SDS-Gele mit Coomassie G250 gefärbt. Dafür wurde die SimplyBlue™ SafeStain Lösung nach Herstellerangaben verwendet. Nachdem die Gele $3 \times$ mit 100 ml dH₂O gewaschen wurden, folgte eine Inkubation mit 100 ml Färbelösung für ca. 3 h. Danach wurde die Färbelösung dekantiert und die Gele mit 100 ml dH₂O für mind. 3 h oder ü. N. gewaschen. Zum Einscannen oder Abfotografieren der Gele wurden diese in Folie eingeschweißt.

3.3.6 Immunopräzipitation mittels GFP-Trap

Für die Isolierung von GFP und GFP-Fusionskonstrukten aus frischem Zelllysat wurde das GFP-Trap Kit verwendet. Die Isolierung wurde mittels der bereitgestellten Puffer und nach Hersteller-Protokoll durchgeführt.

Ca. 1×10^6 - 1×10^7 Zellen der jeweils angegeben Zelllinien wurden durch Abkratzen mit einem sterilen Zellschaber in 1 ml eiskaltem PBS geerntet. Die Zellen wurden daraufhin in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt, bei $500 \times g$, für 3 min und bei 4°C zentrifugiert und anschließend $2 \times$ mit eiskaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 200 μ l

eiskaltem RIPA-Lysepuffer mit Protease-Inhibitoren gelöst und 30 min auf Eis inkubiert. Alle 10 min wurde der Ansatz durch auf- und abpipettieren gut resuspendiert. Das Zelllysate wurde bei $20000\times g$ für 10 min und bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und der Zelldebris entsorgt. Dem Überstand wurden danach $300\ \mu\text{l}$ Verdünnungs-Puffer hinzugegeben. Währenddessen wurden $25\ \mu\text{l}$ GFP-Bead Suspension äquilibriert und mit dem verdünnten Zelllysate in einer *Spinning Column* auf einem Rotierapparat für ca. 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde die *Spinning Column* bei $2500\times g$ für 2 min und bei 4°C abzentrifugiert und die GFP-Beads $3\times$ mit $500\ \mu\text{l}$ Verdünnungs-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde der Ansatz erneut wie zuvor abzentrifugiert. Zuletzt wurde das gebundene Protein mit $50\ \mu\text{l}$ Glycerin (0,2 M, pH 2,5) für 30 s unter ständigem Schütteln eluiert und unmittelbar danach in ein frisches Eppi mit $5\ \mu\text{l}$ Tris Base (pH 10,4) zentrifugiert.

3.3.7 Malachitgrün GTPase Aktivitäts-Test

Über den GTPase Aktivitäts-Test wurde die Enzymaktivität anhand der Menge des freigesetzten, anorganischen Phosphats vom eingesetzten Substrat bestimmt. Für die Aktivitätsmessungen wurde frisch isoliertes, rekombinantes Protein verwendet. Die Ansätze wurden zunächst ohne Protein nach folgendem Schema zusammen pipettiert.

	Proben	Negativkontrolle (w/o protein)	Negativkontrolle (w/o MgCl_2)
Protein	$5\ \mu\text{g}$	-	$5\ \mu\text{g}$
MgCl_2 (1 M)	$1\ \mu\text{l}$	$1\ \mu\text{l}$	-
EDTA (0,5 M)	-	-	$4\ \mu\text{l}$
GTP (100 mM)	$x\ \mu\text{l}$	$2\ \mu\text{l}$	$2\ \mu\text{l}$
Reaktionspuffer (GFPA)	auf $100\ \mu\text{l}$	auf $100\ \mu\text{l}$	auf $100\ \mu\text{l}$

Tab. 41 Pipettierschema zum Malachitgrün GTPase Aktivitäts-Test

Neben den beiden Negativkontrollen wurden insgesamt sechs Proben-Ansätze mit einer finalen GTP-Konzentration von 0 – 5 mM hergestellt. Parallel dazu wurde eine Na_2HPO_4 Standard-Reihe mit den Konzentrationen 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 und $500\ \mu\text{M}$ hergestellt, um die absolute Konzentration des freigesetzten Phosphats berechnen zu können. Zuletzt wurde das rekombinante Protein zum jeweiligen Ansatz hinzugegeben. Sofort wurden 2×25

Methoden

μl (Doppelbestimmung) der Ansätze in 175 μl eiskalte Stopplösung überführt und der restliche Ansatz für exakt 20 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden erneut 2× 25 μl der jeweiligen Probe in 175 μl eiskalte Stopplösung überführt. Durch die Zugabe von 50 μl Malachit-Färbelösung wurde das freigesetzte Phosphat durch einen Farbumschlag optisch sichtbar gemacht und nach 15 min Inkubationszeit die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm (Absorptionsmaximum Malachitfarbstoff) photometrisch detektiert. Zuletzt wurde die Enzymaktivität in $\text{nmol}_{\text{p}}/\text{min}/\text{mg}_{\text{protein}}$ umgerechnet.

3.3.8 Proteinexpression und Aufreinigung

Für die Proteinexpression wurden pQE80L-mGBP9 transfizierte *E. coli* Rosetta™ 3(DE3)pLysS als Vorkultur in 150 ml 2xYT-Medium, mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Amp und 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CAM ü. N. angezogen. Aus der Vorkultur wurden 6 Liter 2xYT-Medium auf eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,1 angeimpft. Die Proteinexpression von mGBP9 mit His₆-Tag wurde nach dem Erreichen einer OD_{600} von 0,5 durch die Zugabe von 150 mM IPTG induziert. Die Inkubation erfolgte bei ca. 16°C im Schüttelinkubator bei 1800 rpm für ca. 72 h. Danach wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 8000 rpm, für 20 min und 4°C geerntet. Das Pellet wurde in mit DNaseI versetztem Puffer A aufgenommen und gut resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen unter Kühlung durch Hochdruckhomogenisation im Zelldisrupter (3 Durchläufe, 2,7 kbar) aufgeschlossen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt in der Ultrazentrifuge mit 48000 rpm für 1 h. Der Überstand wurde mit 2× 5 ml äquilibrierter Ni-NTA-Agarose ü. N. bei 4°C auf dem Rotierapparat inkubiert. Anschließend wurde die Ni-NTA-Agarose ca. 3 - 4x mit 45 ml Puffer B, für 10 min, bei 4°C auf dem Rotierapparat gewaschen. Die Elution des rekombinanten Proteins erfolgte mittels Inkubation mit 5 ml Puffer C, für ca. 1 h und bei 4°C auf dem Rotierapparat. Danach wurde die Ni-NTA-Agarose durch mehrfaches Zentrifugieren und Überführen des Eluats in ein neues Reaktionsgefäß aus der Elutionsfraktion entfernt. Das Eluat wurde in einem 50 kDa MWCO (engl., *molecular weight cut-off*) Konzentrator aufkonzentriert und auf ein maximales Volumen von 5 ml reduziert. Anschließend wurde die Elutionsfraktion auf eine mit GFPA-Puffer äquilibrierte Superdex 200 26/600-Säule aufgetragen und mittels Größenausschluss-Chromatographie aufgetrennt. Die monomeren mGBP9-Fractionen wurden in Eppendorfgläser überführt und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung und Westernblot analysiert. Die reinen mGBP9-Fractionen wurden entweder mittels 50 kDa MWCO Konzentrator aufkonzentriert und direkt weiterverwendet oder nach Schockgefrierung in flüssigem N₂ bei -80°C gelagert.

3.3.9 Kristallographie

Kristallisationsversuche mit möglichst reinem, hoch aufkonzentriertem mGBP9-Protein (> 10 mg/ml) wurden von den Mitarbeitern/innen des Center for Structural Studies (CSS, Stefanie Kobus und Astrid Port, HHU, gefördert durch die deutsche Forschungsgesellschaft (DFG), DFG Grant Nummer 417919780) durchgeführt. Die Kristallisation erfolgte mittels der Dampfdiffusionsmethode *sitting drop* und gewachsene Kristalle wurden am Deutschen Elektronensynchrotron (Beamline P14, EMBL) in Hamburg gemessen. Das 3D-Strukturmodell wurde mittels der Diffraktionsdaten und den *Tools* des Phyre2 Portals (Kelley et al., 2015) generiert. Mit dem Programm PyMOL wurde das vorläufige mGBP9-Strukturmodell in das hGBP1-Strukturmodell (Prakash et al., 2000) nach dem Maximum-Likelihood-Prinzip modelliert.

3.3.10 SAXS-Analysen

SAXS-Analysen mit möglichst reinem, hoch aufkonzentriertem mGBP9-Protein (> 10 mg/ml) wurden von den Mitarbeitern des Center for Structural Studies (CSS, Jens Reiners und Sander Smits, HHU, gefördert durch die deutsche Forschungsgesellschaft (DFG), DFG Grant Nummer 417919780) durchgeführt. Die SAXS-Messung erfolgte in der SAXS-Anlage des CSS (INST 208/761-1 FUGG). Das 3D-Hüllenmodell für mGBP9 wurde mittels der Streuungsdaten mit dem Programm GASBOR (Svergun et al., 2001) erstellt. Mit dem Programm PyMOL wurde das vorläufige mGBP9-Strukturmodell (4.4.2) in die volumetrische Hülle nach dem Maximum-Likelihood-Prinzip modelliert.

3.3.11 Generierung eines mGBP9-spezifischen Antikörpers

Für die Generierung eines mGBP9-spezifischen Antikörpers wurde möglichst reines Protein an die Mitarbeiter/innen der Firma Eurogentec geschickt. Für das sogenannte 28 Tage *Speedy* Protokoll wurde das Antigen zwei verschiedenen Kaninchen mit geringer Serum-Kreuzreaktivität zum Antigen injiziert. Nach 28 Tagen wurde das Antikörper-Serum isoliert und mittels Affinitätsaufreinigung zusätzlich zur Spezifitätssteigerung mittels mGBP9-Antigens aufgereinigt. Die mGBP9-Spezifität wurde dann mittels Western Blot-Analyse (3.3.4) bestimmt.

Methoden

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung einer mGBP9-Defizienz mittels CRISPR/Cas9 Genom-Editierungssystem

Guanylat-bindende Proteine (GBPs) erfassen die 65 kDa Familie der IFN γ -induzierten GTPasen. Sie sind ein wichtiger Bestandteil der zellautonomen Immunabwehr und konnten mit der Eliminierung einiger intrazellulär replizierender Pathogene in Verbindung gebracht werden (Praefcke, 2018). In einer quantitativen Analyse wurde die Rekrutierung der einzelnen murinen GBPs (mGBPs) in zwei verschiedenen Infektionsmodellen untersucht (*T. gondii*, *C. trachomatis*) (Lindenberg et al., 2017). Für mGBP1 und mGBP2 konnten hierbei jeweils die höchsten Frequenzen sowohl an der Inklusionsmembran des gram-negativen Bakteriums *C. trachomatis* als auch an der Membran der parasitophoren Vakuole des Protozoons *T. gondii* festgestellt werden. Des Weiteren konnte für mGBP9 ausschließlich in der Chlamydien-Infektion eine vergleichbar hohe Frequenz an der Pathogen-assoziierten Membran (PM) beobachtet werden.

Die mGBPs weisen untereinander sehr ähnliche Sequenzidentitäten auf. Mitglieder des Chromosom 5 (Chr5)-Clusters zeigen Aminosäuren (AS)-Sequenz-Homologien zwischen 65 und 98 % und würden daher ähnliche Funktionen dieser Proteine vermuten lassen (Degrandi et al., 2007, Kresse et al., 2008). Die verschiedenen Rekrutierungsmuster in den genannten Infektionsmodellen deuteten jedoch auf unterschiedliche Funktionen hin.

Eine funktionelle Charakterisierung von mGBP9 einem Mitglied des Chr5-Clusters wurde bisher noch nicht durchgeführt. Um die Rolle des Proteins im Kontext der zellautonomen Immunität besser definieren zu können, stellte eine der Hauptaufgaben dieser Arbeit die funktionelle Charakterisierung des mGBP9 Proteins in verschiedenen Infektionsmodellen dar.

Die Generierung genetisch veränderter Zelllinien oder Organismen ist dabei ein etabliertes Verfahren, um die Funktion von Genen zu analysieren. Mutationen können zum generellen Verlust oder zum Funktionsverlust eines Proteins führen und dadurch beispielsweise Veränderungen in Zellmorphologie oder subzellulären Prozessen hervorrufen (Reva et al., 2011). Unterschiede zwischen wildtypischer und mutierter Kondition lassen schließlich auf die Funktion des Zielproteins rückschließen.

Mit der Entdeckung des CRISPR/Cas9 Mechanismus als „adaptives“ Immunsystem einiger Bakterien, konnte ein hochpräzises, gentechnisches Verfahren entwickelt werden, das

Ergebnisse

sogenannte CRISPR/Cas9 Genom-Editierungssystem (Charpentier et al., 2014, Mojica et al., 2005). Dieses Verfahren bietet die Möglichkeit, gezielte Mutationen in einer DNA-Sequenz zu induzieren.

Die molekularen Komponenten des CRISPR/Cas9-Mechanismus setzen sich aus einer Zielsequenz-bindenden ‚guideRNA‘ (gRNA) sowie der DNA-Nuklease Cas9 zusammen. Mittels gRNA wird die Cas9-Nuklease zu einer entsprechenden DNA-Zielsequenz rekrutiert und induziert dort einen DNA-Doppelstrangbruch. Über die Anpassung der gRNA-Sequenz an einen spezifischen Locus im Genom der Zielzellen kann ein DNA-Doppelstrangbruch in der genomischen DNA induziert werden, der Voraussetzung für eine erfolgreiche Genomeditierung ist.

Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedene CRISPR/Cas9-basierte Klonierungsansätze in verschiedenen Zelllinien getestet, um das mGBP9-Gen zu mutieren.

4.1.1 Generierung einer mGBP9-defizienten, murinen ES Zelllinie: Erste Strategie

Die Funktion eines Proteins kann u. a. in *in vitro* Analysen bestimmt werden. Allerdings geben die Ergebnisse nur bedingt Informationen über die systemische Relevanz des Proteins. Daher ist die Etablierung eines Tiermodells oft erstrebenswert. Für die funktionelle Charakterisierung des mGBP9 Proteins sollte deshalb u. a. eine mGBP9-defiziente Mauslinie generiert werden.

Eine häufig angewandte Methodik zur Generierung genetisch veränderter Mauslinien ist die von Bradley et al. (1984) erstmals beschriebene Injektion von murinen embryonalen Stammzellen (ES Zellen) in Blastozysten *ex vivo*. Dabei werden mutierte ES Zellen in den sehr frühen Embryo injiziert (Hogan et al., 1994). Aus der Kombination mutierter und wildtypischer ES Zellen entwickeln sich Tiere mit unterschiedlichem Genotyp in den einzelnen Gewebs- und Zelltypen, den sogenannten Chimären (Gardner et al., 1973). Im Falle der Keimbahngängigkeit der modifizierten ES Zellen kann die genetische Veränderung an die Nachkommenschaft vererbt werden (Gossler et al., 1986, Robertson et al., 1986). Durch gezielte Verpaarungen wird die Mutation schließlich in der Mauslinie manifestiert. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist, dass Gendefizienzen zunächst *in vitro* in ES Zellen induziert und ausschließlich genetisch veränderte ES Zell-Klone für die Injektion verwendet werden.

Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit der erfolgreichen Generierung einer Gen-defizienten Mauslinie mit einer geringen Anzahl an Tieren im Sinne des 3R-Prinzips (Russell, 1959). In dieser Arbeit sollte eine mGBP9-Defizienz in JM8.a3 ES Zellen (C57BL/6 Hintergrund) wie bereits beschrieben durch das CRISPR/Cas9 Genom-Editierungssystem induziert werden. Auch wenn das System als hochpräzise beschrieben wird, stellen ungezielte Effekte (engl. ‚*off-target effects*‘) der Nukleaseaktivität ein großes Problem dar. Diese ungezielten Effekte entstehen u. a. durch Fehlpaarung der gRNA zu weiteren DNA-Sequenzen außerhalb der Zielsequenz. Anpassungen bestimmter Bedingungen im Experimental-Design können dabei die Wahrscheinlichkeit von ungezielten Effekten bereits reduzieren (Hsu et al., 2013). Problematisch bleiben jedoch homologe Sequenzbereiche bzw. Gene mit sehr ähnlichen Sequenzidentitäten. Homologien in unterschiedlichen Genen können z. B. durch Gen-Duplikation entstanden sein, wie es auch für die mGBPs des Chr5-Clusters (*mgbp4*, *mgbp6*, *mgbp8*, *mgbp9*, *mgbp10*, *mgbp11*) vermutet wird (Degrandi et al., 2007, Kresse et al., 2008). Die Proteine der Chr5-Cluster mGBPs weisen dabei insbesondere im aminoterminalen (N-terminal) Bereich sehr ähnliche Sequenzen auf. Für die Generierung einer Gen-Defizienz ist üblicherweise auch der N-Terminus Zielbereich für die Induktion einer Mutation. Die Anwendung des CRISPR/Cas9 Systems im mGBP Chr5-Cluster stellte daher eine große Herausforderung dar.

4.1.1.1 Versuchsplanung zum ersten Ansatz in ES Zellen

Über detaillierte Sequenzvergleiche sollte zunächst eine mGBP9-spezifische gRNA mit einer entsprechenden *Protospacer-adjacent motif* (PAM)-Sequenz identifiziert werden. Dafür wurden die Sequenzen der mGBP-Gene des Chr5-Clusters mit dem *Alignment-Tool* der ‚*Geneious*‘-Software analysiert. MGBP4 wurde bei dieser und weiteren Analysen ausgeschlossen, da es sich um einen nicht-funktionalen Locus in Mäusen und Zelllinien mit C57BL/6 Hintergrund handelt (Koner mann et al., 2007). Die Sequenzvergleiche zeigten, dass ein mGBP9-spezifischer, CRISPR/Cas9-induzierter Doppelstrangbruch in den 5‘-Exonen (Exon 2, Exon 3) des mGBP9-Gens nicht möglich war, ohne weitere mGBPs zu beeinflussen (AbbS. 1). Grund dafür waren die bereits beschriebenen Homologien des Gen-Clusters.

Im ersten Versuchsansatz zur Generierung einer mGBP9-defizienten ES Zelllinie sollte daher ein einzelner Doppelstrangbruch in der Intronsequenz zwischen Exon 1 und 2 des mGBP9-Gens induziert werden (Abb. 1). Die für diesen Versuchsansatz gewählte mGBP9-spezifische gRNA wies mindestens sieben Unterschiede in der Basenfolge zu den weiteren mGBP-Sequenzen auf (AbbS. 2). Die synthetisierte gRNA wurde anschließend mit rekombinanter

Ergebnisse

Cas9 Nuklease nach Methoden 3.1.3.1 in ES Zellen transfiziert. Zusätzlich wurden die ES Zellen mit einem synthetisch hergestelltem, einzelsträngigen DNA (ssDNA) Fragment transfiziert. Das Fragment sollte durch den Homologie-gerichteten Reparaturmechanismus (HDR) an der Stelle des Doppelstrangbruchs in die genomische DNA integriert werden (Yamamoto et al., 2018). In HDR-basierten Ansätzen werden dafür häufig ssDNA Moleküle verwendet, da hier eine effiziente Integration des Moleküls im Gegensatz zu doppelsträngigen Fragmenten auch mit verhältnismäßig kurzen, homologen Enden (40-80 Bp) erreicht werden kann (Miura et al., 2018).

Der Aufbau des ssDNA Fragments stellte eine fast identische Kopie des Ziel-Sequenzabschnitts aus dem mGBP9 Locus dar. Um eine mGBP9-Defizienz zu induzieren wurden hier zusätzliche Modifikationen eingebaut (Abb. 9, Box links). Modifikation 1 war ein Basenaustausch am 3'-Ende des ssDNA Fragments (Punktmutation, PM). Durch den Basenaustausch sollte ein frühes Stopp-Codon in der mGBP9-kodierenden Sequenz generiert werden, das im weiteren Verlauf zu einem Abbruch der Proteinbiosynthese führt.

mGBP9 Genlokus

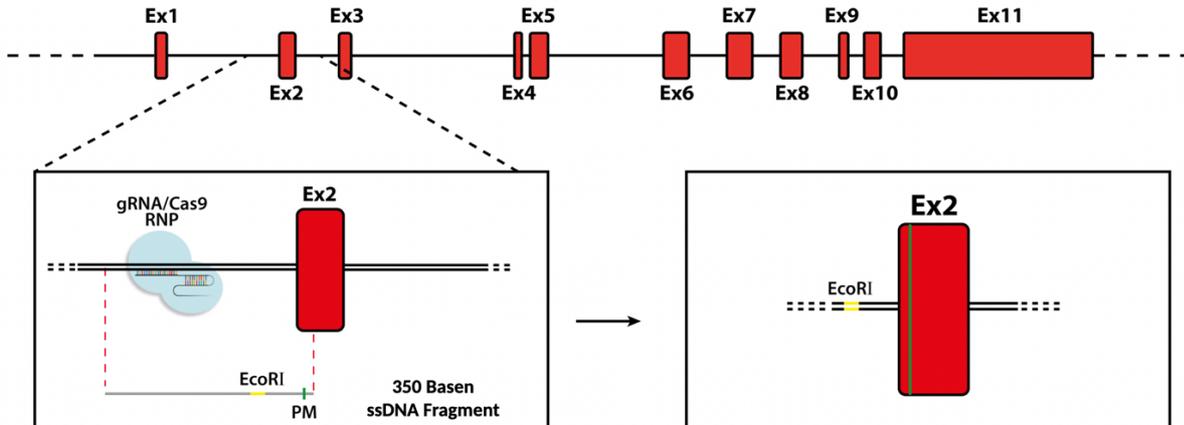


Abb. 9 Schematische Darstellung der ersten CRISPR/Cas9 Genomeditierungs-Strategie zur Etablierung einer mGBP9-Defizienz.

Mittels Sequenz-spezifischer gRNA soll der gRNA/Cas9 Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex in den mGBP9-Genlokus rekrutiert werden. Der Cas9-induzierte Doppelstrangbruch wird unmittelbar vor dem Exon 2 (5'-Richtung) des mGBP9-Gens eingeführt. Anschließend soll ein einzelsträngiges DNA (ssDNA) Fragment mit einer Länge von 350 Basen über homologe Rekombination in die genomische DNA integriert werden. Das ssDNA Fragment trägt zwei Modifikationen. Modifikation 1 ist eine Punktmutation (PM), die zu einem frühen Stopp-Codon im mGBP9-Gen führen soll. Modifikation 2 (EcoRI) ist eine Enzymschnittstelle, die ein anschließendes Screening zur Identifikation genetisch veränderter Klone vereinfacht.

Um die Integration des ssDNA Fragments anschließend überprüfen zu können, wurde Modifikation 2 eingebaut. Hierbei handelte es sich um eine 20 Basen lange Sequenz, die im Bereich zwischen der Cas9 Schnittstelle und dem Exon 2 lokalisiert wurde (Abb. 9, Box links). Die Modifikation beinhaltetete zum einen eine *EcoRI*-Enzymschnittstelle (GAATTC). In einem nachfolgenden Screening konnte somit über die Amplifizierung des Zielbereichs mit anschließendem *EcoRI*-Enzymverdau eine erfolgreiche Integration überprüft werden. Des Weiteren setzte sich Modifikation 2 neben der Schnittstellensequenz aus einer randomisierten Basenabfolge zusammen. Die gesamte Sequenz stellte somit eine spezifische Primer-Bindestelle dar. Positive Klone des Enzymverdaus hätten somit über eine Screening-PCR zusätzlich verifiziert werden können.

Insertionen, wie die beschriebene Modifikation 2, können die Detektion und Effizienz von proximalen ‚*Splicing*‘-Stellen beeinflussen (Sharpe et al., 2017). Das ‚*Splicing*‘ ist ein Vorgang bei der mRNA-Reifung. Hierbei werden die Intronsequenzen aus der transkribierten RNA herausgetrennt und die Exonsequenzen verbunden (engl. ‚*splicing*‘). Dieser Prozess ist abhängig von ‚*Splicing*‘-regulierenden Elementen, deren Aktivität wiederum abhängig von den umliegenden DNA-Sequenzen ist. Mittels des RESCUE-basierten HEXplorer Score Tools (Erkelenz et al., 2014) konnten die voraussichtlich ‚*Splicing*‘-verstärkenden (pos. Z-Werte) bzw. -inhibierenden (neg. Z-Werte) Sequenzbereiche vorhergesagt werden. Das Z-Wert Profil dieser Sequenzen deutet demnach auf die Wahrscheinlichkeit hin, mit der die ‚*Splice*‘-Stelle bei der mRNA-Reifung verwendet wird (engl. ‚*Splice-site usage*‘). Um zu überprüfen, ob Modifikation 2 eine Veränderung des Z-Wert Profils verursacht und damit Einfluss auf das ‚*Splicing*‘ nehmen könnte, wurden die Sequenzen wildtypischer und modifizierter DNA mittels HEXplorer Score Tool analysiert. Wie in Abb. 10 zu erkennen ist, konnten keine Unterschiede zwischen dem ursprünglichen Z-Wert Profil (WT) und dem der modifizierten Sequenz beobachtet werden. Die inserierte Sequenz (Abb. 10, roter Kasten) wies nach HEXplorer Score Tool einen verstärkenden Einfluss auf die ‚*Splice-site usage*‘ auf. Demnach konnte davon ausgegangen werden, dass Modifikation 2 das korrekte ‚*Splicing*‘ nicht negativ beeinflusst. Im Falle eines negativen Z-Wert Profils hätte Exon 2 beim ‚*Splicing*‘ übersprungen werden können. Da das Start-Codon von mGBP9 in diesem Exon lokalisiert ist, hätte ein alternatives Start-Codon zu einer trunkierten Variante des mGBP9 Proteins führen können. Die Analyse mittels des HEXplorer Score Tools konnte somit die Eventualität einer teilweise aktiven Trunkationsvariante mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließen.

Ergebnisse

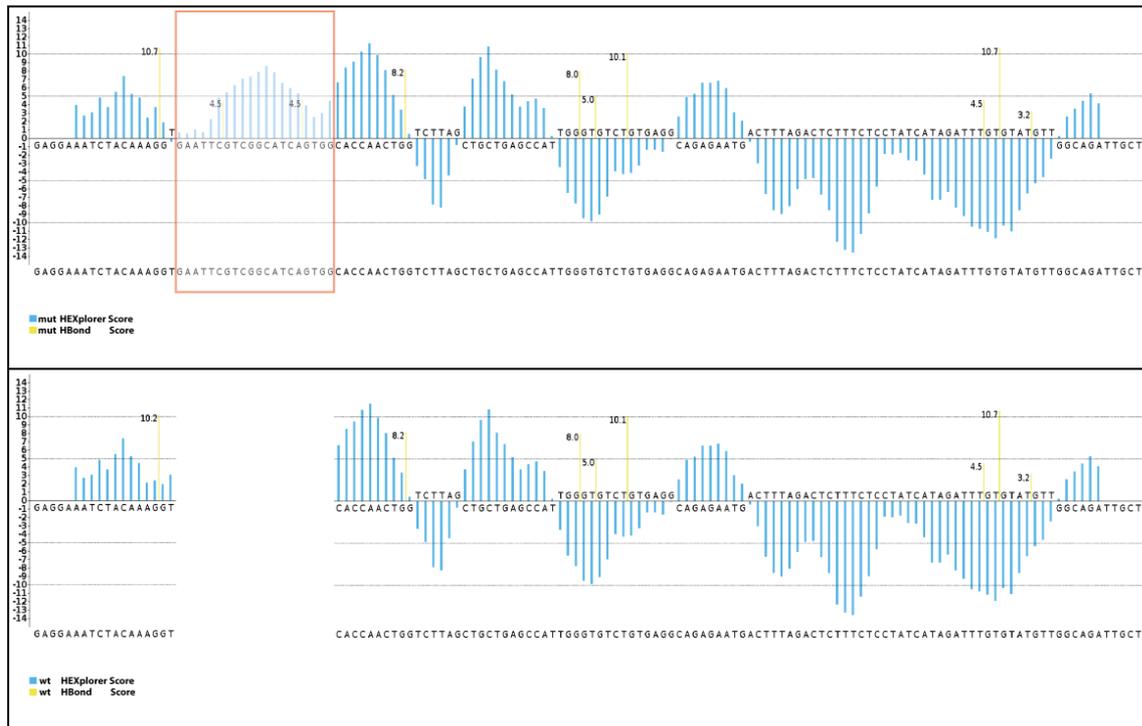


Abb. 10 Z-Wert Profile der Zielsequenz von Modifikation 2.

Die Z-Werte wurden mittels des *HEXplorer Score Tools* berechnet. Dargestellt ist der Genom-editierte mGBP9 Intron-Abschnitt (oben) und der wildtypische Intron-Abschnitt (unten) proximal am 5'-Ende von Exon 2 des mGBP9-Gens.

4.1.1.2 Screening zum ersten Ansatz in ES Zellen

Nachdem die ES Zellen schließlich mit den CRISPR/Cas9 Genom-Editierungs Komponenten transfiziert und nach Methode 3.1.1.3 kultiviert worden waren, konnten homogene Zellkolonien gepickt und expandiert werden. Um die Integration des ssDNA Fragments in die genomische DNA zu überprüfen, wurde das in Abschn. 4.1.1.1 beschriebene Screening durchgeführt. Dafür wurde zunächst die genomische DNA aus den verschiedenen Klonen isoliert. Anschließend erfolgte eine Screening-PCR mit Lokus-spezifischen Primern (Abb. 11A). Das erwartete PCR-Fragment sollte eine Länge von 483 Bp aufweisen. Insgesamt konnte für 108 Klone ein PCR-Fragment mit korrekter Länge verzeichnet werden. Abb. 11B zeigt beispielhaft das Ergebnis der Screening-PCR von vier verschiedenen Klonen. Im anschließenden *EcoRI*-Restriktionsverdau wurden in Bezug auf die Integration des ssDNA Fragments jedoch 100 % der Klone negativ getestet (Abb. 11C). Das Ergebnis verdeutlichte, dass dieser CRISPR/Cas9 Experimentalansatz nicht für das Zielvorhaben geeignet war.

Da eine mGBP9-defiziente Mauslinie von großer Bedeutung für diese Arbeit war, wurde eine alternative Verfahrensweise angewendet, welche im Folgenden beschrieben wird.

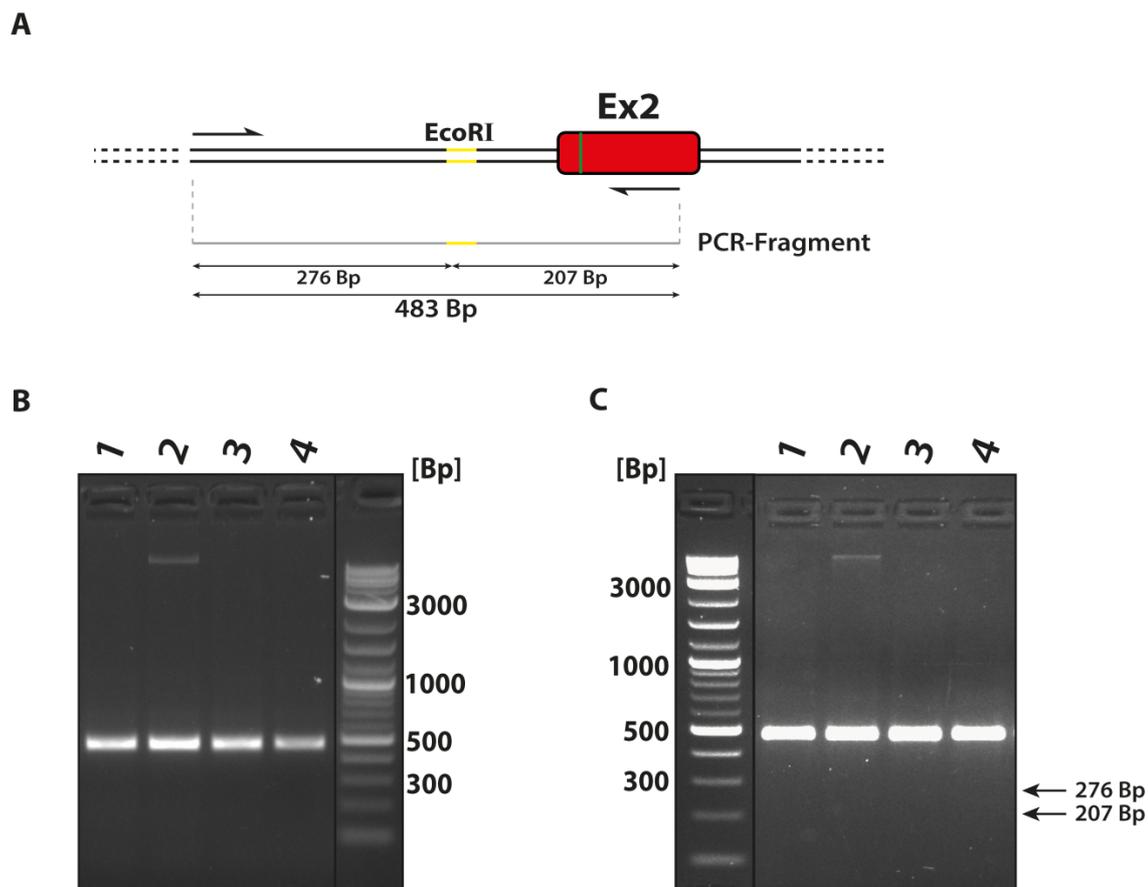


Abb. 11 Testverfahren zur Identifikation positiver Klone im ersten CRISPR/Cas9 Genomeditierungs-Ansatz.

A Schematische Darstellung des Testverfahrens. Über spezifische Primer wird der gezeigte Sequenzbereich amplifiziert (mGBP9 Oligo Primer Fw.4, mGBP9 Oligo Primer Rev.2). Im Falle einer erfolgreichen Genom-Editierung kann das PCR-Fragment durch die integrierte Restriktionsschnittstelle (*EcoRI*) in einem Restriktionsverdau restringiert werden. **B** 10 μ l eines jeweiligen PCR-Ansatzes (1-4) wurden auf einem 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt. Die Basenpaarlängen des Markers sind an der Seite angegeben. **C** Das jeweilige PCR-Produkt (1-4) wurde für 3 h bei 37°C mit dem *EcoRI* Restriktionsenzym restringiert. Die Restriktionsverdaue wurden auf einem 2%igem Agarosegel aufgetragen und für ca. 1,5 h bei 90 V aufgetrennt. Die potentiellen Fragmentgrößen von restringiertem PCR-Produkt sind auf der rechten Seite des Agarosegels angegeben.

4.1.2 Generierung einer mGBP9-defizienten, murinen ES Zelllinie: Zweite Strategie

Die Ergebnisse des ersten Experimentalansatzes sowie vertiefende Sequenzvergleiche haben gezeigt, dass die Generierung einer mGBP9-spezifischen Mutation in Exon 2 über das CRISPR/Cas9 Genom-Editierungssystem nicht möglich war. Durch neue Kenntnisse, die im Diskussionsteil (Abschn. 5.1) beschrieben sind, konnte zudem der Misserfolg der ersten Strategie genauer erklärt werden. Um eine mGBP9-Defizienz in JM8.a3 ES Zellen zu induzieren, wurde daher ein zweiter CRISPR/Cas9-basierter Experimentalansatz entwickelt.

4.1.2.1 Versuchsplanung zum zweiten Ansatz in ES Zellen

Eine mGBP9-spezifische gRNA konnte in den 5' Exonen des mGBP9 Gens nicht identifiziert werden. Die Einführung einer Mutation in den 3' Exonen mit einer einhergehenden Verschiebung des Leserasters am 3'-Ende wäre außerdem nicht zielführend gewesen. Ähnlich wie beim fehlerhaften ‚*Splicing*‘ könnten hierbei trunkierte Proteine entstehen, die eine Teilaktivität aufweisen und damit die Untersuchungen der Funktion von mGBP9 erschweren würden.

Daher wurde der Fokus des zweiten Experimentalansatzes weiterhin auf die Intronsequenzen zwischen den 5' Exonen des mGBP9-Gens gelegt. Über einen Sequenzvergleich der Intronsequenzen zwischen Exon 2 und Exon 3 sowie zwischen Exon 3 und Exon 4 der mGBPs des Chr5-Clusters, konnten zwei mGBP9-spezifische PAM-Motive identifiziert werden (Abb. 4, gRNA.1 und gRNA.2, AbbS. 3). Das spezifische PAM-Motiv von Cas9 stellt eine 5'-NGG-3' Sequenz dar, die entscheidend für die Cas9 Nuklease-Aktivität ist (Mojica et al., 2009). Im Sequenzvergleich zur Identifizierung von gRNA.1 konnte in jedem weiteren Chr5-mGBP lediglich eine 5'-NAG-3' Sequenz sowie mindestens zwei Basenunterschiede zwischen der mGBP-Zielsequenz und der gRNA observiert werden. Im Sequenzvergleich zur Identifizierung einer gRNA.2 konnte in jedem weiteren Chr5-mGBP Gen lediglich eine 5'-TAN-3' Sequenz sowie mindestens drei Basenunterschiede zwischen den Zielsequenzen und der gRNAs festgestellt werden. Die Wahrscheinlichkeit, mit der neben mGBP9 auch in weiteren mGBP-Genen ein zweifacher, CRISPR/Cas9-induzierter Doppelstrangbruch auftreten würde, war somit äußerst gering.

Vergleichbar zum ersten Versuchsansatz sollten anschließend die 5'- und 3'-Enden der beiden Doppelstrangbrüche mittels eines ssDNA Fragments über den Homologie-gerichteten Reparaturmechanismus miteinander verknüpft werden (Abb. 12). Das synthetisch hergestellte

ssDNA Fragment mit einer Gesamtlänge von 120 Basen setzte sich aus zwei fusionierten Sequenzabschnitten des mGBP9-Gens zusammen. Die ersten 60 Basen stellten den komplementären Sequenzbereich in 5'-Orientierung des ersten Doppelstrangbruchs dar, die letzten 60 Basen den entsprechend komplementären Sequenzbereich in 3'-Orientierung des zweiten Doppelstrangbruchs. Die CRISPR/Cas9-induzierte Restriktion sowie die Integration des ssDNA Fragments sollten demnach zur vollständigen Deletion von Exon 3 des mGBP9 Gens führen. In der Theorie würden dadurch beim ‚Splicing‘ Exon 2 und Exon 4 miteinander verknüpft werden. Neben einer Trunkation hätte dies zusätzlich eine Verschiebung im Leseraster der kodierenden Sequenz zur Folge. Vertiefende Sequenzanalysen zeigten, dass durch die Leserasterverschiebung ein frühes Stopp-Codon erzeugt wird, das einen möglichen Auslöser für die mRNA-Degradation durch den NMD-Mechanismus darstellt. Im Falle einer anschließenden Protein-Synthese würde zudem lediglich ein verkürztes Protein von 62 AS Länge entstehen.

mGBP9 Genlokus

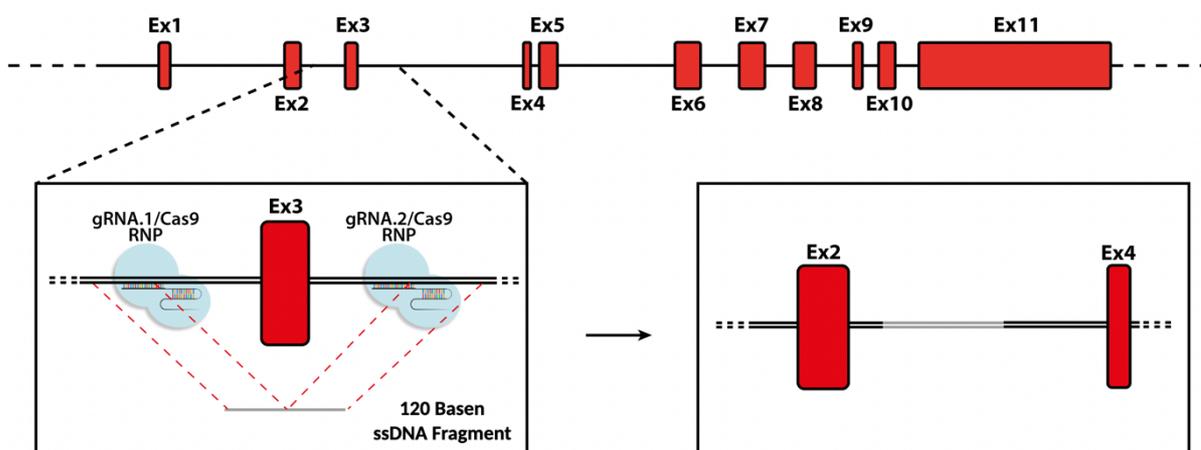


Abb. 12 Schematische Darstellung des zweiten CRISPR/Cas9 Genomeditierungs-Ansatzes im mGBP9 Genlokus.

Über die Induzierung zweier gRNA-gerichteter (gRNA.1, gRNA.2) Doppelstrangbrüche durch die Cas9 Nuklease wird ein Abschnitt des mGBP9 Lokus aus der genomischen DNA herausgeschnitten. Ein einzelsträngiges DNA (ssDNA) Fragment mit einer Länge von 120 Basen wird anschließend über den Homologie-gerichteten Reparaturmechanismus in die genomische DNA integriert. Durch den Verlust des Exon 3 entsteht eine Verschiebung im Leseraster und ein funktionales mGBP9 Protein kann nicht mehr exprimiert werden.

Die geplante Deletion von Exon 3 hätte allerdings Einfluss auf die ‚Splice-site usage‘ von Exon 2 und Exon 4 während der mRNA-Reifung nehmen können (Schaal H., persönl. Kommunikation, 2018). Sequenzanalysen ergaben (Daten nicht gezeigt), dass die Verknüpfung von Exon 2 mit den in 3'-Orientierung gelegenen Exonen in allen Fällen zu

Ergebnisse

einer Verschiebung des Leserasters geführt hätte. Zudem würde mit jedem weiteren übersprungenen Exon der trunkierte Bereich größer werden. Unabhängig von veränderten ‚*Splicing*‘-Vorgängen hätte eine Deletion des Exon 3 von *mgbp9* mit großer Wahrscheinlichkeit eine mGBP9-Defizienz zur Folge.

4.1.2.2 Screening zum zweiten Ansatz in ES Zellen

Die ES Zellen wurden nach Methode 3.1.3.1 zunächst mit den CRISPR/Cas9 Komponenten und dem ssDNA Fragment transfiziert und kultiviert. Die homogenen ES Zellkolonien wurden vereinzelt, expandiert und die genomische DNA schließlich für die Identifizierung genetisch veränderter Klone isoliert. Für das *Screening* wurden zwei neue Testverfahren etabliert (Abb. 13A, B). Das erste Testverfahren setzte sich aus zwei mGBP9-spezifischen PCR-Analysen zusammen. Die verwendeten Primerpaare sind in Abb. 13A als grüne bzw. schwarze Pfeile dargestellt. Das erste Primerpaar flankierte die Deletions-Zielsequenz (schwarze Pfeile), sodass ein langes PCR-Fragment von ca. 4000 Bp für den wildtypischen Genotyp und ein kürzeres PCR-Fragment von ca. 1500 Bp für eine Deletionsmutante erwartet wurden. Das zweite Primerpaar setzte sich aus einem innerhalb der Deletions-Zielsequenz liegenden sowie aus einem außenliegenden Primer zusammen (grüne Pfeile). Für die wildtypische Sequenz wurde somit ein 1000 Bp langes PCR-Produkt erwartet, im Falle einer Deletion jedoch keins. In Abb. 13B sind beispielhaft die Ergebnisse der Screening-PCRs für einen von 128 getesteten Klonen des zweiten CRISPR/Cas9-Ansatzes sowie einer jeweiligen WT- und H₂O-Kontrolle gezeigt. Für den Klon konnte in PCR1 neben der beschriebenen WT-Bande die charakteristische Bande der Deletions-Mutation von ca. 1500 Bp detektiert werden. Im Vergleich dazu wies die WT-Kontrolle lediglich die erwartete WT-Bande auf. In PCR2 konnte sowohl für den Klon als auch für den WT eine Bande von ca. 1000 Bp detektiert werden. Allerdings war die Bandenintensität im Falle des Klons deutlich geringer. Die Ergebnisse der Screening-PCRs deuteten an dieser Stelle auf eine heterozygote Exon 3 Deletion hin (mGBP9^{+/-}). Über das PCR-Screening konnte im weiteren Verlauf von den 128 getesteten ES Zell-Klonen kein Klon als homozygote Deletionsmutante identifiziert werden. Für die Generierung einer mGBP9-defizienten Mauslinie ist eine heterozygote mGBP9-defiziente ES Zelllinie jedoch ausreichend.

Um die Heterozygotie der mGBP9^{+/-} ES Zelllinie zu verifizieren wurde zusätzlich ein mGBP9-spezifischer Southernblot etabliert (Methoden 2.2.12, Abb. 13C). Dafür wurde zunächst genomische DNA aus WT und mGBP9^{+/-} Zellen isoliert und mittels des *Pst*I-Restriktionsenzym fragmentiert. Anschließend wurde das Fragment, das den CRISPR/Cas9-

Zielbereich beinhaltete, mit einer radioaktiv markierten Sonde gekennzeichnet (Abb. 13C). Die Fragment-Größen der WT- bzw. mGBP9^{+/-}-spezifischen Fragmente mussten sich somit um die Länge des Deletionsbereichs unterscheiden. Um die Problematik der mGBP Chr5-Cluster Homologien zu umgehen, wurde mit dem *PstI*-Restriktionsenzym ein Verdau gewählt, bei dem unterschiedlich lange Ziel-Fragmente für die verschiedenen mGBPs entstehen, innerhalb der eine unspezifische Bindung der Sonde möglich wäre. Somit hätten unspezifische Bindungen der Sonde an weitere mGBP-Fragmente anhand der Fragment-Längen identifiziert und ausselektiert werden können. Für die mGBP9-Fragmente wurden Größen von ca. 11 kBp (WT) und 9 kBp (Deletion) erwartet.

Wie in Abb. 13D zu erkennen ist, konnte im mGBP9-spezifischen Southernblot im Verdau der WT DNA eine Bande von ca. 11 kBp detektiert werden. Im Verdau der mGBP9^{+/-} DNA konnte ebenfalls eine Bande von 11 kBp detektiert werden. Mit den Ergebnissen der PCR-Analyse einhergehend, wies diese eine deutlich geringere Intensität zur Bande im WT auf. Zusätzlich wurde die erwartete Deletionsbande von ca. 9 kBp festgestellt. Die Intensität der Deletionsbande war dabei vergleichbar zur Intensität der WT-Bande im mGBP9^{+/-} Klon. Der Southernblot spiegelte somit das Ergebnis der Screening-PCRs wider. Eine heterozygote Deletion des Exon 3 im mGBP9-Gen konnte somit bestätigt werden.

In einem letzten Testverfahren wurde die Expression der mGBPs auf mRNA-Ebene mittels RT-qPCR untersucht. Die IFN γ -abhängige Induzierbarkeit der mGBP-Expression (mGBP2) konnte bereits in undifferenzierten ES Zellen (129S2/SvPas) gezeigt werden (Briken et al., 1995). Um die mGBP-Expression in JM8.a3 ES Zellen zu analysieren, wurde die relative Expression der einzelnen mGBPs gegen die β -Aktin Expression normalisiert. Anschließend wurde die relative Expression der IFN γ -stimulierten gegen die unstimulierten Konditionen normalisiert. In Abb. 14 ist die relative mGBP Expression (mGBP1, 2, 3, 5, 6/10, 7, 8 und 9) in WT (blau) bzw. mGBP9^{+/-} (grün) ES Zellen dargestellt. Eine Expression von mGBP1 und mGBP8 konnte weder in WT noch in mGBP9^{+/-} ES Zellen detektiert werden. Im Vergleich von WT und mGBP9^{+/-} konnten in der relativen Expression der verschiedenen mGBPs starke Schwankungen beobachtet werden. Dabei zeigte sich für die meisten mGBPs eine erhöhte Expression in den mGBP9^{+/-} ES Zellen. Die relative Expressionsrate von mGBP9 in wildtypischen ES Zellen war im Vergleich zur Expression anderer mGBPs bereits relativ gering. Dennoch konnte eine deutliche Reduzierung der mGBP9-Expression in mGBP9^{+/-} ES Zellen um ca. 50 % festgestellt werden. Über die RT-qPCR wurde somit erneut bestätigt, dass es sich bei dem Klon um einen heterozygoten, mGBP9-defizienten Klon handelte.

Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden zusätzlich durch Sequenzierungsanalysen unterstützt. Hierfür wurde der CRISPR/Cas9-Zielbereich des mGBP9-Gens (Intron-Sequenzbereiche in 5'- und 3'-Orientierung des Exon 3) mittels PCR amplifiziert, das Amplifikat in den pCR[®]2.1 Vektor kloniert und per Sanger-Sequenzierung analysiert (AbbS. 4). Eine Westernblot-Analyse konnte auf Grund eines fehlenden mGBP9-spezifischen Antikörpers nicht durchgeführt werden.

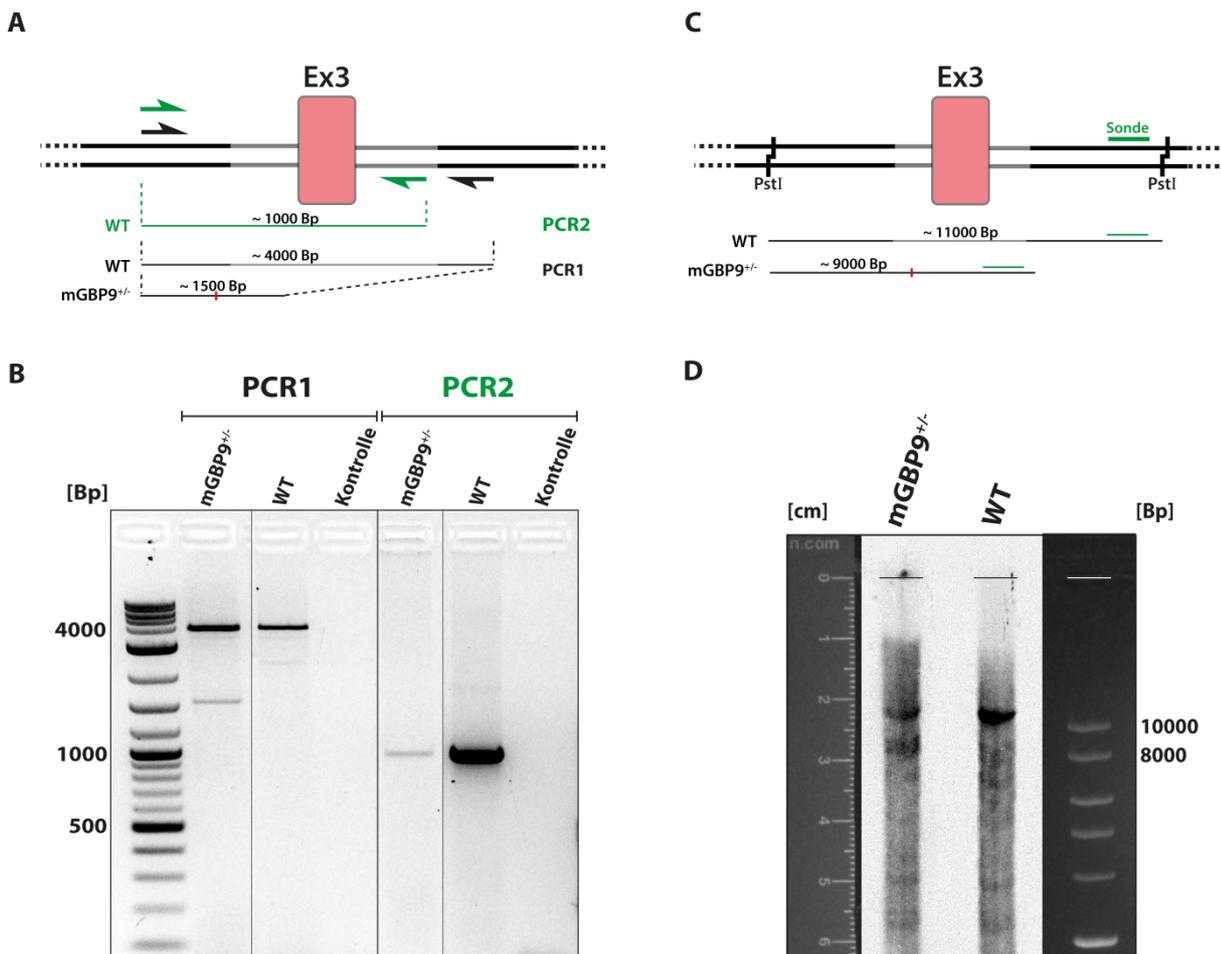


Abb. 13 Testverfahren zur Identifikation positiver Klone im zweiten CRISPR/Cas9 Genomeditierungs-Ansatz.

A Schematische Darstellung des PCR-Testverfahrens. Über zwei spezifische Primer-Paare (schwarz, grün) wird der gezeigte Sequenzbereich amplifiziert. Im Falle einer erfolgreichen Genomeditierung wurde das Exon 3 des mGBP9 Gens deletiert. Eine Deletion kann durch die Größe der PCR-Fragmente verifiziert werden. **B** PCRs mit genomischer DNA aus WT Zellen bzw. eines Klons (mGBP9^{+/-}) und einer H₂O-Kontrolle wurden auf einem 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt. Dargestellt sind einzelne Ausschnitte des Agarosegels (Originalbild s. AbbS. 4). Die vertikalen Linien inidzieren die zusammengefügteten Bildausschnitte. Linksseitig sind die relevanten Basenpaarlängen des Markers gekennzeichnet. **C** Schematische Darstellung des Southernblot-Testverfahrens. Ein Restriktionsverdau der genomischen DNA mit dem Enzym PstI generiert spezifische Fragmente für WT und Deletionsvarianten. Die Fragmente konnten mit einer radioaktiven Sonde markiert werden. **D** Southernblot-Analyse mit genomischer DNA aus wildtypischen ES Zellen und einem Klon (mGBP9^{+/-}) nach Protokoll 2.2.12. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde der Abstand zwischen Geltasche (schwarze bzw. weißer Querstreifen) und Fragment gemessen und die Abstände mit dem Marker verglichen. Die Größen des DNA-Markers sind an der Seite angegeben.

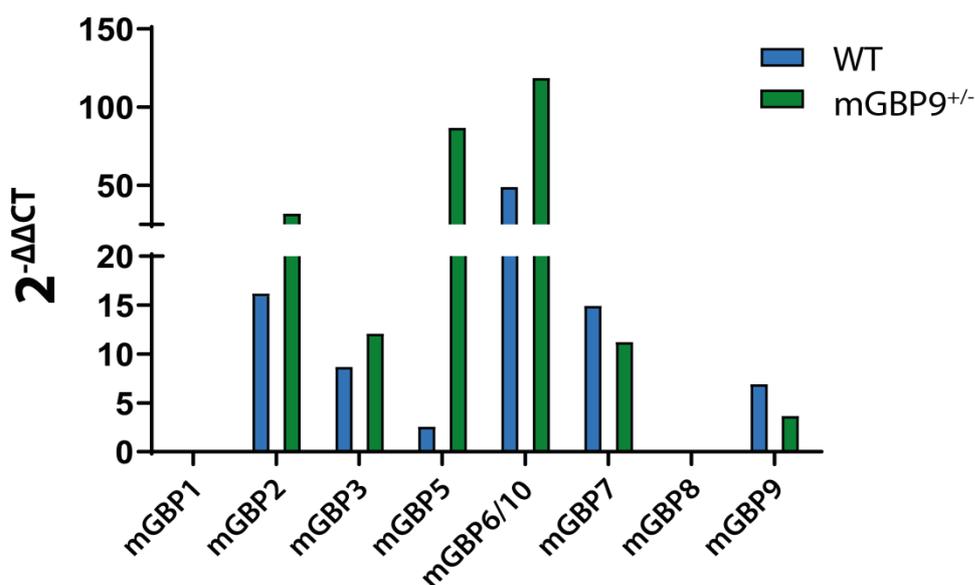


Abb. 14 Analyse der mGBP-Expression in der mGBP9^{+/-} ES Zelllinie.

Die mGBP-Expression wurde mittels RT-PCR analysiert. Wildtypische ES Zellen sowie mGBP9^{+/-} ES Zellen wurden für ca. 18 h mit IFN γ stimuliert oder blieben unstimuliert. Gesamt-RNA wurde isoliert und die RT-PCR wie in 3.2.12 beschrieben durchgeführt. Alle cDNAs wurden in Duplikaten gemessen und die Expressionslevel gegen die β -Aktin Expression normalisiert. Dargestellt ist die relative Expressionsrate der mGBPs im Vergleich zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen.

Zusammenfassend konnte durch die hier gezeigten Testverfahren und der durchgeführten Sequenzierungsanalysen ein heterozygoter ES Zell Klon (mGBP9^{+/-}) mit einer Deletion des Exon 3 im mGBP9 Gen erfolgreich verifiziert werden.

4.1.3 Generierung einer mGBP9-Defizienz in NIH/3T3 Fibroblasten

Neben der Genomeditierung in ES Zellen sollte zusätzlich eine mGBP9-Defizienz in NIH/3T3 Fibroblasten induziert werden, um die Auswirkung der Defizienz zusätzlich *in vitro* analysieren zu können.

4.1.3.1 Versuchsplanung zum NIH/3T3 Fibroblasten-Ansatz

Der hier durchgeführte CRISPR/Cas9 Genom-Editierungsansatz unterschied sich von den zuvor beschriebenen Strategien insbesondere in der Applikationsform der CRISPR/Cas9-Komponenten (gRNA, Cas9-Nuklease). Anders als in diesen Ansätzen wurden gRNA und Cas9-Nuklease nicht als Synthese-Produkt, sondern auf einem Expressionsplasmid kodiert in die Zielzellen (NIH/3T3 Fibroblasten) transfiziert. Die mGBP9-spezifische gRNA wurde für diesen Ansatz mittels *CRISPR-Design-Tool* bestimmt und die entsprechende Sequenz in das pPX458 Plasmid (Ran et al., 2013) kloniert. Neben den kodierenden CRISPR/Cas9-Komponenten trug das Plasmid des Weiteren ein GFP-Reportergen.

Die NIH/3T3 Fibroblasten wurden mit dem Plasmid transient transfiziert und Plasmid-tragende Zellen über das GFP-Signal identifiziert. Mittels Zell-Sortierung (FACS AriaTM IIu) wurden die Plasmid-positiven Zellen von den negativen separiert und weiterkultiviert. Durch die transiente Transfektion und Expression des Plasmids ohne Selektionsdruck wurde eine dauerhafte Expression von gRNA und Cas9-Nuklease verhindert und somit die Wahrscheinlichkeit möglicher *off-target* Effekte reduziert. Per Einzelzell-Verdünnung wurden anschließend klonale Zelllinien kultiviert und diese auf potentielle Mutationen untersucht.

Anders als in den Versuchsansätzen zur Mutagenese in ES Zellen wurde hier kein ssODN eingesetzt. Damit wurde der Doppelstrangbruch nicht über den HDR-Mechanismus, sondern über den nicht-homologen Endenverknüpfungs-Mechanismus (engl. ‚*nonhomologous end-joining*‘) repariert. Dieses Reparatursystem ist *per se* nicht inakkurat. Einige beeinflussende Faktoren führen jedoch dazu, dass dieser Reparaturmechanismus nicht fehlerfrei ablaufen kann und verhältnismäßig häufig Basen-Deletionen oder -Insertionen induziert (Betermier et al., 2014). Die hypothetische Mutation, die dabei entstehen sollte, war somit keine gerichtete, sondern eine zufällige Insertions-Deletions (Indel)-Mutation. Eine Indel-Mutation in Exon 2 des mGBP9-Gens sollte zu einer Verschiebung des Leserasters und bestenfalls zu einem frühen Stopp-Codon führen.

Zur Überprüfung einer erfolgreichen mGBP9-Mutagenese wurden ebenfalls spezifische Testverfahren etabliert.

4.1.3.2 Screening im Rahmen des NIH/3T3 Fibroblasten-Ansatzes

Nach der Einzel-Zell-Kultivierung wurden in einer ersten Analyse zur Identifizierung einer mGBP9-defizienten Zelllinie die verschiedenen Klone zunächst auf DNA-Ebene untersucht. Dafür wurde der CRISPR/Cas9-Zielbereich des mGBP9-Gens (Exon 2) mittels PCR amplifiziert (Primerpaar: mGBP9 TA Fw Fibroblasten und mGBP9 TA Rev Fibroblasten), das Amplifikat in den pCR[®]2.1 Vektor kloniert und per Sanger-Sequenzierung analysiert (Daten nicht gezeigt). Im Zuge dieser Analysen konnten verschiedene Klone identifiziert werden, die eine Veränderung in mindestens einem Allel des mGBP9 Gens trugen. Ein Klon, von hier an als *mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO}* bezeichnet, mit zwei unterschiedlichen Mutationen in beiden mGBP9-Allelen (Tab. 42) wurde schließlich detaillierter analysiert.

Um die mGBP-Expression auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurde erneut eine RT-qPCR Analyse nach 3.2.12 durchgeführt. Dafür wurde die Gesamt-RNA aus IFN γ -stimulierten sowie unstimulierten WT und *mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO}* Zellen isoliert. In Abb. 15A ist die relative mGBP-Expression (mGBP1, 2, 3, 5, 6/10, 7, 8 und 9) in WT (blau) bzw. *mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO}* (grün) Zellen dargestellt. Dafür wurden erneut die IFN γ -Konditionen auf die jeweilige β -Aktin-Expression und anschließend die stimulierte auf die unstimulierte Kondition normalisiert. Die mGBPs des Chromosom 3 Clusters (mGBP1, 2, 3, 5, 7) wiesen im WT, wie auch in den *mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO}* Zellen, keine Unterschiede in ihrer Expression auf. Im Gegensatz dazu konnte eine stark reduzierte mGBP9-Expression im *mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO}* Klon festgestellt werden. Interessanterweise waren trotz der nachgewiesenen Mutationen in beiden Allelen geringe Mengen mGBP9 RNA detektierbar. Die RT-qPCR Daten spiegelten dennoch die Ergebnisse der Sequenzierungen wider und bestätigten, dass eine Mutagenese von mGBP9 durch das CRISPR/Cas9 Genom-Editierungssystem stattgefunden hat.

Neben einer reduzierten mGBP9-Expression konnte des Weiteren eine starke Reduzierung der mGBP6/10-Expression in den *mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO}* Zellen beobachten werden. In verschiedenen Messungen konnte mGBP8 weder in der WT- noch in der *mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO}*-Linie detektiert werden, wie es bereits im Screening der ES Zellen der Fall gewesen ist.

Ergebnisse

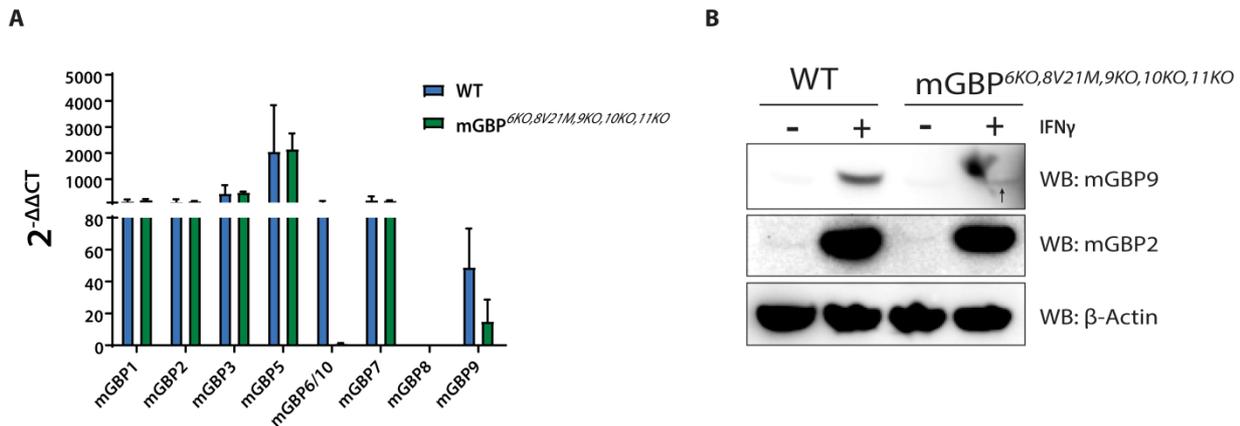


Abb. 15 Identifizierung einer multiplen mGBP defizienten NIH/3T3 Fibroblasten Zelllinie.

A Die mGBP-Expression wurde mittels RT-PCR analysiert. Wildtypische Fibroblasten und Fibroblasten einer CRISPR/Cas9 Genom-editierten Linie (mGBP9^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO}) wurden für ca. 18 h mit IFN γ stimuliert oder blieben unstimuliert. Gesamt-RNA wurde isoliert und die RT-PCR wie in Methoden 3.2.12 beschrieben durchgeführt. Alle cDNAs wurden in Duplikaten gemessen und die Expressionslevel gegen die β -Aktin Expression normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Expressionsrate im Vergleich von stimulierten und unstimulierten Zellen (n=2). **B** Westernblot Analyse mit Zelllysate von wildtypischen Fibroblasten und einer CRISPR/Cas9 Genom-editierten Zelllinie (mGBP9^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO}). Die Zellen wurden für ca. 18 h mit IFN γ stimuliert oder blieben unstimuliert und wurden anschließend mit DISC Lyse-Puffer lysiert. 4,5 μ g Protein pro Zelllysate wurden auf einem 4-12%igem Bis-Tris SDS Gel aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Die Detektion erfolgte mittels eines selbst generierten, in Abschn. 4.4.3 beschriebenen, mGBP9-spezifischen Antikörpers mit Kreuzreaktivität zu den mGBPs 3, 6, 8 und 10, eines anti-mGBP2 und eines anti- β -Aktin Antikörpers. Schwarzer Pfeil indiziert Antikörper-spezifische Bande.

Da es sich bei den betroffenen mGBPs um diejenigen mGBPs des Chr5-Clusters handelte (Cluster-Homologie: 65 – 98 % (Kresse et al., 2008)), sollten diese in detaillierten Sequenzierungsanalysen untersucht werden. Dafür wurden der CRISPR/Cas9-Zielsequenzabschnitt des mGBP9-Gens und die homologen Sequenzbereiche von mGBP6, 8, 10 und 11 mit spezifischen Primern amplifiziert (Primerpaare: mGBP6/10 Fw.2 u. mGBP6/10 Rev.1, mGBP8 Fw.1 u. mGBP8 Rev.1, mGBP11 Fw.2 u. mGBP11 Rev.1). Die generierte cDNA wurde anschließend aufgereinigt, in den pCR[®]2.1 Vektor kloniert und mittels Sequenzierung analysiert. Die Sequenzierungsergebnisse der einzelnen mGBPs und die aufgetretenen Mutationen in der mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Zelllinie wurden in Tab. 42 zusammengefasst. Neben mGBP9 konnte in allen sequenzierten mGBP Genen eine CRISPR/Cas9-abhängige Mutagenese festgestellt werden. Die häufigste Mutationsvariante, die detektiert werden konnte, war eine Deletion des Basenpaares an Position 18 der gRNA (Tab. 42: Allel-Varianten). Alle Deletionsmutationen führten zu einem frühen Stopp-Codon an Position 25 (Einzelbasen-Deletion) bzw. 61 (Doppelbasen-Deletion, nur mGBP9) der jeweiligen mGBP AS-Sequenz. Ein Allel des mGBP8-Gens wies eine Punktmutation auf, die

zu einem AS-Austausch von Valin zu Methionin an Position 21 der Aminosäuresequenz führte. Zusätzlich konnte für mGBP8 ein WT-Allel detektiert werden.

		Allel-Varianten			Mutation	AS/ Pos.	Phänotyp
mGBP6-WT	TGAACAGCTGTCA	G	TGA	A C C			mGBP6
<i>mGBP6-mut</i>	TGAACAGCTGTCA	G	TGA	- C C	Deletion	25Ter	mGBP6 KO
mGBP8-WT	TGAACATCTGTCC	G	TGA	A C C			mGBP8
<i>mGBP8-mut</i>	TGAACATCTGTCC	A	TGA	A C C	Punktmut.	V21M	mGBP8 ^{V21M}
mGBP9-WT	TGAACAGCTGTTG	G	TGA	A C C			mGBP9
<i>mGBP9-mut.1</i>	TGAACAGCTGTTG	G	TGA	- C C	Deletion	25Ter	mGBP9 KO
<i>mGBP9-mut.2</i>	TGAACAGCTGTTG	G	TGA	- - C	Deletion	61Ter	mGBP9 KO
mGBP10-WT	TGAACAGCTGTCA	G	TGA	A C C			mGBP10
<i>mGBP10-mut</i>	TGAACAGCTGTCA	G	TGA	- C C	Deletion	25Ter	mGBP10 KO
mGBP11-WT	TGAACAGCTGTTG	G	TGA	A C C			mGBP11
<i>mGBP11-mut</i>	TGAACAGCTGTTG	G	TGA	- C C	Deletion	25Ter	mGBP11 KO

Tab. 42 Allel-Varianten der verschiedenen mGBP Gene des Chromosom 5-Clusters in einer CRISPR/Cas9 Genom-editierten Fibroblasten Zelllinie.

Zusammenfassung der verschiedenen Allel-Varianten, der Art der jeweiligen Mutation, der entsprechenden AS-Position der Punktmutation bzw. Abbruchstelle der Translation und der daraus resultierende Phänotyp. Zu jedem mGBP Gen wurden mindestens zehn verschiedene Sanger-Sequenzierungsanalysen durchgeführt. In den Sequenzierungsergebnissen sind ausschließlich die mutierten Allel-Varianten (*mGBP-mut*) detektiert worden. WT-Allele dienen als Referenz.

Nachfolgend wurde eine Westernblot-Analyse mit Zelllysate von IFN γ -stimulierten und unstimulierten WT sowie mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Zellen durchgeführt (Abb. 15B). Für den Immunoblot wurde u. a. ein generiertes Antiserum verwendet, das mGBP3, 6, 8, 9 und 10 detektiert und in Abschn. 4.4.3 genauer beschrieben wurde. Als Kontrolle wurden ein β -Aktin- sowie ein mGBP2-spezifischer Antikörper verwendet. Mittels der Kontrollantikörper konnte eine gleichmäßige Protein-Expression (β -Aktin-Kontrolle) sowie eine IFN γ -abhängige Induktion der mGBP2-Expression in beiden Zelllinien bestätigt werden. Über das generierte Antiserum konnte anschließend eine mGBP-Expression in stimulierten WT Zellen detektiert werden. Interessanterweise war eine deutlich geringere Bandenintensität im Vergleich zur mGBP2-Kontrolle zu verzeichnen, obwohl über die Kreuzreaktivität des mGBP9-Antiserums verschiedene mGBPs parallel detektiert werden. Zusätzlich konnte mittels des Immunoblots gezeigt werden, dass die Expression der durch das Antiserum detektierbaren mGBPs in IFN γ -stimulierten mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Zellen deutlich reduziert war im Vergleich zum WT. Eine eindeutige Interpretation in Bezug auf die Expression des jeweiligen mGBPs (mGBP3, 6, 8, 9 und 10) war auf Grund der Kreuzreaktivität des Antikörpers nicht möglich.

Ergebnisse

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem identifizierten Klon um eine NIH/3T3 Fibroblastenlinie mit multiplen Chr5-Cluster mGBP-Defizienzen sowie einer konservativen Punktmutation im mGBP8-Gen handelte (mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO}).

4.2 *In vitro* Analysen zum Einfluss multipler mGBP-Defizienzen auf die zellintrinsische Immunität von NIH/3T3 Fibroblasten

Einige der mGBPs konnten wie bereits beschrieben mit der Kontrolle von intrazellulären Infektionen in Zusammenhang gebracht werden (Praefcke, 2018). Dabei schienen insbesondere die GTPase-Aktivität sowie die Rekrutierung der mGBPs an Pathogen-assoziierte Membranen (PMs) eine entscheidende Rolle zu spielen (Kravets et al., 2016, Kravets et al., 2012, Steffens et al., 2020). Das mGBP2-Protein war zumeist eines der prominentesten mGBPs auf Pathogen-assoziierten Vakuolen intrazellulär replizierender Parasiten (Lindenberg et al., 2017). Außerdem konnte mGBP7 als ein relevanter Immunfaktor im Infektionsmodell des obligat intrazellulären Parasiten *T. gondii* beschrieben werden (Steffens et al., 2020). mGBP7-defiziente Mäuse zeigten sich hoch suszeptibel gegenüber einer *T. gondii* Infektion, während 90 % der WT Tiere die Infektion überlebten. Der molekulare Mechanismus, der diese enorme Bedeutung der mGBP-abhängigen Immunität ausmacht, ist bislang noch nicht geklärt.

Die Rolle der mGBPs des Chr5-Clusters in Infektionen ist bislang noch nicht beschrieben. In Abhängigkeit des Pathogens konnten einige Mitglieder dieses Clusters jedoch mit hohen Frequenzen an PMs beobachtet werden (Lindenberg et al., 2017). Um ein besseres Verständnis für die Funktion der Chr5-Cluster mGBPs zu bekommen, wurden daher WT und mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} NIH/3T3 Fibroblasten im *C. trachomatis*- sowie im *T. gondii*-Infektionsmodell analysiert.

4.2.1 mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Fibroblasten im *C. trachomatis* Infektionsmodell

In der bereits beschriebenen Quantifizierungsanalyse zur Rekrutierung der mGBPs an verschiedene PMs konnten verhältnismäßig hohe Frequenzen von mGBP9-Akkumulationen an der Inklusionsmembran von *C. trachomatis* beobachtet werden (Lindenberg et al., 2017). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass mGBP9 einen relevanten Faktor in der Kontrolle von Chlamydien-Infektionen darstellt. In der Literatur

wurde eine Funktion von mGBP9 bislang noch nicht beschrieben. Um die Funktion in *in vitro* Experimenten charakterisieren zu können, sollte eine mGBP9-defiziente NIH/3T3 Fibroblasten Zelllinie generiert werden. Da aus dem in Abschn. 4.1.3 beschriebenen Ansatz eine Fibroblasten-Zelllinie mit multiplen mGBP-Defizienzen resultierte, wurden *in vitro* Infektionsanalysen mit der mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Mutante durchgeführt. Anhand dieser Infektionsanalysen sollte ursprünglich der potentielle Einfluss von mGBP9, nun jedoch aller mutierten mGBPs auf eine Infektion mit *C. trachomatis* beschrieben werden. Dafür wurden WT und mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Zellen mit *C. trachomatis* Serovar L2 für 24 h infiziert. Um Unterschiede vor allem in der Infektionsrate sowie in der Proliferation (Größe der Inklusionen) der Chlamydien eindeutiger beschreiben zu können, sollte die Infektion der Fibroblasten mit *C. trachomatis* durch einen Zentrifugationsschritt synchronisiert werden. Die hier verwendeten NIH/3T3 Fibroblasten wiesen jedoch eine äußerst schwache Adhärenz auf, sodass eine Zentrifugation zum Kontaktverlust der Zellen vom jeweiligen Untergrund führte. Die Infektion der nicht-adhären Zellen verursachte schließlich ein Absterben dieser und teilweise auch der übrigen adhären Zellen. Um das Problem der schwachen Adhärenz zu lösen, wurde in einem Experiment das Glykoprotein Fibronectin als Oberflächenbeschichtung getestet (Daten nicht gezeigt). Fibronectin ist ein Baustein der extrazellulären Matrix. Eine Bindung zwischen Fibronectin und dem Oberflächenrezeptor Integrin hat u. a. Einfluss auf die Adhärenz, als auch auf das Wachstum von Fibroblasten (Ingber, 1990). Durch die Oberflächenbehandlung deutete sich zunächst eine gesteigerte Adhärenz der Zellen an. Die Ausbildung von Foci, die zuvor in der Zellkultur beobachtet werden konnten, blieb nach der Oberflächenbehandlung ebenfalls aus. Dadurch konnten die Fibroblasten einen konfluenten Zellrasen ausbilden. Um die Adhärenz unter den Experimentalbedingungen zu testen, wurden die Fibroblasten anschließend uninfiziert zentrifugiert. Trotz der Beschichtung führte eine Zentrifugation jedoch erneut zum Ablösen der Fibroblasten, sodass auf eine synchronisierte Infektion verzichtet werden musste.

Nach einer Inkubation mit *C. trachomatis* wurden die Zellen 3 hpi mit 100 U/ml IFN γ stimuliert. Konzentration sowie Applikationart (Post-Stimulation) wurden entsprechend der Angaben zuvor publizierter Experimente eingesetzt bzw. durchgeführt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen (Finethy et al., 2015, Haldar et al., 2016). Die infizierten Zellen wurden anschließend für die Konfokalmikroskopie vorbereitet und mit ‚Pathfinder *Chlamydia* DFA‘ und DAPI gefärbt. Über die Pathfinder-Färbung konnten die Chlamydien direkt durch einen FITC-gekoppelten, MOMP-spezifischen (‚Major Outer Membrane Protein‘) Antikörper detektiert werden. Eine Färbung des Zytoskeletts diente zusätzlich zur Identifizierung von

Ergebnisse

Inklusionen, die in kreisförmigen Aussparungen des Zytoskeletts sichtbar wurden. Die FITC⁺, DAPI⁺ Inklusionen konnten schließlich in den infizierten Zellen ausgezählt werden. Um einen Einfluss der multiplen mGBP-Defizienz zu analysieren, wurden 20 Gesichtsfelder pro Zelllinie, pro Stimulationsbedingung ausgezählt. In Abb. 16A sind die durchschnittlichen Inklusionszahlen pro Gesichtsfeld aus Chlamydien-Infektionen mit einer MOI von 0,25 (oben) bzw. 0,5 (unten) dargestellt.

Eine Infektion mit einer MOI von 0,5 führte in einigen Experimenten auch ohne den Zentrifugationsschritt interessanterweise zu einem großflächigen Absterben der Zellen. In den bereits publizierten Analysen zur mGBP Rekrutierung an die Inklusionsmembran in NIH/3T3 Fibroblasten (Lindenberg et al., 2017) wurden die Zellen mit einer MOI = 3 infiziert. Dies entsprach dem sechsfachen der Bakterienkonzentration, die in diesen Experimenten verwendet wurde. Das erhöhte Absterben der Zellen konnte hier sowohl für WT als auch für mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Zellen beobachtet werden. Dabei zeichneten sich vor allem die unstimulierten mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Zellen als besonders suszeptibel gegenüber einer Infektion aus. Wie in Abb. 16A (unten) zu erkennen ist, konnte für diese Kondition aus verschiedenen Experimenten nur ein Wert ermittelt werden. In der Zusammenfassung der Experimente schienen die unstimulierten mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Zellen dabei mit 11 Inklusionen/Gesichtsfeld am geringsten infiziert zu sein. Im Vergleich konnten durchschnittlich 20 Inklusionen ± 8 in den IFN γ -stimulierten mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Zellen, 18 Inklusionen ± 9 in unstimulierten WT Zellen und 19 Inklusionen ± 8 in IFN γ -stimulierten WT Zellen durchschnittlich gezählt werden. In Einzelbetrachtung der Experimente zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen den Zelllinien sowie den Stimulationsbedingungen.

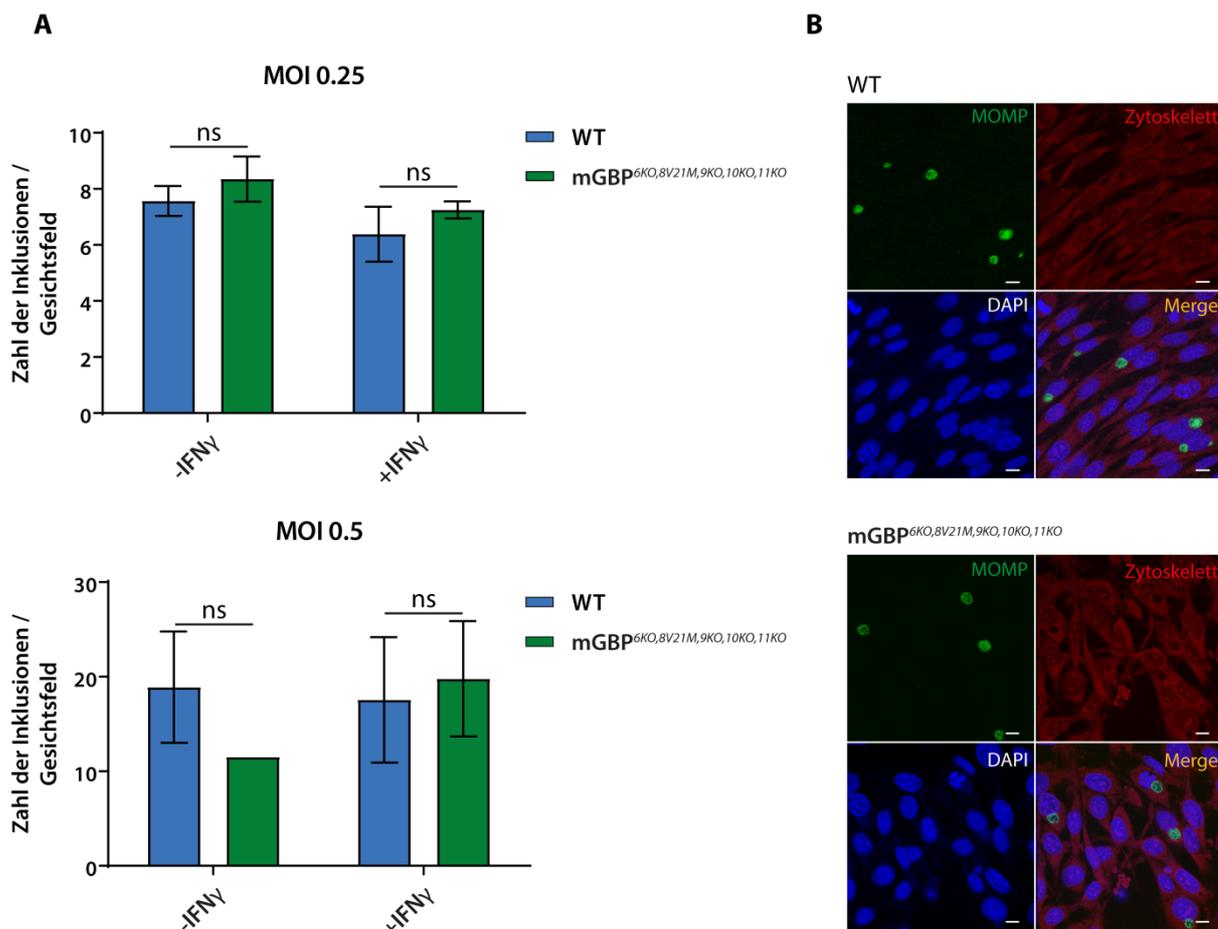


Abb. 16 mGBP-Funktionsanalyse in der *C. trachomatis* Infektion von NIH/3T3 Fibroblasten.

1×10^5 Zellen (WT (blau) und mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} (grün)) wurden mit einer MOI von 0,25 oder 0,5 mit *C. trachomatis* Serovar L2 für 24 h infiziert und 3 hpi mit IFN γ stimuliert oder blieben unstimuliert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Pathfinder *Chlamydia* DFA (BioRad) gefärbt. Die Deckgläschen wurden mittels Konfokalmikroskopie analysiert. **A** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Inklusionszahlen/Gesichtsfeld von 20 verschiedenen Gesichtsfeldern (ca. $135 \mu\text{m} \times 135 \mu\text{m}$) (MOI 0,25: n=3; MOI 0,5: n=2) sowie die statistische Signifikanz (Two-way ANOVA). **B** Aufnahmen aus der Konfokalmikroskopie. Beispielhaft dargestellt sind *C. trachomatis* infizierte, IFN γ -stimulierte WT und mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Zellen. Größenmarker entspricht $10 \mu\text{m}$.

Um das Ablösen und das mögliche Absterben der Zellen durch die Chlamydien-Infektion zu reduzieren, wurden in drei weiteren Experimenten WT und mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Zellen mit einer MOI = 0,25 infiziert (Abb. 16A, oben). Auf Grund der niedrigeren Bakterienkonzentration konnten erwartungsgemäß entsprechend weniger Inklusionen pro Gesichtsfeld, Zelllinie und Bedingung ermittelt werden. Allerdings zeigten sich erneut keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Inklusionen pro Gesichtsfeld zwischen WT und mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} (MW und SD: WT unstim.: 8 ± 1 , WT IFN γ -stim.: 6 Inklusionen, mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} unstim.: 8 ± 1 , mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} IFN γ -stim.: 7 ± 1).

Ergebnisse

Zusammenfassend konnten die Infektionsexperimente zeigen, dass die Defizienzen von mGBP6, 9, 10 und 11 und die konservative Punktmutation im mGBP8-Gen (V21M) keine Auswirkungen auf die Infektionsrate von *C. trachomatis* Serovar L2 haben.

In einem weiteren Experiment sollte die Proliferation von *C. trachomatis* in WT und mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} NIH/3T3 Fibroblasten untersucht werden. Dazu wurden die Zellen auf Wells einer 6 Well Platte ausgesät und erneut mit *C. trachomatis* (MOI = 0,25) infiziert. Die Infektion wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten (12 h, 24 h, 42 h) durch Lyse der Zellen gestoppt. Aus dem Lysat wurde anschließend die Gesamt-DNA isoliert und mittels RT-qPCR untersucht. Über eine Chlamydien-spezifische Sonde wurde die relative Anzahl chlamydialer Genome zu den verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und auf die Expression des Einzelkopiegens *IFN β* der Fibroblasten normalisiert. Im Falle eines anti-proliferativen Effekts der mGBPs des Chr5-Clusters sollte über die verschiedenen Zeitpunkte überprüft werden, ob potentielle Effekte früh bzw. spät im Infektionszyklus auftreten. Die ausgewählten Zeitpunkte stellten drei Schlüsselmomente des Infektionszyklus von *C. trachomatis* dar (Differenzierung, Redifferenzierung, Zellausstieg, s. auch Abschn. 1.4.4). In Abb. 17A sind die Ergebnisse der RT-qPCR Analyse dargestellt.

Erwartungsgemäß konnte in beiden Zelllinien nur eine niedrige relative Anzahl chlamydialer Genome nach 12 h festgestellt werden. Aufgrund der Differenzierung der Chlamydien in ihre metabolisch aktive Form (ca. 12 h) stieg die Proliferation über 24 und 42 h exponentiell in beiden Fibroblastenlinien an. Dabei zeichnete sich sogar eine tendenziell höhere Proliferation in WT Zellen ab. Unerwarteterweise konnte in einem Experiment sogar ein signifikanter Unterschied zwischen IFN γ -stimulierten WT und mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der unterschiedlichen Reaktion der NIH/3T3 Fibroblasten auf die Chlamydien-Infektion, bestätigte sich der signifikante Unterschied jedoch nicht in den drei Replikaten (Abb. 17A). Die Ergebnisse der RT-qPCR deuteten demnach in etwa auf eine antibakterielle Wirkung der mGBP6, 9, 10 und 11 Defizienzen hin. Ein IFN γ -Effekt war dabei erneut weder in den WT noch in den mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Zellen zu verzeichnen.

Um zu überprüfen, ob die starken Abweichungen dieser Analyse möglicherweise auf eine Verunreinigung der isolierten DNA zurückzuführen war, wurde beispielhaft eine weitere RT-qPCR mit genomischer DNA der 42 h Infektion eines Experiments durchgeführt (Abb. 17B). Die DNA wurde hier in zwei verschiedenen Konzentrationen (blaue Klammer: 150 ng, orange Klammer: 15 ng) in Triplikaten eingesetzt. Der parallele Verlauf der Amplifizierungskurven in den jeweiligen Triplikaten und die gleichmäßige Verschiebung der Amplifizierungskurven

zwischen den Verdünnungen der Triplikate deuteten jedoch auf eine reine DNA aus der Aufreinigung hin.

Zusammenfassend konnte in der RT-qPCR Analyse gezeigt werden, dass die multiple mGBP-Defizienz eine tendenziell antibakterielle Wirkung auf *C. trachomatis* spät im ersten Infektionszyklus zu haben schien.

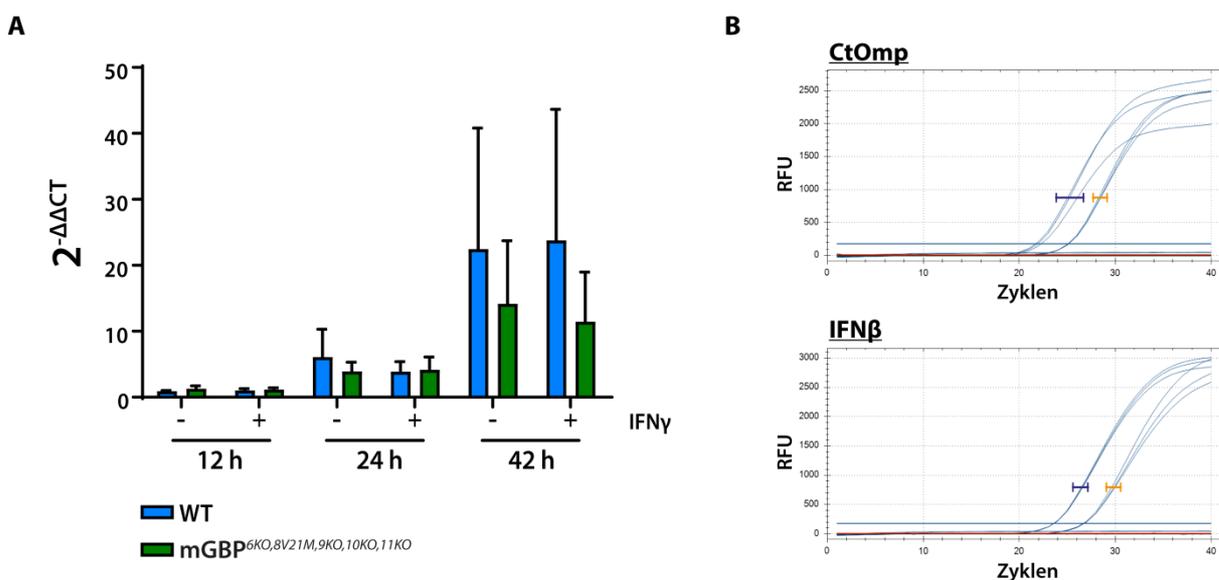


Abb. 17 Proliferationsanalyse von *C. trachomatis* in infizierten NIH/3T3 Fibroblasten.

WT und mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Fibroblasten wurden mit einer MOI von 0,25 infiziert und 3 hpi mit IFN γ stimuliert oder blieben unstimuliert. Nach 12 h, 24 h und 42 h wurde die genomische DNA isoliert. **A** RT-PCR wurde mit 150 ng DNA pro Bedingung durchgeführt. Alle PCRs wurden in Duplikaten durchgeführt und die relative Zahl der Chlamydien-Genome gegen das Einzelkopie-Gen IFN β normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von drei unabhängigen Experimenten. **B** Zur Kontrolle der DNA-Reinheit wurde eine RT-PCR mit 150 ng und 15 ng genomischer DNA aus den Präparationen der 42 h Infektion durchgeführt. Dargestellt sind die Amplifizierungskurven der Triplikate (150 ng: blaue Klammer; 15 ng: orange Klammer).

4.2.2 mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Fibroblasten im *T. gondii* Infektionsmodell

Um den Einfluss der mGBP6, 9, 10 und 11 Defizienzen in einer *T. gondii*-Infektion zu untersuchen, wurden IFN γ -stimulierte sowie unstimulierte WT und mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Zellen mit *T. gondii* (MOI = 1) für 24 h infiziert. Die in der PV liegenden *T. gondii* Parasiten wurden mittels einer Antikörperfärbung gegen das Membranprotein SAG1 für die Konfokalmikroskopie gefärbt. Über die SAG1-Färbung konnte zum einen die Anzahl der PVs und somit auch mögliche Infektionsunterschiede bei einer Infektion der beiden Zelllinien mit *T. gondii* untersucht werden. Zum anderen konnte

Ergebnisse

über die Färbung die Anzahl der Parasiten pro PV bestimmt werden, um mögliche Proliferationsunterschiede der Parasiten zu analysieren. Für die jeweiligen Konditionen wurden schließlich 100 PVs in den infizierten Zellen ausgezählt. In Abb. 18 ist die Anzahl der PVs mit einem Parasiten (blau) bzw. mit zwei oder mehr Parasiten (orange) für die jeweilige Bedingung dargestellt.

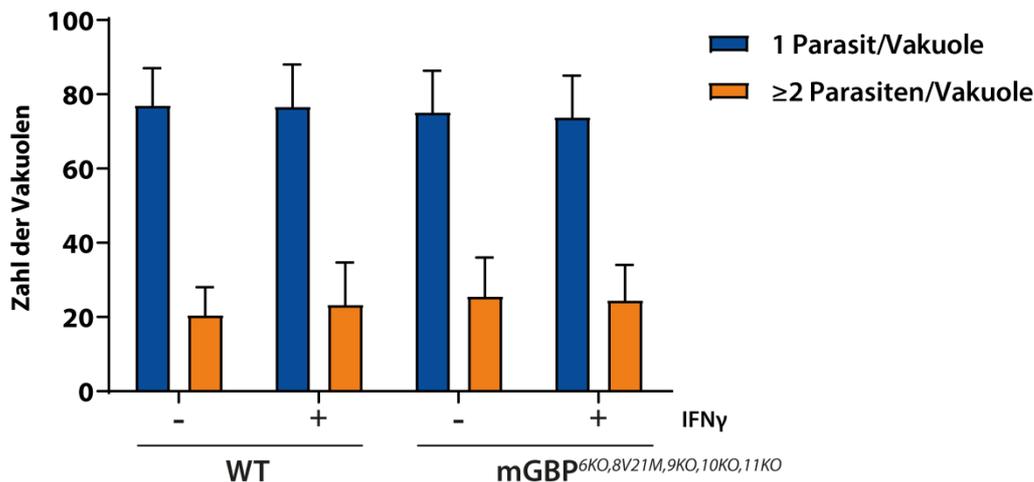


Abb. 18 mGBP-Funktionsanalyse in der *T. gondii* Infektion von NIH/3T3 Fibroblasten.

1×10^4 Zellen (WT und mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO}) wurden ausgesät und für 18 h mit IFN γ stimuliert oder blieben unstimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit einer MOI von 1 mit dem *T. gondii* Stamm ME49 für 24 h infiziert, fixiert und *T. gondii* mit anti-SAG1 gefärbt. Pro Bedingung wurden 100 Vakuolen ausgezählt. Dargestellt sind MW und SEM der Anzahl der Vakuolen mit einem (blau) oder ≥ 2 Parasiten (orange) aus zwei Experimenten.

Die Ergebnisse des Experiments zeigten, dass es keine Unterschiede in der *T. gondii* Proliferation zwischen den beiden Zelllinien gab. Interessanterweise wurden zudem keine Unterschiede zwischen den IFN γ -stimulierten und den unstimulierten Bedingungen in WT, als auch in mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Zellen festgestellt.

Ähnlich wie in den Infektions-Experimenten mit *C. trachomatis* wiesen die Zellen durch die Kombination aus IFN γ -Stimulation und Infektion mit *T. gondii* einen starken Adhärenzverlust auf. Durch den sich in den Experimenten wiederholt auftretenden Kontaktverlust der NIH/3T3 Zellen zum Boden des Zellkulturgefäßes konnten Unterschiede in der Infektion zwischen den beiden Zelllinien nicht analysiert werden.

4.2.3 mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Fibroblasten im MCMV Infektionsmodell

Neben dem Einfluss der GBPs auf die Infektion von intrazellulär replizierenden Protozoen und Bakterien konnten zudem auch antivirale Eigenschaften insbesondere der hGBPs bereits beschrieben werden (Anderson et al., 1999, Braun et al., 2019, Feng et al., 2017, Zhu et al., 2013). Des Weiteren wurde eine inhibierende Funktion von mGBP2 auf die Vesicular stomatitis virus- sowie die Encephalomyocarditis Virus-Replikation festgestellt (Carter et al., 2005). Insgesamt ist die Rolle der mGBPs in Virus-Infektionen jedoch wenig untersucht.

Um mögliche antivirale Eigenschaften von mGBPs des Chr5-Clusters zu charakterisieren, wurden daher WT und mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} NIH/3T3 Fibroblasten im MCMV-Infektionsmodell untersucht. MCMV ist ein doppelsträngiges DNA Virus mit mehr als 160 offenen Leserahmen (Smith et al., 2013). Die Expression von mindestens zwei der Virus-kodierten Gene vermittelt die Fähigkeit den Jak-STAT Signalweg in den jeweiligen Wirtszellen zu inhibieren (Trilling et al., 2014). Eines dieser Gene ist *M27*, dessen Expression zu einer DDB1-abhängigen Degradation von STAT2 führt (Trilling et al., 2011). STAT2 wiederum ist ein wichtiges Signalmolekül vor allem für den IFNAR-Signalweg. Seine Bedeutung im IFN γ R-Signalweg scheint weitaus geringer zu sein, wird jedoch kontrovers diskutiert (Gough et al., 2008). Interessanterweise konnte in einer Infektionsanalyse mit einem MCMV- Δ M27 Stamm insbesondere nach IFN γ -Behandlung eine fast vollständige Inhibierung der Virus-Replikation beobachtet werden (Zimmermann et al., 2005). Um zu überprüfen, ob Chr5-mGBPs relevante Faktoren der IFN γ -abhängigen Virus-Inhibierung darstellen, wurden WT und mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} NIH/3T3 Fibroblasten in den Kollaborationslabors der AG Trilling (UK Essen) mit eGFP-exprimierenden MCMV sowie MCMV- Δ M27 Reporterviren infiziert (1000 PFU). Zusätzlich wurden mCherry, mCherry-mGBP6, mCherry-mGBP9 und mCherry-mGBP10 stabil-transduzierte mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Zelllinien infiziert. Über die rekonstituierte Expression der mCherry-mGBP Fusionsproteine sollte überprüft werden, ob potentielle Effekte der multiplen Defizienz wieder aufgehoben werden können. Die Verwendung von mCherry-Fusionsproteinen diene der Identifizierung sowie der Selektion erfolgreich transduzierter Zellen.

Die verschiedenen Zelllinien wurden zunächst mit Typ-I (250 U/ml) oder Typ-II IFN (500 U/ml) für 48 h stimuliert oder blieben unstimuliert. Als Kontrolle der IFN-Responsivität wurden Zellen mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Ruxolitinib behandelt, der Jak1/2 Signalwege inhibiert. Die kombinatorische Behandlung aus Ruxolitinib und IFN γ sollte zusätzlich die Effektivität des Inhibitors prüfen.

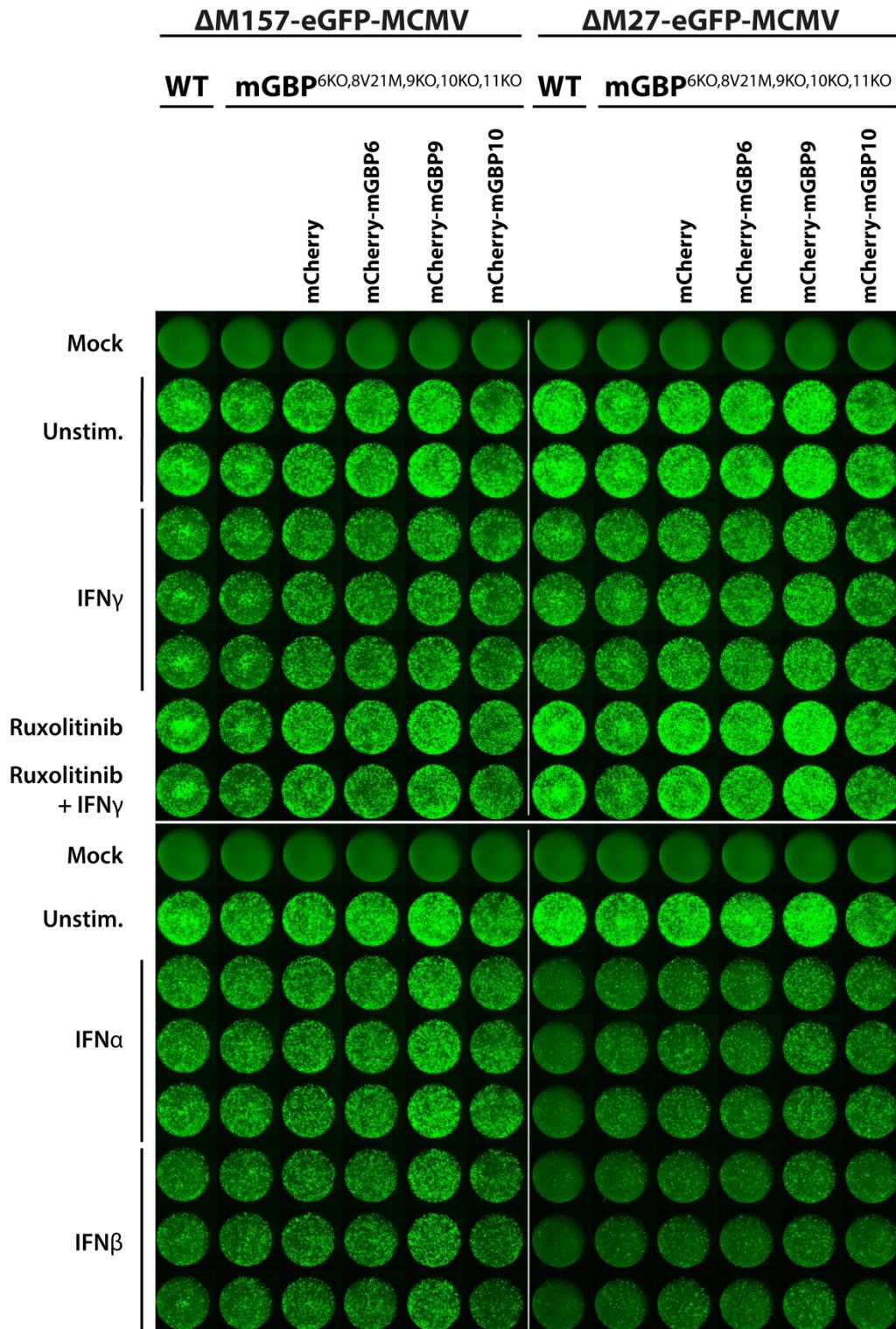


Abb. 19 mGBP-Funktionsanalyse in der MCMV Infektion von NIH/3T3 Fibroblasten.

WT und mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} sowie lentiviral transduzierte mCherry, mCherry-mGBP6, mCherry-mGBP9 und mCherry-mGBP10 exprimierende mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Fibroblasten wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete 96 Well Platten ausgesät. Zellen wurden für ca. 42 h mit 500 U/ml IFN γ , mit 500 U/ml IFN γ und Ruxolitinib (1:5000) oder nur mit Ruxolitinib (1:5000) behandelt oder blieben unbehandelt (Unstim.) (oberes Panel). Des Weiteren wurden Zellen mit 250 U/ml IFN α oder 250 U/ml IFN β behandelt oder blieben unbehandelt (Unstim.) (unteres Panel). Anschließend wurden die Zellen mit 1000 PFU des $\Delta M157$ -eGFP oder des $\Delta M27$ -eGFP MCMV-Stamms infiziert oder blieben uninfiziert (Mock). Der Infektionsverlauf wurde durch Fluoreszenzmessungen im Bioreader aufgenommen. Dargestellt sind die Wells von zwei 96 Well Platten 72 hpi. Die weißen, vertikalen Linien trennen die $\Delta M157$ -eGFP und $\Delta M27$ -eGFP MCMV infizierten Plattenhälften.

Der Infektionsverlauf konnte anhand der eGFP-Expressionsstärke durch das jeweilige Virus täglich überprüft werden. Abb. 19 zeigt die eGFP-Expression in den verschiedenen Zelllinien und Konditionen ca. 72 h nach der Infektion aus dem einzigen bisher durchgeführten Experiment. Eine Wiederholung des Experiments war im Rahmen dieser Dissertation aus zeitlichen und weiteren Gründen nicht mehr möglich. Es handelt sich hierbei um präliminäre Daten.

Die höchste Virusreplikation konnte erwartungsgemäß in den unstimulierten Zellen detektiert werden. Eine vergleichbare Virusreplikation wurde zudem in den Ruxolitinib-behandelten Zellen (+/- IFN γ) gemessen. Unerwarteter Weise konnte eine verhältnismäßig hohe Virusreplikation in den IFN γ -behandelten Zellen beobachtet werden. Unterschiede zwischen den Zelllinien konnten weder innerhalb noch zwischen den MCMV und MCMV- Δ M27 Infektionen beobachtet werden, obwohl MCMV- Δ M27 nachweislich anfälliger gegenüber einer IFN γ -Behandlung ist, als der wildtypische Stamm (Zimmermann et al., 2005). Nach Typ-I IFN Stimulation (α/β) konnte eine stärker inhibierte Virusreplikation von MCMV- Δ M27 beobachtet werden. Die höchste Virusreplikation insgesamt wurde in mCherry-mGBP9-exprimierenden mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} NIH/3T3 Fibroblasten beobachtet.

In einer finalen Messung dieses Experiments wurden zusätzlich die relativen Fluoreszenzintensitäten des eGFP-Signals in den verschiedenen Zelllinien gemessen (Abb. 5). Dafür wurde das Medium zunächst abgenommen und die Zellen im Berthold MultimodeReader analysiert. Diese Messung wurde einmalig am Finaltag des Experiments (72 hpi) durchgeführt.

Typ I IFN: Die Messung der Fluoreszenzintensitäten hat gezeigt, dass die Virus-Replikation in Typ-I IFN behandelten mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Fibroblasten leicht erhöht ist im Vergleich zum WT. Die konstitutive Expression der verschiedenen mGBP-Fusionsproteine hatte keinen Einfluss auf diesen Effekt. Auffällig war zudem, dass mCherry-mGBP9-exprimierende mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} NIH/3T3 Fibroblasten eine signifikant erhöhte Virusreplikation im Vergleich zu den weiteren Zelllinien aufwies.

Typ II IFN: Eine Behandlung der Fibroblasten mit IFN γ führte nicht, wie in der Literatur beschrieben, zu einer stark inhibierten MCMV-Replikation (Zimmermann et al., 2005). Interessanterweise wiesen IFN γ -stimulierte WT und mCherry-mGBP9-exprimierende mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Fibroblasten die höchsten Fluoreszenzintensitäten in beiden Infektionen (MCMV und MCMV- Δ M27) auf. Die mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} sowie die mCherry-mGBP6-, 8- und 10-rekonstituierten Linien zeigten einen Inhibitionseffekt auf die

Ergebnisse

MCMV-Replikation. Die Expression von mGBP9 führte zu einer vergleichbaren Virusreplikation, wie sie im WT beobachtet werden konnte.

Zusammengefasst deuteten die Ergebnisse dieses Experiment an, dass die multiple mGBP-Defizienz in den Fibroblasten (mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO}) nur eine geringe Auswirkung auf die MCMV-Replikation hatte (Typ-I IFN Behandlung). Zudem ließen die ersten Messungen einen proviralen Effekt durch die konstitutive Expression von mCherry-mGBP9 vermuten (AbbS. 5). Auch wenn das Experiment nur einmalig durchgeführt wurde, konnte mittels der hier gezeigten Ergebnisse jedoch erneut eine reduzierte IFN γ -Responsivität der hier verwendeten NIH/3T3 Fibroblasten bestätigt werden. Anders, als in den bisher publizierten Ergebnissen (Le-Trilling et al., 2018, Zimmermann et al., 2005), wiesen die hier eingesetzten WT Fibroblasten trotz IFN γ -Stimulation eine relativ hohe Virusreplikation auf.

Die Ergebnisse des Experiments und Hypothesen, die sich daraus ergaben, müssen durch zukünftige Experiment-Wiederholungen validiert werden. Die bisherigen Beobachtungen dürfen nur als Tendenz betrachtet werden, da das Experiment aus zeitlichen Gründen und aufgrund der Corona-Pandemie nur einmalig durchgeführt werden konnte.

4.3 Lokalisationsstudie von mGBP9 mit weiteren mGBPs

Für die Ausübung ihrer Funktion spielt die korrekte subzelluläre Lokalisierung der mGBPs eine bedeutende Rolle. Die mGBPs 1, 2 und 5 besitzen ein C-terminales CaaX-Motiv, das post-translational isoprenyliert werden kann (Olszewski et al., 2006). Über eine Isoprenylierung können die Proteine mit Membranlipiden interagieren und sich in der Membran verankern (Resh, 2006). Eine Mutation im CaaX-Motiv von mGBP2 führte nachweislich zu einer vollständigen Inhibierung der mGBP2-Akkumulation an der PV-Membran von *T. gondii* und damit einhergehend zu einer stark inhibierten Infektionskontrolle (Kravets et al., 2016).

Die meisten mGBPs besitzen ein solches CaaX-Motiv jedoch nicht. Dennoch konnte eine Akkumulation einiger dieser mit variierenden Frequenzen an verschiedenen PMs beobachtet werden (Legewie et al., 2019, Lindenberg et al., 2017, Steffens et al., 2020). Ein zweiter wichtiger Faktor für die Lokalisierung der mGBPs ist die GTP-Bindungs- und -Hydrolyse-abhängige Multimerisierung. Für mGBP2 konnte eine Komplexbildung mit mGBP1, 2 und 3 in Form von Dimeren oder Multimeren gezeigt werden (Kravets et al., 2016). Die mGBP2-enthaltenden Komplexe wurden an VLS oder an der PV-Membran des Parasiten *T. gondii* beobachtet. In der gleichen Studie konnten MFIS-FRET Analysen zeigen, dass eine Mutation in einem GTP-Bindungsmotiv eine ubiquitäre Verteilung (monomerer Zustand) von mGBP2 zur Folge hatte.

In der AS-Sequenz von mGBP9 existiert kein CaaX-Motiv (Kresse et al., 2008). Die beobachtete Akkumulierung an der Inklusionsmembran von *C. trachomatis* (Lindenberg et al., 2017) führte daher zu der Hypothese, dass eine mGBP9-Akkumulierung von weiteren Inklusionsmembran-interagierenden Faktoren abhängig sein muss. Weiterführend könnte es sich bei diesen Faktoren möglicherweise um weitere mGBPs handeln. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden daher Co-Lokalisationsstudien mit fluoreszentem mGBP9 und weiteren mGBP-Fusionsproteinen durchgeführt.

4.3.1 Expressionsanalyse von GFP-mGBP9 und mCherry-mGBP Fusionsproteinen in NIH/3T3 Fibroblasten

Um eine potentielle Co-Lokalisation der mGBPs untersuchen zu können, sollten ein N-terminal, GFP-gekoppeltes mGBP9- sowie mCherry-gekoppelte mGBP-Fusionsproteine in einer konfokalmikroskopischen Analyse verwendet werden. Dafür wurde zunächst ein *gfp-mgbp9* sowie ein *mCherry-mgbp10* Fusionsgen mittels ‚AQUA-Cloning‘ (Beyer et al., 2015)

Ergebnisse

generiert und in den pWPXL-Expressionsvektor kloniert (AbbS. 6, 7). Alle weiteren hier verwendeten *mCherry-mgbp* Fusionsgene wurden in früheren Studien generiert (Kravets et al., 2016, Lindenberg et al., 2017). Damit die Co-Lokalisation anschließend analysiert werden konnte, wurde das Fusionsgen *gfp-mgbp9* zunächst lentiviral in NIH/3T3 Fibroblasten transduziert. Die GFP-exprimierenden Zellen wurden am FACS Aria™ IIu sortiert und anschließend mit mCherry oder verschiedenen N-terminal, mCherry-gekoppelten *mgbp*-Fusionsgenen erneut lentiviral transduziert (Abb. 20A). In dieser Arbeit wurde versucht die folgenden Expressions-Zelllinien herzustellen: GFP-mGBP9 in Kombination mit mCherry, mCherry-mGBP1, mCherry-mGBP2, mCherry-mGBP3, mCherry-mGBP5, mCherry-mGBP6, mCherry-mGBP7, mCherry-mGBP8, mCherry-mGBP9 oder mCherry-mGBP10. Die mGBPs 4 und 11 wurden in dieser Analyse nicht berücksichtigt, da es sich bei *mgbp4* um einen nicht-funktionalen Locus handelt und das mGBP11-Protein auf Grund eines frühen Stopp-Codons einen stark verkürzten C-Terminus besitzt (Kresse et al., 2008).

Die Expression der Fusionsproteine wurde zunächst konfokalmikroskopisch analysiert. Dafür wurden die Fibroblasten auf Deckgläsern kultiviert, anschließend nach Protokoll 3.1.9 fixiert und mit DAPI gefärbt. Abb. 20B zeigt beispielhaft die konfokale Analyse von GFP-mGBP9- und mCherry-mGBP2-exprimierenden Fibroblasten. Unterschiedliche Intensitäten der GFP- und mCherry-Signale konnten sowohl zwischen den Zellen einer Zelllinie als auch zwischen den Zelllinien beobachtet werden (Abb. 21-30). Die mCherry-mGBP2, -mGBP5, -mGBP6, -mGBP7 und -mGBP8 Fusionsproteine wiesen eine homogene Verteilung im Zytosol auf und konnten teilweise in Vesikel-ähnlichen Strukturen lokalisiert beobachtet werden. Die mCherry-mGBP1, -mGBP3, -mGBP9 und -mGBP10 sowie GFP-mGBP9 transduzierten Zellen wiesen eine eher ubiquitäre, zytoplasmatische Verteilung der mCherry und GFP Signale auf, ähnlich zur mCherry-exprimierenden Kontroll-Zelllinie.

In einer weiteren Expressionskontrolle wurde Zelllysat der verschiedenen Zelllinien in einer Immunoblot-Analyse mit GFP- und mCherry-spezifischen Antikörpern untersucht (Abb. 20 C). Die Immunoblot-Analyse zeigte, dass alle doppelt-transduzierten Zelllinien ein GFP-mGBP9-Konstrukt mit einer molekularen Masse von ca. 100 kDa exprimieren. Zudem konnten verschiedenste Degradationsbanden beobachtet werden. Die GFP-exprimierende Kontrollzelllinie wies eine Bande von ca. 27 kDa auf. Zusätzlich konnte eine sehr prominente GFP-Degradationsbande beobachtet werden, die zudem in allen doppelt-transduzierten Zelllinien detektiert wurde.

In der mCherry-spezifischen Westernblot-Analyse konnte im Zelllysat der meisten doppelt-transduzierten Zelllinien eine Bande von ca. 100 kDa (Fusionsproteine) detektiert werden. Die

variierenden Laufweiten dieser Banden erklärten sich durch die unterschiedliche molekulare Masse der verschiedenen mGBPs (ca. 65-73 kDa). In vermeintlich mCherry-mGBP1- und mCherry-mGBP10-exprimierenden Zelllinien konnten jedoch keine Fusionsproteine auf ähnlicher Höhe detektiert werden. Zudem fehlten die sonst beobachteten Degradationsbanden. In beiden Zelllinien konnte jedoch eine Bande auf Höhe der mCherry-Bande der ‚mCherry + GFP-mGBP9‘ Zelllinie (ca. 27 kDa) detektiert werden.

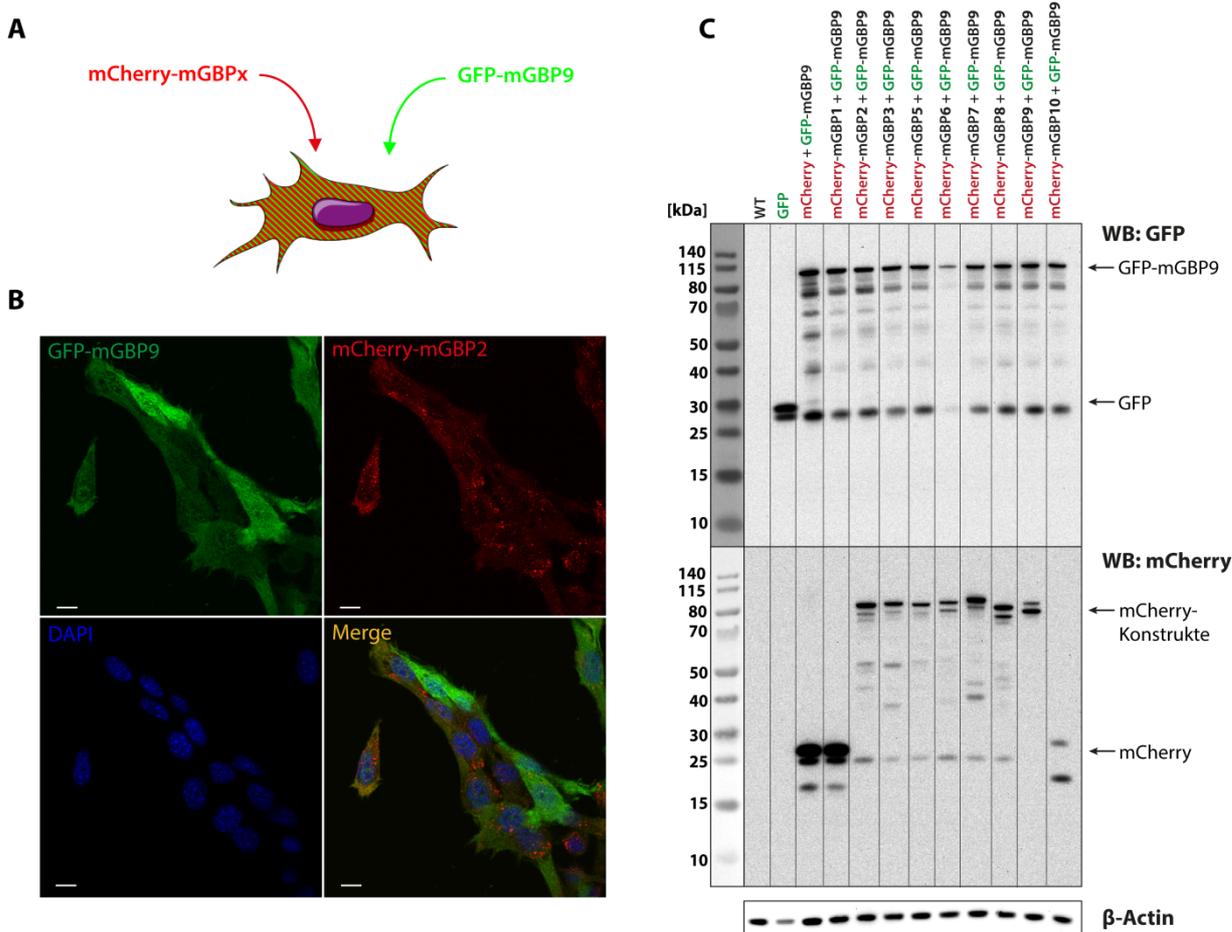


Abb. 20 Ektopische Expression von GFP- und mCherry-mGBP Konstrukten in NIH/3T3 Fibroblasten.

A Schematische Darstellung der Generierung verschiedener Expressions-Varianten. Jeweils ein GFP-mGBP9 und ein mCherry-mGBP_x Konstrukt ($x = 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10$) wurden lentiviral in NIH/3T3 Fibroblasten transduziert. **B** Exemplarische Aufnahme aus der Konfokalmikroskopie. GFP-mGBP9 und mCherry-mGBP2 exprimierende Zellen wurden für ca. 18 h mit IFN γ stimuliert, anschließend fixiert und mit DAPI gefärbt. Größenmarker entspricht 10 μ m. **C** Westernblot-Analyse mit Zelllysate der verschiedenen doppelt transduzierten und Kontroll-Zelllinien. 5 μ g Protein pro Zelllysate wurden auf einem 4-12%igen Bis-Tris SDS Gel aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Die Detektion erfolgte mittels anti-GFP, anti-mCherry und anti- β -Aktin Antikörpern.

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen ließen darauf schließen, dass die meisten Konstrukte erfolgreich in den NIH/3T3 Fibroblasten exprimiert wurden. Die fehlenden Banden in der Westernblot-Analyse sowie die ubiquitäre Verteilung des mCherry-Signals

Ergebnisse

(Mikroskopiebilder) deuteten jedoch darauf hin, dass die Konstrukte mCherry-mGBP1 und mCherry-mGBP10 nicht in Volllänge exprimiert wurden. Diese Beobachtungen galt es bei der Auswertung der nachfolgenden Lokalisations- und Interaktionsanalysen zu berücksichtigen.

4.3.2 Co-Lokalisationsanalyse von GFP-mGBP9 und verschiedenen mCherry-mGBP Fusionsproteinen

Nach der Expressionsanalyse sollte die Co-Lokalisation von mGBP9 mit verschiedenen mGBPs in den doppelt-transduzierten Zelllinien untersucht werden. Dafür wurden die GFP- und mCherry-Signale der konfokalmikroskopischen Aufnahmen zunächst überlagert (Merge). Für eine präzise Berechnung der Co-Lokalisation wurden die Bilder zusätzlich mittels Bitplane IMARIS Software analysiert und die Co-Lokalisation in einem separaten Kanal veranschaulicht (Co-Lokalisation).

Die Fusionsproteine mCherry-mGBP6 und GFP-mGBP9 konnten im Vergleich zu den anderen Fusionsprotein-Kombinationen am häufigsten und in verhältnismäßig großen VLS beobachtet werden (Abb. 26). Der Co-Lokalisationskanal zeigte zudem, dass es einen räumlichen Zusammenhang zwischen dem mCherry- und dem GFP-Signal gab. Eine Co-Lokalisation in den Vesikeln war unabhängig von einer IFN γ -Stimulation.

Des Weiteren konnte eine Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 mit mCherry-mGBP2, -mGBP3, -mGBP7 und -mGBP9 beobachtet werden (Abb. 23, 24, 27, 29). Die Co-Lokalisation von mCherry-mGBP7 mit GFP-mGBP9 stellte sich als IFN γ -unabhängig heraus. Die Co-Lokalisation von mCherry-mGBP2 und -mGBP3 mit GFP-mGBP9 hingegen erwies sich als IFN γ -abhängig. Interessanterweise konnte eine Co-Lokalisation von mCherry-mGBP9 mit GFP-mGBP9 nur in unstimulierten Zellen beobachtet werden.

In den übrigen Zelllinien konnte keine Co-Lokalisation zwischen GFP-mGBP9 und dem jeweiligen mCherry-mGBP Konstrukt detektiert werden. Dabei gilt es zu bedenken, dass mCherry-mGBP1 und -mGBP10 möglicherweise nicht als Fusionsprotein exprimiert wurden.

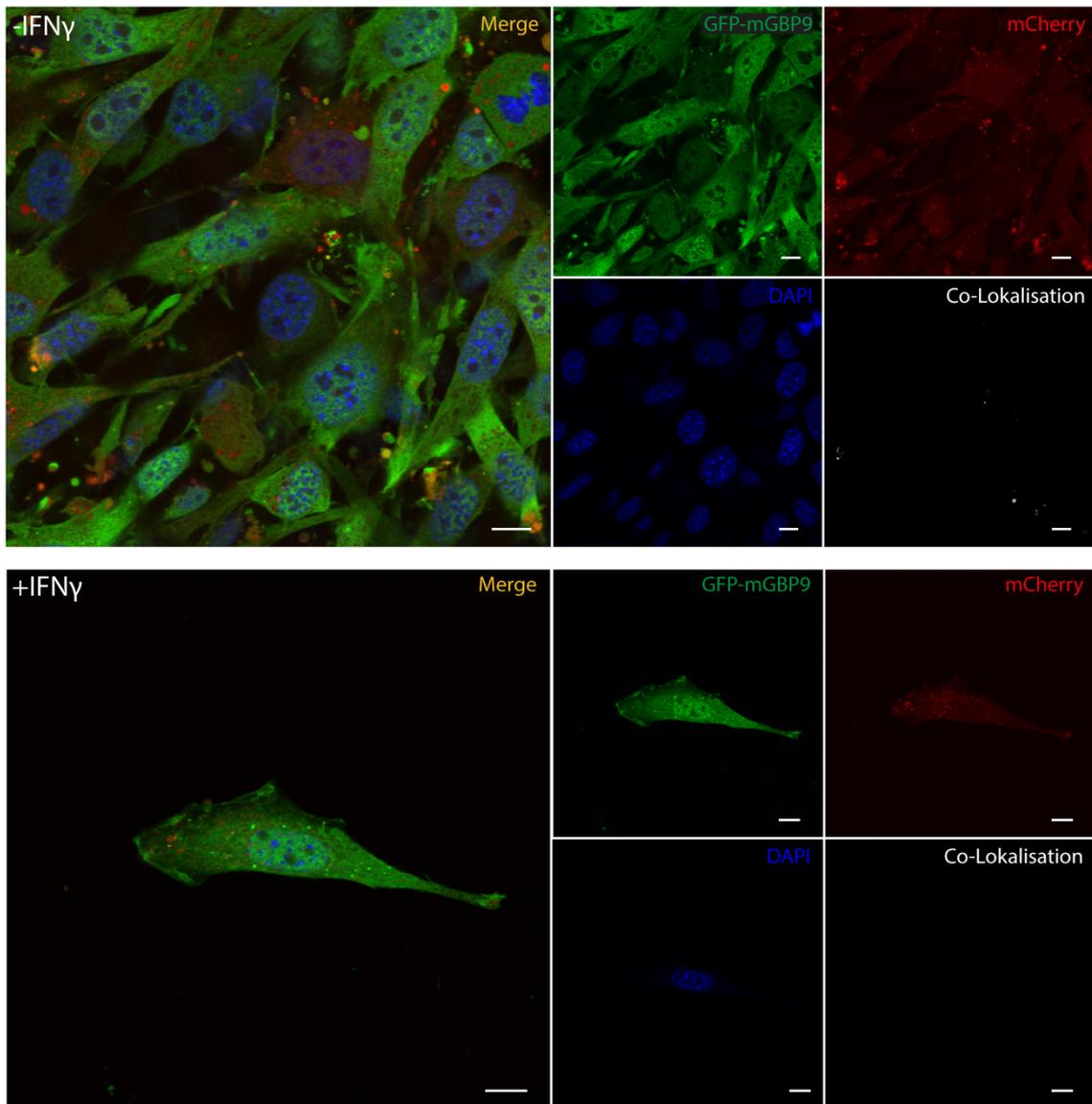


Abb. 21 Konfokalmikroskopische Analyse zur Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 mit mCherry.

Doppelt-transduzierte NIH/3T3 Fibroblasten wurden für ca. 18 h mit 100 U/ml IFN γ stimuliert (unten) oder blieben unstimuliert (oben) und wurden anschließend fixiert und mit DAPI gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem Konfokalmikroskop erstellt und die Co-Lokalisation mittels Bitplane IMARIS analysiert. Größenmarker entspricht 10 μ m.

Ergebnisse

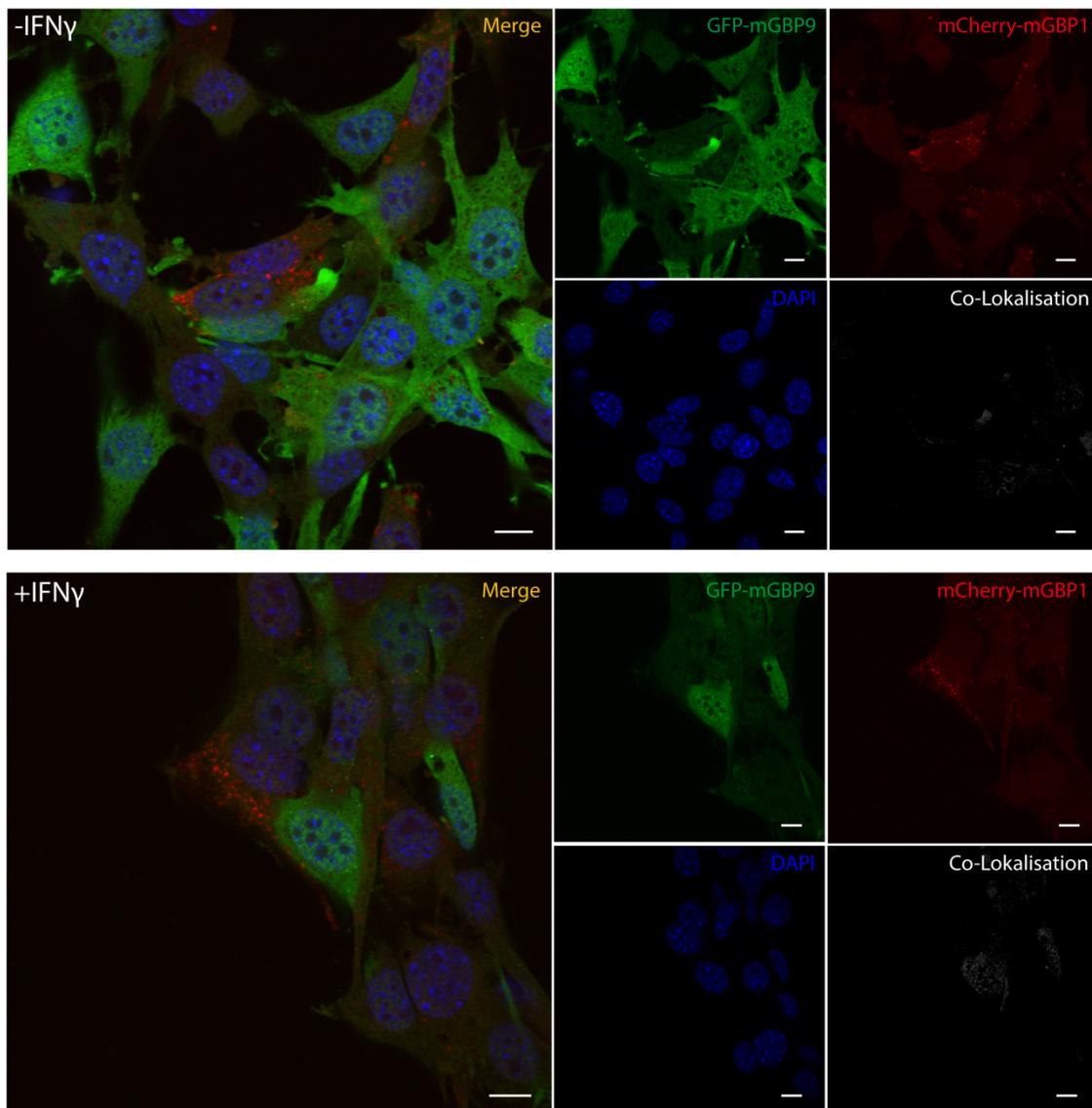


Abb. 22 Konfokalmikroskopische Aufnahme zur Expressionsanalyse der GFP-mGBP9 und mCherry-mGBP1 doppelt-transduzierten Zelllinie.

Doppelt-transduzierte NIH/3T3 Fibroblasten wurden für ca. 18 h mit 100 U/ml IFN γ stimuliert (unten) oder blieben unstimuliert (oben) und wurden anschließend fixiert und mit DAPI gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem Konfokalmikroskop erstellt. Größenmarker entspricht 10 μ m.

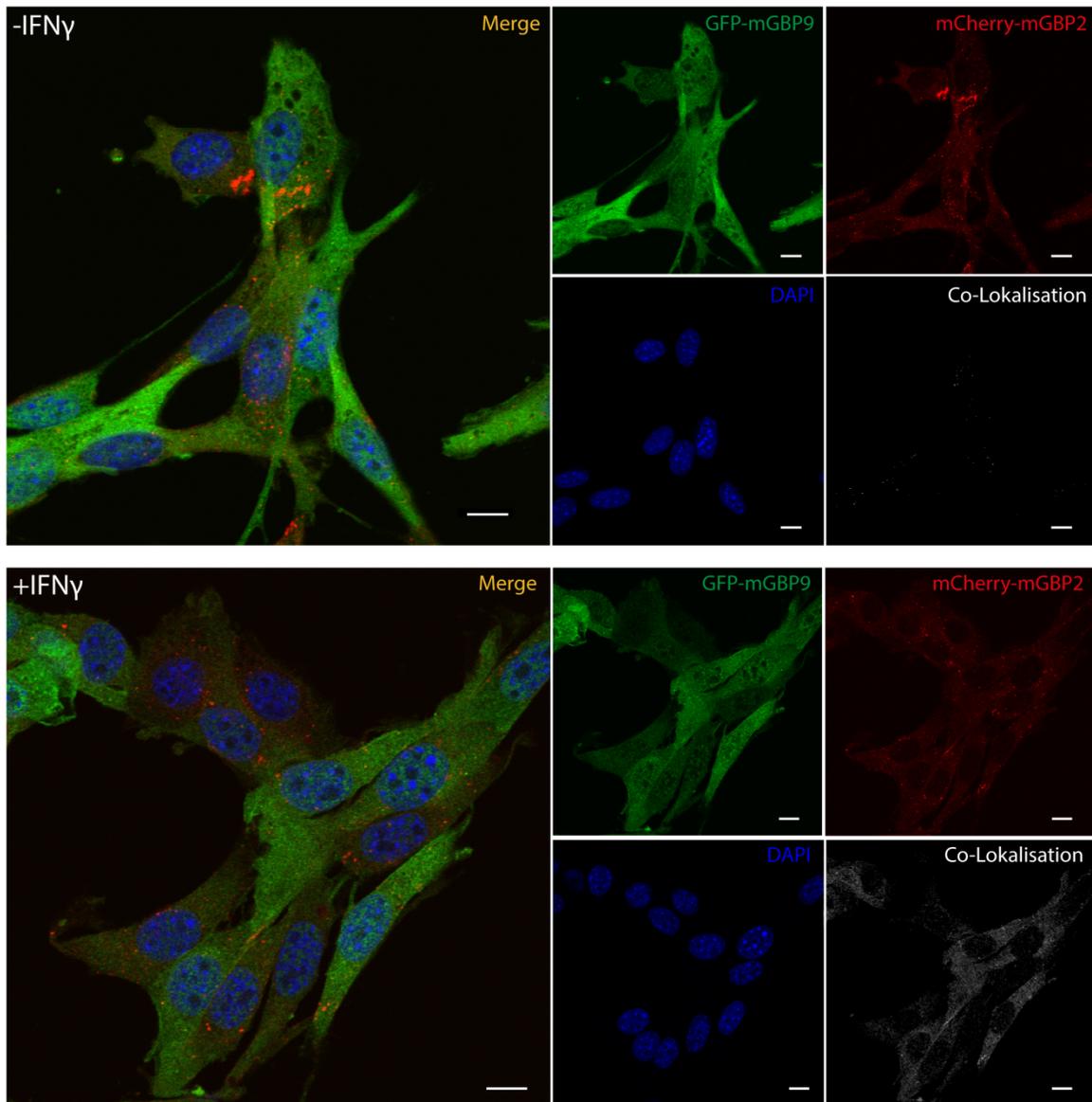


Abb. 23 Konfokalmikroskopische Analyse zur Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 mit mCherry-mGBP2. Doppelt-transduzierte NIH/3T3 Fibroblasten wurden für ca. 18 h mit 100 U/ml IFN γ stimuliert (unten) oder blieben unstimuliert (oben) und wurden anschließend fixiert und mit DAPI gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem Konfokalmikroskop erstellt und die Co-Lokalisation mittels Bitplane IMARIS analysiert. Größenmarker entspricht 10 μ m.

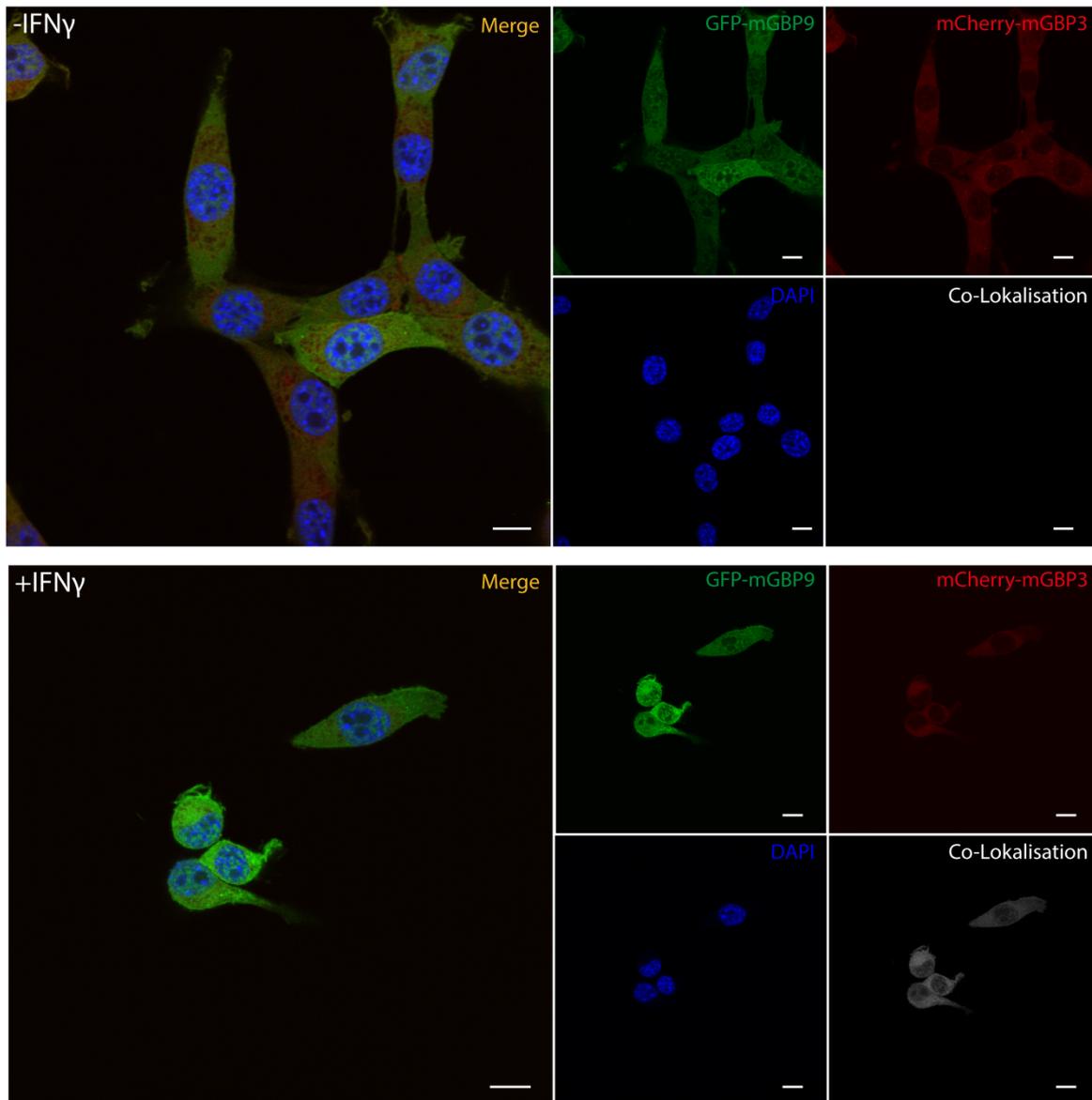


Abb. 24 Konfokalmikroskopische Analyse zur Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 mit mCherry-mGBP3.

Doppelt-transduzierte NIH/3T3 Fibroblasten wurden für ca. 18 h mit 100 U/ml IFN γ stimuliert (unten) oder blieben unstimuliert (oben) und wurden anschließend fixiert und mit DAPI gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem Konfokalmikroskop erstellt und die Co-Lokalisation mittels Bitplane IMARIS analysiert. Größenmarker entspricht 10 μ m.

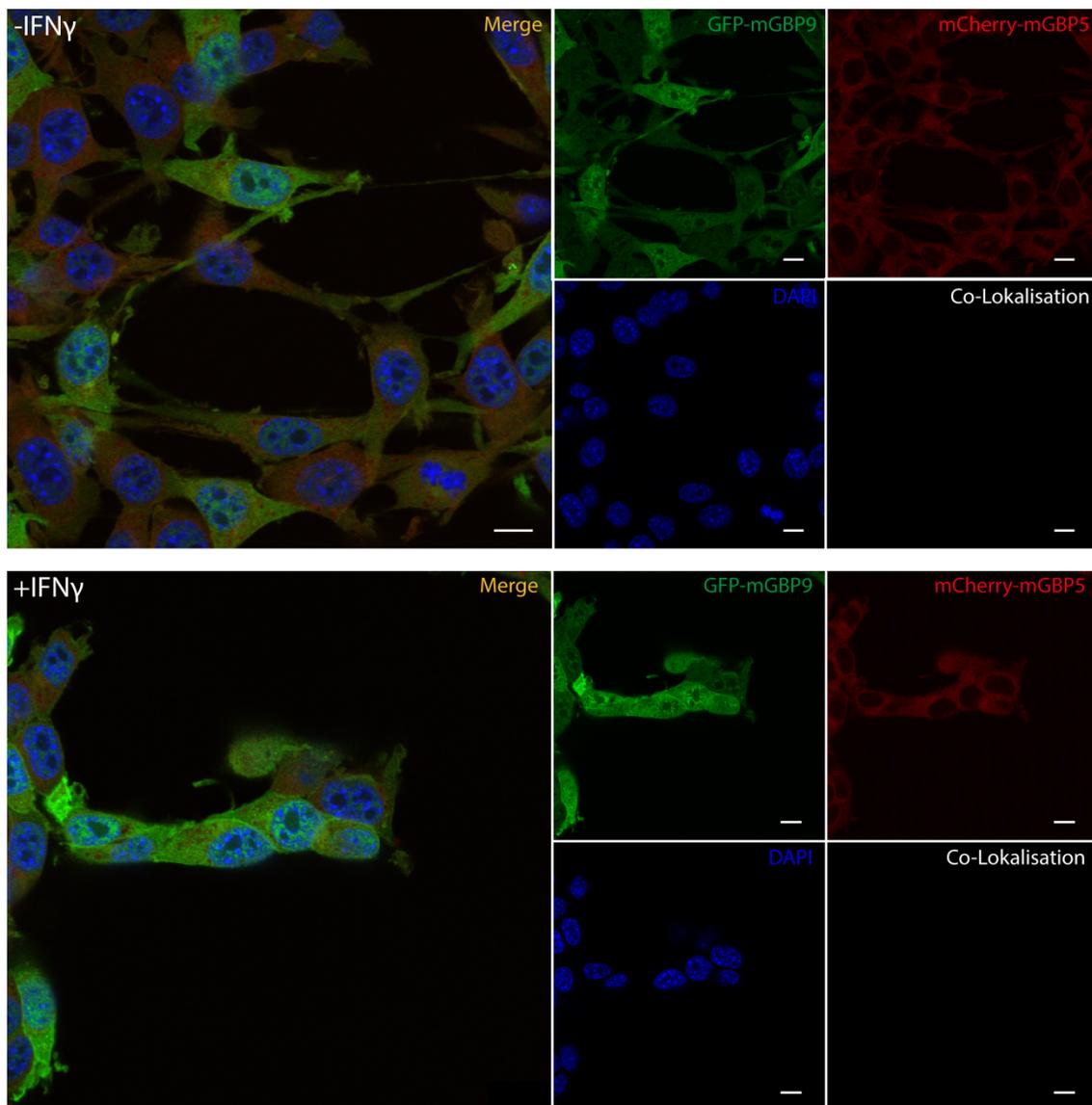


Abb. 25 Konfokalmikroskopische Analyse zur Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 mit mCherry-mGBP5. Doppelt-transduzierte NIH/3T3 Fibroblasten wurden für ca. 18 h mit 100 U/ml IFN γ stimuliert (unten) oder blieben unstimuliert (oben) und wurden anschließend fixiert und mit DAPI gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem Konfokalmikroskop erstellt und die Co-Lokalisation mittels Bitplane IMARIS analysiert. Größenmarker entspricht 10 μ m.

Ergebnisse

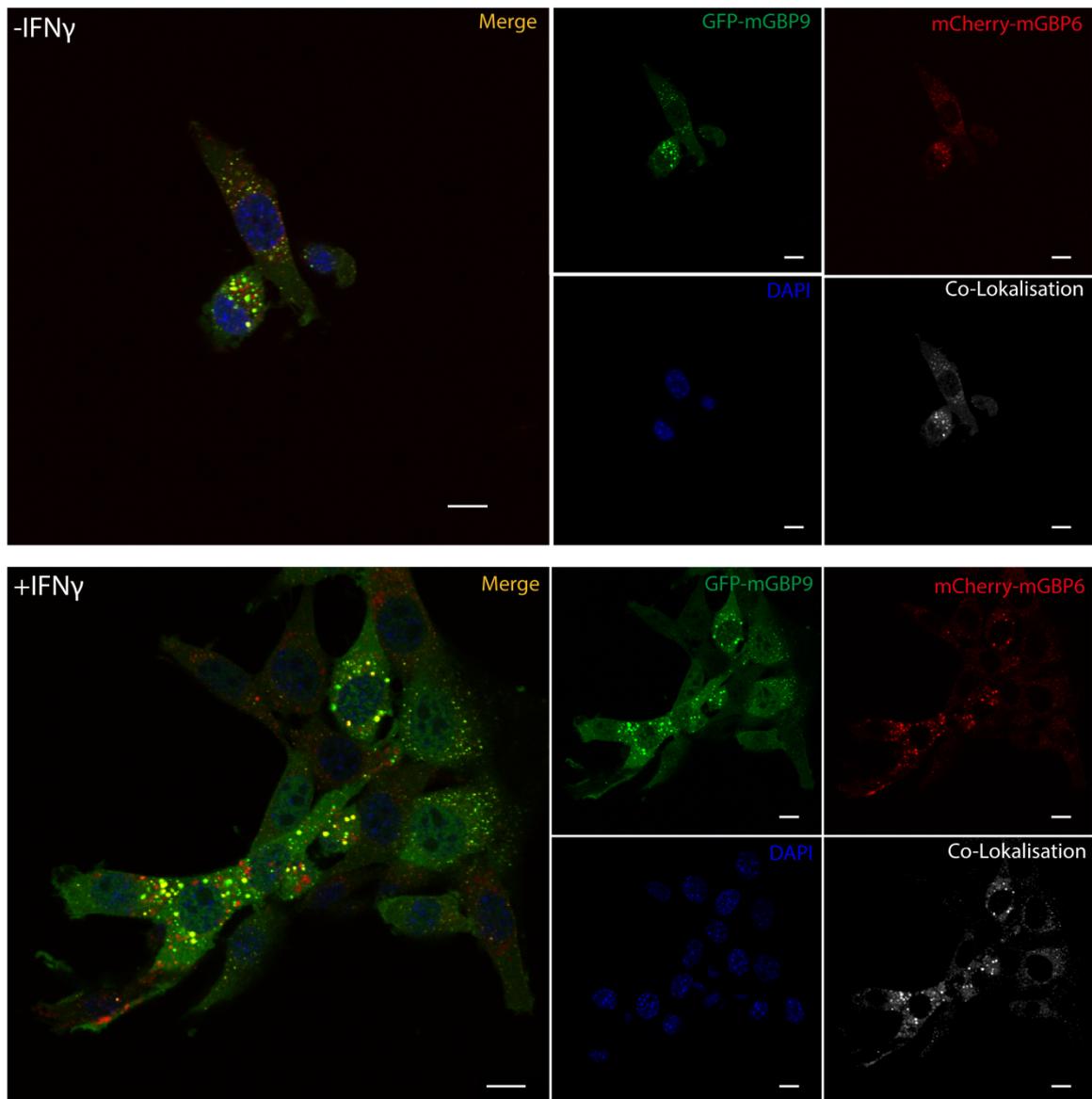


Abb. 26 Konfokalmikroskopische Analyse zur Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 mit mCherry-mGBP6. Doppelt-transduzierte NIH/3T3 Fibroblasten wurden für ca. 18 h mit 100 U/ml IFN γ stimuliert (unten) oder blieben unstimuliert (oben) und wurden anschließend fixiert und mit DAPI gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem Konfokalmikroskop erstellt und die Co-Lokalisation mittels Bitplane IMARIS analysiert. Größenmarker entspricht 10 μ m.

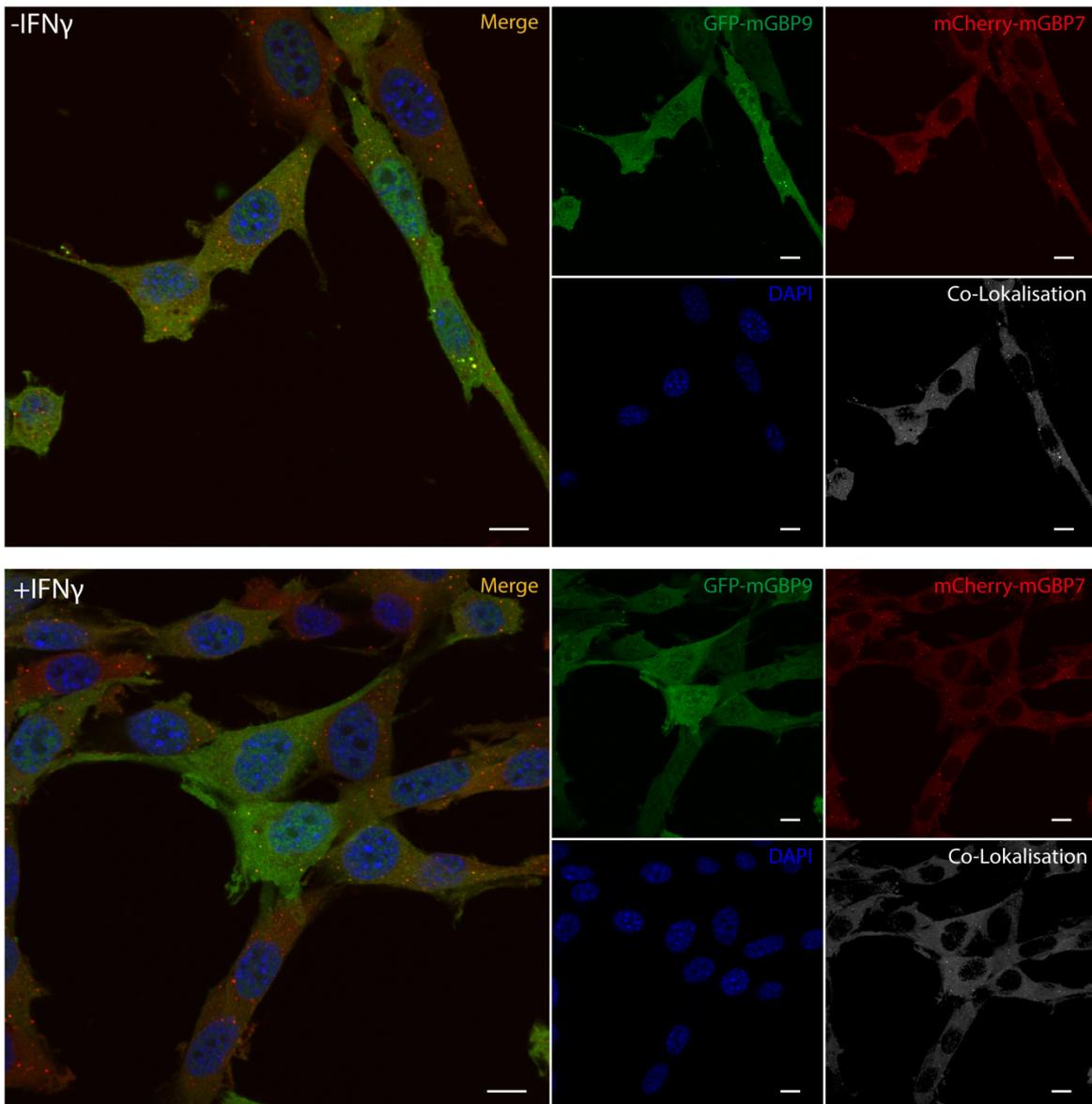


Abb. 27 Konfokalmikroskopische Analyse zur Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 mit mCherry-mGBP7. Doppelt-transduzierte NIH/3T3 Fibroblasten wurden für ca. 18 h mit 100 U/ml IFN γ stimuliert (unten) oder blieben unstimuliert (oben) und wurden anschließend fixiert und mit DAPI gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem Konfokalmikroskop erstellt und die Co-Lokalisation mittels Bitplane IMARIS analysiert. Größenmarker entspricht 10 μ m.

Ergebnisse

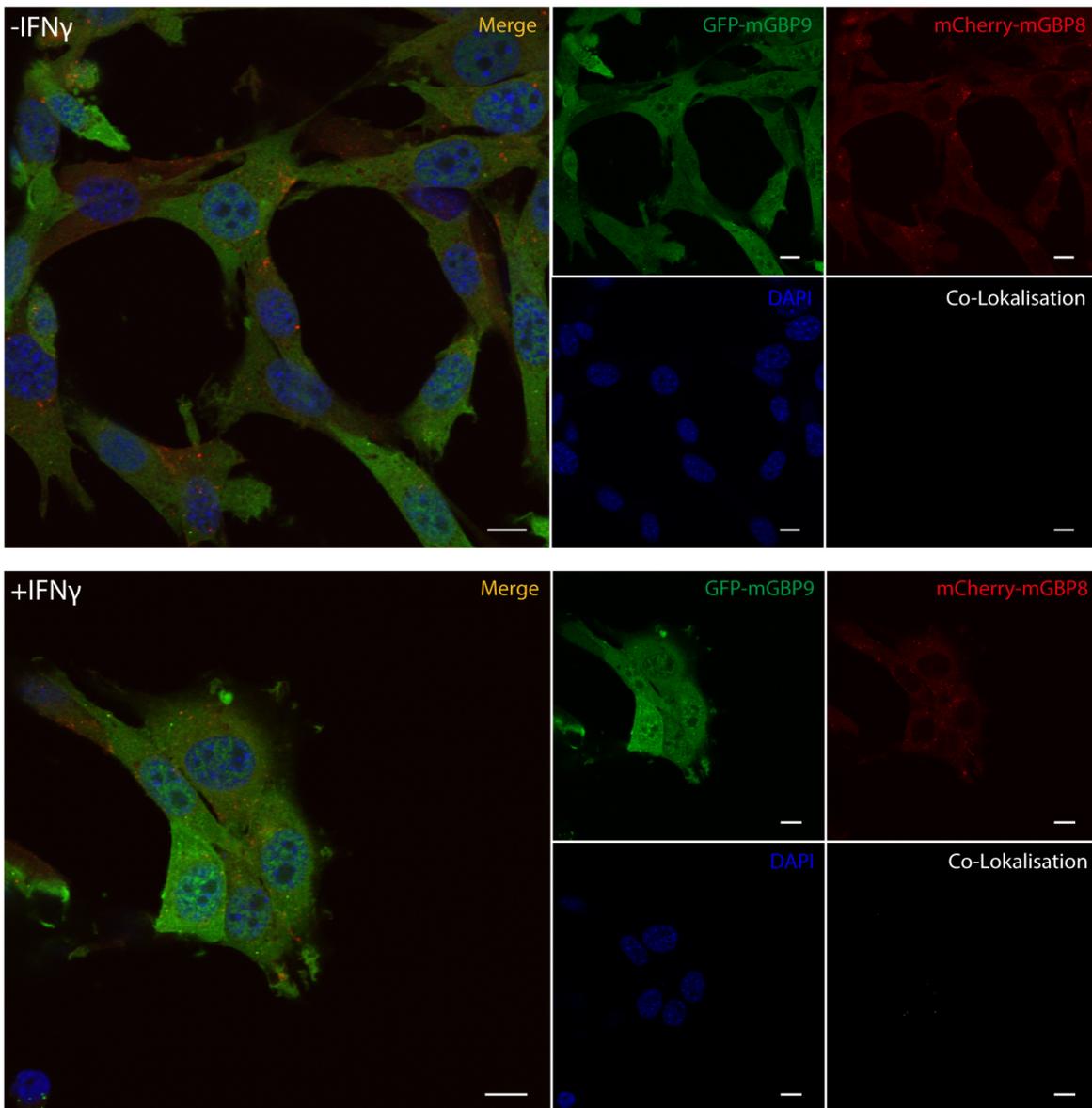


Abb. 28 Konfokalmikroskopische Analyse zur Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 mit mCherry-mGBP8. Doppelt-transduzierte NIH/3T3 Fibroblasten wurden für ca. 18 h mit 100 U/ml IFN γ stimuliert (unten) oder blieben unstimuliert (oben) und wurden anschließend fixiert und mit DAPI gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem Konfokalmikroskop erstellt und die Co-Lokalisation mittels Bitplane IMARIS analysiert. Größenmarker entspricht 10 μ m.

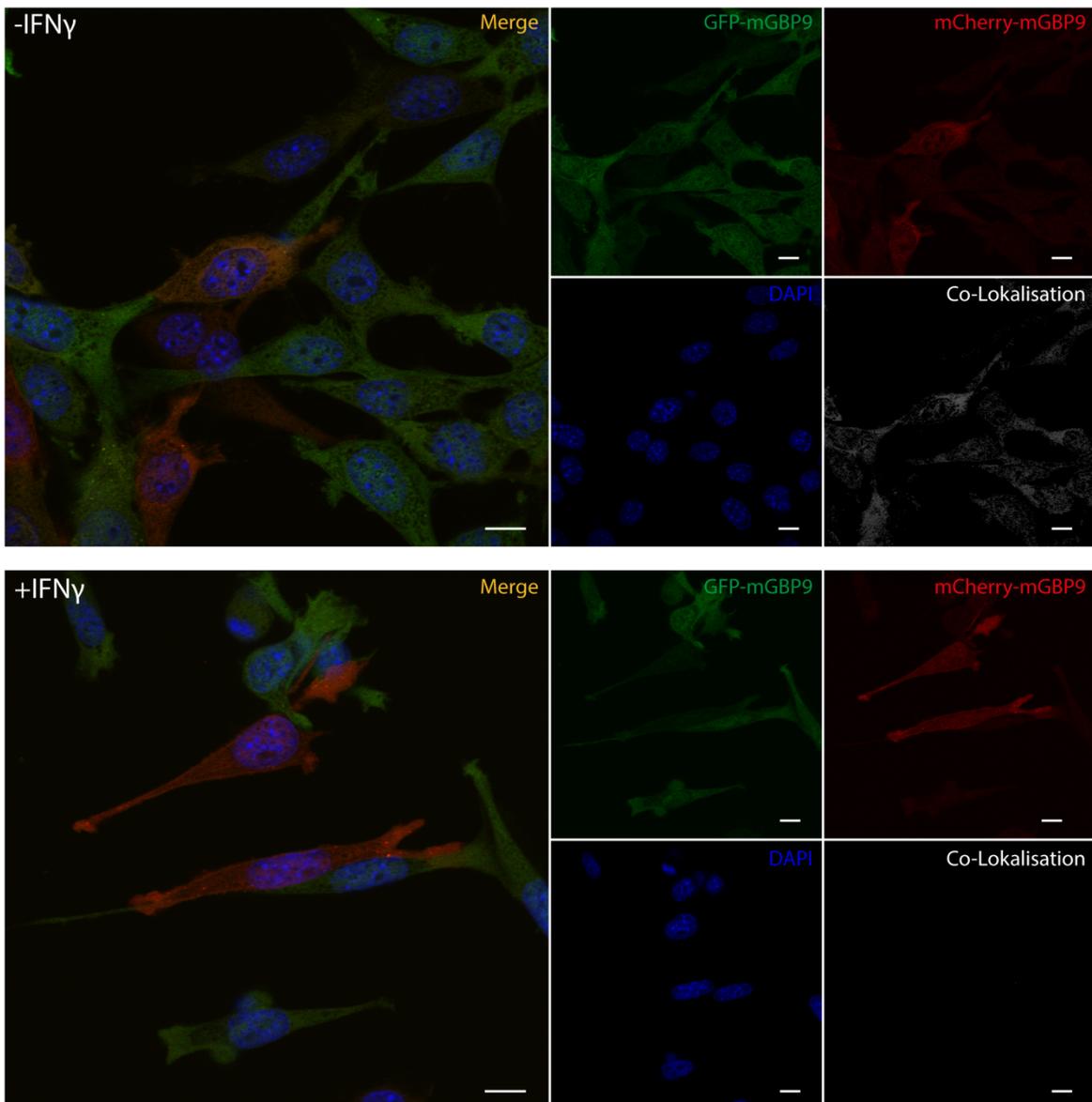


Abb. 29 Konfokalmikroskopische Analyse zur Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 mit mCherry-mGBP9. Doppelt-transduzierte NIH/3T3 Fibroblasten wurden für ca. 18 h mit 100 U/ml IFN γ stimuliert (unten) oder blieben unstimuliert (oben) und wurden anschließend fixiert und mit DAPI gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem Konfokalmikroskop erstellt und die Co-Lokalisation mittels Bitplane IMARIS analysiert. Größenmarker entspricht 10 μ m.

Ergebnisse

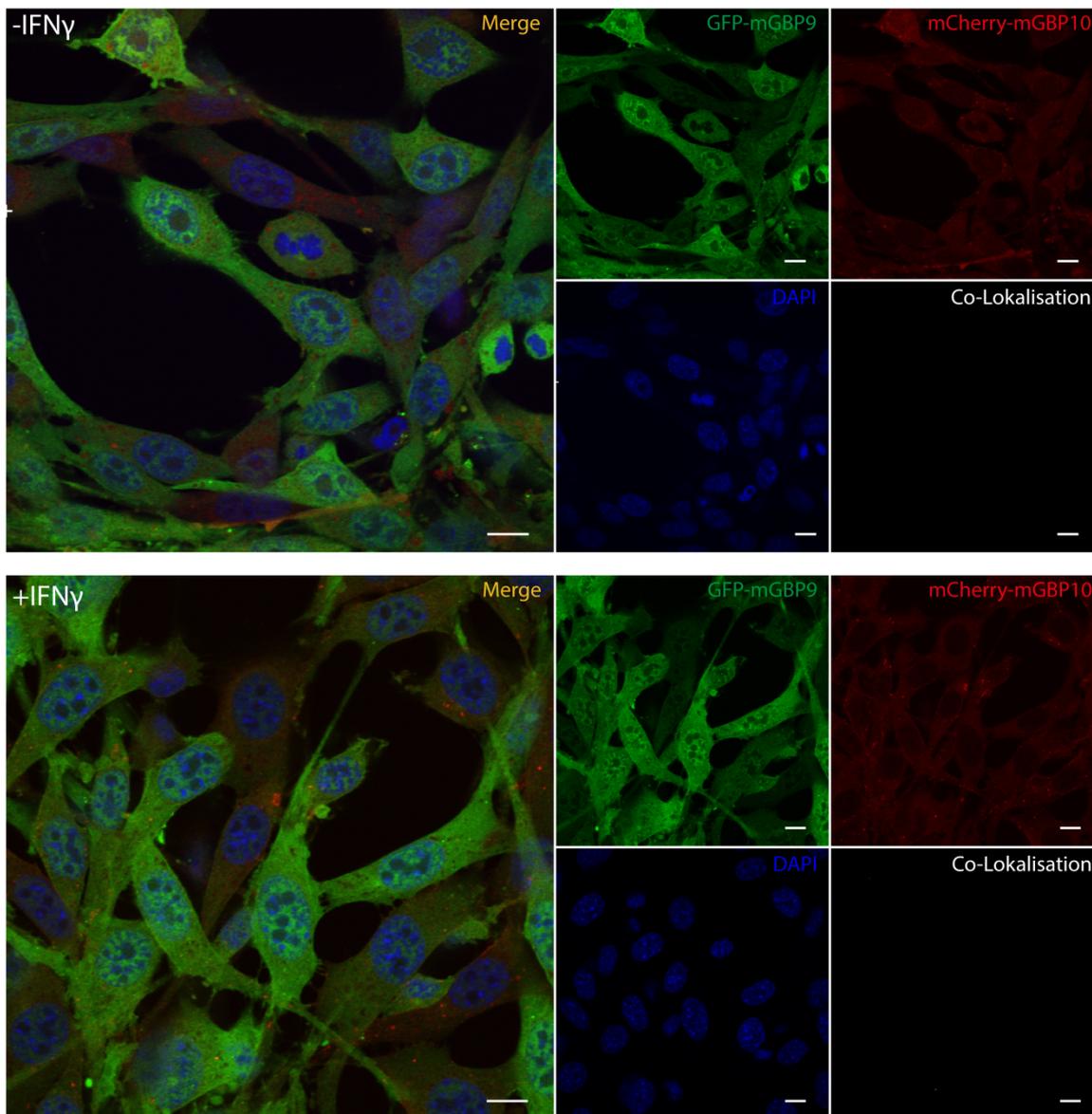


Abb. 30 Konfokalmikroskopische Aufnahme zur Expressionsanalyse der GFP-mGBP9 mit mCherry-mGBP10 doppelt-transduzierten Zelllinie.

Doppelt-transduzierte NIH/3T3 Fibroblasten wurden für ca. 18 h mit 100 U/ml IFN γ stimuliert (unten) oder blieben unstimuliert (oben) und wurden anschließend fixiert und mit DAPI gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem Konfokalmikroskop erstellt. Größenmarker entspricht 10 μ m.

4.3.2.1 Interaktionsstudie von GFP-mGBP9 und mCherry-mGBP6

Das häufige Auftreten von GFP-mGBP9 und mCherry-mGBP6 in den beobachteten VLS deutete auf eine mögliche Interaktion der Proteine in einem hetero-Multimerisierungskomplex hin. Um zu überprüfen, ob die Co-Lokalisation der Konstrukte auf eine Interaktion zwischen den beiden mGBPs zurückzuführen war, wurde daher eine Co-Immunopräzipitation mittels des *GFP-Trap* Kits durchgeführt (s. 3.3.6). Dafür wurde das Zelllysate der doppelt-transduzierten Zelllinie mit GFP-Antikörper-gekoppelten *Beads* inkubiert, über eine Säule aufgereinigt und das gebundene Protein schließlich von den *Beads* eluiert. Im Falle einer Interaktion zwischen den beiden Konstrukten wurde das mCherry-mGBP6 Konstrukt ebenfalls in der Elutionsfraktion erwartet.

In einer Westernblot-Analyse wurden mittels GFP- und mCherry-spezifischen Antikörpern die Präsenz der jeweiligen Konstrukte im Zelllysate (L), im Überstand nach *Bead*-Inkubation (Ü) und in den Elutionsfraktionen (E) untersucht. Zur Kontrolle der GFP-Spezifität der *Beads* wurde des Weiteren Zelllysate von Zellen analysiert, die ungekoppeltes GFP- bzw. mCherry-Protein exprimieren. Um eine mögliche Interaktion zwischen dem mCherry-Marker und dem GFP-mGBP9 Konstrukt ausschließen zu können, wurde als weitere Kontrolle das Zelllysate einer mCherry-exprimierenden sowie GFP-mGBP9-exprimierenden Zelllinie getestet.

Die Kontrollen zeigten im Westernblot die erwarteten Ergebnisse (Abb. 31). Ausschließlich GFP, nicht aber mCherry konnten in der jeweiligen Elutionsfraktion detektiert werden. Des Weiteren konnte lediglich GFP-mGBP9, nicht aber mCherry in der Elutionsfraktion der Kontrollzelllinie (mCherry + GFP-mGBP9) beobachtet werden. Im Lysate der Testzelllinie wurden GFP-mGBP9 und mCherry-mGBP6 erneut über die entsprechenden Antikörper nachgewiesen. Wie bereits in der Expressionskontrolle beobachtet (Abb. 20C), war für mCherry-mGBP6 ein zu weiteren mGBPs vergleichbares Expressionslevel zu verzeichnen. In der Elutionsfraktion hingegen wurde ausschließlich das GFP-mGBP9 Konstrukt beobachtet. Dieses Ergebnis ließ demnach vermuten, dass die beiden Fusionsproteine nicht miteinander interagieren und die beobachtete Co-Lokalisation möglicherweise durch weitere Faktoren, wie beispielsweise einem gemeinsamen subzellulären Lokalisationssignal, begünstigt wurde. Da eine homo-Multimerisierung für mGBP2 bereits beschrieben (Kravets et al., 2016) und eine Co-Lokalisation in den GFP- und mCherry-mGBP9-exprimierenden Zellen beobachtet wurde (Abb. 29), lag die Vermutung nahe, dass auch mGBP9 möglicherweise homomere Komplexe bildet. Daher wurde parallel zur mGBP6-mGBP9 Interaktionsanalyse eine mGBP9-mGBP9 Interaktion untersucht. Um eine mögliche Interaktion zu untersuchen, wurde

Ergebnisse

ebenfalls eine Co-IP mit den entsprechenden Fusionsproteinen durchgeführt. Im Zelllysate (L) der GFP-mGBP9 und mCherry-mGBP9-exprimierenden Zelllinie konnten beide Konstrukte über den entsprechenden GFP- bzw. mCherry-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte neben GFP-mGBP9 auch mCherry-mGBP9 in der Elutionsfraktion im entsprechenden Immunoblot detektiert werden. Das Ergebnis der Co-IP zeigte somit, dass mGBP9 mit weiteren mGBP9-Molekülen interagiert.

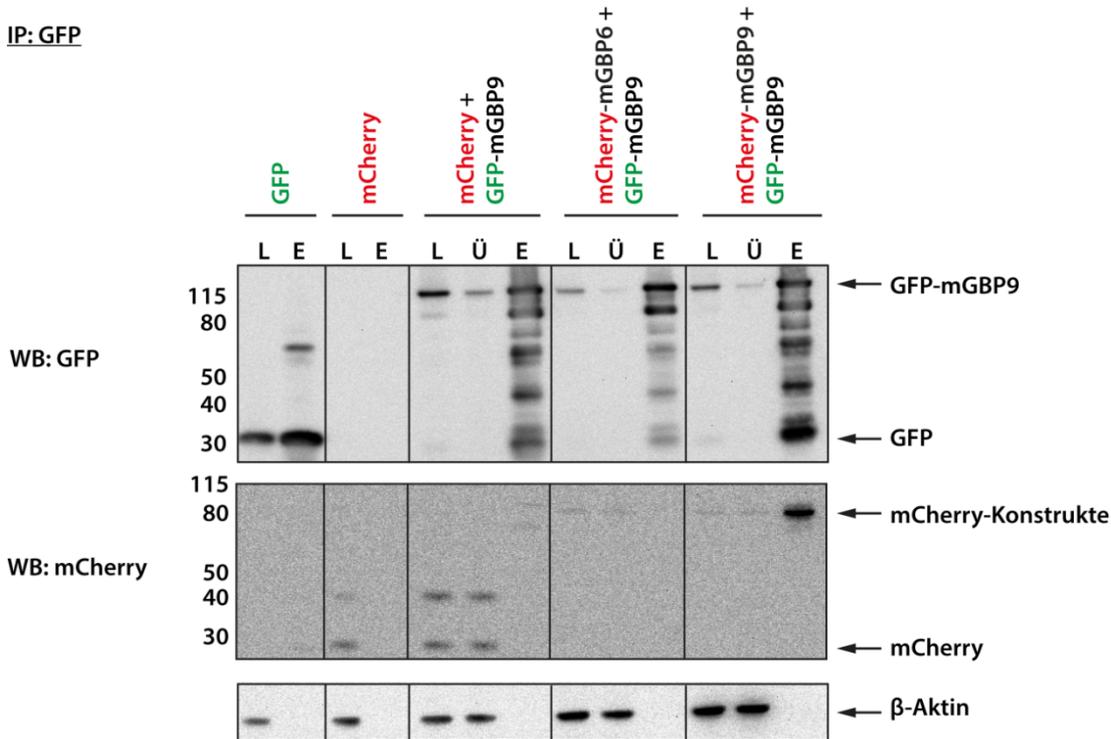


Abb. 31 Interaktionsanalyse von GFP-mGBP9 mit mCherry-mGBP Konstrukten.

Zelllysate von GFP, mCherry, mCherry u. GFP-mGBP9, mCherry-mGBP6 u. GFP-mGBP9 sowie mCherry-mGBP9 und GFP-mGBP9 exprimierenden Zellen wurde isoliert und GFP oder GFP-mGBP9 mittels des GFP-Trap Kit aufgereinigt. Ca. 3 μ g Protein aus den verschiedenen Fraktionen Zelllysate (L), Überstand nach der Aufreinigung (Ü) und Elution (E) wurden auf einem 4-12%igem Bis-Tris SDS Gel aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Die Detektion erfolgte mittels anti-GFP, anti-mCherry und anti- β -Aktin Antikörpern.

4.3.3 Co-Lokalisationsanalyse von mGBP9 mit verschiedenen mGBPs an der chlamydialen Inklusionsmembran

Das mGBP9-Protein akkumuliert mit relativ hoher Frequenz an der Inklusionsmembran von *C. trachomatis*, besitzt jedoch, wie bereits beschrieben, keine C-terminale Isoprenylierungsstelle (Kresse et al., 2008, Lindenberg et al., 2017). Eine Akkumulation an der Inklusion könnte daher hypothetisch folgende Gründe haben. Zum einen könnte das mGBP9-Protein eine spezifische Sequenz am C-Terminus besitzen, die für Membraninteraktionen, wie im

Falle der mGBP7-Interaktion mit der *T. gondii* PV-Membran, verantwortlich ist (Legewie et al., 2019). Zum anderen wäre die Existenz unbekannter Inklusionsmembran-ständiger Interaktionspartner möglich. Verschiedene Studien konnten belegen, dass die GBP-Rekrutierung an PMs (hGBPs und mGBPs) teils einem hierarchischen Muster unterliegt (Piro et al., 2017, Steffens et al., 2020, Wandel et al., 2017). Demnach begünstigt die Akkumulation einiger GBPs scheinbar die Rekrutierung weiterer GBPs zu membranösen Strukturen. Neben mGBP9 wurden mGBP1 und mGBP2 mit ähnlichen hohen Frequenzen und weitere mGBPs mit deutlich geringeren Frequenzen, an der Inklusion detektiert (Lindenberg et al., 2017). Diese Beobachtungen als auch die gezeigte Co-Lokalisation (Abschn. 4.3.2) führten zu der Hypothese, dass eine Rekrutierung von mGBP9 an die Inklusionsmembran im Zusammenhang mit der Rekrutierung weiterer mGBPs steht.

Um eine mögliche Co-Lokalisation an der Inklusionsmembran zu untersuchen, wurden daher GFP-mGBP9 und mCherry-mGBP_x doppelt-transduzierte NIH/3T3 Fibroblasten auf Deckgläschen ausgesät und mit *C. trachomatis* infiziert (MOI = 0,25). 3 hpi wurden die Zellen mit IFN γ stimuliert oder blieben unstimuliert. Die Infektion wurde nach 24 h durch Fixierung der Zellen gestoppt. Die Chlamydien wurden mittels eines primären Maus-anti-MOMP und eines sekundären, Alexa647-gekoppelten anti-Maus Antikörpers gefärbt. Schließlich wurden die Nuklei und die chlamydiale DNA mit DAPI gefärbt und die infizierten Zellen konfokalmikroskopisch untersucht.

Ähnlich wie in den Infektionsexperimenten zur Analyse der mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Zelllinie wurde eine eingeschränkte Adhärenz der NIH/3T3 Fibroblasten durch die Behandlung mit IFN γ sowie durch die Chlamydien-Infektion festgestellt. Ebenso bewirkte eine Zentrifugation der Zellen zur Synchronisierung der Infektion einen erhöhten Kontaktverlust zum Deckgläschen (s. Abschn. 4.2.1). Im Vergleich zur Quantifizierungsanalyse der mGBP-Einzelrekrutierung (Lindenberg et al., 2017), konnten in den doppelt-transduzierten Zellen allgemein seltener mGBP-Akkumulierungen an der Inklusion beobachtet werden. Zudem wurde ausschließlich eine Rekrutierung der Fusionsproteine mCherry-mGBP2, -mGBP8, -mGBP9 und GFP-mGBP9 an die Inklusion detektiert (Abb. 32, 33). Die Lokalisation der Fusionsproteine mCherry-mGBP1 und -mGBP10 konnte auch hier erneut nicht analysiert werden. Trotz der häufig auftretenden Co-Lokalisation von mCherry-mGBP6 und GFP-mGBP9 in uninfizierten Zellen wurde eine Co-Lokalisation dieser Konstrukte an der Inklusionsmembran nicht festgestellt. Im Gegensatz dazu konnte, ähnlich wie an der *T. gondii* PV, eine IFN γ -abhängige Akkumulation von

Ergebnisse

mCherry-mGBP2 an einigen Inklusionen als ringförmiger Einschluss beobachtet werden (Abb. 32, oben). Die meisten Inklusionen wiesen jedoch keine mGBP2-Akkumulationen auf. Eine Co-Lokalisation von mCherry-mGBP2 mit GFP-mGBP9 war hauptsächlich im Zytosol detektierbar. Des Weiteren zeigte sich auch eine schwache Co-Lokalisation an der Inklusionsmembran. Die mGBP9-Rekrutierung viel dabei deutlich geringer aus als die mGBP2-Rekrutierung.

Im Vergleich dazu konnten in mCherry-mGBP9- und GFP-mGBP9-exprimierenden Zellen keine ringförmigen Einschlüsse um die Inklusion beobachtet werden. Interessanterweise wurden jedoch ausgeprägte Akkumulationen von GFP- und mCherry-mGBP9 an MOMP-positiven Strukturen detektiert, die allerdings nicht die übliche, rundliche Erscheinung einer Inklusion aufwiesen (Abb. 32, unten). Zudem war hier eine sehr eindeutige Co-Lokalisation von GFP- und mCherry-mGBP9 zu verzeichnen. Inklusionen mit rundlichem Erscheinungsbild wiesen in dieser Zelllinie hingegen keine mGBP9-Rekrutierung auf.

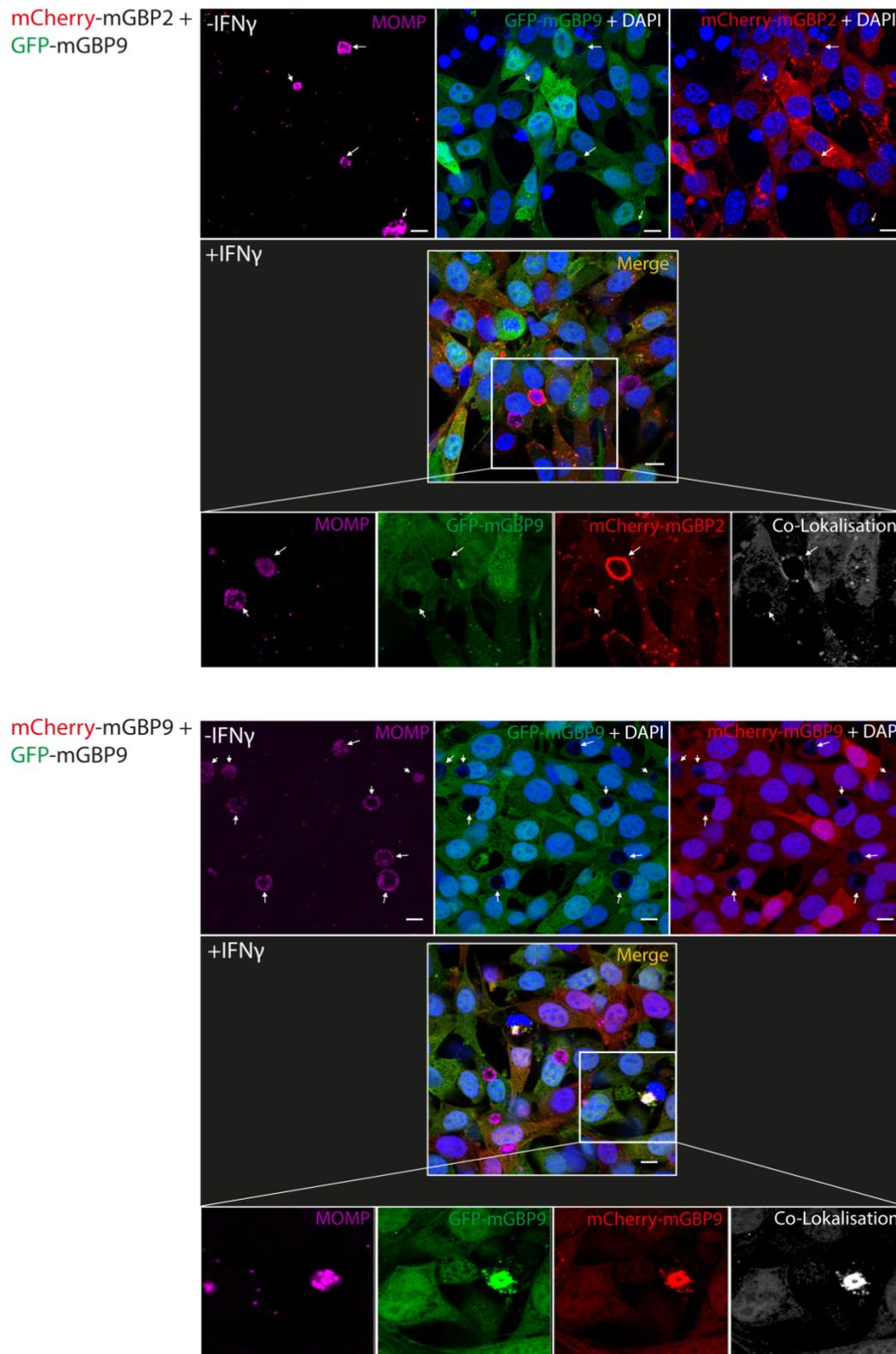


Abb. 32 Konfokalmikroskopische Analyse der Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 und mCherry-mGBP Konstrukten an der chlamydialen Inklusion.

mCherry-mGBP2 (oben) bzw. mCherry-mGBP9 (unten) und GFP-mGBP9 doppelt-transduzierte NIH 3T3 Fibroblasten wurden für 24 h mit *C. trachomatis* Serovar L2 infiziert und 3 hpi mit 200 U/ml IFN γ stimuliert oder blieben unstimuliert. Infizierte Zellen wurden anschließend fixiert und mit DAPI gefärbt. Chlamydien wurden mittels eines primären Maus-anti-MOMP Antikörpers und eines sekundären Ziege-anti-Maus-Alexa647 Antikörpers gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem Konfokalmikroskop erstellt. Größenmarker entspricht 10 μ m.

Ergebnisse

Neben mGBP2 und mGBP9 wurde eine relativ häufige Rekrutierung von mCherry-mGBP8 zur Inklusion beobachtet. Obwohl eine Co-Lokalisation mit GFP-mGBP9 in uninfizierten Zellen (Abb. 28) nicht festgestellt wurde, konnte an allen mCherry-mGBP8-positiven Inklusionen eine Co-Lokalisation der beiden Fusionsproteine detektiert werden (Abb. 33). Zudem konnte häufig eine Co-Lokalisation von mCherry-mGBP8 und MOMP-Alexa647 beobachtet werden, was auf eine Lokalisation von mGBP8 auch innerhalb der Inklusion hindeutete. GFP-mGBP9 hingegen wies teilweise eine ringförmige Lokalisation außerhalb der Inklusion auf (MOMP-negativ), co-lokalisierte hier jedoch mit mCherry-mGBP8. Die Beobachtungen zur mGBP8-Akkumulation stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Lindenberg et al., in denen beschrieben wurde, dass mGBP8 weder an die PV von *T. gondii* noch an die Inklusion von *C. trachomatis* rekrutiert wurde.

mCherry-mGBP8 + GFP-mGBP9

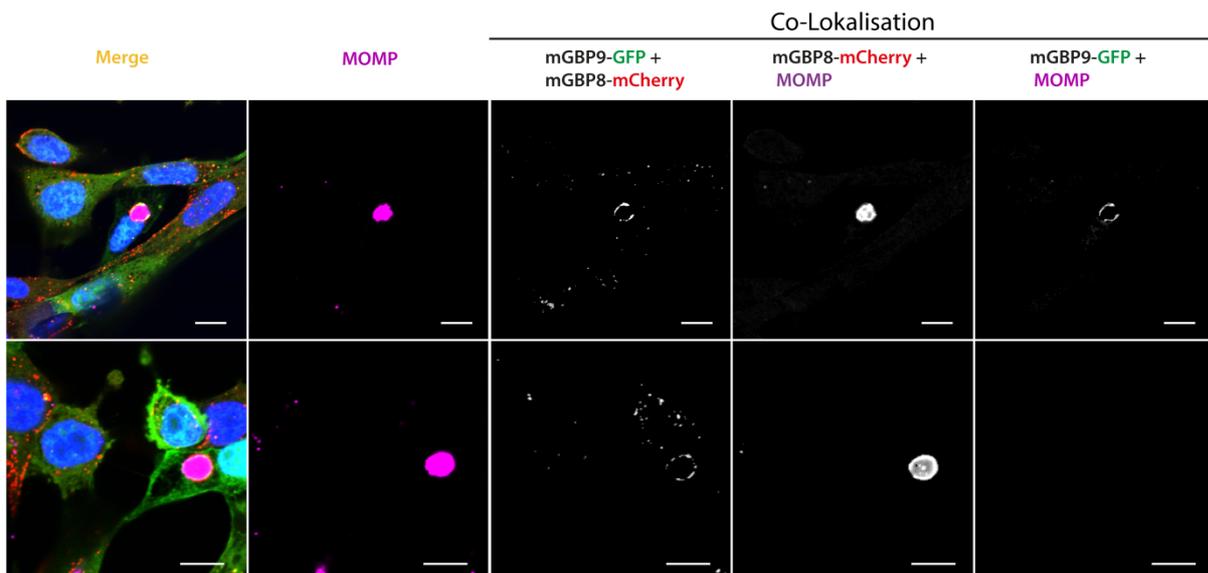


Abb. 33 Konfokalmikroskopische Analyse der Co-Lokalisation von mCherry-mGBP8, GFP-mGBP9 und *C. trachomatis*.

mCherry-mGBP8 und GFP-mGBP9 doppelt-transduzierte NIH/3T3 Fibroblasten wurden für 24 h mit *C. trachomatis* Serovar L2 infiziert und 3 hpi mit 100 U/ml IFN γ stimuliert. Infizierte Zellen wurden anschließend fixiert und mit DAPI gefärbt. Die Chlamydien wurden mittels eines primären Maus-anti-MOMP und eines sekundären Ziege-anti-Maus-Alexa647 Antikörpers gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem Konfokalmikroskop erstellt. Die Co-Lokalisation wurde mittels Bitplane Imaris Software berechnet. Größenmarker entspricht 10 μ m.

4.4 Biochemische Analysen von mGBP9

Um ein besseres Verständnis über die Funktion der mGBPs zu erhalten, stellt die Analyse der biochemischen Eigenschaften einen weiteren wichtigen Schritt dar. Neben mGBP2 wurden bereits detaillierte biochemische Analysen zu mGBP7 publiziert (Kravets et al., 2012, Legewie et al., 2019). Die biochemischen Eigenschaften von mGBP9 sind jedoch bislang nicht beschrieben. Im Zuge dieser Arbeit sollten daher die GTPase-Aktivität sowie die Struktur des mGBP9-Proteins ermittelt werden.

4.4.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem mGBP9 Protein in nativem Zustand

Um die biochemischen Eigenschaften von mGBP9 analysieren zu können, musste zunächst eine Aufreinigung des nativen Proteins durchgeführt werden. Dafür wurde ein *His₆-mgbp9*-Fusionsgen in den pQE80L-Expressionsvektor kloniert (AbbS. 8, 9) und in den *Escherichia coli* (*E. coli*) Rosetta™ 2(DE3)pLysS Stamm transformiert. Die Expression wurde anschließend bei niedriger Temperatur (16°C) durchgeführt, um eine langsame Proteinfaltung zu gewährleisten und um die Wahrscheinlichkeit einer fehlerhaften Konformation zu reduzieren. Danach erfolgte eine Nickel-NTA-Agarose *batch* Aufreinigung mit anschließender Größenausschlusschromatographie (engl. „*size-exclusion chromatography*“, SEC). Das SEC-Chromatogramm (Abb. 34A) deutete auf einen hohen monomeren Anteil des mGBP9 Proteins hin. Eine nachfolgende SDS-Gelelektrophorese mit Coomassiefärbung und eine Immunoblot-Analyse mit einem anti-*His₄* Antikörper (Abb. 34B) konnten das mGBP9-Monomer in besonders hoher Reinheit veranschaulichen. Die Monomer-Fractionen wurden schließlich für weitere Analysen verwendet (Lagerung 4°C) oder nach Schockgefrierung in flüssigem N₂ bei -80°C gelagert.

GBPs besitzen die besondere Eigenschaft in einem zweistufigen Hydrolyseschritt GTP zu GDP und GMP unter Freisetzung von Phosphat zu hydrolysieren (Kravets et al., 2012, Schwemmler et al., 1994). Die Reaktionsgeschwindigkeit ist dabei für einige der GBPs bislang nicht charakterisiert. Um diese für mGBP9 zu bestimmen und gleichzeitig den funktionellen Zustand des Proteins zu überprüfen, wurde ein Malachitgrün Phosphatassay durchgeführt (3.3.7). Das freigesetzte Phosphat aus der Hydrolysereaktion konnte hierbei durch die Ausbildung von Phosphat-Molybdat-Malachitgrün Komplexen photometrisch detektiert werden. Für mGBP9 konnte eine apparente maximale Reaktionsgeschwindigkeit von $275,1 \pm$

Ergebnisse

19,07 nmol \times min⁻¹ pro mg Protein ermittelt werden (Abb. 34C). Zudem schien mGBP9 mit einer K_M von $0,43 \pm 0,19$ eine relativ niedrige Affinität zu seinem Substrat aufzuweisen.

Mittels der hier durchgeführten Analysen konnte somit erstmals die erfolgreiche Aufreinigung von rekombinantem mGBP9-Protein, als auch die vermutete GTPase-Funktion gezeigt werden.

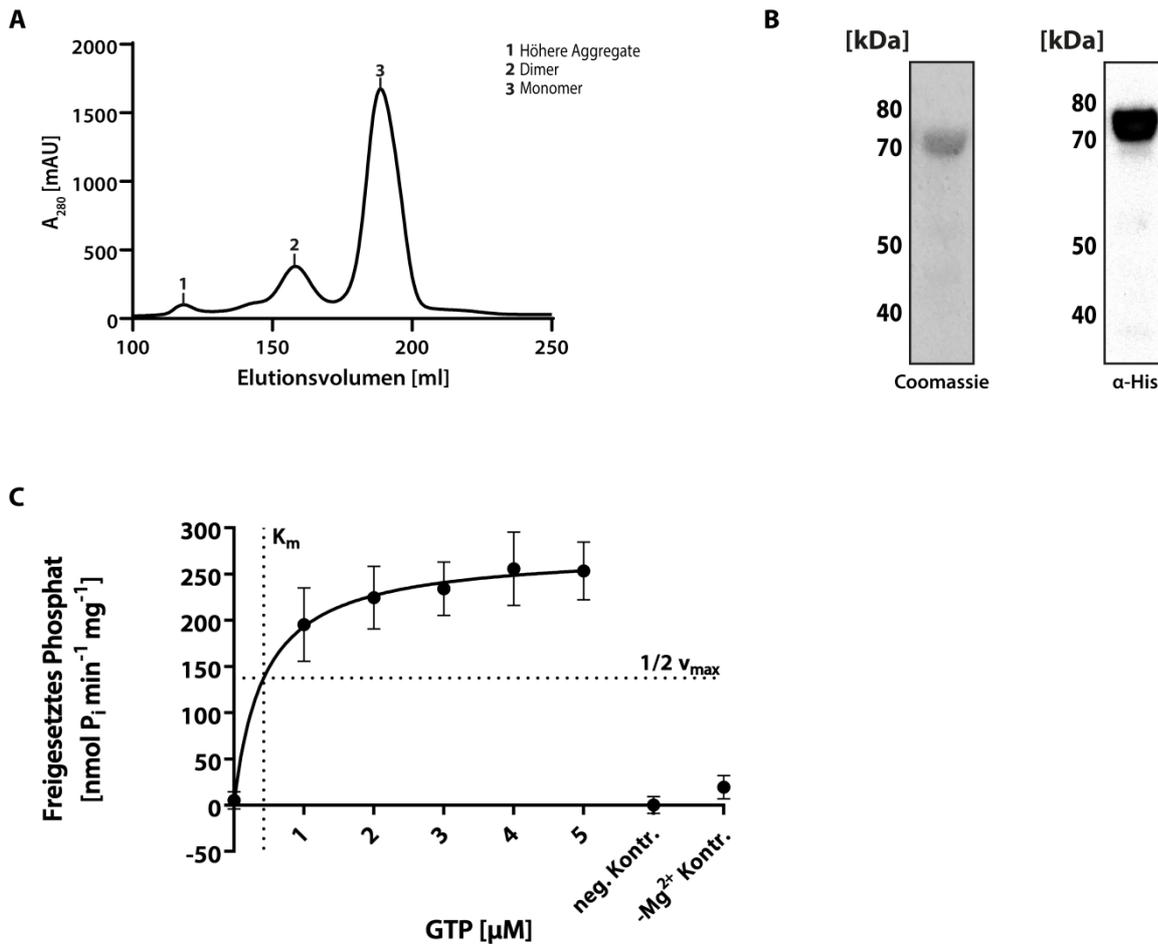


Abb. 34 Protein-Biochemische Analysen von mGBP9.

Rekombinantes, nativ aufgereinigtes His₆-mGBP9 Fusions-Protein wurde in *E. coli* Rosetta 2(DE3)pLysS überexprimiert, nach 3.3.8 aufgereinigt und mittels Größenausschluss-Chromatographie aufgereinigt. **A** Profil der Größenausschluss-Chromatographie von rek. His₆-mGBP9. Dargestellt ist die UV-Licht Streuung in mAU über dem Volumen des gemessenen Eluats. **B** Ca. 5 µg Protein wurde gelelektrophoretisch aufgereinigt und anschließend in einer Coomassie-Färbung (links) und einer Westernblot-Analyse (rechts) detektiert. Das Immunoblotting erfolgte mittels monoklonalem anti-Tetra Histidin Antikörper. **C** Mittels Malachitgrün Phosphatassay wurde die GTPase-Aktivität von mGBP9 in Abhängigkeit der GTP-Konzentrationen (1-5 µM) durch Phosphat-Freisetzung bestimmt. Beispielhaft dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Doppelbestimmungen eines Experiments.

4.4.2 Strukturaufklärung des mGBP9 Proteins

Die Auflösung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen ist von enormer Bedeutung. Durch die Struktur können Rückschlüsse auf Funktion sowie potentielle Bindungs- und Interaktionsstellen gezogen werden.

GBPs scheinen trotz ihrer hohen Sequenzidentitäten unterschiedliche Funktionen bei der Kontrolle von Infektionen einzunehmen. Dies konnte u. a. anhand der Rekrutierungsmuster der mGBPs an verschiedenen PMs von intrazellulären Erregern dargestellt werden (Lindenberg et al., 2017). Die unterschiedliche Rekrutierung ist dabei sehr wahrscheinlich auf post-translationale Modifikationen (CaaX-Motiv) und möglicherweise auf andere strukturelle Unterschiede am C-Terminus zurückzuführen (Degrandi et al., 2013, Legewie et al., 2019). Grund für die Annahme ist, dass sich die AS-Sequenzen der mGBPs hauptsächlich in diesem C-terminalen Bereich unterscheiden (Kresse et al., 2008). Somit könnten mögliche funktionelle Unterschiede auf Unterschiede in der Tertiärstruktur dieses Bereichs zurückgeführt werden. Um ein besseres Verständnis für die Funktion und das Interaktionsverhalten von mGBPs, insbesondere von mGBP9, zu erhalten, sollte daher die dreidimensionale Struktur von mGBP9 mittels Kristallographie und der Kleinwinkelröntgenstreuung (engl. *Small Angle X-ray Scattering*, SAXS) gelöst werden.

4.4.2.1 Strukturaufklärung von mGBP9 mittels Kristallographie

In den letzten Jahren nahm neben der Kryo-Elektronenmikroskopie, der NMR-Spektroskopie und der Neutronen-Diffraktion vor allem die Röntgenstrahl-Kristallographie eine bedeutende Rolle in der Analytik von Protein-Strukturen im atomaren Auflösungsbereich ein (Wang et al., 2017). Durch die fixierten Atom-Positionen im Kristall und der Verwendung von hochenergetischer Strahlung bei den Messungen werden hier besonders hohe Struktur-Auflösungen erreicht. Eine große Einschränkung dieser Methode ist jedoch der Kristallisierungsprozess, da nicht alle Proteine kristallisieren.

Für die Kristallisation von mGBP9 wurde sehr reines, hochkonzentriertes Protein aus der Aufreinigung mit anschließender SEC an das ‚Center for Structural Studies‘ (CSS, HHU Düsseldorf) übergeben. Mittels *sitting-drop* Dampfdiffusion konnten die Mitarbeiter/innen dort unter verschiedenen Pufferbedingungen Kristalle mit unterschiedlichen geometrischen Konformationen generieren und reproduzieren (Abb. 35).

Ergebnisse

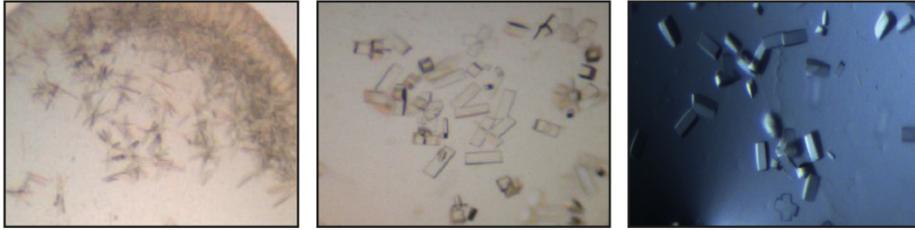


Abb. 35 Kristallisation des mGBP9 Proteins.

Über die *sitting-drop* Dampfdiffusion wurden unter verschiedenen Pufferbedingungen reproduzierbare mGBP9-Kristalle generiert, die unterschiedliche Formen aufwiesen. Einige der Kristalle wurden am DESY (Deutsches Elektronen-Synchrotron) in Hamburg gemessen.

Einige dieser Kristalle wurden anschließend im Synchrotron (Strahllinie P14 am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg) analysiert. Bei diesem Verfahren wird hochenergetische, monochromatische Strahlung (Synchrotron-Strahlung) verwendet, durch die einerseits die Messdauer reduziert und andererseits sehr spezifische Wellenlängen ($< 1,54 \text{ \AA}$) genutzt werden können. Dadurch wird das Signal-Rausch-Verhältnis stark verringert, was wiederum die Auflösung erhöht (Ilari et al., 2008). Trifft ein Röntgenstrahl auf ein Elektron kommt es zur sogenannten Strahlenbeugung oder Diffraktion. Das Diffraktionsmuster spiegelt die räumliche Verteilung der Elektronen eines Moleküls wider und wird in Form einer Elektronendichtewolke visualisiert. Durch die Einpassung der bekannten AS-Sequenz des Proteins in das Elektronendichtewolke-Modell kann somit die dreidimensionale Struktur gelöst werden (Ilari et al., 2008). Eine optimale strukturgebende Auflösung beginnt bei ca. 3 \AA , da es möglich ist die ungefähren Atompositionen zu bestimmen und somit zwischen dem Sequenz-Rückgrat und der Seitenketten-Geometrie zu unterscheiden (Matthews, 1976).

Die höchste Auflösung, die bei einer Messung eines mGBP9-Kristalls erreicht werden konnte, lag bei ca. $3,3 \text{ \AA}$ (Puffer-Zusammensetzung: $0,2 \text{ M LiSO}_4$, $0,1 \text{ M Tris/HCl}$, pH 8,5, 25 % PEG 400; Nukleotid-ungebunden). Abb. 36 (links) zeigt die dreidimensionale Anordnung der AS-Kette von mGBP9, die Anhand der Elektronendichtewolke determiniert werden konnte. Die Positionierung der AS-Seitenketten war in einigen Bereichen aufgrund der suboptimalen Auflösung nicht möglich. Das in dieser Arbeit vorgestellte Strukturmodell ist daher ein vorläufiges.

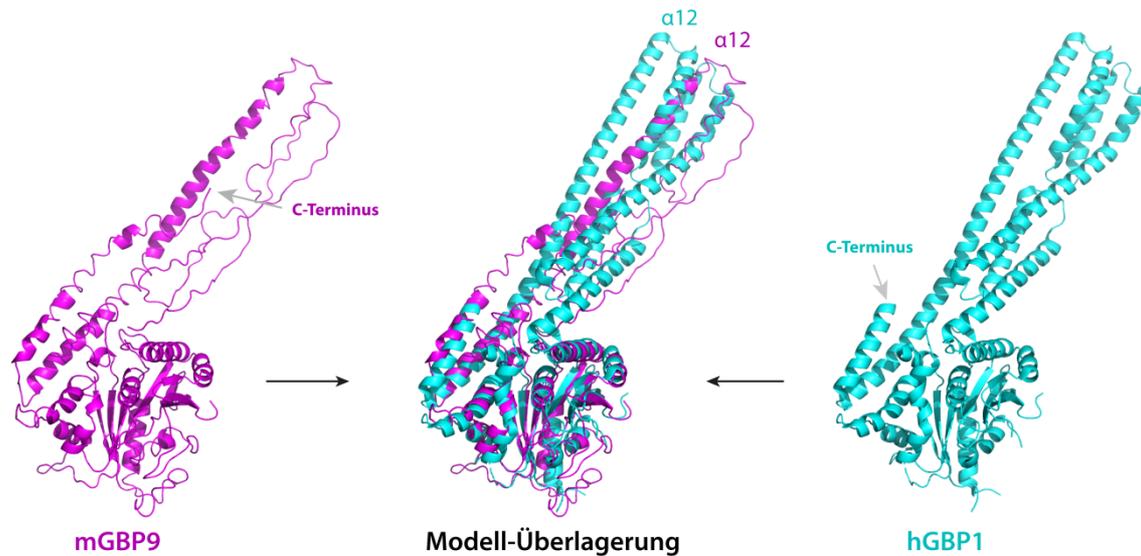


Abb. 36 Vergleich der Kristallstrukturen von mGBP9 und hGBP1.

Links: Vorläufige Kristallstruktur von mGBP9. Die AS-Sequenz von mGBP9 wurde mittels PyMOL Software in die Elektronendichtewolke aus der Synchrotronmessung eingelagert und erste α/β -Sekundärstrukturen determiniert. **Mitte/Recht:** Publierte Kristallstruktur von hGBP1 (Prakash et al., 2000) und Modellüberlagerung mit der vorläufigen Struktur von mGBP9.

Für die GBPs wurde bislang nur ein einziges Strukturmodell (hGBP1) beschrieben (Abb. 36, Rechts) (Prakash et al., 2000). Aus der Strukturanalyse von hGBP1 ging hervor, dass das Protein aus einer großen globulären Domäne (LG-Domäne) am N-Terminus, einer C-terminalen, elongierten Domäne bestehend aus verschiedenen α -Helices und einem kurzen Verbindungsstück dieser beiden Domänen besteht. Die Überlagerung des hGBP1- und des vorläufigen mGBP9-Modells (Abb. 36, Mitte) zeigte, dass sowohl Molekülgröße als auch die räumliche Anordnung der AS von mGBP9 sehr ähnlich zum hGBP1 waren. Insbesondere die LG-Domäne wies eine nahezu identische Struktur der bisher für hGBP1 identifizierten $\alpha\beta$ -Strukturen auf. Für die helikale Domäne von mGBP9 konnte ein im Vergleich zu hGBP1 elongierter C-Terminus festgestellt werden, der bis zum hinteren Drittel der langen α -Helix ($\alpha 12$ für hGBP1) ragte. Des Weiteren konnte ein spitzerer Neigungswinkel des elongierten C-Terminus zur LG-Domäne festgestellt werden.

Über die Optimierung der Kristallisation gilt es nun die Auflösung bei der Messung neuer Kristalle zu erhöhen, um präzisere Aussagen über Strukturunterschiede treffen und um ein vollständiges Strukturmodell generieren zu können.

4.4.2.2 Strukturaufklärung von mGBP9 mittels SAXS-Analyse

Über das SAXS-Verfahren können Strukturmerkmale und Interaktionen von Molekülen in kolloidalen Lösungen im Nanometerbereich (1 – 100 nm) analysiert werden (Pedersen, 1997). Für Strukturanalysen werden vor allem monodisperse Lösungen des Zielmoleküls verwendet (Koch et al., 2003). Abgeleitet vom Bragg'schen Gesetz:

$$\sin \theta = \frac{\lambda}{2d}$$

ergibt sich, dass bei der Messung von größeren Makromolekülen mit großen atomaren Abständen (engl. ‚(atomic) distances‘, d) der korrespondierende Streuwinkel (θ) sehr klein wird (Bragg et al., 1913). Daher wird das elastische Streuverhalten der Röntgenstrahlen hier in sehr kleinen Winkeln ($0,1 - 10^\circ$) aufgenommen. Das aus der Messung hervorgehende SAXS-Profil wird aus der Subtraktion der beiden SAXS-Profile von gelöstem Makromolekül sowie des Puffers bestimmt. Mittels Fourier Transformation ist es möglich, aus dem SAXS-Profil eine ungefähre Verteilung der paarweise atomaren Abstände und daraus ein dreidimensionales Modell zu bilden (Schneidman-Duhovny et al., 2010). Ein besonderer Unterschied zu den kristallographischen Methoden ist, dass eine kristalline Probe nicht obligatorisch ist und Proteine unter annähernd physiologischen Bedingungen gemessen werden können (Schneidman-Duhovny et al., 2010). Daher sollte mittels SAXS die native mGBP9-Struktur in gelöstem Zustand annäherungsweise untersucht werden. Dafür wurde erneut rekombinant exprimiertes mGBP9-Protein aufgereinigt, nach anschließender SEC an die Mitarbeiter/innen des CSS übergeben und in der SAXS-Anlage des CSS (INST 208/761-1 FUGG) gemessen.

Aus den Daten der Kleinwinkelstreuung konnte ein 3D-Volumenmodell erstellt werden (Abb. 37). Um die Anpassungsgüte des Modells zu den Messdaten zu bestimmen, wurde der χ^2 -Anpassungstest durchgeführt. Mit einem χ^2 -Wert von 1,04 konnte gezeigt werden, dass das vorhergesagte Modell mit großer Wahrscheinlichkeit zu den gemessenen Daten passt. Die Struktur des Modells ließ darauf schließen, dass das Protein in Lösung nicht homodimerisiert. Ähnliche Beobachtungen konnten bereits in der SEC-Analyse gemacht werden (s. Abb. 34A). Die Einlagerung des vorläufigen Kristallmodells in die SAXS-Modell-Hülle nach Maximum-Likelihood-Schätzung zeigte zudem, dass die rigide Kristallstruktur und die flexiblere, gelöste Form des Proteins keine stark abweichenden, strukturellen Unterschiede aufwiesen.

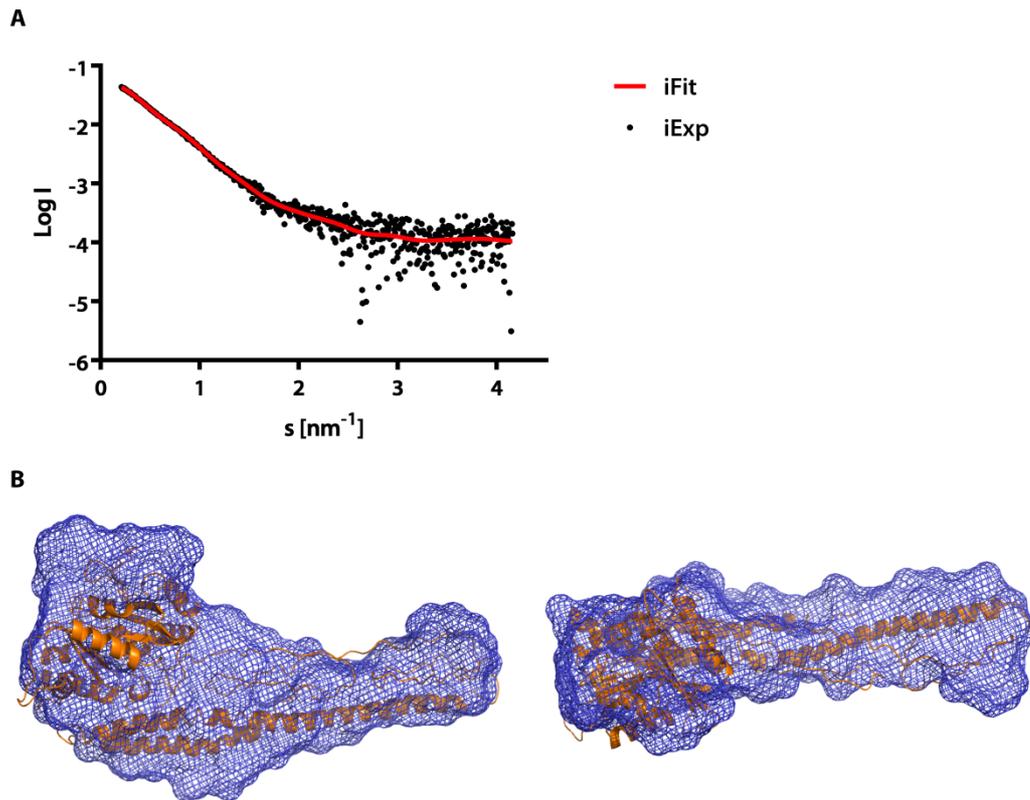


Abb. 37 SAXS-Messung von mGBP9.

Das mGBP9 Protein wurde in der SAXS-Anlage des CSS in Düsseldorf gemessen. **A** Dargestellt ist die Streukurve der Messdaten (iExp) und die geschätzte Anpassungskurve (iFit) zur Berechnung eines 3D-Volumenmodells. **B** Einlagerung der vorläufigen mGBP9-Kristallstruktur in das 3D-Volumenmodell nach Maximum-Likelihood-Schätzung. Verschiedene Ansichten der Einlagerung (90° Rotation um die X-Achse).

4.4.3 Generierung eines mGBP9-spezifischen polyklonalen Antikörpers

Aufgrund der ähnlichen Sequenzidentitäten der Chr5-Cluster mGBPs ist die Generierung von mGBP-spezifischen Antikörpern nicht trivial. In früheren Generierungsansätzen wurden kurze Peptidsequenzen aus dem C-Terminus der verschiedenen mGBPs zur Immunisierung von Kaninchen verwendet, da sich die GTPasen in diesem Sequenzbereich am meisten voneinander unterscheiden (Kresse et al., 2008, Olszewski et al., 2006). Spezifische Antikörper gegen die einzelnen Chr5-Cluster mGBPs konnten jedoch nicht isoliert werden. Häufig wird für die Immunisierung natives Volllängenprotein verwendet, da die Spezifität der Antikörper nicht nur durch die Sequenz, sondern ebenso durch Konformationsunterschiede gegeben sein kann. Für den Nachweis von Gen-Defizienzen sind spezifische Antikörper von enormer Bedeutung, um die Abwesenheit eines Proteins in den entsprechenden Gen-defizienten Geweben und Zellen verifizieren zu können (Brooks et al., 2018). Deshalb war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Generierung eines mGBP9-spezifischen Antikörpers.

Für die Generierung wurde natives, rekombinantes mGBP9-Protein aus der Aufreinigung (4.4.1) an die Firma Eurogentec verschickt. Über die Immunisierung von Kaninchen mit dem mGBP9-Antigen wurde mittels des sogenannten 28-Tage *Speedy* Programms ein polyklonaler Antikörper generiert (Abb. 38A). Anschließend erfolgte eine mGBP9-spezifische Affinitätsaufreinigung (Eurogentec) mittels des rekombinanten mGBP9-Proteins.

Die Spezifität des daraus resultierenden, polyklonalen Antikörpers wurde anschließend in einer Immunoblot-Analyse untersucht. Dafür wurde Zelllysat von mCherry- oder GFP-mGBP exprimierenden NIH/3T3 Fibroblasten, IFN γ -stimulierten und unstimulierten WT-Fibroblasten sowie von GFP- oder mCherry-exprimierenden NIH/3T3 Fibroblasten in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Detektion im Immunoblot erfolgte mittels des polyklonalen Antikörpers. Wie in Abb. 38B deutlich zu erkennen ist, wies der Antikörper trotz der Affinitätsaufreinigung eine Kreuzreaktivität zu den Fusionsproteinen mCherry-mGBP3, 6 und 8 sowie zu GFP-mGBP10 auf. GFP und mCherry wurden durch den polyklonalen Antikörper im Zelllysat der entsprechenden Kontrolllinien nicht detektiert. Demnach war die Kreuzreaktivität auf ähnliche mGBP-Sequenzen bzw. -Konformationen, nicht aber auf den jeweiligen Marker zurückzuführen. Des Weiteren konnte in fast allen Zelllinien auf Höhe der endogenen mGBPs (65-72 kDa) eine Bande detektiert werden, deren Intensität außerdem durch eine IFN γ -Stimulation gesteigert werden konnte (Abb. 38B, WT - IFN γ , WT +IFN γ).

Wie in Abschn. 4.1.3.2 beschrieben, konnte der in dieser Arbeit generierte, polyklonale Antikörper unterstützend zur Validierung einer multiplen mGBP-Defizienz in NIH/3T3 Fibroblasten eingesetzt werden. Für die Bestätigung einer einzelnen mGBP9-Defizienz wird jedoch ein Antikörper mit höherer Spezifität benötigt. Dies könnte durch eine Affinitätsaufreinigung angestrebt werden (Huse et al., 2002).

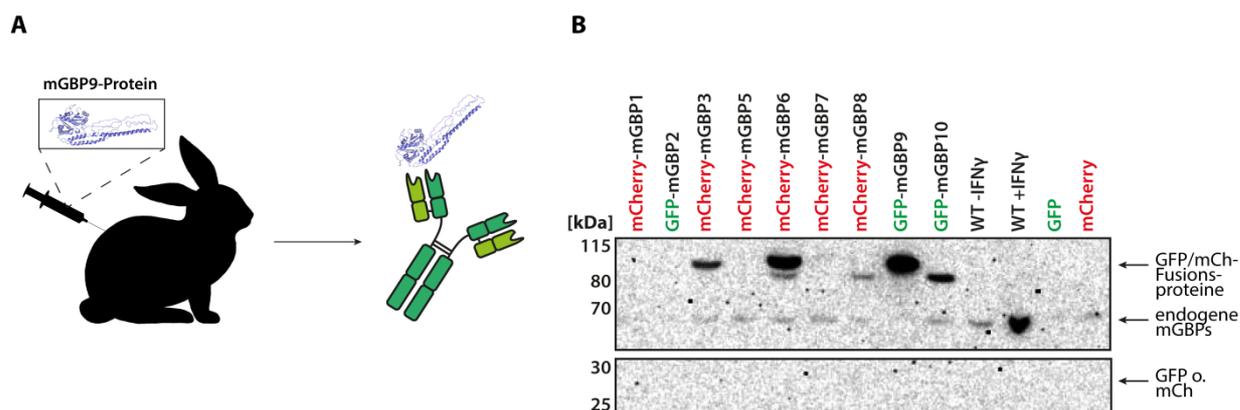


Abb. 38 Generierung eines mGBP9-spezifischen polyklonalen Antikörpers.

A Rekombinantes mGBP9-Protein wurde zur Immunisierung in Kaninchen verwendet (Eurogentec). Polyklonaler Antikörper wurde aus dem Serum aufgereinigt und zusätzlich mit Hilfe des Antigens affinitätsaufgereinigt (Firma Eurogentec). **B** Der polyklonale Antikörper wurde mittels Immunoblot-Analyse überprüft. Dafür wurde Zelllysate von verschiedenen mCherry- (mCh) oder GFP-mGBP Fusionsprotein-exprimierenden NIH/3T3 Fibroblasten, von mCherry- (mCh) oder GFP-exprimierenden Fibroblasten oder von IFN γ -stimulierten bzw. unstimulierten WT Fibroblasten hergestellt. Ca. 5 μ g Protein wurden auf einem 4-12%igem Bis-Tris SDS Gel aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Die Detektion erfolgte mittels des anti-mGBP9 Antikörpers.

Ergebnisse

5 Diskussion

GBPs sind wichtige Schlüsselproteine in der IFN γ -induzierten, zellintrinsischen Immunabwehr (Degrandi et al., 2007, Meunier et al., 2016, Praefcke, 2018, Tretina et al., 2019). Neben den p47-GTPasen stellen sie dabei vermutlich die am häufigsten auftretenden Transkripte in IFN γ -stimulierten MEFs und ANA-1 Makrophagen dar (Boehm et al., 1998, Tretina et al., 2019). In den letzten Jahren wurden viele Studien zur Charakterisierung der GBPs durchgeführt (Tretina et al., 2019). Dennoch bleiben bis zum heutigen Zeitpunkt einige Fragen in Bezug auf ihre Funktion in subzellulären Prozessen, als auch auf ihren direkten Einfluss auf die Replikation von intrazellulär replizierenden Pathogenen sowie deren Replikationsnischen offen. Die GBPs 1, 2 und 5 weisen am C-Terminus ein CaaX-Motiv auf, das post-translational modifiziert werden kann (Olszewski et al., 2006). Eine Isoprenylierung des CaaX-Motivs bewirkt, dass sich die entsprechenden GBPs in Membranen verankern und in Abhängigkeit davon die Integrität Pathogen-assoziiertes Lipidmembranen beeinflussen können (Kravets et al., 2016, Kravets et al., 2012). Im Falle der murinen GBPs besitzen ca. zwei Drittel der Proteine ein solches CaaX-Motiv jedoch nicht (Degrandi et al., 2007). Dennoch konnte bereits gezeigt werden, dass diese mGBPs ebenso eine wichtige Rolle in einigen Infektionsmodellen einnehmen (Lindenberg et al., 2017, Steffens et al., 2020). Insbesondere die Fähigkeit der gezielten Re-Lokalisation zu Pathogen-spezifischen Strukturen scheint dabei die Bedeutung der jeweiligen mGBPs für die Infektionsbeseitigung zu unterstreichen (Kravets et al., 2012). So konnten neben mGBP1 und 2 auch beachtlich hohe Frequenzen von mGBP9 an der Inklusionsmembran des obligat intrazellulären Bakteriums *C. trachomatis* beobachtet werden (Lindenberg et al., 2017). mGBP9 gehört zu einem separaten mGBP-Cluster auf dem Chromosom 5, das ausschließlich mGBPs ohne das oben erwähnte CaaX-Motiv beinhaltet (Degrandi et al., 2007). Im Gegensatz zum Chr3-Cluster sind Funktion und Relevanz dieses mGBP-Clusters weitaus weniger beschrieben. Die hohe Rekrutierungsfrequenz von mGBP9 an die Inklusionsmembran machte das Protein zu einem interessanten Kandidaten für funktionelle Analysen im *C. trachomatis*- sowie weiteren Infektionsmodellen, um das allgemeine Verständnis von GBP-Funktionen bei der Abwehr von intrazellulären Infektionserregern zu erweitern (Lindenberg et al., 2017).

5.1 Etablierung des mGBP9 K.O. Tiermodells

Die Bedeutung eines Proteins für einen Organismus lässt sich in *in vitro* Experimenten nur bedingt aufklären. Daher war ein Hauptziel dieser Arbeit die Generierung einer mGBP9-defizienten Mauslinie. Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, sollte dafür zunächst eine mGBP9-Defizienz in pluripotenten ES Zellen (Pfeffer et al., 1994) induziert werden. Die *state-of-the-art* Methode zur Induktion genomischer Mutationen ist das CRISPR/Cas9 Genom-Editierungssystem (Charpentier et al., 2014). Über eine Sequenz-spezifische gRNA, die komplementär an einen mGBP9-spezifischen Gen-Lokus bindet, wurde ein Doppelstrangbruch durch die Cas9 Nuklease induziert. Anschließend sollte der Doppelstrangbruch über die Integration eines ssODN-Fragments mittels des HDR-Mechanismus repariert werden. Je nach Versuchsansatz sollten die im Ergebnisteil detailliert beschriebenen Mutationen integriert werden (s. Abschn. 4.1.1, 4.1.2).

Im ersten Versuchsansatz wurde dazu das beschriebene ssODN mit zwei Modifikationen verwendet, das einerseits eine mGBP9-Defizienz induzieren und andererseits ein Screening der Klone ermöglichen sollte. Das Screening von 108 Klonen ergab eine Erfolgsquote von 0 % für die hier angewandte CRISPR/Cas9-basierte Targetingstrategie. Aufgrund der vielen verschiedenen Faktoren, die bei der Erfolglosigkeit dieses Ansatzes eine Rolle gespielt haben könnten, werden an dieser Stelle nur Vermutungen aufgestellt, die für zukünftige Versuchsplanungen hilfreich sein können.

Eine erste mögliche Fehlerquelle war die Transfektion mittels Elektroporation. An dieser Stelle war es möglich, dass die Transfektionseffizienz in JM8.a3 ES Zellen deutlich geringer war, als die Effizienz der im verwendeten Protokoll beschriebenen Zelllinie (3.2.1). Die Problematik, die sich in diesem Versuchsansatz zur Kontrolle der Elektroporationseffizienz stellte, war, dass drei verschiedene Komponenten parallel in die Zielzellen transfiziert werden mussten. Häufig wird eine Transfektion beispielsweise mittels eines Fluoreszenzmarkers überprüft. Da es sich bei den Komponenten um fertige Syntheseprodukte handelte, war das Ankoppeln eines Markers jedoch nicht möglich. Außerdem hätte für jede Komponente ein separater Marker verwendet werden müssen, um die Transfektion aller Komponenten gleichermaßen überprüfen zu können. Eine Fluorophor-Kopplung hätte des Weiteren mit großer Wahrscheinlichkeit sterische Effekte in Bezug auf die gRNA-Cas9 Interaktion oder die komplementäre Bindung der gRNA an die Zielsequenz. 5'-Modifikationen der gRNA führen nachweislich zu inhibitorischen Effekten in Bezug auf die Cas9-induzierte DNA-Restriktion (Mullally et al., 2020). Wenn eine Komponenten-Markierung nicht umsetzbar ist, müssen optimale Transfektionsparameter in Vorexperimenten bestimmt oder der Literatur entnommen

werden. Da für JM8.a3 ES Zellen Transfektions-Parameter bereits definiert wurden, konnten diese Parameter für das hier verwendete Protokoll übernommen werden (Mutant Mouse Resources and Research Centers (MMRRC)).

Ein weiterer kritischer Punkt war die Genomeditierungs-Effizienz, für die insbesondere die Konzentration der einzelnen CRISPR/Cas9-Komponenten eine wichtige Rolle spielte. Die zu verwendenden Konzentrationen von gRNA und Cas9 Nuklease wurden für die Transfektion verschiedener Zelllinien bereits durch die Firma IDT-DNA optimiert und können auf der Homepage eingesehen werden (IDT-DNA, <https://eu.idtdna.com/pages/support/guides-and-protocols>). Das Einsetzen von ssODN-Fragmenten war zum Zeitpunkt der Anwendung nur begrenzt untersucht und die hier verwendete Konzentration möglicherweise nicht im optimalen Bereich. Zur Kontrolle hätten verschiedene Konzentrationen parallel oder in aufeinanderfolgenden Experimenten getestet werden müssen. Optimierungen wurden jedoch wegen anderer, nachfolgender Problematiken in diesem Versuchsaufbau nicht durchgeführt.

Neben den bereits genannten Aspekten kann der Misserfolg dieses Ansatzes auch durch Probleme in den molekularen Prozessen (Induktion des Doppelstrangbruchs, Integration des ssODN-Fragments) gegeben worden sein. Da eine Zugänglichkeit zur Zielsequenz in der genomischen DNA Voraussetzung für die Cas9-Aktivität ist, können offene oder geschlossene Chromatinstrukturen Einfluss auf die Effizienz der CRISPR/Cas9-Mutagenese haben (Uusi-Makela et al., 2018). Auch wenn eine CRISPR/Cas9-basierte mGBP9-Defizienz in NIH/3T3 Fibroblasten induziert worden war (s. Abschn. 4.1.3.2), wurde in diesem Ansatz eine Zelllinie eines völlig unterschiedlichen Entwicklungsstadiums (Pluripotenz) verwendet. Eine unterschiedliche Expressions-Aktivität durch veränderte Chromatinstrukturen wäre daher nicht auszuschließen gewesen. Die Ergebnisse einer Studie deuteten darauf hin, dass die Aktivität der Cas9-Nuklease *in vitro* insbesondere durch eine Nukleosomen-Positionierung auf der PAM-Sequenz determiniert wird (Hinz et al., 2015). Möglicherweise haben ungünstige Chromatinstrukturen auch in diesem Ansatz die Cas9-Aktivität inhibiert. ‚*Assay for Transposase-Accessible Chromatin using Sequencing*‘ (ATAC-seq)-Analysen hätten hier zur Beschreibung der Cas9-Zugänglichkeit zum mGBP9-Gen verhelfen können, waren jedoch auf Grund des erfolgreichen, zweiten Ansatzes nicht notwendig (Buenrostro et al., 2015).

Auch wenn die bisher genannten Problemstellungen nicht aufgeklärt worden sind, wurde der erste Versuchsansatz nicht wiederholt. Grund dafür war eine Publikation von Brian Wang zur Optimierung der CRISPR/Cas9 – HDR Mutageneserate (Wang, 2018). Wang beschrieb, dass die Integration einer Zielsequenz durch den HDR-Mechanismus unwahrscheinlicher wird, je weiter sie von der Cas9-induzierten Schnittstelle eingefügt werden soll (Abb. 39A). Eine

Diskussion

Verlagerung der Insertionssequenz um 21 Basenpositionen in 3'- oder 5'-Orientierung vom Doppelstrangbruch reduzierte nach Wang die Effizienz von 20 % auf < 5% (Abb. 39B). Modifikation 1, über die ein frühes Stopp-Codon in der Exon 2 Sequenz induziert werden sollte, lag jedoch ca. 160 Basen von der Schnittstelle entfernt. Auch die neue Restriktionsschnittstelle/Primersequenz zum vereinfachten Screening lag ca. 20 Basen von der Schnittstelle entfernt. Damit wäre eine Integration der Modifikationen höchst unwahrscheinlich und könnte trotz der weiteren ungeklärten Aspekte den Misserfolg dieses Experiments am ehesten erklären.

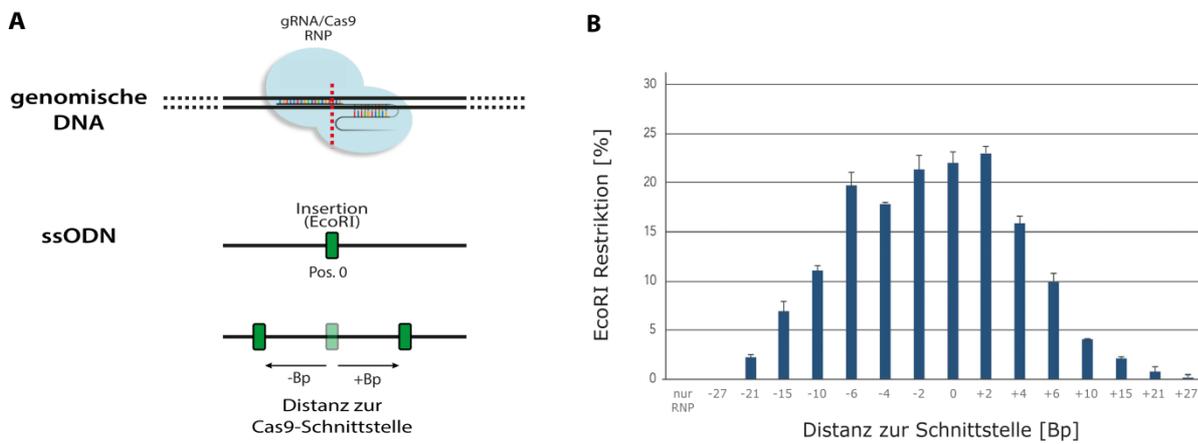


Abb. 39 Die HDR-Effizienz ist abhängig von der Insertions-Position auf dem DNA-Template.

A Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Induktion eines Doppelstrangbruchs erfolgte durch das CRISPR/Cas9 Genomeditierungs-System (rot gestrichelte Linie). Die EcoRI Schnittstellensequenz sollte mittels ssODN und dem HDR-Mechanismus bei gleicher Cas9-Schnittstelle an verschiedenen Positionen in die genomische DNA integriert werden. **B** Überprüfung der HDR-Effizienz mittels EcoRI-Verdau in Bezug auf die „Distanz zur Schnittstelle“ (siehe **A**). Modifiziert nach Wang (2018).

Im zweiten Versuchsansatz sollte das Exon 3 des mGBP9-Gens über zwei verschiedene, flankierende gRNAs deletiert und die beiden Restriktions-Enden erneut über ein ssODN-Fragment mittels HDR-Mechanismus zusammengefügt werden. Die Deletion von Exon 3 sollte bewirken, dass bei der Transkription von mGBP9 Exon 2 mit Exon 4 verknüpft wird. Infolgedessen würde ein verkürztes Protein mit einer Leseraster-Verschiebung ab dem 3'-Ende des Exon 2 synthetisiert werden. Sequenzanalysen konnten zuvor bestätigen, dass die Verschiebung des Leserasters unabhängig davon ist, mit welchem Folgeexon dieses verknüpft wird (Daten nicht gezeigt). Durch eine Leserasterverschiebung entstehen häufig frühe, terminierende Codons (engl. *„premature termination codons“*, PTC) im offenen Leseraster. Exprimierte mRNAs mit solchen PTCs werden über verschiedene Faktoren wie dem Exon-Verbindungs-Komplex detektiert und über den *„Nonsense-mediated decay“*-Mechanismus degradiert (Chang et al., 2007, Le Hir et al., 2001). Im Falle einer Translation würde die

Leserasterverschiebung folglich zu einem nicht-funktionellen, stark verkürzten Protein führen.

Die beschriebenen Testverfahren im anschließenden Screening der potenziell mutagenisierten ES Zellen zeigten ein eindeutiges Ergebnis des hier gezeigten Klons mGBP9^{+/-}. Wie im Ergebnisteil bereits detailliert beschrieben verifizierten sowohl die PCR-Analysen als auch der Southern Blot eine heterozygote mGBP9 Exon 3 Deletion (Abb. 13B, D). Die Ergebnisse wurden zusätzlich durch eine Transkriptionsanalyse (RT-qPCR) von IFN γ -stimulierten sowie unstimulierten WT und mGBP9^{+/-} ES Zellen bestätigt. Hier konnte eine um ca. die Hälfte reduzierte mGBP9-Expression detektiert werden, die vermutlich auf den erwähnten ‚Nonsense-mediated decay‘-Mechanismus zurückzuführen war (Abb. 14). Die erhöhte Expression der weiteren hier detektierten mGBPs in den mGBP9^{+/-} Zellen könnte als eine Kompensation durch die reduzierte mGBP9-Expression beschrieben werden. Eine generelle mGBP-Expressionsanalyse in anderen KO-Modellen wie mGBP2^{-/-} oder mGBP7^{-/-} MEFs wurden jedoch bislang nicht durchgeführt. Ob eine veränderte Transkriptionsrate einzelner mGBPs tatsächlich regulatorische Einflüsse auf die Expression weiterer mGBPs hat, müsste daher durch weitere Expressionsanalysen, beispielsweise in den genannten KO-Modellen, untersucht werden. Die fehlende Expression von mGBP1 in WT und mGBP9^{+/-} Zellen (Abb.14) kann dadurch begründet werden, dass eine Induktion der mGBP1-Expression generell in Tieren mit C57BL/6 Hintergrund nur gering ausfällt (Clough et al., 2019). Die JM8.a3 ES Zellen stammen aus Tieren mit eben diesem genetischen Hintergrund. Eine nicht-detektierbare mGBP8-Expression konnte auch in NIH/3T3 Fibroblasten beobachtet werden und ist vermutlich auf eine defekte Sonde zurückzuführen.

Die finale Analyse der mGBP9 Protein-Expression war auf Grund eines fehlenden, spezifischen Antikörpers im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Ergänzt durch Sequenzierungsanalysen (Daten nicht gezeigt) sind die bisherigen Ergebnisse jedoch aussagekräftig genug, um die ES Zellen schließlich zur Generierung einer mGBP9-defizienten Mauslinie verwenden zu können. Damit wurde in dieser Arbeit der Grundstein für das Tiermodell zur Untersuchung einer mGBP9-Defizienz *in vivo* gelegt.

5.2 Analysen zur mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} NIH/3T3 Fibroblasten-Linie

5.2.1 Die kombinierten mGBP6, 9, 10 und 11 Defizienzen resultierten aus einer unspezifischen gRNA-Bindung

Um die CRISPR/Cas9 Genomeditierung des mGBP9-Gens in NIH/3T3 Fibroblasten zu überprüfen (Abschn. 4.1.3), wurde im Screening zunächst die mGBP9-Zielsequenz amplifiziert und Amplifikate in nachfolgenden Sequenzierungs-Analysen untersucht. Eine genaue Aussage über die Effizienz des angewandten Experimentalansatzes konnte nicht getroffen werden, was sich wie folgt erklären lässt. Jeder Klon musste mindestens 10× in Sequenzierungs-Analysen überprüft werden, damit sichergestellt ist, dass beide Allele von der Analyse erfasst wurden. Die Bestimmung der Effizienz wäre daher bereits mit einer geringen Stichprobenzahl von 20 ausgewählten Klonen sehr umfangreich geworden und stellte zudem kein vordergründiges Ziel dar. Des Weiteren würde unklar bleiben, ob in WT-Allelen die Induktion eines Doppelstrangbruchs tatsächlich erfolglos war oder ob dieser durch den NHEJ-Mechanismus lediglich fehlerfrei repariert wurde. Unabhängig davon konnte ein mGBP9-defizienter Klon, wie bereits beschrieben, identifiziert werden (Abschn. 4.1.3.2).

In der Expressions-Analyse des mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Klons wurden trotz der in den Sequenzierungsdaten bestätigten Mutationen im mGBP9-Gen geringe Mengen mGBP9-mRNA detektiert. Dies lässt sich dadurch erklären, dass eine Transkription durch Indel-Mutationen nicht inhibiert wird. Vielmehr wird durch die Leseraster-Verschiebung ein PTC generiert, das anschließend den NMD-Mechanismus aktiviert (Chang et al., 2007). Folglich wird zunächst eine fehlerhafte mRNA synthetisiert, die anschließend über den Kontrollmechanismus degradiert wird. In Abhängigkeit der Transkriptionsrate und der Geschwindigkeit des NMD-Mechanismus kann es somit durchaus dazu kommen, dass mRNAs detektiert werden, diese aber nicht zur Expression eines funktionalen Proteins führen. Auch wenn bislang kein mGBP9-spezifischer Antikörper generiert werden konnte, unterstützt der gezeigte Western Blot mit einem mGBP3, 6, 8 und 10-kreuzreaktiven Antiserum gegen mGBP9 diese Annahme (Abb. 15B).

Anhand der RT-qPCR Analyse (Abb. 15A) sowie der generierten Sequenzierungsdaten (Daten nicht gezeigt) wurde deutlich, dass neben mGBP9 auch weitere mGBPs des Chr5-

Clusters durch die CRISPR/Cas9 Genomeditierung mutiert wurden (mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO}). Ursache für die ‚*off-target*‘ Effekte war die durch das *CRISPR-Design Tool* (Ran et al., 2013) prognostizierte, vermeintlich mGBP9-spezifische gRNA. In einem Sequenzvergleich von gRNA und den Exon 2-Abschnitten der betroffenen mGBP-Gene (AbbS. 1, Exon 2) wurde deutlich, dass mit maximal zwei Basenunterschieden die Anzahl der Fehlpaarungen nicht ausreichend war, um eine mGBP9-Spezifität zu garantieren. Der allgemeine Konsens war anfänglich, dass eine Anzahl von mindestens drei Fehlpaarungen notwendig ist, um eine möglichst niedrige ‚*off-target*‘ Wahrscheinlichkeit zu erzielen. Mittlerweile konnten verschiedene Studien zeigen, dass neben der Anzahl der Fehlpaarungen auch die jeweiligen Basen-Positionen, die Verteilung der Fehlpaarungen und auch die Basenidentitäten der jeweiligen Fehlpaarungen eine entscheidende Rolle spielen (Hsu et al., 2013, Terns et al., 2014). So scheinen beispielsweise proximal zum PAM-Motiv gelegene Fehlpaarungen weniger von der Cas9-Nuklease toleriert zu werden als distal gelegene (Wang et al., 2019, Xu et al., 2017). Die Algorithmen zur Berechnung spezifischer gRNAs wurden in den letzten Jahren stetig optimiert (Liu et al., 2020). Zum Zeitpunkt des Experiment-Designs waren diese scheinbar noch nicht ausgereift. Dies führte zur Vorhersage einer gRNA, welche zusätzlich zur Spezifität für mGBP9 noch weitere Targets im mGBP Chr5-Cluster gebunden hat. Für eine Wiederholung des Experiments müsste zunächst eine andere, spezifischere gRNA gewählt werden. Auf Grund der hohen Sequenzidentitäten der mGBPs bleibt zu bezweifeln, dass eine Exon-lokalisierte mGBP9-spezifische gRNA identifiziert werden kann. Daher wurden in den Versuchsstrategien zur Generierung einer mGBP9-Defizienz in ES Zellen andere CRISPR/Cas9-basierte Experimentalansätze mit höherer Spezifität zum mGBP9-Gen gewählt. Weitere Optimierungsmöglichkeiten für diesen Ansatz bestehen in der Verwendung von optimierten Cas9-Nukleasen mit erhöhter Präzision bzw. Fehlerlese-Funktion (Chen et al., 2017, Slaymaker et al., 2016). Allerdings werden auch diese Nukleasen mit großer Wahrscheinlichkeit ‚*off-target*‘ Effekte induzieren, wenn sich die gRNA-Sequenz nur minimal von potentiellen ‚*off-targets*‘ unterscheidet.

5.2.2 NIH/3T3 Fibroblasten weisen eine reduzierte Adhärenz auf

Die in diesem Projekt verwendete NIH/3T3 Fibroblasten-Zelllinie ist eine subklonierte, immortalisierte Linie mit Ursprung aus NIH Swiss Mausembryo-Kulturen (Todaro et al., 1963). Sie weist morphologische Charakteristika auf, die insbesondere gut für Transformations-Assays geeignet sind (Copeland et al., 1979). Unter Standardbedingungen

Diskussion

können diese NIH/3T3 Fibroblasten einen konfluenten Zellrasen ausbilden. Aufgrund ihrer Kontakt-inhibierenden Eigenschaft sollte eine Konfluenz anschließend zum Proliferationsarrest der Zellen führen. Ein Überwachsen der Zellen, z. B. durch die Ausbildung von kompakten Zellzusammenschlüssen (Foci), in den ersten Tagen nach Erreichen der Konfluenz wird dadurch normalerweise verhindert (Angaben des Herstellers ATCC). Die in diesem Projekt verwendeten WT sowie die daraus generierten *mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO}* NIH/3T3 Fibroblasten, zeigten jedoch ein verändertes Wachstumsverhalten mit den zuvor erwähnten phänotypischen Ausprägungen. Zusätzlich wiesen die Zellen eine reduzierte Adhärenz auf und lösten sich teils vom Untergrund, nachdem eine Konfluenz erreicht wurde bzw. mechanischer Stress, wie z. B. durch Zentrifugation, auf die Zellen wirkte (Daten nicht gezeigt). Die Adhäsion der Zellen war dabei nicht eingeschränkt, sodass diese sich oft auch in einem Einzellagen-Verbund vom Gefäßboden lösten (Daten nicht gezeigt).

Dass mGBPs einen Einfluss auf die Proliferation sowie die Ausbreitung von Fibroblasten haben, konnte in einigen Studien bereits gezeigt werden (Gorbacheva et al., 2002, Messmer-Blust et al., 2010). Gorbacheva et al. (2002) stellten u. a. eine um 50 % reduzierte Verdopplungszeit von mGBP2-transfizierten NIH/3T3 Fibroblasten im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen fest. Ein ähnliches Ergebnis konnte dabei auch in IFN γ -stimulierten Kontrollzellen verzeichnet werden. Da das Wachstum in den mGBP2-transfizierten Zellen unabhängig von weiteren IFN γ -Faktoren beeinflusst wurde, scheint demnach mGBP2 ausschlaggebend für diesen Phänotyp zu sein. Des Weiteren konnte in der gleichen Studie gezeigt werden, dass mGBP2-transfizierte Zellen fünf Tage nach Erreichen der Konfluenz eine deutlich höhere Zelldichte aufwiesen sowie kompakte Foci ausbildeten. Inwiefern mGBP2 auf molekularer Ebene Einfluss auf die Zellproliferation nimmt, ist bislang unklar. Es hätte somit vermutet werden können, dass auch die multiple mGBP-Defizienz ebenfalls Auswirkungen auf subzelluläre Prozesse aufweist, die im Zusammenhang mit der Zell-Proliferation stehen. Allerdings wurde das veränderte Zellwachstum bereits unter Standardbedingungen, also IFN γ -unstimulierten Konditionen, und somit einem allenfalls basalen mGBP-Expressionslevel, beobachtet (Daten nicht gezeigt). Zudem konnte der gleiche Phänotyp auch im Falle der WT Zellen verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt). Eine Veränderung muss demnach bereits vor der CRISPR/Cas9 Genomeditierung aufgetreten sein. Aufgrund der einfachen Kultivierung und der guten Transfizierbarkeit sind NIH/3T3 Fibroblasten auch heute noch eine populäre Zelllinie in der Zellkultur. Durch die weite Verbreitung stellt die Etablierung von Subklon-Varianten mit veränderten Eigenschaften

daher ein reales Problem dar. Eine Entwicklung von Varianten aus der gleichen Ursprungslinie konnte u. a. anhand der Mitomycin C-Responsivität von SWISS 3T3 Zellen gezeigt werden (Chugh et al., 2015). Es wäre daher denkbar, dass die hier verwendeten Fibroblasten eine Linie mit wenig eingeschränkter mitotischer Aktivität darstellen und somit auch über eine Konfluenz hinaus proliferieren konnten. Ein Gegenargument gegen diese Hypothese stellt jedoch die Tatsache dar, dass es sich bei den hier verwendeten NIH/3T3 Fibroblasten um Zellen aus sehr niedrigen Passagen aus den Stocks der Organisation ATCC handelte. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich bei der Kultivierung der Zellen innerhalb dieses Zeitraums ein neuer Subklon entwickelt hat, ist daher höchst unwahrscheinlich.

Das veränderte Wachstum der Zellen könnte allerdings durch ein weiteres Problem, dem Verlust der Zellkontakt-Inhibition, aufgetreten sein (Angaben des Herstellers, ATCC). Es ist bekannt, dass sich ein häufiges Überwachsen der Zellen in den Zellkulturgefäßen negativ auf die Zellkontakt-Inhibition auswirken kann. Auch wenn die Zellen in regelmäßigen Abständen passagiert wurden, kam es durchaus vor, dass einige Passagen dichter gewachsen waren als andere. Der veränderte Wachstums-Phänotyp könnte somit bereits im Voraus in den WT Zellen konstituiert worden sein. Dies würde erklären, weshalb WT also auch die daraus generierten mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Zellen den gleichen Phänotyp aufzeigten. Um dies zukünftig zu überprüfen, könnte eine Wachstums-Kontrolle mit neuen, wildtypischen NIH/3T3 Fibroblasten mitgeführt werden, um eine mögliche Veränderung der Zellkontakt-Inhibition zwischen den hier verwendeten Zellen und Zellen einer anderen Charge zu vergleichen.

5.2.3 NIH/3T3 Fibroblasten weisen eine reduzierte IFN γ -Responsivität auf

T. gondii

Zusätzlich zu den Wachstumsunterschieden konnten auch Veränderungen in der IFN γ -Responsivität der Zellen beobachtet werden. Unabhängig vom Infektionsmodell (*C. trachomatis* Serovar L2, *T. gondii* ME49, MCMV) blieb ein IFN γ -Effekt in Bezug auf die Pathogen-Replikation aus (Abb. 16A, 17A, 18, 19). In Infektionsexperimenten mit einem virulenten Typ I *T. gondii*-Stamm (RH) konnten ähnliche Beobachtungen bereits festgestellt werden (Takacs et al., 2012). Auch hier zeigte die IFN γ -Stimulation von NIH/3T3 Fibroblasten sogar in Kombination mit TNF α keinen Einfluss auf die *T. gondii*-Proliferation. Allerdings ist bereits bekannt, dass *T. gondii* Typ I Stämme eine Reihe an Effektor-Proteinen

Diskussion

sekretieren. Durch die Effektoren wird neben der IRG- auch die mGBP-vermittelte Immunität inhibiert und somit eine effektivere Immunsupprimierung induziert, als es z. B. intermediär virulente Typ II Stämme vermögen (Behnke et al., 2012, Behnke et al., 2011, Degrandi et al., 2007, Etheridge et al., 2014, Kim et al., 2016). Ähnliche Infektionsexperimente zur Analyse der Infektiösität der Typ II Stämme in NIH/3T3 Fibroblasten wurden nach bisherigem Wissensstand nicht publiziert.

In IFN γ -stimulierten mGBP2^{-/-} MEFs konnte im Vergleich zu WT-Zellen eine reduzierte Anzahl aufgebrochener PVs in einer *T. gondii*-Infektion mit dem ME49-Stamm (Typ II) detektiert werden (Degrandi et al., 2013). Auch wenn die MEF-Linie einem anderen Entwicklungsstadium entspringt, handelt es sich wie im Falle der NIH/3T3 Zellen um Fibroblasten. Eine IFN γ -abhängige mGBP-Expression konnte sowohl in MEFs als auch in den hier verwendeten NIH/3T3 Fibroblasten detektiert werden (unveröffentlicht, diese Arbeit). Der ausbleibende IFN γ -Effekt insbesondere in den *T. gondii*-infizierten WT NIH/3T3 Fibroblasten musste daher durch eine andere Ursache als eine beeinflusste mGBP-Expression bedingt sein.

C. trachomatis

Die Hauptzielzellen der verschiedenen *Chlamydia spp.* sind im Allgemeinen Epithelzellen (Jutras et al., 2003). Mittlerweile ist bekannt, dass Chlamydien allerdings eine Vielzahl von Zelltypen infizieren können und so auch Zellen mesenchymalen Ursprungs wie beispielsweise Fibroblasten (Kagebein et al., 2014). Des Weiteren scheint die IFN γ -Antwort eine wichtige Funktion in der Beseitigung von Chlamydien-Infektionen einzunehmen. Infizierte IFN γ -Rezeptor-defiziente Mäuse weisen eine erhöhte Verteilung der Bakterien in die verschiedenen Organe wie Lunge, Leber und Milz auf (Cotter et al., 1997). *In vitro* Studien konnten außerdem eine starke IFN γ -abhängige Inhibierung des *C. trachomatis*-Wachstums in MEFs beschreiben (Al-Zeer et al., 2009).

Die hier durchgeführten Experimente ließen darauf schließen, dass eine Infektion von NIH/3T3 Fibroblasten mit *C. trachomatis* L2 nicht durch die IFN γ -abhängige, Zell-autonome Immunabwehr beeinflusst wurde. Veranschaulicht wurde dies durch die vergleichbaren Inklusionszahlen zwischen IFN γ -stimulierten sowie unstimulierten WT Fibroblasten, aber auch im Vergleich zwischen der infizierten WT und der mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Linie (Abb. 16A). Der ausbleibende Phänotyp in den IFN γ -stimulierten Zellen scheint dabei nicht auf einer generell inhibierten Infektiösität der Chlamydien zu beruhen. Vielmehr schien die Fibroblasten-Linie erneut das Problem bei der Analyse darzustellen. Die in den Experimenten

teils eingesetzte MOI von 0,5 war im Vergleich zu weiteren Studien sehr niedrig (Knowlton et al., 2013, Lindenberg et al., 2017). Dennoch konnte ein deutliches Zellsterben oder der oben beschriebene Adhärenzverlust verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt). Es ist bekannt, dass eine Chlamydien-Infektion zytopathologische Effekte auch in 3T3 Fibroblasten verursacht (Knowlton et al., 2013). Zu diesen Effekten gehören beispielsweise die Zentrosom-Amplifizierung, die Formierung multipolarer Spindeln und die Induktion eines Verankerungs-unabhängigen Wachstums (Grieshaber et al., 2006, Knowlton et al., 2011, Knowlton et al., 2013). Die zytologischen Veränderungen spielen demnach vor allem in proliferierenden Zellen eine entscheidende Rolle. In Bezug auf die hier durchgeführten Experimente könnte daher rückgeschlossen werden, dass die Effekte der Chlamydien-Infektion verstärkende Auswirkungen auf den Adhärenzverlust sowie die uneingeschränkte Zellteilung der Zelllinie haben. Unklar ist nur, ob die an der Mitose beteiligten Effekte bereits nach 24 h, also dem Zeitpunkt des Infektionsstopps, erkennbar sind, da innerhalb dieses Zeitrahmens die meisten Zellen maximal eine Teilung durchlaufen haben. Welche veränderten Eigenschaften verantwortlich für den ausbleibenden Phänotyp sind, kann an dieser Stelle nicht definitiv gesagt werden.

Die RT-qPCR Analysen zur Bestimmung der Chlamydien-Proliferation zeigten ebenfalls keinen Unterschied zwischen den IFN γ -stimulierten und unstimulierten Bedingungen. Entgegengesetzt zu den Erwartungen konnte eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Proliferationsinhibition in den mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Zellen nach 42 h beobachtet werden (Abb. 17A). Die meisten der in der mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Linie defizienten mGBPs werden normalerweise an die Inklusionsmembran rekrutiert (Lindenberg et al., 2017). Eine mögliche Erklärung für das aufgeführte Ergebnis könnte daher sein, dass die multiple mGBP-Defizienz zu einer erhöhten Rekrutierung der Chr3 Cluster-mGBPs geführt hat. Da insbesondere diese mGBPs einen starken Einfluss auf PV-residierende und zytosolische Pathogene aufweisen (Degrandi et al., 2013, Man et al., 2015, Meunier et al., 2014), wäre dies eine mögliche Erklärung für den beobachteten Phänotyp. Die Tatsache, dass keine abweichenden Inklusionszahlen beobachtet werden konnten, lag möglicherweise am Zeitpunkt des Infektionsstopps. Die erste Infektionsanalyse wurde bereits nach 24 h beendet, während die leichte Proliferationsinhibition in der qPCR-Analyse nach 42 h festgestellt wurde.

Wie in Abschn. 4.3.3 beschrieben, konnte eine Co-Lokalisation von mGBP8 mit anti-MOMP-gefärbten Chlamydien beobachtet werden (Abb. 33). Demnach wäre auch eine direkte Interaktion zwischen mGBP8 und beispielsweise Oberflächenproteinen auf der

Diskussion

Chlamydienmembran nicht auszuschließen. Das *mgbp8*-Gen war in diesem CRISPR/Cas9-Ansatz das einzige Gen der untersuchten mGBPs, das keine Leserasterverschiebung und somit kein PTC aufwies. Damit ist es sehr wahrscheinlich als funktionelles, Punkt-mutiertes Protein exprimiert worden. Die Funktion der Chr5-Cluster mGBPs ist bislang noch nicht beschrieben. Daher könnten mögliche Effekte von mGBP8 auf die Infektion von *C. trachomatis* in zukünftigen Studien mittels einer mGBP8-überexprimierenden MEF-Zelllinie untersucht werden. *In vitro* Experimente mit hGBP1-transfizierten HeLa Zellen zeigten in diesem Zusammenhang bereits signifikante inhibitorische Effekte auf das Wachstum von *C. trachomatis* Serovar B im Vergleich zum bakteriellen Wachstum in WT-Zellen (Tietzel et al., 2009). Eine Proliferationsanalyse mittels RT-qPCR könnte den Einfluss einer mGBP8-Überexpression auf die Proliferation von *C. trachomatis in vitro* beschreiben. Zudem könnten weitere Lokalisationsanalysen in MEF-Zelllinien durchgeführt werden, um die in NIH/3T3 Fibroblasten beobachtete Co-Lokalisation von mGBP8 mit MOMP-positiven Strukturen zu verifizieren.

Die Zell-intrinsischen, immunologischen Prozesse der Fibroblasten sind nur ein Auszug dessen, was bei einer Immunreaktion gegen eine Chlamydien-Infektion ausgelöst wird. Möglicherweise spielt die Funktion von mGBP9 in anderen Zellpopulationen eine größere Rolle in Bezug auf die Infektionsbekämpfung, als durch die hier gezeigten Ergebnisse angenommen werden kann. *In vivo* Infektionsexperimente mit mGBP9-defizienten Tieren könnten daher zukünftig die systemische Funktion von mGBP9 unter der Berücksichtigung des Zusammenspiels aller Zellpopulationen und Zytokine detaillierter beschreiben. Durch die Generierung der heterozygot mGBP9-defizienten ES Zellen stehen diese Tiere sehr wahrscheinlich bald zur Verfügung.

MCMV

In den MCMV-Infektionsexperimenten wurde u. a. der MCMV- Δ M27-Stamm verwendet. Das MCMV-Protein M27 stellt einen viralen Effektor dar, der STAT2-abhängige Signalwege, wie Typ I und III IFN-, nicht aber den Typ II IFN-induzierten Signalweg, inhibiert (Trilling et al., 2011). Interessanterweise konnte in früheren MCMV- Δ M27 Infektionsexperimenten aber vor allem eine reduzierte Virus-Replikation in IFN γ -stimulierten NIH/3T3 Fibroblasten festgestellt werden (Le-Trilling et al., 2018). Welche Effektormoleküle bei der Inhibition der MCMV-Virusreplikation die entscheidende Rolle spielen, ist bis heute unklar. Um potentielle, antivirale Eigenschaften der mGBPs im MCMV-Modell zu analysieren, wurden daher WT,

mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO}-defiziente und mit mCherry-mGBP6, -9 und -10 rekonstituierte mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} NIH/3T3 Fibroblasten mit WT- und Δ M27- MCMV infiziert.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigten im Vergleich zu den publizierten Daten eine deutlich abgeschwächte Inhibierung der Virus-Replikation (Δ M27) in IFN γ -stimulierten NIH/3T3 Fibroblasten (Abb. 19) (Le-Trilling et al., 2018). Im Gegensatz dazu konnte im Vergleich zum WT MCMV eine erhöhte MCMV- Δ M27 Inhibierung in Typ I IFN-stimulierten Zellen beobachtet werden. Damit wurde auch hier deutlich, dass der IFN γ -Signalweg in den verwendeten NIH/3T3 Fibroblasten unabhängig von den Virus-vermittelten Effektormechanismen beeinflusst war. Um zu überprüfen, ob der IFN γ -Signalweg in diesen Zellen entgegengesetzt der Annahmen durch das WT-MCMV inhibiert wurde, könnte in zukünftigen Experimenten die Expression der mGBPs nach einer Infektion mit MCMV untersucht werden. Da eine GBP-Expression in IFN γ -stimulierten, uninfizierten NIH/3T3 Zellen bereits gemessen wurde (Abb. 15) und eine Inhibierung der mGBP-Expression durch MCMV- Δ M27 unwahrscheinlich ist, sind vermutlich andere IFN γ -abhängige Faktoren beeinflusst gewesen, die verantwortlich für die inhibierte Virus-Replikation sind. Da die veränderte IFN γ -Responsivität im Vergleich zu den publizierten Daten (Zimmermann et al., 2005) sowohl in WT Zellen als auch in Zellen mit multipler mGBP-Defizienz aufgetreten ist, müsste dieses Phänomen unabhängig von der CRISPR/Cas9 Genom-Editierung entstanden sein.

Dass eine mGBP9-Überexpression provirale Eigenschaften auf die MCMV-Replikation hat, kann an dieser Stelle nur mit einer gewissen Vorsicht diskutiert werden. Wie bereits erwähnt, wurde das gezeigte Experiment nur einmalig durchgeführt und veranschaulicht hier in erster Linie zusätzlich die beeinflusste IFN γ -Antwort der NIH/3T3 Fibroblasten (Abb. 19). Dennoch wäre ein proviraler Effekt nicht abwegig. Bereits ISG15 stellte sich als potentieller Schlüsselfaktor im Replikationszyklus von HCV heraus (Broering et al., 2010). Ein *Knockdown* von ISG15 wies supprimierende Eigenschaften auf die Virusreplikation auf, während die Überexpression zu einer signifikant erhöhten Replikation führte. Somit konnte bereits ein IFN-induzierter Immunfaktor identifiziert werden, der möglicherweise durch eine evolutionäre Anpassung des Virus eine provirale Funktion eingenommen hat.

Ein Fazit kann aus den Infektionsexperimenten mit der mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Fibroblastenlinie nicht gezogen werden, da aufgrund der veränderten IFN γ -abhängigen Virus-Inhibierung in den Kontrollzellen im Vergleich zu den publizierten Daten (Zimmermann et al., 2005) keine direkte Aussage über die Funktion der mGBPs getroffen werden kann.

Diskussion

NIH/3T3 Fibroblasten wurden bereits im MCMV-Infektionsmodell eingesetzt (Le-Trilling et al., 2018). Demnach konnte davon ausgegangen werden, dass diese Zelllinie eine geeignete Linie für die hier durchgeführten Experimente gewesen ist. Allerdings wiesen die Zellen, wie bereits erwähnt, Veränderungen im Wachstum sowie eine Beeinträchtigung in ihrer Zell-autonomen Immunabwehr auf (s. 5.2.2). Beide Merkmale sind dabei unabhängig von der Genomeditierung entstanden, da die veränderten Eigenschaften auch in wildtypischen Zellen beobachtet werden konnte. Eine Wiederholung der Infektionsexperimente in allen hier gezeigten Modellen mit neuen NIH/3T3 Fibroblasten wäre daher notwendig. Allerdings müsste dafür die CRISPR/Cas9 Genomeditierung in der Fibroblastenlinie wiederholt werden. Eine Problematik, die sich hierbei stellt, ist die Zufälligkeit, mit der Mutationen durch den NHEJ-Mechanismus induziert werden. Wie bereits in der NIH/3T3 Fibroblasten CRISPR/Cas9-Strategie beschrieben, wiesen nicht alle gescreenten Klone eine Mutation im *mGBP9* Gen auf (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren können stille oder wie im Beispiel von *mgbp8* in der *mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO}* Fibroblasten-Linie auch konservative Mutationen auftreten (Tab. 42), die nicht zu einer entsprechenden *mGBP*-Defizienz führen. Die multiple Defizienz war daher ein Ergebnis, dessen erfolgreiche Wiederholung ein eher unwahrscheinliches Ereignis darstellt.

Das ursprüngliche Ziel dieses Teil-Projekts war die Charakterisierung der *mGBP9*-Funktion. Für weitere *in vitro* Analysen würden sich daher isolierte MEFs aus der zukünftig generierten, *mGBP9*-defizienten Mauslinie empfehlen. Nachfolgende Analysen lassen sich dadurch besser mit den aus diesem Institut publizierten Ergebnissen vergleichen, da zur Charakterisierung der *mGBP*-Funktionen häufig MEF-Linien verwendet wurden (Degrandi et al., 2013, Steffens et al., 2020).

5.3 *mGBP9* co-lokalisiert mit verschiedenen *mGBP*s

Um eine mögliche Co-Lokalisation von *mGBP9* mit weiteren Mitgliedern der *mGBP*-Familie zu charakterisieren, wurden NIH/3T3 Fibroblasten mit GFP-*mGBP9* und verschiedenen *mCherry-mGBP* Fusionsproteinen transduziert (Abb. 20A). Die Expression der Fusionsproteine wurde anhand von Konfokal-mikroskopischen Aufnahmen sowie Western Blot-Analysen bestätigt (Abb. 20C, 21-30). In den Analysen konnte gezeigt werden, dass die Fusionsproteine *mCherry-mGBP1* und *mCherry-mGBP10* nicht exprimiert wurden, sondern lediglich der Fluoreszenzmarker *mCherry*. Dies äußerte sich in einer ubiquitären Verteilung des *mCherry*-Signals in den Zellen. Ein ähnliches Ergebnis konnte ebenfalls in der

Immunoblot-Analyse beobachtet werden, da ausschließlich Banden auf Höhe der mCherry-Kontrolle detektiert wurden (Abb. 20C). Die Gründe für die fehlende Expression der Fusionsproteine sind unklar, da eine erfolgreiche Transduktion zumindest von mCherry-mGBP1 u. a. bereits in NIH 3T3 Fibroblasten gezeigt werden konnte (Kravets et al., 2016, Lindenberg et al., 2017). Für die Generierung der mCherry-mGBP1 und GFP-mGBP9 doppelt-transduzierten Zelllinie wurde in dieser Arbeit das gleiche Ursprungsplasmid verwendet, wie in den oben aufgeführten Publikationen. Die korrekte Klonierung von *mCherry-mgbp10* in den gleichen Zielvektor (AbbS. 7) konnte durch Sequenzierungsanalysen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt), sodass ein mutiertes Fusionsprotein oder eine Leserasterverschiebung auszuschließen war. Eine weitere mögliche Ursache für das Auftreten der einzelnen Markerproteine hätte die Aminosäuresequenz des Linkers zwischen dem Ziel- und dem Markerprotein darstellen können, im Falle dessen, dass diese potentielle Zielsequenzen für endogene Proteasen beinhaltet. Die meisten der hier verwendeten Fusionsproteine wurden allerdings vor diesen Experimenten bereits in NIH/3T3 Fibroblasten, als auch in MEFs transduziert, ohne dass eine proteolytische Abspaltung des Markers detektiert werden konnte. Zudem konnte in der hier durchgeführten Westernblot-Analyse zur Überprüfung der mCherry-mGBP1 und -mGBP10 Expression überhaupt kein Fusionsprotein detektiert werden, was darauf hindeutete, dass die Markerproteine bereits einzeln exprimiert und nicht nachträglich proteolytisch getrennt wurden.

Ähnlich wie bei der Adhäsionsproblematik, spielt die Zelldichte der NIH/3T3 Fibroblasten in der Zellkultur auch in Bezug auf die Protein-Degradation eine wichtige Rolle. So konnte in der Ursprungslinie Swiss 3T3 eine positive Korrelation zwischen Zelldichte und einer erhöhten Proteindegradation festgestellt werden (Cockle et al., 1984). Fibroblasten gehen während eines Wundheilungsprozesses in eine proliferative Phase über (Martin, 1997). In dieser Phase werden langlebige, zytoplasmatische Proteine hauptsächlich über den Prozess der Zytokinese aus dem Zytosol herausverdünnt (Eden et al., 2011). Nach erfolgter Wundheilung wird die proliferative Phase über Zellkontakt-Inhibition wieder gestoppt (Coller et al., 2006). Bei Eintritt der Fibroblasten in diese reversible Zellzyklus-Arrest Phase können langlebige Proteine dementsprechend nicht mehr über Zytokinese entfernt werden. Aus diesem Grund steigt in den Zellen die Autophagie-vermittelte Degradation insbesondere von zytosolischen Proteinen (Zhang et al., 2017). Da die Fibroblasten in den hier durchgeführten Experimenten sowohl für die Fluoreszenzaufnahmen als auch für die Protein-Isolation meist sehr dicht wachsen gelassen wurden, könnte dies mitunter eine Erklärung für die beobachteten Ergebnisse sein. Ein Argument, das wiederum gegen diese Hypothese spricht, wäre, dass eine

Diskussion

Autophagie-vermittelte Degradation zum Abbau des gesamten Fusionsproteins geführt hätte. Allerdings konnte das mCherry-Molekül im Falle der mCherry-mGBP1 Zelllinie sehr eindeutig und im Falle der mCherry-mGBP10 Zelllinie schwach im Immunoblot detektiert werden.

Eine weitere Hypothese wäre, dass bei der Transduktion lediglich der unfusionierte mCherry-Marker in das Genom der vermeintlich mCherry-mGBP1 und 10-exprimierenden Zellen integriert wurde. Dieses Ereignis wäre sehr unwahrscheinlich, prinzipiell aber möglich. Dagegen spricht, dass für die Experimente Mischkulturen aus den transduzierten Zellen hergestellt wurden, um homogene Zellpopulationen zu vermeiden. Darüber sollen zufällig auftretende Phänotypen, die aufgrund der ungerichteten Integration der Zielsequenz in das Genom auftreten können, durch die Heterogenität der Population herausgemittelt werden. Eine genaue Erklärung für die unvollständigen Fusionsproteine kann an dieser Stelle jedoch nicht gegeben werden. Um die Co-Lokalisationsanalyse zu komplettieren, müssten diese Zelllinien zukünftig neugeneriert und analysiert werden.

Interessanterweise zeigten alle doppelt-transduzierten Zelllinien auch eine ubiquitäre Verteilung des GFP-mGBP9 Fusionsproteins (Abb. 21-30). In der Co-Lokalisationsanalyse konnte jedoch eine Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 mit einigen der mCherry-Konstrukte beobachtet werden. Demnach schien das GFP-mGBP9 Fusionsprotein nur teilweise degradiert worden zu sein. Diese Annahme wurde durch die Ergebnisse der Western Blot-Analyse unterstützt. Eine Relokalisierung von GFP-mGBP9 in den Nukleus war aufgrund einer fehlenden Nukleus-Lokalisierungssequenz des mGBPs und durch die Molekülgröße unwahrscheinlich. Zudem konnte eine solche Lokalisation von mGBP9 und weiteren mGBPs auch in früheren Studien nicht beobachtet werden (DeGrandi et al., 2007, Lindenberg et al., 2017). Die Abspaltung des GFP-Markers konnte erneut in der Western Blot-Analyse bestätigt werden (Abb. 20C). Die ungewöhnliche räumliche Verteilung der mGBPs war demnach der Tatsache geschuldet, dass die Fusionskonstrukte teilweise degradiert wurden. Verschiedene GFP- und mCherry-Konstrukte waren dabei in unterschiedlichem Ausmaß betroffen. Diese Beobachtungen galt es bei der Auswertung der Co-Lokalisationsanalyse zu berücksichtigen. Des Weiteren konnte eine recht schwache Fluoreszenz der mCherry-gekoppelten mGBP-Fusionsproteine detektiert werden. Interessanterweise variierten die Fluoreszenzintensitäten der mCherry-Konstrukte zwischen den Zelllinien deutlich, obwohl die doppelt-transduzierten Zellen nach identischen Fluoreszenz-zytometrischen Parametern selektiert wurden. Es ist allerdings unklar, ob es sich hierbei um eine Problematik bei der Transduktion (unterschiedliche Anzahl integrierter Gen-Kopien) oder der anschließenden Gen-Expression

handelt oder aber der oben beschriebenen Proteindegradation geschuldet ist. Alternativ könnte daher die Co-Transduktion sowie -Expression zukünftig in einer MEF-Linie getestet werden. Auch wenn mCherry ein etablierter Fluoreszenzmarker ist, könnten zusätzlich neuere Fluorophore mit optimierten Eigenschaften bei der Generierung zukünftiger Fusionsproteine verwendet werden (Bindels et al., 2017, Thorn, 2017).

Die Charakterisierung der mGBP Co-Lokalisation war von besonderem Interesse, um ein mögliches Zusammenspiel zwischen mGBP9 und weiteren mGBPs als potentielle Effektormoleküle bei der Infektionskontrolle zu untersuchen. Außerdem hätten die Ergebnisse darüber hinaus Hinweise auf direkte Protein-Interaktionen geben können. Die in NIH/3T3 Fibroblasten erstmals durchgeführte mGBP9 Co-Lokalisationsanalyse ergab, dass GFP-mGBP9 mit mCherry-mGBP6, -mGBP7 und -mGBP9 co-lokalisierte und dass diese Co-Lokalisation vornehmlich im Zytosol detektierbar war (Abb. 26, 27, 29). Eine Lokalisation in VLS, wie es für einige der mGBPs bereits in MEFs beschrieben wurde (Kravets et al., 2016), war eventuell aufgrund der abgespalteten Markerproteine seltener beobachtet worden. Eine andere Hypothese wäre, dass möglicherweise die Fusions-Konstrukte generell seltener in VLS in NIH/3T3 Fibroblasten akkumulieren. In IFN γ stimulierten, GFP-mGBP9 und mCherry-mGBP6 doppelt-transduzierten Zellen hingegen konnte eine verhältnismäßig häufige Akkumulation beider Konstrukte im Zytoplasma als auch an den jeweils gleichen VLS detektiert werden (Abb. 26).

In den Analysen von Kravets et al. (2016) konnte eine Co-Lokalisation von mGBP6 mit den mGBPs 1, 2, 3 und 5 nicht identifiziert werden. Auch mGBP9 scheint mit diesen mGBPs nicht in VLS zu co-lokalisieren, wie in den hier gezeigten Experimenten beobachtet wurde (Abb. 22-25). Die Analyse legt nahe, dass eine Rekrutierung der verschiedenen mGBPs zu den VLS möglicherweise von unterschiedlichen Rekrutierungssignalen abhängt, die demnach Einfluss auf spezifische Gruppen der mGBP-Mitglieder zu haben scheinen. Eine dieser Gruppen würde den hier gezeigten Ergebnissen nach zu urteilen mindestens mGBP6, mGBP7 und mGBP9 beinhalten (Abb. 26, 27, 29, 40). Für eine genaue Definition der Gruppen müsste jedoch die Co-Lokalisation aller mGBPs mit jedem weiteren Mitglied untersucht werden.

In den meisten doppelt-transduzierten Zelllinien wurde eine Rekrutierung von mGBP9 zu VLS nicht beobachtet. Deshalb könnte eine gegenseitige Abhängigkeit der mGBPs 6 und 9 in Bezug auf die Lokalisation an VLS vermutet werden. Interessanterweise konnte jedoch ebenfalls keine Lokalisation von GFP-mGBP9 in den übrigen Zelllinien beobachtet werden, nachdem diese mit IFN γ stimuliert wurden. Eine Expression von endogenem mGBP6 hätte im

Diskussion

Falle einer solchen Abhängigkeit ebenso eine Akkumulierung von GFP-mGBP9 in VLS zur Folge gehabt. Es könnte weiterhin spekuliert werden, dass die unterschiedliche intrazelluläre Konzentration ursächlich für die häufige Co-Lokalisation in den VLS ist. Warum eine solch ausgeprägte Co-Lokalisation in den mCherry-mGBP6 und GFP-mGBP9 exprimierenden Zellen beobachtet werden konnte, bleibt jedoch zunächst unklar.

Eine Co-Lokalisation von GFP-mGBP9 mit einigen mCherry-Fusionsproteinen konnte teilweise als IFN γ -abhängig (mCherry-mGBP2 und 3, Abb. 23, 24) oder aber als IFN γ -unabhängig (mCherry-mGBP6, 7, und 9, Abb. 26, 27, 29) determiniert werden (Abb. 40). Die IFN γ -unabhängige Co-Lokalisation (GFP-mGBP9 + mCherry-mGBP6, 7, 9) könnte demnach eine direkte Interaktion zwischen den mGBPs 6, 7, 9 und mGBP9 bedeuten, da hier zumindest keine weiteren IFN γ -induzierten Faktoren für eine Co-Lokalisation benötigt werden. Des Weiteren könnte vermutet werden, dass eine Co-Lokalisierung von mGBP2 und 3 mit mGBP9 abhängig von der IFN γ -induzierten Expression weiterer Faktoren wie beispielsweise anderer mGBPs ist und möglicherweise eine primäre Interaktion zwischen mGBP9 und beispielsweise mGBP6 oder 7 Voraussetzung für diese Art der Co-Lokalisation ist. Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse frühere Analysen, bei denen eine Co-Lokalisation von mCherry-mGBP2 und GFP-mGBP7 als auch von GFP-mGBP2 und mCherry-mGBP6 in IFN γ -stimulierten MEFs selten detektiert wurde (Kravets et al., 2016, Steffens et al., 2020).

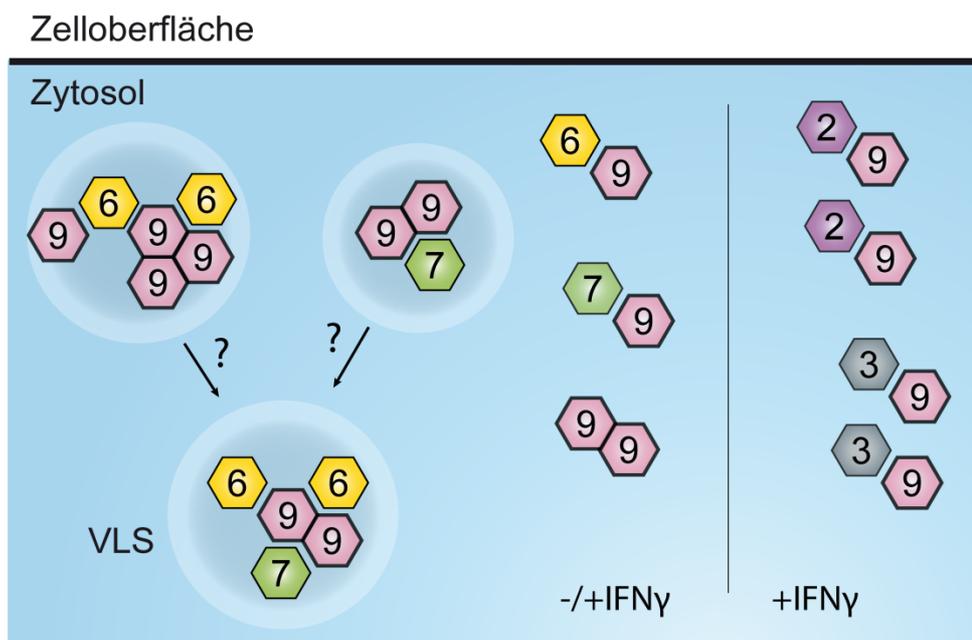


Abb. 40 Schematische Darstellung der Co-Lokalisation von mGBP9 mit weiteren mGBPs in IFN γ -stimulierten bzw. unstimulierten NIH/3T3 Fibroblasten.

VLS: Vesikel-ähnliche Strukturen (engl. ‚vesicle-like structures‘); -/+IFN γ : Co-Lokalisation, die in IFN γ -stimulierten, als auch unstimulierten Zellen beobachtet wurde; +IFN γ : Co-Lokalisation, die ausschließlich in

IFN γ -stimulierten Zellen beobachtet wurde. Verbundene Hexagone zeigen eine nachgewiesene Interaktion. Getrennte Hexagone deuten eine räumliche Nähe/Co-Lokalisation an.

Diese Beobachtung wird durch die hier durchgeführte Interaktionsstudie teilweise unterstützt (s. 4.3.2.1). Mittels Co-IP konnte gezeigt werden, dass mCherry-mGBP6 eine nicht ausreichend starke Bindung zu GFP-mGBP9 aufweist, um im Eluat der GFP-spezifischen Präzipitation gemessen werden zu können (Abb. 31). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass möglicherweise weitere IFN γ -induzierte Faktoren bei der Co-Lokalisation eine Rolle spielen. Um auszuschließen, dass gegebenenfalls eine schwache Interaktion zwischen mGBP6 und mGBP9 nicht doch existiert, könnten zukünftig ‚Multiparameter-Fluoreszenz-Image-Spektroskopie‘-Analysen durchgeführt werden, durch die bereits die supramolekularen mGBP-Komplexe in den VLS beschrieben wurden (Kravets et al., 2016).

Die bisherigen Lokalisationsstudien, die an diesem Institut durchgeführt wurden, konnten u. a. zeigen, dass mGBP7 mit mGBP3 oder mGBP6 an VLS co-lokalisiert (Steffens et al., 2020). In den hier gezeigten Analysen wurde ergänzend beobachtet, dass mGBP9 mit mGBP6 und teilweise auch mit mGBP7 zusammen an VLS co-lokalisiert (Abb. 26-27). Eine gemeinsame Rekrutierung von mGBP9 mit mGBP2 und mGBP3 konnte an diesen Strukturen hingegen nicht detektiert werden. Diesen Beobachtungen zu Folge scheinen vermehrt einige spezifische mGBPs ohne Isoprenylierungsstelle, wie mGBP6, 7 und 9, gemeinsam an VLS zu akkumulieren. Eine Hypothese, die daher aufgestellt werden könnte, ist, dass die VLS-Rekrutierung der mGBPs ohne CaaX-Motiv abhängig von der Rekrutierung der jeweils anderen mGBPs sein könnte. Zusätzlich könnte vermutet werden, dass die Akkumulation der betroffenen mGBPs einer Art Rekrutierungshierarchie unterliegt. Solch eine Rekrutierungshierarchie wird beispielsweise für hGBP1 und hGBP2, 3, 4 und 6 an *Shigella flexneri*, als auch für mGBP2 und mGBP7 an der *T. gondii* PV mit mGBP2 als initiiierenden Rekrutierungsfaktor für mGBP7 vermutet (Piro et al., 2017, Steffens et al., 2020, Wandel et al., 2017). Interessanterweise gilt diese Beobachtung nicht für die Lokalisation von mGBP2 und mGBP7 in VLS (Steffens et al., 2020). In einer weiteren Publikation zur Charakterisierung des mGBP7 Proteins wurde vermutet, dass der flexible C-Terminus von mGBP7 Eigenschaften zur Membranverankerungen besitzen könnte und somit das fehlende CaaX-Motiv funktionell ersetzt (Legewie et al., 2019). Das Rekrutierungsverhältnis zwischen mGBP2 und mGBP7 zur *T. gondii* PV beruht weiteren Vermutungen zu Folge darauf, dass mGBP2 zunächst die Integrität der PV Membran beeinflusst und dadurch die Bindung von mGBP7 ermöglicht. Aufgrund der fehlenden Co-Lokalisation der beiden mGBPs in VLS könnte daher vermutet werden, dass es sich bei VLS möglicherweise um nicht Lipid-haltige

Diskussion

Strukturen handelt. Der Aufbau von VLS ist zum heutigen Stand noch nicht geklärt. Diesem Gedankengang folgend, würde eine Co-Lokalisation der in VLS gemeinsam auftretenden mGBPs eher aus einer Interaktion zwischen den Proteinen resultieren oder durch weitere unbekannte Rekrutierungs-Faktoren vermittelt werden. Den bisherigen Beobachtungen nach zu urteilen könnte eine mGBP9-Rekrutierung an VLS abhängig von einer mGBP6- bzw. mGBP7-Expression oder aber sogar von der Expression beider mGBPs sein (Abb. 40). Solch eine Abhängigkeit könnte zudem die beobachtete IFN γ -abhängige Co-Lokalisation mit mGBP2 und mGBP3 erklären. Eine Co-Lokalisation mit diesen Proteinen wird womöglich durch die Expression weiterer IFN γ -induzierter Faktoren, wie den endogenen mGBPs, begünstigt, die im weiteren Verlauf als Adapter fungieren könnten.

Ob die oben diskutierten mGBPs ohne CaaX-Motiv tatsächlich vermehrt oder sogar ausschließlich in den gleichen Vesikeln co-lokalisieren und voneinander abhängig sind, müsste über erweiterte Lokalisationsanalysen untersucht werden. Dazu könnten tripel-transduzierte NIH/3T3 Fibroblasten mit den mGBPs 6, 7 und 9 als Fusionsproteine mit verschiedenen Fluorophoren generiert werden, um die gemeinsame Lokalisation an VLS zu untersuchen. Um die zeitliche Abfolge der mGBP-Rekrutierung an VLS zu analysieren, könnten die Ziel-mGBPs beispielsweise unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimiert werden. Vektor-kodierte, Fluorophor-markierte mGBPs könnten somit in murine Fibroblasten transfiziert werden und ihre Lokalisation nach Expressions-Induktion in Lebendzell-Aufnahmen verfolgt werden. In solch einem Experiment könnte parallel überprüft werden, ob die teils beobachtete Rekrutierung an VLS IFN γ -abhängig ist, da aufgrund der Induzierbarkeit einzelner mGBPs ein IFN γ -Stimulus nicht notwendig wäre.

5.3.1 Doppelt-transduzierte NIH/3T3 Fibroblasten weisen veränderte mGBP-Rekrutierung zur Inklusionsmembran auf

Die Rekrutierung der mGBPs an die Inklusionsmembran von *C. trachomatis* stellte sich in den doppelt-transduzierten NIH/3T3 Fibroblasten anders dar, als bisher beschrieben (Lindenberg et al., 2017). Aufgrund der Tatsache, dass die Fusionsprotein-exprimierenden Zelllinien mit der gleichen WT Zelllinie generiert wurden, wie die Fibroblasten zur Analyse einer multiplen mGBP-Defizienz, konnte eine ähnliche Problematik in den anschließenden Infektionen festgestellt werden. Nach einer Infektion wurde auch hier ein vermehrtes Absterben bzw. Ablösen der Zellen unabhängig von einer IFN γ -Stimulation beobachtet. Bei den Infektionen der verschiedenen Zelllinien konnte kein Zusammenhang zwischen der

jeweiligen Art der exprimierten mGBP-Fusionsproteine und der reduzierten Adhärenz der Zellen festgestellt werden. Diese Beobachtung bekräftigte die Vermutung, dass die hier verwendeten Zellen veränderte Eigenschaften aufwiesen, die zu einem vermehrten Ablösen sowie zu einer erhöhten Sterblichkeit in den Infektionsexperimenten führten.

Des Weiteren wurde in erfolgreich infizierten Zellen nur in äußerst seltenen Fällen eine mGBP-Akkumulation an der chlamydialen Inklusionsmembran beobachtet. Neben den dokumentierten Rekrutierungen (Abb. 32, oben) konnten meist nur wenige mGBP-positive Inklusionen auf den jeweils analysierten Deckglässchen detektiert werden. Die hohe Sterblichkeit bzw. die reduzierte Adhäsion der Zellen in Infektion mit höheren MOIs (s. Abschn. 4.2.1) und die seltenen Rekrutierungs-Events machten eine quantitative Bestimmung der Co-Lokalisation nicht möglich.

Eine mGBP-Rekrutierung zur Inklusionsmembran wurde lediglich für mCherry-mGBP2, mCherry-/GFP-mGBP9 und interessanterweise für mCherry-mGBP8 beobachtet. GFP-mGBP2 konnte in einer quantitativen Analyse als das mGBP mit den höchsten Rekrutierungsfrequenzen zu chlamydialen Inklusionen sowie zu *T. gondii* PV's identifiziert werden (Lindenberg et al., 2017). Da selbst für mGBP2 in den hier gezeigten Experimenten selten eine Rekrutierung zur Chlamydien-Inklusion beobachtet werden konnte, bestätigt diese Beobachtung erneut das veränderte Verhalten der hier verwendeten NIH/3T3 Fibroblasten. An den wenigen Inklusionen, an denen eine mGBP2-Akkumulation beobachtet wurde, konnte jedoch keine GFP-mGBP9 Co-Rekrutierung detektiert werden. Obwohl für mGBP2 und mGBP9 ähnliche Rekrutierungs-Frequenzen beschrieben wurden (Lindenberg et al., 2017), deuteten die Ergebnisse dieser Analyse darauf hin, dass die Rekrutierungen unabhängig voneinander verlaufen. Dies geht auch mit der fehlenden Co-Lokalisation von mGBP2 und mGBP9 in VLS in uninfizierten Zellen einher. Ob mGBP1, das mit ähnlich hohen Frequenzen auf der Inklusion detektiert wurde (Lindenberg et al., 2017), möglicherweise für eine mGBP9-Rekrutierung verantwortlich war, konnte auf Grund des fehlenden Fusionsproteins in der doppelt-transduzierten Zelllinie nicht analysiert werden. Da mGBP1 und mGBP2 sowohl an VLS als auch an der Toxoplasma PV häufig co-lokalisieren (Kravets et al., 2016) und es keine Korrelation zwischen mGBP2 und mGBP9 zu geben scheint, ist dies jedoch unwahrscheinlich.

In den GFP-/ mCherry-mGBP9-exprimierenden Zellen konnte ebenfalls in einigen wenigen Fällen eine Rekrutierung von mGBP9 an chlamydiale Inklusionen beobachtet werden (Abb. 32, unten). Die Co-Lokalisation der beiden Fusionsproteine konnte dazu im Coloc-Kanal veranschaulicht werden. Zusätzlich bestätigte die hier durchgeführte Co-IP eine Interaktion

Diskussion

zwischen den mGBP9-Molekülen (Abb. 31). Interessanterweise wurde trotz der hohen intrazellulären Konzentrationen von mGBP9 durch die Expression zweier verschiedener Fusionsproteine insgesamt nur eine geringe Anzahl Inklusionen durch diese erkannt. Dies wirft die Frage auf, welcher IFN γ -abhängige Faktor verantwortlich für die Akkumulierung von mGBP9 an der chlamydialen Inklusion war (Lindenberg et al., 2017). Um die Problematik mit der hier verwendeten Fibroblasten-Linie zu umgehen, könnten die Doppel-Transduktionen in MEF Zellen wiederholt und die Lokalisation der mGBPs erneut analysiert werden. Eine IFN γ -induzierte und Irga6-abhängige Inhibierung des Chlamydien-Wachstums konnte bereits in der MEF-Linie beschrieben werden, was somit auch auf einen Einfluss der mGBPs hindeutet (Al-Zeer et al., 2009). Zur Identifizierung von mGBP9-Interaktionspartnern an der Inklusionsmembran könnten zum Beispiel Analysen mittels immunologischer Co-IP und anschließender Massenspektrometrie (MS) durchgeführt werden (Free et al., 2009). Dafür müsste zunächst ein HA-mGBP9 Fusionskonstrukt kloniert werden. Anschließend könnte das Konstrukt in mGBP9-defizienten MEFs, die aus der zukünftig generierten mGBP9-defizienten Maus isoliert werden würden, transfiziert und überexprimiert werden. Für die Identifizierung von chlamydialen oder Wirtszell-eigenen Interaktionspartnern an der Inklusionsmembran müsste das HA-mGBP9 Konstrukt aus infizierten (Probe) und uninfizierten (Kontrolle), IFN γ -stimulierten Zellen isoliert (IP) und mittels MS analysiert werden. Aus dem Vergleich der co-immunopräzipitierten Proteine infizierter und Kontrollzellen könnten schließlich die spezifischen Faktoren identifiziert werden, die vermutlich für eine mGBP9-Rekrutierung verantwortlich sind.

Im Gegensatz zu mGBP2 konnte eine mGBP9-Akkumulation häufig nicht als ringförmiger Einschluss um die Inklusion beobachtet werden. Vielmehr konnte eine Relokalisation von mGBP9 an scheinbar zerstörte Inklusionen und sogar an die Bakterien selbst beobachtet werden. Dies wurde über die Auswertung der konfokalmikroskopischen Aufnahmen mittels IMARIS-Software bestätigt (Abb. 33). Der Co-Loc Kanal zeigte eine Co-Lokalisation von mGBP9 zu anti-MOMP gefärbten Chlamydien unabhängig von der Art des verwendeten mGBP9-Fluoreszenzmarkers (mCherry oder GFP). In einer vertiefenden Lebendzell-Analyse wurde eine direkte Interaktion von mGBP9 mit Chlamydien untersucht. Dafür wurden mCherry-exprimierende Chlamydien mit aufgereinigtem GFP-mGBP9 Protein inkubiert und über einen Zeitraum von einigen Minuten unter dem Konfokalmikroskop beobachtet (Daten nicht gezeigt). Für das Fusionsprotein konnte in dieser Analyse jedoch keine direkte Bindung an die chlamydialen Partikel verzeichnet werden. Dieses Ergebnis könnte folgende Gründe

haben. In der Infektionsanalyse mit doppelt-transduzierten NIH/3T3 Fibroblasten konnte nicht zwischen RBs und EBs unterschieden werden, während die Interaktionsanalyse zwischen GFP-mGBP9 und den Chlamydien ausschließlich mit isolierten EBs durchgeführt wurde. Ca. 22 % des *C. trachomatis*-Genoms werden während des Entwicklungszyklus temporär reguliert und so auch einige Oberflächenproteine (Nicholson et al., 2003). Aufgrund der unterschiedlichen Differenzierungsstadien wären Unterschiede in der Oberflächenstruktur der Bakterien möglich, die eine Interaktion gegebenenfalls beeinträchtigen oder aber begünstigen. Eine wahrscheinlichere Möglichkeit, weshalb eine Interaktion zwischen GFP-mGBP9 und *C. trachomatis* EBs nicht beobachtet werden konnte, waren vermutlich hier in der *in vitro* Analyse fehlende, zusätzliche intrazelluläre Faktoren.

In einer jüngst publizierten Studie konnte gezeigt werden, dass LPS bzw. der Lipid A Baustein von LPS einen kritischen Faktor für die Rekrutierung isoprenylierter mGBPs (mGBP1, 2, 5) an die äußere Bakterienmembran darstellt und darüber eine nicht-kanonische Inflammasom-Aktivierung eingeleitet wird (Santos et al., 2018). Die GBP-spezifische LPS-Erkennung geschieht dabei nachweislich nicht durch eine direkte Interaktion. Daher wurde spekuliert, dass der strukturelle Einfluss von LPS auf die Bakterienmembran möglicherweise die Insertion isoprenylierter mGBPs in die Membran erleichtert. Da ein Einfluss von mGBPs auf die Integrität Pathogen-assoziiertes Membranen bekannt ist, könnten diese wiederum zu einer Erweiterung der Interaktionsplattform führen (Kravets et al., 2016). Chr3-Cluster mGBPs scheinen für eine LPS-abhängige Aktivierung von Caspase-11 nur transient erforderlich zu sein, während eine Aktivierung durch das in der Membran sitzende Lipid A stark von diesen abhängig ist (Santos et al., 2018). Daher wäre denkbar, dass Chr3-Cluster mGBPs insbesondere für die Freilegung von Lipid A verantwortlich sind und weitere mGBPs möglicherweise an der anschließenden Inflammasom-Aktivierung beteiligt sind. Da mGBP8 und mGBP9 mit anti-MOMP-gefärbten Chlamydien co-lokalisierten, wäre eine Hypothese, dass LPS aufgrund seines Lipid A-Bausteins möglicherweise einen Interaktionspartner dieser mGBPs darstellt. Um die Hypothese zu überprüfen, könnte eine Interaktionsstudie mittels überexprimiertem Fluorophor-markiertem mGBP-8 und 9 und alternativ markiertem Lipid A beispielsweise in Fibroblasten durchgeführt werden. In einer anschließenden Co-IP könnten die Proteine schließlich auf eine Interaktion untersucht werden. Weitere Möglichkeiten zur Charakterisierung einer Protein-Interaktion wären ein der Co-IP ähnlicher Pull-down Assay oder eine Interaktionsanalyse mittels des Yeast-Two-Hybrid Systems (Phizicky et al., 1995). Zusätzlich könnte eine mögliche Interaktion zwischen den mGBPs und LPS oder Lipid A in

Diskussion

Transfektionsexperimenten mit ‚*Outer Membrane Vesicles*‘ nach Santos et al. (2018) überprüft werden.

Verschiedene Studien konnten des Weiteren zeigen, dass in *Salomonella*, *Legionella* oder *Yersinia* Infektionen einige Galectine der Wirtszelle an die PCV des jeweiligen Pathogens rekrutiert werden (Creasey et al., 2012, Paz et al., 2010, Pilla et al., 2014, Thurston et al., 2012). Galectine gelten als bakterielle Sensoren und binden vor allem an β -Glykane, die normalerweise isoliert im PCV- bzw. Vesikel-Lumen vorliegen (Chen et al., 2014). Eine Sekretion von Effektor-Proteinen mittels spezieller Sekretionssysteme, wie z. B. dem Typ III Sekretionssystem der Chlamydien, führt nachweislich zu Schwankungen der PCV-Membranintegrität (Feeley et al., 2017). Dadurch wird temporär eine Detektion der β -Glykane durch Galectine möglich. Galectin-3 gilt beispielsweise als Indikator für aufgebrochene Vakuolen und vermittelt des Weiteren die Rekrutierung von mGBP1 und mGBP2 zu *Yersinia* oder *Legionella*-spezifischen PCVs (Feeley et al., 2017, Pilla et al., 2014). Galectin-8 begünstigt die Rekrutierung des Autophagie-Adapterproteins NDP52 an verschiedene PCVs und detektiert neben beschädigter PCVs auch aufgebrochene Endolysosomen (Thurston et al., 2012). Des Weiteren binden Galectine auch an Glykane auf der Oberfläche von Pathogenen (Vasta, 2009). Eine Galectin-abhängige Rekrutierung der mGBPs direkt an die äußere Bakterienmembran wurde bislang nicht untersucht. Aus diesem Grund könnten zukünftig Galectin-Färbungen mit *C. trachomatis* infizierten, GFP-mGBP9-exprimierenden Zellen durchgeführt werden. Da bislang noch keine Interaktionen oder Co-Lokalisationen zwischen den Galectinen 3, 8 und 9 und den mGBPs des Chr5-Clusters beschrieben wurden, könnten diese in *C. trachomatis*-infizierten, GFP-mGBP9 oder mCherry-mGBP8 einzel-transduzierten Fibroblasten untersucht werden.

5.3.2 mGBP8 co-lokalisiert mit *C. trachomatis* im Inklusionslumen

In Bezug auf die mGBP-Rekrutierung zu *C. trachomatis*-Inklusionen konnten ähnliche Ergebnisse für mGBP8 in mCherry-mGBP8- und GFP-mGBP9-exprimierenden Zellen beobachtet werden. Die Auswertung der Konfokalaufnahmen mittels IMARIS zeigte, dass mGBP8 sogar deutlich prominenter innerhalb von Inklusionen lokalisiert war als mGBP9. Anders als in den GFP-/ mCherry-mGBP9 doppelt-transduzierten Zellen konnte mGBP9 hier vermehrt als ringförmiger Einschluss um die Inklusion detektiert werden. Eine Co-Lokalisation mit anti-MOMP-gefärbten Bakterien konnte nur teilweise am äußersten Rand der Inklusion beobachtet werden (Abb. 33). Die Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass in zeitlicher Abfolge zunächst mGBP8 und anschließend mGBP9 an die Plasmamembran der

Bakterien rekrutiert wird, so wie es bereits für mGBP2 und mGBP7 in *T. gondii*-infizierten MEFs beschrieben wurde (Kravets et al., 2016, Steffens et al., 2020). Eine weitere Vermutung ist, dass mGBP8 eine höhere Rekrutierungs-Präferenz an die äußere Bakterienmembran haben könnte als mGBP9.

Durch welchen initialen Faktor die Inklusionsmembran aufgebrochen wurde, welcher Faktor für die Rekrutierung von mGBP8 und mGBP9 an die Bakterien verantwortlich ist und ob die Rekrutierung der mGBPs auch zu einer reduzierten Integrität der Bakterienmembran führt, gilt es in zukünftigen Experimenten herauszufinden. Eine Rekrutierungs-Präferenz oder -hierarchie könnte auch hier mittels Lebendzell-Konfokalmikroskopie Analysen (Steffens et al., 2020) untersucht werden. Dazu könnten GFP-mGBP9 und mCherry-mGBP8 doppelt-transduzierte, IFN γ -stimulierte Zellen mit Chlamydien infiziert und der Infektionsverlauf sowie die mGBP-Lokalisierung bildlich über die Zeit festgehalten werden. Zur Identifizierung von mGBP-Interaktionspartnern könnten die oben beschriebenen Analysen zu Lipid A oder Volllängen-LPS durchgeführt werden. In Bezug auf die Fragestellung zur reduzierten Membranintegrität könnten Infektionsexperimente mit *C. trachomatis* und neu zu generierenden mGBP8- oder mGBP9-defizienten NIH/3T3 Fibroblasten bzw. Zellen einer anderen Linie Klarheit verschaffen. Unabhängig von den publizierten Ergebnissen von Lindenberg et al. (2017) betrachtet, scheint mGBP8, den hier gezeigten Ergebnissen nach zu urteilen, eine wichtigere Rolle in der Eliminierung von Chlamydien-Infektionen einzunehmen, während mGBP9 trotz der hohen Rekrutierungsfrequenzen möglicherweise nur einen Co-Faktor darstellt.

5.4 Strukturaufklärung von mGBP9

Um ein umfangreiches Bild über das mGBP9 Protein und seine Funktion zu erhalten, wurden neben den Analysen zur physiologischen Funktion auch proteinbiochemische sowie Strukturanalysen durchgeführt. Dafür wurde das His₆-mGBP9 Fusionskonstrukt mittels IMAC aufgereinigt (s. 4.4.1). Um den nativen Zustand des Proteins zu bestätigen, wurde im Anschluss die GTPase-Funktion des Proteins überprüft. Mittels des Malachit-Grün GTPase-Aktivitätsassays wurde erstmals die Enzymaktivität von mGBP9 beschrieben. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug nach Verwendung der Michaelis-Menten Gleichung $275,1 \pm 19,07 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \text{ pro mg Protein}$ für mGBP9 (Abb. 34C). Ein ähnliches Ergebnis wurde jüngst auch für das mGBP7 Protein publizierten (Legewie et al., 2019). Die Ähnlichkeiten in der Reaktionsgeschwindigkeit stehen im Einklang mit den weitestgehend übereinstimmenden

Diskussion

Sequenzen der GTP-Bindungsdomänen (G1-G4) von mGBP7 und mGBP9 (Degrandi et al., 2007), die auf eine ähnliche GTP-Bindungsaffinität hindeuten. Ob mGBP9 tatsächlich eine vergleichbare GTP Bindungsaffinität aufweist, müsste zukünftig über Fluoreszenzspektroskopische Nukleotidbindungs-Analysen mit fluoreszierenden GTP-Analoga untersucht werden, wie es bereits für mGBP2 und mGBP7 publiziert wurde (Kravets et al., 2012, Legewie et al., 2019). Außerdem sind erweiterte Messungen notwendig, um präzisere Angaben über die Reaktionsgeschwindigkeit von mGBP9 machen zu können, da die hier gezeigte Bestimmung nicht bei optimaler Nukleotidsättigung durchgeführt wurde. Dies ist dadurch erkennbar, dass die Sättigungskurve nicht vollständig die Plateau-Phase erreichte (Abb. 34C). Durch ergänzende GTP-Konzentrationen (Sättigung) und Optimierung der Proteinkonzentration (Konz. mit 100 % Enzymaktivität) könnte anschließend die Kooperativität des Proteins, also der Einfluss einer potentiellen Dimerisierung auf die Enzymaktivität, ermittelt werden. Eine positive Kooperativität konnte bereits für hGBP1, mGBP2 und mGBP7 gezeigt werden (Kravets et al., 2012, Legewie et al., 2019, Prakash et al., 2000).

GBPs weisen als Mitglieder der Dynamin-Superfamilie die einzigartige Fähigkeit auf, GTP in einem zweistufigen Hydrolyseschritt zu GDP und GMP zu hydrolysieren (Schwemmle et al., 1994). Für hGBP1 konnte gezeigt werden, dass während der Hydrolyse-Reaktion anstelle einer Pyrophosphat-Gruppe zwei einzelne Phosphatgruppen abgespalten wurden (Schwemmle et al., 1994). Ähnliche Eigenschaften werden auch für das mGBP7-Protein vermutet (Legewie et al., 2019). Dabei wird angenommen, dass die zusätzliche Energie durch den zweiten Hydrolyseschritt relevant für die physiologische Funktion der mGBPs ist und für die Kontrolle intrazellulär replizierender Pathogene benötigt wird. Eine vertiefende Analyse der biochemischen Eigenschaften der Chr5-Cluster mGBPs, wie dem mGBP9, könnte daher ergänzende Hinweise zur ihrer derzeit unklaren Rolle in der Zell-autonomen Immunabwehr erbringen.

Die biochemischen Eigenschaften von mGBP9 sind ersten Experimenten zu Folge denen des mGBP7-Proteins recht ähnlich. Daraus stellt sich jedoch die Frage, in welchem Kontext die Existenz von mGBP9 relevant für die Zelle ist. Für mGBP7 konnte eine eindeutige Funktion in einer *T. gondii* Infektion determiniert werden (Steffens et al., 2020). Die ersten Ergebnisse der Infektionsexperimente mit der mGBP^{6KO,8V21M,9KO,10KO,11KO} Linie lassen trotz verändertem Wachstumsverhalten jedoch vermuten, dass Chr5-Cluster mGBPs keinen großen Einfluss auf das Überleben der hier untersuchten Pathogene zu haben scheinen (Abb. 16A, 17A, 18, 19). Diese Annahme wird durch die Tatsache untermalt, dass bislang keine Publikationen zur

Rolle der Chr5-Cluster mGBPs im immunologischen Kontext veröffentlicht wurden. Möglicherweise ist die physiologische Funktion der unterschiedlichen mGBPs trotz der hohen Sequenzidentitäten doch sehr verschieden. Vertiefende Analysen zu den biochemischen Eigenschaften der mGBPs sowie die genetische Inaktivierung in Tiermodellen könnten Hinweise liefern, inwiefern sich die einzelnen Mitglieder der sonst so scheinbar ähnlichen mGBP-Familie unterscheiden und stellt daher ein interessantes, zukünftiges Forschungsprojekt dar.

5.4.1 Kristallstruktur von mGBP9

In dieser Arbeit konnte erstmals mittels kristallographischer Methoden die Struktur eines mGBPs in einem Kristall mit einer Auflösung im Ångströmbereich beschrieben werden. Unter verschiedenen Pufferbedingungen konnten einige mGBP9-Proteinkristalle generiert und der atomare Aufbau mittels Röntgendiffraktion gemessen werden. Die höchste Auflösung, die bei der Vermessung eines mGBP9-Kristalls erreicht wurde, betrug ca. 3,3 Å. Mit dieser Auflösung war es möglich, den Großteil der α/β -Strukturen der LG-Domäne zu determinieren (Abb. 36). Die exakte Positionierung der AS-Seitenketten in der helikalen Domäne muss allerdings zukünftig durch Optimierung der Kristallisationsbedingungen und weiteren Röntgendiffraktionsmessungen bestimmt und ergänzt werden.

Das einzige Kristall-Modell, das bislang für Mitglieder der GBP-Familie publiziert wurde, ist das Modell des hGBP1-Proteins (Prakash et al., 2000). Durch die Überlagerung des vorläufigen mGBP9-Modells mit dem des hGBP1-Proteins wurde ersichtlich, dass der generelle Aufbau der Moleküle sehr ähnlich ist. Insbesondere in der LG-Domäne konnten große Übereinstimmungen in den α/β -Strukturen gezeigt werden. Dieser sehr ähnliche Aufbau im N-terminalen Bereich lässt sich durch die konservierten Aminosäuren-Sequenzen in hGBPs und mGBPs erklären (Olszewski et al., 2006). Phylogenetische Analysen und detaillierte Sequenzvergleiche lassen vermuten, dass die verschiedenen mGBP-Gene sehr wahrscheinlich auf Grund von Gen-Duplikationen entstanden sind und insbesondere die LG-Domäne aufgrund ihrer funktionellen Relevanz in allen Genen erhalten geblieben ist (Degrandi et al., 2007, Kresse et al., 2008, Olszewski et al., 2006). Eine Homo-Dimerisierung von hGBP1 ist nachweislich durch die Bindung der beiden Moleküle an der LG-Domäne gegeben (Ghosh et al., 2006, Wehner et al., 2012). MFIS-FRET Analysen konnten außerdem bestätigen, dass einige mGBPs in Hetero-Multimeren vorkommen, was womöglich auf die ähnlichen Konformationen zurückzuführen ist (Kravets et al., 2012).

Diskussion

Der veränderte Neigungswinkel der helikalen Domäne zur LG Domäne (Abb. 36) könnte ein Hinweis auf die abweichende Funktionalität von mGBP9 in den untersuchten Infektionsmodellen sein, da eine andere Konformation sehr wahrscheinlich auch andere Interaktionen ermöglicht. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass eine Homo-Dimerisierung von mGBP2 und mGBP7 mit mutiertem GTP-Bindemotiv (K51A) und der dadurch verlorengangenen GTPase-Aktivität nicht stattfindet (Kravets et al., 2012, Legewie et al., 2019). Die GTP-Bindung sowie die -Hydrolyse sind sehr wahrscheinlich für eine Konformationsänderung und der daraus resultierenden Dimerisierung verantwortlich, wie es bereits für hGBP1 publiziert wurde (Wehner et al., 2012). Dies veranschaulicht die Bedeutung der GBP-Konformation für die Ausbildung multimerer Strukturen und der damit einhergehenden Funktionalität. Wie in der Co-Lokalisationsanalyse gezeigt, co-lokalisiert mGBP9 zudem nur mit bestimmten mGBPs im Zytosol oder an VLS (Abb. 40). Die strukturellen Eigenschaften des Proteins könnten dabei den entscheidenden Faktor darstellen. Computermodellierungen deuteten darauf hin, dass die helikale Domäne von mGBP9 flexibler ist, als die helikalen Domänen von mGBP2 und hGBP1 (nicht publiziert, Information von Jennifer Loschwitz). Dies würde zum einen die Schwierigkeiten bei der Strukturauflösung in diesem Bereich erklären. Zum anderen könnte dies bedeuten, dass der scheinbar veränderte Neigungswinkel der helikalen Domäne von mGBP9 lediglich aus einem Mittel von verschiedener Konformationen hervorgegangen ist. Dies gilt es ebenfalls durch eine optimierte Kristallisation und wiederholte Röntgendiffraktionsmessungen herauszufinden.

Der verlängerte C-Terminus von mGBP7 ist für Interaktionen mit Membranstrukturen verantwortlich (Legewie et al., 2019). Obwohl mGBP9 kein CaaX-Motiv besitzt, deuteten TMpret-*Tool* Analysen darauf hin, dass es sich bei den AS 599-609 um einen Transmembran-Bereich handeln könnte (Daten nicht gezeigt). Daraus stellt sich die folgende Frage. Ist die mGBP9-Akkumulierung an PVs möglicherweise doch ein intrinsischer Prozess ausgelöst durch die Energie der GTPase-Reaktion und der potentiellen Transmembran-Sequenz oder werden tatsächlich weitere Faktoren benötigt? Die Lokalisationsanalysen deuteten hierbei auf ein eindeutiges Ergebnis hin, da ohne einen IFN γ -Stimulus keine mGBP9-Rekrutierung beobachtet werden konnte. Somit scheint ein vorausgehender Integritätsverlust der Zielmembran obligatorisch für die mGBP9-Akkumulierung zu sein. Dieser kann, wie bereits mehrfach erwähnt, z. B. durch isoprenylierte mGBPs induziert werden. Rekrutierungskinetiken von mGBP9 mit weiteren mGBPs könnten Aufschluss zu dieser

Problemstellung geben. Ähnliche Kinetiken wurden bereits für mGBP2 und mGBP7 publiziert (Steffens et al., 2020). Dabei wurde deutlich, dass mGBP7 erst deutlich später an die *T. gondii* PV rekrutiert wurde und dass einzelpositive PVs mit mGBP7 nur sehr selten vorkamen. Aufgrund der ähnlichen Charakteristika (elongierter C-Terminus, ohne CaaX-Motiv, ähnliche GTPase-Aktivität) von mGBP7 und mGBP9 könnte ein vergleichbares Ergebnis erwartet werden.

Durch eine Optimierung der Kristallisation und wiederholter Röntgendiffraktionsmessungen in Kombination mit Mutationsanalysen des mGBP9 Proteins müssen die fehlenden Strukturelemente zunächst ergänzt werden, bevor endgültige Aussagen zur mGBP9-Struktur und daraus resultierenden Interpretationen zur physiologischen Funktion gemacht werden können.

5.4.2 Aufgereinigtes mGBP9-Protein zeigt keine Homo-Dimerisierung in Nukleotid-freier Lösung

Wie bereits in Abschn. 5.4.1 diskutiert, konnte für mGBP9 eine GTPase-Aktivität ähnlich zur Aktivität von mGBP7 gemessen werden (Abb. 34C). Die Analyse bestätigte damit nicht nur die native Konformation des mGBP9-Proteins, sondern zeigte auch eine zumindest temporäre Stabilität des Proteins in gelöstem Zustand. Des Weiteren konnte anhand der SEC-Analyse gezeigt werden, dass das isolierte Protein vorwiegend als Monomer vorlag und eine Homo-Dimerisierung von mGBP9 unter diesen Bedingungen selten stattfindet (Abb. 34A). Interessanterweise konnte eine Interaktion von mCherry-mGBP9 und GFP-mGBP9 mittels Co-IP determiniert werden (Abb. 31). Der Unterschied zur Aufreinigung im großen Maßstab war, dass die Fluorophor-markierten Proteine aus murinen Fibroblasten isoliert und His₆-mGBP9 in *E. coli* Bakterien überexprimiert wurde. Daraus ließe sich schlussfolgern, dass eine Interaktion von mGBP9-Molekülen möglicherweise von Faktoren abhängig ist, die in prokaryotischen Zellen nicht existieren.

Aus den Daten einer anschließend in Kooperation mit dem CSS durchgeführten SAXS-Analyse konnte ein 3D-Volumenmodell für das gelöste mGBP9-Protein mit einem χ^2 -Wert von 1,04 im Anpassungstest erstellt werden (s. 4.4.2.2). Das Modell deutete ebenfalls darauf hin, dass mGBP9 in GTP-freier Lösung kein Homo-Dimer ausbildet. Anders verhielt es sich für mGBP7, das unter gleichen Bedingungen in einer SAXS-Messung als Dimer identifiziert wurde (Larissa Legewie, Sander Smits, unveröffentlicht). Im Gegensatz dazu konnte eine

Diskussion

mGBP7-K51A Mutante ohne GTPase-Aktivität in der gleichen Studie lediglich als Monomer gemessen werden. Demnach scheint die Dimerisierung von mGBP7 abhängig von einer Nukleotidbindung zu sein. Ähnliche Ergebnisse wurden in einer früheren Studie für hGBP1 und hGBP2 beschrieben (Abdullah et al., 2010). Diese konnten zeigen, dass der zweite Hydrolyse-Schritt von GDP zu GMP abhängig von einer Dimerisierung der untersuchten hGBPs ist. Gleichzeitig konnte in dieser Studie beschrieben werden, dass eine Dimerisierung wiederum von einer Konformationsänderung und der damit einhergehenden Freilegung der α -6 Helix abhängig ist (Prakash et al., 2000). Die α -6 Helix (AS 291 – 309) zeichnet sich durch eine hohe Anzahl hydrophober Aminosäuren aus, die nicht nur im hGBP1 Protein vorkommen, sondern in allen mGBPs konserviert sind (Degrandi et al., 2007). Die Konservierung dieser Aminosäuren unterstreicht ihre funktionelle Relevanz in Bezug auf die Oligomerisierung der mGBPs und damit einhergehend vermutlich auch für ihre physiologische Funktion. Eine Dimerisierung und damit einhergehende strukturelle Veränderungen von mGBP9 könnten in zukünftigen SAXS- oder auch Kristallisations-Analysen durch die Zugabe von Guanosin-Nukleotiden weiter untersucht werden.

5.5 Polyklonaler mGBP9-Antikörper weist Kreuzreaktivität zu weiteren mGBP-Proteinen auf

Der in Abschn. 4.4.3 beschriebene Antikörper wurde über eine Immunisierung von Kaninchen mit dem aufgereinigten His₆-mGBP9-Protein (s. 4.4.2) generiert. In einem Optimierungsverfahren wurde die Spezifität des Antikörpers mittels Affinitätsaufreinigung gegen das mGBP9-Antigen (mGBP9-Volllängenprotein mit nativer Konformation) zusätzlich erhöht. Der anschließend durchgeführte Westernblot zur Überprüfung der Reaktivität des Antikörpers, zeigte eine Reaktivität gegen das mGBP9-Protein, als auch eine Kreuzreaktivität gegen die mGBPs 3, 6, 8 und 10 unabhängig vom fusionierten Fluoreszenzmarker (Abb. 38). Die Problematik, die sich bei der Generierung eines mGBP-spezifischen Antikörpers stellt, sind die Sequenz-Homologien zwischen den verschiedenen Mitgliedern der GBP-Familie (Degrandi et al., 2007, Kresse et al., 2008). Die AS-Sequenzidentitäten der Chr5-Cluster mGBPs gleichen sich insbesondere im N-terminalen Sequenzbereich und unterscheiden sich am meisten am äußeren C-Terminus. Eine Möglichkeit zur Steigerung der Affinität wäre daher eine Aufreinigung gegen ein mGBP9-spezifisches Peptid aus jenem C-Terminus. Solche hochspezifischen Aufreinigungen können jedoch dazu führen, dass die Konzentration der isolierten Antikörper aus dem polyklonalen Serum sehr niedrig wird, falls nur ein geringer

Anteil der Antikörper gegen das Peptid gerichtet ist. In einer Peptid-Analyse, durchgeführt durch die Firma Eurogentec, zu einem früheren mGBP-Antikörper-Generierungsversuch, konnte lediglich ein einziges Peptid aus der mGBP9-AS-Kette vorhergesagt werden, das spezifisch für mGBP9 und gleichzeitig potentiell immunogen ist. Die Immunisierung von zwei verschiedenen Kaninchen mittels des vorhergesagten Peptids führte jedoch nicht zur Ausbildung eines mGBP9-spezifischen Antikörpers.

Die Paratope eines Antikörpers können kontinuierliche (lineare) oder diskontinuierliche (konformationelle) Epitope erkennen. Da nach der Peptid-Immunisierung kein spezifischer Antikörper identifiziert werden konnte, scheint das Peptid nicht immunogen zu sein. Daher ist es möglich, dass der in dieser Arbeit aufgereinigte, polyklonale Antikörper ausschließlich andere lineare Epitope oder konformationelle Epitope detektiert. In Bezug auf die Proteinkonformation ist es unwahrscheinlich, dass das verwendete Peptid im nativ gefalteten Protein ein verdecktes, konformationelles Epitop darstellt, da die Peptid-Sequenz aus dem C-Terminus entspringt. Wie anhand des mGBP9-Modells gezeigt werden konnte, interagiert dieser Bereich sehr wahrscheinlich nicht mit anderen Domänen (Abb. 36). Somit ist auch unwahrscheinlich, dass die gewählte Peptid-Sequenz aufgrund einer ungünstigen Proteinkonformation in diesem Bereich für den polyklonalen Antikörper nicht zugänglich ist. Der Erfolg einer weiteren Affinitätsreinigung erscheint dennoch limitiert und wurde deshalb in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Die Generierung und Verwendung eines spezifischen monoklonalen anti-mGBP9 Antikörpers wäre prinzipiell erstrebenswert. Die Problematik, die sich bei der aufwendigen Verfahrensweise zur Generierung eines solchen Antikörpers stellt, ist im Falle der mGBPs die geringe Sicherheit, mit der ein einzigartiges Epitop schließlich detektiert wird. Über die Hybridom-Technik könnte jedoch ein umfangreiches und kostenintensives Screening durchgeführt werden (Kohler et al., 1975). Alternativ dazu wäre auch eine ‚*In vitro display*‘ Analyse möglich (Bradbury et al., 2011). Im ‚*Phage- display*‘ oder ‚*Yeast display*‘ werden Peptide oder auch Volllängenproteine aus großen, rekombinanten Bibliotheken auf der Oberfläche des entsprechenden Organismus präsentiert (Feldhaus et al., 2003, Marks et al., 1991). Studien zu Folge ist das ‚*In vitro display*‘ auch im Falle von ähnlichen Proteinen/-domänen sehr effizient (Mersmann et al., 2010, Pershad et al., 2010). Somit könnten verschiedene Antikörpervarianten gegen beispielsweise das mGBP9-Protein identifiziert und in einem erweiterten Screening direkt auf Kreuzreaktivität gegen andere mGBPs getestet werden.

Diskussion

6 Literaturverzeichnis

1. Abdelrahman, Y. M. and Belland, R. J. (2005). **"The Chlamydial Developmental Cycle."** *FEMS Microbiol Rev* **29**(5): 949-959.
2. Abdullah, N., Balakumari, M. and Sau, A. K. (2010). **"Dimerization and Its Role in Gmp Formation by Human Guanylate Binding Proteins."** *Biophys J* **99**(7): 2235-2244.
3. Adams, L. B., Hibbs, J. B., Jr., Taintor, R. R. and Krahenbuhl, J. L. (1990). **"Microbiostatic Effect of Murine-Activated Macrophages for Toxoplasma Gondii. Role for Synthesis of Inorganic Nitrogen Oxides from L-Arginine."** *J Immunol* **144**(7): 2725-2729.
4. Adams, M. J., Carstens, E. B. and Lefkowitz, E. J. (2012). **Virus Taxonomy - Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, Elsevier Inc., 1327.
5. Adams, O., Besken, K., Oberdorfer, C., MacKenzie, C. R., Takikawa, O. and Daubener, W. (2004). **"Role of Indoleamine-2,3-Dioxygenase in Alpha/Beta and Gamma Interferon-Mediated Antiviral Effects against Herpes Simplex Virus Infections."** *J Virol* **78**(5): 2632-2636.
6. Aggarwal, B. B. (2003). **"Signalling Pathways of the Tnf Superfamily: A Double-Edged Sword."** *Nat Rev Immunol* **3**(9): 745-756.
7. Akira, S. (2000). **"The Role of Il-18 in Innate Immunity."** *Curr Opin Immunol* **12**(1): 59-63.
8. Al-Zeer, M. A., Al-Younes, H. M., Braun, P. R., Zerrahn, J. and Meyer, T. F. (2009). **"Ifn-Gamma-Inducible Irga6 Mediates Host Resistance against Chlamydia Trachomatis Via Autophagy."** *PLoS One* **4**(2): e4588.
9. Al-Zeer, M. A., Al-Younes, H. M., Lauster, D., Abu Lubad, M. and Meyer, T. F. (2013). **"Autophagy Restricts Chlamydia Trachomatis Growth in Human Macrophages Via Ifng-Inducible Guanylate Binding Proteins."** *Autophagy* **9**(1): 50-62.
10. Alwine, J. C. (2012). **"The Human Cytomegalovirus Assembly Compartment: A Masterpiece of Viral Manipulation of Cellular Processes That Facilitates Assembly and Egress."** *PLoS Pathog* **8**(9): e1002878.
11. Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A. and Jinek, M. (2014). **"Structural Basis of Pam-Dependent Target DNA Recognition by the Cas9 Endonuclease."** *Nature* **513**(7519): 569-573.
12. Anderson, S. L., Carton, J. M., Lou, J., Xing, L. and Rubin, B. Y. (1999). **"Interferon-Induced Guanylate Binding Protein-1 (Gbp-1) Mediates an Antiviral Effect against Vesicular Stomatitis Virus and Encephalomyocarditis Virus."** *Virology* **256**(1): 8-14.
13. Ank, N., West, H. and Paludan, S. R. (2006). **"Ifn-Lambda: Novel Antiviral Cytokines."** *J Interferon Cytokine Res* **26**(6): 373-379.

Literaturverzeichnis

14. Arimori, Y., Nakamura, R., Yamada, H., Shibata, K., Maeda, N., Kase, T. and Yoshikai, Y. (2013). **"Type I Interferon Limits Influenza Virus-Induced Acute Lung Injury by Regulation of Excessive Inflammation in Mice."** *Antiviral Res* **99**(3): 230-237.
15. Armstrong, D., Gold, J. W., Dryjanski, J., Whimbey, E., Polsky, B., Hawkins, C., Brown, A. E., Bernard, E. and Kiehn, T. E. (1985). **"Treatment of Infections in Patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome."** *Ann Intern Med* **103**(5): 738-743.
16. Bach, E. A., Aguet, M. and Schreiber, R. D. (1997). **"The Ifn Gamma Receptor: A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling."** *Annu Rev Immunol* **15**: 563-591.
17. Banchereau, J. and Steinman, R. M. (1998). **"Dendritic Cells and the Control of Immunity."** *Nature* **392**(6673): 245-252.
18. Barko, P. C., McMichael, M. A., Swanson, K. S. and Williams, D. A. (2018). **"The Gastrointestinal Microbiome: A Review."** *J Vet Intern Med* **32**(1): 9-25.
19. Bastidas, R. J., Elwell, C. A., Engel, J. N. and Valdivia, R. H. (2013). **"Chlamydial Intracellular Survival Strategies."** *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**(5): a010256.
20. Beatty, W. L., Belanger, T. A., Desai, A. A., Morrison, R. P. and Byrne, G. I. (1994). **"Tryptophan Depletion as a Mechanism of Gamma Interferon-Mediated Chlamydial Persistence."** *Infect Immun* **62**(9): 3705-3711.
21. Beatty, W. L., Byrne, G. I. and Morrison, R. P. (1993). **"Morphologic and Antigenic Characterization of Interferon Gamma-Mediated Persistent Chlamydia Trachomatis Infection in Vitro."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(9): 3998-4002.
22. Behnke, M. S., Fentress, S. J., Mashayekhi, M., Li, L. X., Taylor, G. A. and Sibley, L. D. (2012). **"The Polymorphic Pseudokinase Rop5 Controls Virulence in Toxoplasma Gondii by Regulating the Active Kinase Rop18."** *PLoS Pathog* **8**(11): e1002992.
23. Behnke, M. S., Khan, A., Wootton, J. C., Dubey, J. P., Tang, K. and Sibley, L. D. (2011). **"Virulence Differences in Toxoplasma Mediated by Amplification of a Family of Polymorphic Pseudokinases."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(23): 9631-9636.
24. Bekpen, C., Hunn, J. P., Rohde, C., Parvanova, I., Guethlein, L., Dunn, D. M., Glowalla, E., Leptin, M. and Howard, J. C. (2005). **"The Interferon-Inducible P47 (Irg) Gtpases in Vertebrates: Loss of the Cell Autonomous Resistance Mechanism in the Human Lineage."** *Genome Biol* **6**(11): R92.
25. Betermier, M., Bertrand, P. and Lopez, B. S. (2014). **"Is Non-Homologous End-Joining Really an Inherently Error-Prone Process?"** *PLoS Genet* **10**(1): e1004086.
26. Beutler, B. A. (2009). **"Tlrs and Innate Immunity."** *Blood* **113**(7): 1399-1407.
27. Beyer, H. M., Gonschorek, P., Samodelov, S. L., Meier, M., Weber, W. and Zurbriggen, M. D. (2015). **"Aqua Cloning: A Versatile and Simple Enzyme-Free Cloning Approach."** *PLoS One* **10**(9): e0137652.
28. Bhopale, G. M. (2003). **"Pathogenesis of Toxoplasmosis."** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **26**(4): 213-222.

29. Biering, S. B., Choi, J., Halstrom, R. A., Brown, H. M., Beatty, W. L., Lee, S., McCune, B. T., Dominici, E., Williams, L. E., Orchard, R. C., Wilen, C. B., Yamamoto, M., Coers, J., Taylor, G. A. and Hwang, S. (2017). **"Viral Replication Complexes Are Targeted by Lc3-Guided Interferon-Inducible Gtpases."** *Cell Host Microbe* **22**(1): 74-85 e77.
30. Bindels, D. S., Haarbosch, L., van Weeren, L., Postma, M., Wiese, K. E., Mastop, M., Aumonier, S., Gotthard, G., Royant, A., Hink, M. A. and Gadella, T. W., Jr. (2017). **"Mscarlet: A Bright Monomeric Red Fluorescent Protein for Cellular Imaging."** *Nat Methods* **14**(1): 53-56.
31. Biron, C. A. and Gazzinelli, R. T. (1995). **"Effects of Il-12 on Immune Responses to Microbial Infections: A Key Mediator in Regulating Disease Outcome."** *Curr Opin Immunol* **7**(4): 485-496.
32. Boehm, U., Guethlein, L., Klamp, T., Ozbek, K., Schaub, A., Futterer, A., Pfeffer, K. and Howard, J. C. (1998). **"Two Families of Gtpases Dominate the Complex Cellular Response to Ifn-Gamma."** *J Immunol* **161**(12): 6715-6723.
33. Bradbury, A. R., Sidhu, S., Dubel, S. and McCafferty, J. (2011). **"Beyond Natural Antibodies: The Power of in Vitro Display Technologies."** *Nat Biotechnol* **29**(3): 245-254.
34. Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H. and Robertson, E. (1984). **"Formation of Germ-Line Chimaeras from Embryo-Derived Teratocarcinoma Cell Lines."** *Nature* **309**(5965): 255-256.
35. Bragg, W. H. and Bragg, W. L. (1913). **"The Reflection of X-Rays by Crystals."** *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **88**: 428-438.
36. Braun, E., Hotter, D., Koepke, L., Zech, F., Gross, R., Sparrer, K. M. J., Muller, J. A., Pfaller, C. K., Heusinger, E., Wombacher, R., Sutter, K., Dittmer, U., Winkler, M., Simmons, G., Jakobsen, M. R., Conzelmann, K. K., Pohlmann, S., Munch, J., Fackler, O. T., Kirchhoff, F. and Sauter, D. (2019). **"Guanylate-Binding Proteins 2 and 5 Exert Broad Antiviral Activity by Inhibiting Furin-Mediated Processing of Viral Envelope Proteins."** *Cell Rep* **27**(7): 2092-2104 e2010.
37. Brestoff, J. R., Kim, B. S., Saenz, S. A., Stine, R. R., Monticelli, L. A., Sonnenberg, G. F., Thome, J. J., Farber, D. L., Lutfy, K., Seale, P. and Artis, D. (2015). **"Group 2 Innate Lymphoid Cells Promote Beiging of White Adipose Tissue and Limit Obesity."** *Nature* **519**(7542): 242-246.
38. Briken, V., Ruffner, H., Schultz, U., Schwarz, A., Reis, L. F., Strehlow, I., Decker, T. and Staeheli, P. (1995). **"Interferon Regulatory Factor 1 Is Required for Mouse Gbp Gene Activation by Gamma Interferon."** *Mol Cell Biol* **15**(2): 975-982.
39. Britzen-Laurent, N., Bauer, M., Berton, V., Fischer, N., Syguda, A., Reipschlager, S., Naschberger, E., Herrmann, C. and Sturzl, M. (2010). **"Intracellular Trafficking of Guanylate-Binding Proteins Is Regulated by Heterodimerization in a Hierarchical Manner."** *PLoS One* **5**(12): e14246.

Literaturverzeichnis

40. Britzen-Laurent, N., Herrmann, C., Naschberger, E., Croner, R. S. and Sturzl, M. (2016). **"Pathophysiological Role of Guanylate-Binding Proteins in Gastrointestinal Diseases."** World J Gastroenterol **22**(28): 6434-6443.
41. Broering, R., Zhang, X., Kottlil, S., Trippler, M., Jiang, M., Lu, M., Gerken, G. and Schlaak, J. F. (2010). **"The Interferon Stimulated Gene 15 Functions as a Proviral Factor for the Hepatitis C Virus and as a Regulator of the Ifn Response."** Gut **59**(8): 1111-1119.
42. Brooks, H. L. and Lindsey, M. L. (2018). **"Guidelines for Authors and Reviewers on Antibody Use in Physiology Studies."** Am J Physiol Heart Circ Physiol **314**(4): H724-H732.
43. Brouns, S. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., Snijders, A. P., Dickman, M. J., Makarova, K. S., Koonin, E. V. and van der Oost, J. (2008). **"Small Crispr Rnas Guide Antiviral Defense in Prokaryotes."** Science **321**(5891): 960-964.
44. Buenrostro, J. D., Wu, B., Chang, H. Y. and Greenleaf, W. J. (2015). **"Atac-Seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide."** Curr Protoc Mol Biol **109**: 21 29 21-21 29 29.
45. Bush, R. M. and Everett, K. D. (2001). **"Molecular Evolution of the Chlamydiaceae."** Int J Syst Evol Microbiol **51**(Pt 1): 203-220.
46. Byrne, G. I., Schobert, C. S., Williams, D. M. and Krueger, D. A. (1989). **"Characterization of Gamma Interferon-Mediated Cytotoxicity to Chlamydia-Infected Fibroblasts."** Infect Immun **57**(3): 870-874.
47. Cao, X. (2016). **"Self-Regulation and Cross-Regulation of Pattern-Recognition Receptor Signalling in Health and Disease."** Nat Rev Immunol **16**(1): 35-50.
48. Carter, C. C., Gorbacheva, V. Y. and Vestal, D. J. (2005). **"Inhibition of Vsv and Emcv Replication by the Interferon-Induced Gtpase, Mgbp-2: Differential Requirement for Wild-Type Gtp Binding Domain."** Arch Virol **150**(6): 1213-1220.
49. Casadevall, A. (2008). **"Evolution of Intracellular Pathogens."** Annu Rev Microbiol **62**: 19-33.
50. Chambers, J., Angulo, A., Amaratunga, D., Guo, H., Jiang, Y., Wan, J. S., Bittner, A., Frueh, K., Jackson, M. R., Peterson, P. A., Erlander, M. G. and Ghazal, P. (1999). **"DNA Microarrays of the Complex Human Cytomegalovirus Genome: Profiling Kinetic Class with Drug Sensitivity of Viral Gene Expression."** J Virol **73**(7): 5757-5766.
51. Chang, Y. F., Imam, J. S. and Wilkinson, M. F. (2007). **"The Nonsense-Mediated Decay Rna Surveillance Pathway."** Annu Rev Biochem **76**: 51-74.
52. Charpentier, E. and Marraffini, L. A. (2014). **"Harnessing Crispr-Cas9 Immunity for Genetic Engineering."** Curr Opin Microbiol **19**: 114-119.
53. Chen, H. Y., Weng, I. C., Hong, M. H. and Liu, F. T. (2014). **"Galectins as Bacterial Sensors in the Host Innate Response."** Curr Opin Microbiol **17**: 75-81.

54. Chen, J. S., Dagdas, Y. S., Kleinstiver, B. P., Welch, M. M., Sousa, A. A., Harrington, L. B., Sternberg, S. H., Joung, J. K., Yildiz, A. and Doudna, J. A. (2017). **"Enhanced Proofreading Governs Crispr-Cas9 Targeting Accuracy."** *Nature* **550**(7676): 407-410.
55. Cheng, Y. S., Colonna, R. J. and Yin, F. H. (1983). **"Interferon Induction of Fibroblast Proteins with Guanylate Binding Activity."** *J Biol Chem* **258**(12): 7746-7750.
56. Chugh, R. M., Chaturvedi, M. and Yerneni, L. K. (2015). **"Occurrence and Control of Sporadic Proliferation in Growth Arrested Swiss 3t3 Feeder Cells."** *PLoS One* **10**(3): e0122056.
57. Clough, B., Finethy, R., Khan, R. T., Fisch, D., Jordan, S., Patel, H., Coers, J. and Frickel, E. M. (2019). **"C57bl/6 and 129 Inbred Mouse Strains Differ in Gbp2 and Gbp2b Expression in Response to Inflammatory Stimuli in Vivo."** *Wellcome Open Res* **4**: 124.
58. Clough, B., Wright, J. D., Pereira, P. M., Hirst, E. M., Johnston, A. C., Henriques, R. and Frickel, E. M. (2016). **"K63-Linked Ubiquitination Targets Toxoplasma Gondii for Endo-Lysosomal Destruction in Ifngamma-Stimulated Human Cells."** *PLoS Pathog* **12**(11): e1006027.
59. Coccia, E. M., Severa, M., Giacomini, E., Monneron, D., Remoli, M. E., Julkunen, I., Cella, M., Lande, R. and Uze, G. (2004). **"Viral Infection and Toll-Like Receptor Agonists Induce a Differential Expression of Type I and Lambda Interferons in Human Plasmacytoid and Monocyte-Derived Dendritic Cells."** *Eur J Immunol* **34**(3): 796-805.
60. Cockle, S. M. and Dean, R. T. (1984). **"Distinct Proteolytic Mechanisms in Serum-Sufficient and Serum-Restricted Fibroblasts. Transformed 3t3 Cells Fail to Regulate Proteolysis in Relation to Culture Density Only During Serum-Sufficiency."** *Biochem J* **221**(1): 53-60.
61. Coller, H. A., Sang, L. and Roberts, J. M. (2006). **"A New Description of Cellular Quiescence."** *PLoS Biol* **4**(3): e83.
62. Colonna, M. (2018). **"Innate Lymphoid Cells: Diversity, Plasticity, and Unique Functions in Immunity."** *Immunity* **48**(6): 1104-1117.
63. Compton, T., Nowlin, D. M. and Cooper, N. R. (1993). **"Initiation of Human Cytomegalovirus Infection Requires Initial Interaction with Cell Surface Heparan Sulfate."** *Virology* **193**(2): 834-841.
64. Copeland, N. G. and Cooper, G. M. (1979). **"Transfection by Exogenous and Endogenous Murine Retrovirus Dnas."** *Cell* **16**(2): 347-356.
65. Cornelissen, A. W., Overdulve, J. P. and van der Ploeg, M. (1984). **"Determination of Nuclear DNA of Five Eucoccidian Parasites, Isospora (Toxoplasma) Gondii, Sarcocystis Cruzi, Eimeria Tenella, E. Acervulina and Plasmodium Berghei, with Special Reference to Gamontogenesis and Meiosis in I. (T.) Gondii."** *Parasitology* **88** (Pt 3): 531-553.
66. Costes, S. V., Daelemans, D., Cho, E. H., Dobbin, Z., Pavlakis, G. and Lockett, S. (2004). **"Automatic and Quantitative Measurement of Protein-Protein Colocalization in Live Cells."** *Biophys J* **86**(6): 3993-4003.

Literaturverzeichnis

67. Cotter, T. W., Ramsey, K. H., Miranpuri, G. S., Poulsen, C. E. and Byrne, G. I. (1997). **"Dissemination of Chlamydia Trachomatis Chronic Genital Tract Infection in Gamma Interferon Gene Knockout Mice."** Infect Immun **65**(6): 2145-2152.
68. Creasey, E. A. and Isberg, R. R. (2012). **"The Protein Sdha Maintains the Integrity of the Legionella-Containing Vacuole."** Proc Natl Acad Sci U S A **109**(9): 3481-3486.
69. Cui, Y., Xu, J., Cheng, M., Liao, X. and Peng, S. (2018). **"Review of Crispr/Cas9 Sgrna Design Tools."** Interdiscip Sci **10**(2): 455-465.
70. Cypionka, H. (2010). **Grundlagen Der Mikrobiologie.** Heidelberg, Springer,
71. Dalton, D. K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I. S., Bradley, A. and Stewart, T. A. (1993). **"Multiple Defects of Immune Cell Function in Mice with Disrupted Interferon-Gamma Genes."** Science **259**(5102): 1739-1742.
72. Dasgupta, A. and Saxena, R. (2012). **"Regulatory T Cells: A Review."** Natl Med J India **25**(6): 341-351.
73. Daubener, W. and MacKenzie, C. R. (1999). **"Ifn-Gamma Activated Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in Human Cells Is an Antiparasitic and an Antibacterial Effector Mechanism."** Adv Exp Med Biol **467**: 517-524.
74. Daubener, W., Remscheid, C., Nockemann, S., Pilz, K., Seghrouchni, S., Mackenzie, C. and Hadding, U. (1996). **"Anti-Parasitic Effector Mechanisms in Human Brain Tumor Cells: Role of Interferon-Gamma and Tumor Necrosis Factor-Alpha."** Eur J Immunol **26**(2): 487-492.
75. Daubener, W., Schmidt, S. K., Heseler, K., Spekker, K. H. and MacKenzie, C. R. (2009). **"Antimicrobial and Immunoregulatory Effector Mechanisms in Human Endothelial Cells. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Versus Inducible Nitric Oxide Synthase."** Thromb Haemost **102**(6): 1110-1116.
76. Daumke, O. and Praefcke, G. J. (2016). **"Invited Review: Mechanisms of Gtp Hydrolysis and Conformational Transitions in the Dynamain Superfamily."** Biopolymers **105**(8): 580-593.
77. Deckert-Schluter, M., Rang, A., Weiner, D., Huang, S., Wiestler, O. D., Hof, H. and Schluter, D. (1996). **"Interferon-Gamma Receptor-Deficiency Renders Mice Highly Susceptible to Toxoplasmosis by Decreased Macrophage Activation."** Lab Invest **75**(6): 827-841.
78. Degrandi, D., Konermann, C., Beuter-Gunia, C., Kresse, A., Wurthner, J., Kurig, S., Beer, S. and Pfeffer, K. (2007). **"Extensive Characterization of Ifn-Induced Gtpases Mgbp1 to Mgbp10 Involved in Host Defense."** J Immunol **179**(11): 7729-7740.
79. Degrandi, D., Kravets, E., Konermann, C., Beuter-Gunia, C., Klumpers, V., Lahme, S., Wischmann, E., Mausberg, A. K., Beer-Hammer, S. and Pfeffer, K. (2013). **"Murine Guanylate Binding Protein 2 (Mgbp2) Controls Toxoplasma Gondii Replication."** Proc Natl Acad Sci U S A **110**(1): 294-299.

80. Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J. and Charpentier, E. (2011). "**Crispr Rna Maturation by Trans-Encoded Small Rna and Host Factor Rnase Iii.**" *Nature* **471**(7340): 602-607.
81. Delves, P. J. and Roitt, I. M. (2000). "**The Immune System. First of Two Parts.**" *N Engl J Med* **343**(1): 37-49.
82. DeMarchi, J. M., Schmidt, C. A. and Kaplan, A. S. (1980). "**Patterns of Transcription of Human Cytomegalovirus in Permissively Infected Cells.**" *J Virol* **35**(2): 277-286.
83. Derouin, F. and Garin, Y. J. (1991). "**Toxoplasma Gondii: Blood and Tissue Kinetics During Acute and Chronic Infections in Mice.**" *Exp Parasitol* **73**(4): 460-468.
84. Desmonts, G. and Couvreur, J. (1974). "**Congenital Toxoplasmosis. A Prospective Study of 378 Pregnancies.**" *N Engl J Med* **290**(20): 1110-1116.
85. Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J. E., Labonte, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romero, D. A., Horvath, P. and Moineau, S. (2008). "**Phage Response to Crispr-Encoded Resistance in Streptococcus Thermophilus.**" *J Bacteriol* **190**(4): 1390-1400.
86. Doring, M., Lessin, I., Frenz, T., Spanier, J., Kessler, A., Tegtmeyer, P., Dag, F., Thiel, N., Trilling, M., Lienenklaus, S., Weiss, S., Scheu, S., Messerle, M., Cicin-Sain, L., Hengel, H. and Kalinke, U. (2014). "**M27 Expressed by Cytomegalovirus Counteracts Effective Type I Interferon Induction of Myeloid Cells but Not of Plasmacytoid Dendritic Cells.**" *J Virol* **88**(23): 13638-13650.
87. Doudna, J. A. and Charpentier, E. (2014). "**Genome Editing. The New Frontier of Genome Engineering with Crispr-Cas9.**" *Science* **346**(6213): 1258096.
88. Du, Y., Zhang, G. and Liu, Z. (2018). "**Human Cytomegalovirus Infection and Coronary Heart Disease: A Systematic Review.**" *Virol J* **15**(1): 31.
89. Dubey, J. P. (1998). "**Advances in the Life Cycle of Toxoplasma Gondii.**" *Int J Parasitol* **28**(7): 1019-1024.
90. Dubey, J. P. and Frenkel, J. K. (1972). "**Cyst-Induced Toxoplasmosis in Cats.**" *J Protozool* **19**(1): 155-177.
91. Dubey, J. P. and Frenkel, J. K. (1976). "**Feline Toxoplasmosis from Acutely Infected Mice and the Development of Toxoplasma Cysts.**" *J Protozool* **23**(4): 537-546.
92. Dubey, J. P., Miller, N. L. and Frenkel, J. K. (1970). "**The Toxoplasma Gondii Oocyst from Cat Feces.**" *J Exp Med* **132**(4): 636-662.
93. Dudley, D. D., Chaudhuri, J., Bassing, C. H. and Alt, F. W. (2005). "**Mechanism and Control of V(D)J Recombination Versus Class Switch Recombination: Similarities and Differences.**" *Adv Immunol* **86**: 43-112.
94. Dupre-Crochet, S., Erard, M. and Nubetae, O. (2013). "**Ros Production in Phagocytes: Why, When, and Where?**" *J Leukoc Biol* **94**(4): 657-670.

Literaturverzeichnis

95. Dy, R. L., Richter, C., Salmond, G. P. and Fineran, P. C. (2014). **"Remarkable Mechanisms in Microbes to Resist Phage Infections."** Annu Rev Virol **1**(1): 307-331.
96. Eden, E., Geva-Zatorsky, N., Issaeva, I., Cohen, A., Dekel, E., Danon, T., Cohen, L., Mayo, A. and Alon, U. (2011). **"Proteome Half-Life Dynamics in Living Human Cells."** Science **331**(6018): 764-768.
97. Elwell, C., Mirrashidi, K. and Engel, J. (2016). **"Chlamydia Cell Biology and Pathogenesis."** Nat Rev Microbiol **14**(6): 385-400.
98. Emery, V. C., Hassan-Walker, A. F., Burroughs, A. K. and Griffiths, P. D. (2002). **"Human Cytomegalovirus (Hcmv) Replication Dynamics in Hcmv-Naive and -Experienced Immunocompromised Hosts."** J Infect Dis **185**(12): 1723-1728.
99. Erkelenz, S., Theiss, S., Otte, M., Widera, M., Peter, J. O. and Schaal, H. (2014). **"Genomic Hexploring Allows Landscaping of Novel Potential Splicing Regulatory Elements."** Nucleic Acids Res **42**(16): 10681-10697.
100. Etheridge, R. D., Alaganan, A., Tang, K., Lou, H. J., Turk, B. E. and Sibley, L. D. (2014). **"The Toxoplasma Pseudokinase Rop5 Forms Complexes with Rop18 and Rop17 Kinases That Synergize to Control Acute Virulence in Mice."** Cell Host Microbe **15**(5): 537-550.
101. Feeley, E. M., Pilla-Moffett, D. M., Zwack, E. E., Piro, A. S., Finethy, R., Kolb, J. P., Martinez, J., Brodsky, I. E. and Coers, J. (2017). **"Galectin-3 Directs Antimicrobial Guanylate Binding Proteins to Vacuoles Furnished with Bacterial Secretion Systems."** Proc Natl Acad Sci U S A **114**(9): E1698-E1706.
102. Feldhaus, M. J., Siegel, R. W., Opresko, L. K., Coleman, J. R., Feldhaus, J. M., Yeung, Y. A., Cochran, J. R., Heinzelman, P., Colby, D., Swers, J., Graff, C., Wiley, H. S. and Wittrup, K. D. (2003). **"Flow-Cytometric Isolation of Human Antibodies from a Nonimmune Saccharomyces Cerevisiae Surface Display Library."** Nat Biotechnol **21**(2): 163-170.
103. Feng, J., Cao, Z., Wang, L., Wan, Y., Peng, N., Wang, Q., Chen, X., Zhou, Y. and Zhu, Y. (2017). **"Inducible Gbp5 Mediates the Antiviral Response Via Interferon-Related Pathways During Influenza a Virus Infection."** J Innate Immun **9**(4): 419-435.
104. Fennie, E. H., Lie, Y. S., Low, M. A., Gribbling, P. and Anderson, K. P. (1988). **"Reduced Mortality in Murine Cytomegalovirus Infected Mice Following Prophylactic Murine Interferon-Gamma Treatment."** Antiviral Res **10**(1-3): 27-39.
105. Ferguson, D. J. (2002). **"Toxoplasma Gondii and Sex: Essential or Optional Extra?"** Trends Parasitol **18**(8): 355-359.
106. Ferguson, D. J. (2004). **"Use of Molecular and Ultrastructural Markers to Evaluate Stage Conversion of Toxoplasma Gondii in Both the Intermediate and Definitive Host."** Int J Parasitol **34**(3): 347-360.
107. Ferguson, S. M. and De Camilli, P. (2012). **"Dynammin, a Membrane-Remodelling Gtpase."** Nat Rev Mol Cell Biol **13**(2): 75-88.
108. Fields, J. K., Gunther, S. and Sundberg, E. J. (2019). **"Structural Basis of Il-1 Family Cytokine Signaling."** Front Immunol **10**: 1412.

109. Finethy, R. and Coers, J. (2016). **"Sensing the Enemy, Containing the Threat: Cell-Autonomous Immunity to Chlamydia Trachomatis."** *FEMS Microbiol Rev* **40**(6): 875-893.
110. Finethy, R., Jorgensen, I., Haldar, A. K., de Zoete, M. R., Strowig, T., Flavell, R. A., Yamamoto, M., Nagarajan, U. M., Miao, E. A. and Coers, J. (2015). **"Guanylate Binding Proteins Enable Rapid Activation of Canonical and Noncanonical Inflammasomes in Chlamydia-Infected Macrophages."** *Infect Immun* **83**(12): 4740-4749.
111. Fischer, S., Maier, L. K., Stoll, B., Brendel, J., Fischer, E., Pfeiffer, F., Dyll-Smith, M. and Marchfelder, A. (2012). **"An Archaeal Immune System Can Detect Multiple Protospacer Adjacent Motifs (Pams) to Target Invader DNA."** *J Biol Chem* **287**(40): 33351-33363.
112. Foltz, C., Napolitano, A., Khan, R., Clough, B., Hirst, E. M. and Frickel, E. M. (2017). **"Trim21 Is Critical for Survival of Toxoplasma Gondii Infection and Localises to Gbp-Positive Parasite Vacuoles."** *Sci Rep* **7**(1): 5209.
113. Fox, B. A., Gigley, J. P. and Bzik, D. J. (2004). **"Toxoplasma Gondii Lacks the Enzymes Required for De Novo Arginine Biosynthesis and Arginine Starvation Triggers Cyst Formation."** *Int J Parasitol* **34**(3): 323-331.
114. Free, R. B., Hazelwood, L. A. and Sibley, D. R. (2009). **"Identifying Novel Protein-Protein Interactions Using Co-Immunoprecipitation and Mass Spectroscopy."** *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 5**: Unit 5 28.
115. Frenkel, J. K. (1988). **"Pathophysiology of Toxoplasmosis."** *Parasitol Today* **4**(10): 273-278.
116. Frenkel, J. K., Dubey, J. P. and Miller, N. L. (1970). **"Toxoplasma Gondii in Cats: Fecal Stages Identified as Coccidian Oocysts."** *Science* **167**(3919): 893-896.
117. Frenkel, J. K. and Friedlander, S. (1951). *Toxoplasmosis : Pathology of Neonatal Disease, Pathogenesis, Diagnosis and Treatment*. Washington, D.C., Microbiological Institutes of the National Institutes of Health.
118. Gardner, R. L. and Johnson, M. H. (1973). **"Investigation of Early Mammalian Development Using Interspecific Chimaeras between Rat and Mouse."** *Nature-New Biology* **246**(151): 86-89.
119. Garneau, J. E., Dupuis, M. E., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadan, A. H. and Moineau, S. (2010). **"The Crispr/Cas Bacterial Immune System Cleaves Bacteriophage and Plasmid DNA."** *Nature* **468**(7320): 67-71.
120. Gazzinelli, R. T., Hieny, S., Wynn, T. A., Wolf, S. and Sher, A. (1993). **"Interleukin 12 Is Required for the T-Lymphocyte-Independent Induction of Interferon Gamma by an Intracellular Parasite and Induces Resistance in T-Cell-Deficient Hosts."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(13): 6115-6119.
121. Ghosh, A., Praefcke, G. J., Renault, L., Wittinghofer, A. and Herrmann, C. (2006). **"How Guanylate-Binding Proteins Achieve Assembly-Stimulated Processive Cleavage of Gtp to Gmp."** *Nature* **440**(7080): 101-104.

Literaturverzeichnis

122. Gill, N., Chenoweth, M. J., Verdu, E. F. and Ashkar, A. A. (2011). **"Nk Cells Require Type I Ifn Receptor for Antiviral Responses During Genital Hsv-2 Infection."** Cell Immunol **269**(1): 29-37.
123. Gill, S. R., Pop, M., Deboy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M. and Nelson, K. E. (2006). **"Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome."** Science **312**(5778): 1355-1359.
124. Goldman, M., Carver, R. K. and Sulzer, A. J. (1958). **"Reproduction of Toxoplasma Gondii by Internal Budding."** J Parasitol **44**(2): 161-171.
125. Gondek, D. C., Roan, N. R. and Starnbach, M. N. (2009). **"T Cell Responses in the Absence of Ifn-Gamma Exacerbate Uterine Infection with Chlamydia Trachomatis."** J Immunol **183**(2): 1313-1319.
126. Gorbacheva, V. Y., Lindner, D., Sen, G. C. and Vestal, D. J. (2002). **"The Interferon (Ifn)-Induced Gtpase, Mgbp-2. Role in Ifn-Gamma-Induced Murine Fibroblast Proliferation."** J Biol Chem **277**(8): 6080-6087.
127. Gossler, A., Doetschman, T., Korn, R., Serfling, E. and Kemler, R. (1986). **"Transgenesis by Means of Blastocyst-Derived Embryonic Stem Cell Lines."** Proc Natl Acad Sci U S A **83**(23): 9065-9069.
128. Gough, D. J., Levy, D. E., Johnstone, R. W. and Clarke, C. J. (2008). **"Ifngamma Signaling-Does It Mean Jak-Stat?"** Cytokine Growth Factor Rev **19**(5-6): 383-394.
129. Gray, D. (2002). **"A Role for Antigen in the Maintenance of Immunological Memory."** Nat Rev Immunol **2**(1): 60-65.
130. Grieshaber, S. S., Grieshaber, N. A., Miller, N. and Hackstadt, T. (2006). **"Chlamydia Trachomatis Causes Centrosomal Defects Resulting in Chromosomal Segregation Abnormalities."** Traffic **7**(8): 940-949.
131. Griffiths, P., Baraniak, I. and Reeves, M. (2015). **"The Pathogenesis of Human Cytomegalovirus."** J Pathol **235**(2): 288-297.
132. Groettrup, M., Khan, S., Schwarz, K. and Schmidtke, G. (2001). **"Interferon-Gamma Inducible Exchanges of 20s Proteasome Active Site Subunits: Why?"** Biochimie **83**(3-4): 367-372.
133. Groettrup, M., Soza, A., Kuckelkorn, U. and Kloetzel, P. M. (1996). **"Peptide Antigen Production by the Proteasome: Complexity Provides Efficiency."** Immunol Today **17**(9): 429-435.
134. Gupta, S. L., Rubin, B. Y. and Holmes, S. L. (1979). **"Interferon Action: Induction of Specific Proteins in Mouse and Human Cells by Homologous Interferons."** Proc Natl Acad Sci U S A **76**(10): 4817-4821.
135. Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F. and Nelson, K. E. (2005). **"A Guild of 45 Crispr-Associated (Cas) Protein Families and Multiple Crispr/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes."** PLoS Comput Biol **1**(6): e60.

136. Hahn, G., Jores, R. and Mocarski, E. S. (1998). **"Cytomegalovirus Remains Latent in a Common Precursor of Dendritic and Myeloid Cells."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7): 3937-3942.
137. Haldar, A. K., Foltz, C., Finethy, R., Piro, A. S., Feeley, E. M., Pilla-Moffett, D. M., Komatsu, M., Frickel, E. M. and Coers, J. (2015). **"Ubiquitin Systems Mark Pathogen-Containing Vacuoles as Targets for Host Defense by Guanylate Binding Proteins."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(41): E5628-5637.
138. Haldar, A. K., Piro, A. S., Finethy, R., Espenschied, S. T., Brown, H. E., Giebel, A. M., Frickel, E. M., Nelson, D. E. and Coers, J. (2016). **"Chlamydia Trachomatis Is Resistant to Inclusion Ubiquitination and Associated Host Defense in Gamma Interferon-Primed Human Epithelial Cells."** *mBio* **7**(6).
139. Haldar, A. K., Saka, H. A., Piro, A. S., Dunn, J. D., Henry, S. C., Taylor, G. A., Frickel, E. M., Valdivia, R. H. and Coers, J. (2013). **"Irg and Gbp Host Resistance Factors Target Aberrant, "Non-Self" Vacuoles Characterized by the Missing of "Self" Irgm Proteins."** *PLoS Pathog* **9**(6): e1003414.
140. Haller, O., Staeheli, P., Schwemmle, M. and Kochs, G. (2015). **"Mx Gtpases: Dynamain-Like Antiviral Machines of Innate Immunity."** *Trends Microbiol* **23**(3): 154-163.
141. Hanley, P. J. and Bollard, C. M. (2014). **"Controlling Cytomegalovirus: Helping the Immune System Take the Lead."** *Viruses* **6**(6): 2242-2258.
142. Haq, I. U., Chaudhry, W. N., Akhtar, M. N., Andleeb, S. and Qadri, I. (2012). **"Bacteriophages and Their Implications on Future Biotechnology: A Review."** *Virology* **9**: 9.
143. Harris, S. R., Clarke, I. N., Seth-Smith, H. M., Solomon, A. W., Cutcliffe, L. T., Marsh, P., Skilton, R. J., Holland, M. J., Mabey, D., Peeling, R. W., Lewis, D. A., Spratt, B. G., Unemo, M., Persson, K., Bjartling, C., Brunham, R., de Vries, H. J., Morre, S. A., Speksnijder, A., Bebear, C. M., Clerc, M., de Barbeyrac, B., Parkhill, J. and Thomson, N. R. (2012). **"Whole-Genome Analysis of Diverse Chlamydia Trachomatis Strains Identifies Phylogenetic Relationships Masked by Current Clinical Typing."** *Nat Genet* **44**(4): 413-419, S411.
144. Heise, M. T. and Virgin, H. W. t. (1995). **"The T-Cell-Independent Role of Gamma Interferon and Tumor Necrosis Factor Alpha in Macrophage Activation During Murine Cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus Infections."** *J Virol* **69**(2): 904-909.
145. Hinz, J. M., Laughery, M. F. and Wyrick, J. J. (2015). **"Nucleosomes Inhibit Cas9 Endonuclease Activity in Vitro."** *Biochemistry* **54**(48): 7063-7066.
146. Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F. and Lacy, E. (1994). **Manipulating the Mouse Embryo**, Cold Spring Harbor Laboratory Press,
147. Horvath, P., Romero, D. A., Coute-Monvoisin, A. C., Richards, M., Deveau, H., Moineau, S., Boyaval, P., Fremaux, C. and Barrangou, R. (2008). **"Diversity, Activity, and Evolution of Crispr Loci in Streptococcus Thermophilus."** *J Bacteriol* **190**(4): 1401-1412.
148. Howe, D. K. and Sibley, L. D. (1995). **"Toxoplasma Gondii Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease."** *J Infect Dis* **172**(6): 1561-1566.

Literaturverzeichnis

149. Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T. J., Marraffini, L. A., Bao, G. and Zhang, F. (2013). **"DNA Targeting Specificity of Rna-Guided Cas9 Nucleases."** Nat Biotechnol **31**(9): 827-832.
150. Hu, J. and Rapoport, T. A. (2016). **"Fusion of the Endoplasmic Reticulum by Membrane-Bound Gtpases."** Semin Cell Dev Biol **60**: 105-111.
151. Hunn, J. P., Koenen-Waisman, S., Papic, N., Schroeder, N., Pawlowski, N., Lange, R., Kaiser, F., Zerrahn, J., Martens, S. and Howard, J. C. (2008). **"Regulatory Interactions between Irg Resistance Gtpases in the Cellular Response to Toxoplasma Gondii."** EMBO J **27**(19): 2495-2509.
152. Hunter, C. A., Subauste, C. S., Van Cleave, V. H. and Remington, J. S. (1994). **"Production of Gamma Interferon by Natural Killer Cells from Toxoplasma Gondii-Infected Scid Mice: Regulation by Interleukin-10, Interleukin-12, and Tumor Necrosis Factor Alpha."** Infect Immun **62**(7): 2818-2824.
153. Huse, K., Bohme, H. J. and Scholz, G. H. (2002). **"Purification of Antibodies by Affinity Chromatography."** J Biochem Biophys Methods **51**(3): 217-231.
154. Hutchison, W. M., Dunachie, J. F., Siim, J. C. and Work, K. (1969). **"Life Cycle of Toxoplasma Gondii."** Br Med J **4**(5686): 806.
155. Hybiske, K. and Stephens, R. S. (2007). **"Mechanisms of Host Cell Exit by the Intracellular Bacterium Chlamydia."** Proc Natl Acad Sci U S A **104**(27): 11430-11435.
156. IDT-DNA. (2020). "User Guides and Protocols." Retrieved 02.10.2020, 2020, from <https://eu.idtdna.com/pages/support/guides-and-protocols>.
157. Ihle, J. N. (1996). **"Signaling by the Cytokine Receptor Superfamily in Normal and Transformed Hematopoietic Cells."** Adv Cancer Res **68**: 23-65.
158. Ilari, A. and Savino, C. (2008). **"Protein Structure Determination by X-Ray Crystallography."** Methods Mol Biol **452**: 63-87.
159. Ince, S., Kutsch, M., Shydlovskiy, S. and Herrmann, C. (2017). **"The Human Guanylate-Binding Proteins Hgbp-1 and Hgbp-5 Cycle between Monomers and Dimers Only."** FEBS J **284**(14): 2284-2301.
160. Iriti, M. and Faoro, F. (2007). **"Review of Innate and Specific Immunity in Plants and Animals."** Mycopathologia **164**(2): 57-64.
161. Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957). **"Virus Interference. I. The Interferon."** Proc R Soc Lond B Biol Sci **147**(927): 258-267.
162. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. and Nakata, A. (1987). **"Nucleotide Sequence of the Iap Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in Escherichia Coli, and Identification of the Gene Product."** J Bacteriol **169**(12): 5429-5433.

163. Itsui, Y., Sakamoto, N., Kakinuma, S., Nakagawa, M., Sekine-Osajima, Y., Tasaka-Fujita, M., Nishimura-Sakurai, Y., Suda, G., Karakama, Y., Mishima, K., Yamamoto, M., Watanabe, T., Ueyama, M., Funaoka, Y., Azuma, S. and Watanabe, M. (2009). **"Antiviral Effects of the Interferon-Induced Protein Guanylate Binding Protein 1 and Its Interaction with the Hepatitis C Virus Ns5b Protein."** *Hepatology* **50**(6): 1727-1737.
164. Ivashkiv, L. B. and Donlin, L. T. (2014). **"Regulation of Type I Interferon Responses."** *Nat Rev Immunol* **14**(1): 36-49.
165. Jansen, R., Embden, J. D., Gaastra, W. and Schouls, L. M. (2002). **"Identification of Genes That Are Associated with DNA Repeats in Prokaryotes."** *Mol Microbiol* **43**(6): 1565-1575.
166. Jean Beltran, P. M. and Cristea, I. M. (2014). **"The Life Cycle and Pathogenesis of Human Cytomegalovirus Infection: Lessons from Proteomics."** *Expert Rev Proteomics* **11**(6): 697-711.
167. Jia, J., Abudu, Y. P., Claude-Taupin, A., Gu, Y., Kumar, S., Choi, S. W., Peters, R., Mudd, M. H., Allers, L., Salemi, M., Phinney, B., Johansen, T. and Deretic, V. (2018). **"Galectins Control Mtor in Response to Endomembrane Damage."** *Mol Cell* **70**(1): 120-135 e128.
168. Jia, J., Abudu, Y. P., Claude-Taupin, A., Gu, Y., Kumar, S., Choi, S. W., Peters, R., Mudd, M. H., Allers, L., Salemi, M., Phinney, B., Johansen, T. and Deretic, V. (2019). **"Galectins Control Mtor and Ampk in Response to Lysosomal Damage to Induce Autophagy."** *Autophagy* **15**(1): 169-171.
169. Jiang, F., Taylor, D. W., Chen, J. S., Kornfeld, J. E., Zhou, K., Thompson, A. J., Nogales, E. and Doudna, J. A. (2016). **"Structures of a Cas9 R-Loop Complex Primed for DNA Cleavage."** *Science* **351**(6275): 867-871.
170. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. and Charpentier, E. (2012). **"A Programmable Dual-Rna-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity."** *Science* **337**(6096): 816-821.
171. Johnston, A. C., Piro, A., Clough, B., Siew, M., Virreira Winter, S., Coers, J. and Frickel, E. M. (2016). **"Human Gbp1 Does Not Localize to Pathogen Vacuoles but Restricts Toxoplasma Gondii."** *Cell Microbiol* **18**(8): 1056-1064.
172. Joiner, K. A., Fuhrman, S. A., Miettinen, H. M., Kasper, L. H. and Mellman, I. (1990). **"Toxoplasma Gondii: Fusion Competence of Parasitophorous Vacuoles in Fc Receptor-Transfected Fibroblasts."** *Science* **249**(4969): 641-646.
173. Jones, J. L. and Dubey, J. P. (2012). **"Foodborne Toxoplasmosis."** *Clin Infect Dis* **55**(6): 845-851.
174. Jutras, I., Abrami, L. and Dautry-Varsat, A. (2003). **"Entry of the Lymphogranuloma Venereum Strain of Chlamydia Trachomatis into Host Cells Involves Cholesterol-Rich Membrane Domains."** *Infect Immun* **71**(1): 260-266.
175. Kabata, H., Moro, K. and Koyasu, S. (2018). **"The Group 2 Innate Lymphoid Cell (Ilc2) Regulatory Network and Its Underlying Mechanisms."** *Immunol Rev* **286**(1): 37-52.

Literaturverzeichnis

176. Kagebein, D., Gutjahr, M., Grosse, C., Vogel, A. B., Rodel, J. and Knittler, M. R. (2014). **"Chlamydia Trachomatis-Infected Epithelial Cells and Fibroblasts Retain the Ability to Express Surface-Presented Major Histocompatibility Complex Class I Molecules."** *Infect Immun* **82**(3): 993-1006.
177. Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N. and Nunez, G. (2013). **"Control of Pathogens and Pathobionts by the Gut Microbiota."** *Nat Immunol* **14**(7): 685-690.
178. Karlin, S. and Brocchieri, L. (2000). **"Heat Shock Protein 60 Sequence Comparisons: Duplications, Lateral Transfer, and Mitochondrial Evolution."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(21): 11348-11353.
179. Kasper, L. H. and Mineo, J. R. (1994). **"Attachment and Invasion of Host Cells by Toxoplasma Gondii."** *Parasitol Today* **10**(5): 184-188.
180. Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. and Sternberg, M. J. (2015). **"The Phyre2 Web Portal for Protein Modeling, Prediction and Analysis."** *Nat Protoc* **10**(6): 845-858.
181. Khaminets, A., Hunn, J. P., Konen-Waisman, S., Zhao, Y. O., Preukschat, D., Coers, J., Boyle, J. P., Ong, Y. C., Boothroyd, J. C., Reichmann, G. and Howard, J. C. (2010). **"Coordinated Loading of Irg Resistance Gtpases on to the Toxoplasma Gondii Parasitophorous Vacuole."** *Cell Microbiol* **12**(7): 939-961.
182. Kim, B. H., Shenoy, A. R., Kumar, P., Bradfield, C. J. and MacMicking, J. D. (2012). **"Ifn-Inducible Gtpases in Host Cell Defense."** *Cell Host Microbe* **12**(4): 432-444.
183. Kim, B. H., Shenoy, A. R., Kumar, P., Das, R., Tiwari, S. and MacMicking, J. D. (2011). **"A Family of Ifn-Gamma-Inducible 65-Kd Gtpases Protects against Bacterial Infection."** *Science* **332**(6030): 717-721.
184. Kim, E. W., Nadipuram, S. M., Tetlow, A. L., Barshop, W. D., Liu, P. T., Wohlschlegel, J. A. and Bradley, P. J. (2016). **"The Rhoptry Pseudokinase Rop54 Modulates Toxoplasma Gondii Virulence and Host Gbp2 Loading."** *mSphere* **1**(2).
185. Klamp, T., Boehm, U., Schenk, D., Pfeffer, K. and Howard, J. C. (2003). **"A Giant Gtpase, Very Large Inducible Gtpase-1, Is Inducible by Ifns."** *J Immunol* **171**(3): 1255-1265.
186. Kleinstiver, B. P., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Topkar, V. V., Nguyen, N. T., Zheng, Z., Gonzales, A. P., Li, Z., Peterson, R. T., Yeh, J. R., Aryee, M. J. and Joung, J. K. (2015). **"Engineered Crispr-Cas9 Nucleases with Altered Pam Specificities."** *Nature* **523**(7561): 481-485.
187. Knowlton, A. E., Brown, H. M., Richards, T. S., Andreolas, L. A., Patel, R. K. and Grieshaber, S. S. (2011). **"Chlamydia Trachomatis Infection Causes Mitotic Spindle Pole Defects Independently from Its Effects on Centrosome Amplification."** *Traffic* **12**(7): 854-866.
188. Knowlton, A. E., Fowler, L. J., Patel, R. K., Wallet, S. M. and Grieshaber, S. S. (2013). **"Chlamydia Induces Anchorage Independence in 3t3 Cells and Detrimental Cytological Defects in an Infection Model."** *PLoS One* **8**(1): e54022.

189. Koch, M. H., Vachette, P. and Svergun, D. I. (2003). **"Small-Angle Scattering: A View on the Properties, Structures and Structural Changes of Biological Macromolecules in Solution."** Q Rev Biophys **36**(2): 147-227.
190. Kohler, G. and Milstein, C. (1975). **"Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity."** Nature **256**(5517): 495-497.
191. Konermann, C. (2008). **"Die Rolle Der Ifn-G-Induzierten 65 Kda Guanylat-Bindenden Proteine Mgbp1 Bis Mgbp5 Als Effektmoleküle in Der Erregerabwehr,** Online-Ressource.
192. Konermann, C., Kresse, A., Beuter-Gunia, C., Wurthner, J., Degrandi, D., Pfeffer, K. and Beer, S. (2007). **"In Silico and in Vitro Characterization of Mgbp4 Splice Variants."** DNA Cell Biol **26**(12): 847-851.
193. Kotenko, S. V., Gallagher, G., Baurin, V. V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N. K., Langer, J. A., Sheikh, F., Dickensheets, H. and Donnelly, R. P. (2003). **"Ifn-Lambdas Mediate Antiviral Protection through a Distinct Class Ii Cytokine Receptor Complex."** Nat Immunol **4**(1): 69-77.
194. Krapp, C., Hotter, D., Gawanbacht, A., McLaren, P. J., Kluge, S. F., Sturzel, C. M., Mack, K., Reith, E., Engelhart, S., Ciuffi, A., Hornung, V., Sauter, D., Telenti, A. and Kirchhoff, F. (2016). **"Guanylate Binding Protein (Gbp) 5 Is an Interferon-Inducible Inhibitor of Hiv-1 Infectivity."** Cell Host Microbe **19**(4): 504-514.
195. Kravets, E., Degrandi, D., Ma, Q., Peulen, T. O., Klumpers, V., Felekyan, S., Kuhnemuth, R., Weidtkamp-Peters, S., Seidel, C. A. and Pfeffer, K. (2016). **"Guanylate Binding Proteins Directly Attack Toxoplasma Gondii Via Supramolecular Complexes."** Elife **5**.
196. Kravets, E., Degrandi, D., Weidtkamp-Peters, S., Ries, B., Konermann, C., Felekyan, S., Dargazanli, J. M., Praefcke, G. J., Seidel, C. A., Schmitt, L., Smits, S. H. and Pfeffer, K. (2012). **"The Gtpase Activity of Murine Guanylate-Binding Protein 2 (Mgbp2) Controls the Intracellular Localization and Recruitment to the Parasitophorous Vacuole of Toxoplasma Gondii."** J Biol Chem **287**(33): 27452-27466.
197. Kresse, A., Konermann, C., Degrandi, D., Beuter-Gunia, C., Wurthner, J., Pfeffer, K. and Beer, S. (2008). **"Analyses of Murine Gbp Homology Clusters Based on in Silico, in Vitro and in Vivo Studies."** BMC Genomics **9**: 158.
198. Kurosaki, T., Kometani, K. and Ise, W. (2015). **"Memory B Cells."** Nat Rev Immunol **15**(3): 149-159.
199. Kutter, E. and Sulakvelidze, A. (2004). **Bacteriophages: Biology and Applications,** CRC Press, 30-32.
200. Lavoie, T. B., Kalie, E., Crisafulli-Cabatu, S., Abramovich, R., DiGioia, G., Moolchan, K., Pestka, S. and Schreiber, G. (2011). **"Binding and Activity of All Human Alpha Interferon Subtypes."** Cytokine **56**(2): 282-289.
201. Le-Trilling, V. T. K., Wohlgemuth, K., Ruckborn, M. U., Jagnjic, A., Maassen, F., Timmer, L., Katschinski, B. and Trilling, M. (2018). **"Stat2-Dependent Immune Responses Ensure Host Survival Despite the Presence of a Potent Viral Antagonist."** J Virol **92**(14).

202. Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E. and Moore, M. J. (2001). **"The Exon-Exon Junction Complex Provides a Binding Platform for Factors Involved in Mrna Export and Nonsense-Mediated Mrna Decay."** EMBO J **20**(17): 4987-4997.
203. Le, Y., Zhou, Y., Iribarren, P. and Wang, J. (2004). **"Chemokines and Chemokine Receptors: Their Manifold Roles in Homeostasis and Disease."** Cell Mol Immunol **1**(2): 95-104.
204. Legewie, L., Loschwitz, J., Steffens, N., Prescher, M., Wang, X., Smits, S. H. J., Schmitt, L., Strodel, B., Degrandi, D. and Pfeffer, K. (2019). **"Biochemical and Structural Characterization of Murine Gbp7, a Guanylate Binding Protein with an Elongated C-Terminal Tail."** Biochem J **476**(21): 3161-3182.
205. Lew, D. J., Decker, T., Strehlow, I. and Darnell, J. E. (1991). **"Overlapping Elements in the Guanylate-Binding Protein Gene Promoter Mediate Transcriptional Induction by Alpha and Gamma Interferons."** Mol Cell Biol **11**(1): 182-191.
206. Li, G., Zhang, J., Sun, Y., Wang, H. and Wang, Y. (2009). **"The Evolutionarily Dynamic Ifn-Inducible Gtpase Proteins Play Conserved Immune Functions in Vertebrates and Cephalochordates."** Mol Biol Evol **26**(7): 1619-1630.
207. Li, G. and Zhang, X. C. (2004). **"Gtp Hydrolysis Mechanism of Ras-Like Gtpases."** J Mol Biol **340**(5): 921-932.
208. Li, T., Chen, J. and Cristea, I. M. (2013). **"Human Cytomegalovirus Tegument Protein Pul83 Inhibits Ifi16-Mediated DNA Sensing for Immune Evasion."** Cell Host Microbe **14**(5): 591-599.
209. Liang, F., Han, M., Romanienko, P. J. and Jasin, M. (1998). **"Homology-Directed Repair Is a Major Double-Strand Break Repair Pathway in Mammalian Cells."** Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5172-5177.
210. Lim, Y., Bak, S. Y., Sung, K., Jeong, E., Lee, S. H., Kim, J. S., Bae, S. and Kim, S. K. (2016). **"Structural Roles of Guide Rnas in the Nuclease Activity of Cas9 Endonuclease."** Nat Commun **7**: 13350.
211. Lindenberg, V., Molleken, K., Kravets, E., Stallmann, S., Hegemann, J. H., Degrandi, D. and Pfeffer, K. (2017). **"Broad Recruitment of Mgbp Family Members to Chlamydia Trachomatis Inclusions."** PLoS One **12**(9): e0185273.
212. Liu, G., Zhang, Y. and Zhang, T. (2020). **"Computational Approaches for Effective Crispr Guide Rna Design and Evaluation."** Comput Struct Biotechnol J **18**: 35-44.
213. Loh, J., Chu, D. T., O'Guin, A. K., Yokoyama, W. M. and Virgin, H. W. t. (2005). **"Natural Killer Cells Utilize Both Perforin and Gamma Interferon to Regulate Murine Cytomegalovirus Infection in the Spleen and Liver."** J Virol **79**(1): 661-667.
214. Low, H. H. and Lowe, J. (2006). **"A Bacterial Dynamin-Like Protein."** Nature **444**(7120): 766-769.

215. Luster, A. D. (1998). **"Chemokines--Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation."** N Engl J Med **338**(7): 436-445.
216. Macchiarulo, A., Camaioni, E., Nuti, R. and Pellicciari, R. (2009). **"Highlights at the Gate of Tryptophan Catabolism: A Review on the Mechanisms of Activation and Regulation of Indoleamine 2,3-Dioxygenase (Ido), a Novel Target in Cancer Disease."** Amino Acids **37**(2): 219-229.
217. Mach, B., Steimle, V., Martinez-Soria, E. and Reith, W. (1996). **"Regulation of Mhc Class Ii Genes: Lessons from a Disease."** Annu Rev Immunol **14**: 301-331.
218. Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J., Wolf, Y. I., Yakunin, A. F., van der Oost, J. and Koonin, E. V. (2011). **"Evolution and Classification of the Crispr-Cas Systems."** Nat Rev Microbiol **9**(6): 467-477.
219. Malhotra, M., Sood, S., Mukherjee, A., Muralidhar, S. and Bala, M. (2013). **"Genital Chlamydia Trachomatis: An Update."** Indian J Med Res **138**(3): 303-316.
220. Mali, P., Esvelt, K. M. and Church, G. M. (2013). **"Cas9 as a Versatile Tool for Engineering Biology."** Nat Methods **10**(10): 957-963.
221. Man, S. M., Karki, R. and Kanneganti, T. D. (2017). **"Molecular Mechanisms and Functions of Pyroptosis, Inflammatory Caspases and Inflammasomes in Infectious Diseases."** Immunol Rev **277**(1): 61-75.
222. Man, S. M., Karki, R., Malireddi, R. K., Neale, G., Vogel, P., Yamamoto, M., Lamkanfi, M. and Kanneganti, T. D. (2015). **"The Transcription Factor Irf1 and Guanylate-Binding Proteins Target Activation of the Aim2 Inflammasome by Francisella Infection."** Nat Immunol **16**(5): 467-475.
223. Man, S. M., Karki, R., Sasai, M., Place, D. E., Kesavardhana, S., Temirov, J., Frase, S., Zhu, Q., Malireddi, R. K. S., Kuriakose, T., Peters, J. L., Neale, G., Brown, S. A., Yamamoto, M. and Kanneganti, T. D. (2016). **"Irgb10 Liberates Bacterial Ligands for Sensing by the Aim2 and Caspase-11-Nlrp3 Inflammasomes."** Cell **167**(2): 382-396 e317.
224. Manger, I. D., Hehl, A. B. and Boothroyd, J. C. (1998). **"The Surface of Toxoplasma Tachyzoites Is Dominated by a Family of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Antigens Related to Sag1."** Infect Immun **66**(5): 2237-2244.
225. Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D. and Winter, G. (1991). **"By-Passing Immunization. Human Antibodies from V-Gene Libraries Displayed on Phage."** J Mol Biol **222**(3): 581-597.
226. Martens, S., Parvanova, I., Zerrahn, J., Griffiths, G., Schell, G., Reichmann, G. and Howard, J. C. (2005). **"Disruption of Toxoplasma Gondii Parasitophorous Vacuoles by the Mouse P47-Resistance Gtpases."** PLoS Pathog **1**(3): e24.
227. Martin, P. (1997). **"Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration."** Science **276**(5309): 75-81.
228. Matthews, B. W. (1976). **"X-Ray Crystallographic Studies of Proteins."** Annual Review of Physical Chemistry **27**: 493-523.

Literaturverzeichnis

229. McLeod, R., Skamene, E., Brown, C. R., Eisenhauer, P. B. and Mack, D. G. (1989). **"Genetic Regulation of Early Survival and Cyst Number after Peroral Toxoplasma Gondii Infection of a X B/B X a Recombinant Inbred and B10 Congenic Mice."** J Immunol **143**(9): 3031-3034.
230. McNew, J. A., Sondermann, H., Lee, T., Stern, M. and Brandizzi, F. (2013). **"Gtp-Dependent Membrane Fusion."** Annu Rev Cell Dev Biol **29**: 529-550.
231. Mehrlitz, A. and Rudel, T. (2013). **"Modulation of Host Signaling and Cellular Responses by Chlamydia."** Cell Commun Signal **11**: 90.
232. Mersmann, M., Meier, D., Mersmann, J., Helmsing, S., Nilsson, P., Graslund, S., Structural Genomics, C., Colwill, K., Hust, M. and Dubel, S. (2010). **"Towards Proteome Scale Antibody Selections Using Phage Display."** N Biotechnol **27**(2): 118-128.
233. Messmer-Blust, A. F., Balasubramanian, S., Gorbacheva, V. Y., Jeyaratnam, J. A. and Vestal, D. J. (2010). **"The Interferon-Gamma-Induced Murine Guanylate-Binding Protein-2 Inhibits Rac Activation During Cell Spreading on Fibronectin and after Platelet-Derived Growth Factor Treatment: Role for Phosphatidylinositol 3-Kinase."** Mol Biol Cell **21**(14): 2514-2528.
234. Meunier, E. and Broz, P. (2016). **"Interferon-Inducible Gtpases in Cell Autonomous and Innate Immunity."** Cell Microbiol **18**(2): 168-180.
235. Meunier, E., Dick, M. S., Dreier, R. F., Schurmann, N., Kenzelmann Broz, D., Warming, S., Roose-Girma, M., Bumann, D., Kayagaki, N., Takeda, K., Yamamoto, M. and Broz, P. (2014). **"Caspase-11 Activation Requires Lysis of Pathogen-Containing Vacuoles by Ifn-Induced Gtpases."** Nature **509**(7500): 366-370.
236. Meunier, E., Wallet, P., Dreier, R. F., Costanzo, S., Anton, L., Ruhl, S., Dussurgey, S., Dick, M. S., Kistner, A., Rigard, M., Degrandi, D., Pfeiffer, K., Yamamoto, M., Henry, T. and Broz, P. (2015). **"Guanylate-Binding Proteins Promote Activation of the Aim2 Inflammasome During Infection with Francisella Novicida."** Nat Immunol **16**(5): 476-484.
237. Michel, T. and Feron, O. (1997). **"Nitric Oxide Synthases: Which, Where, How, and Why?"** J Clin Invest **100**(9): 2146-2152.
238. Milbradt, J., Kraut, A., Hutterer, C., Sonntag, E., Schmeiser, C., Ferro, M., Wagner, S., Lenac, T., Claus, C., Pinkert, S., Hamilton, S. T., Rawlinson, W. D., Sticht, H., Coute, Y. and Marschall, M. (2014). **"Proteomic Analysis of the Multimeric Nuclear Egress Complex of Human Cytomegalovirus."** Mol Cell Proteomics **13**(8): 2132-2146.
239. Miller, N. L., Frenkel, J. K. and Dubey, J. P. (1972). **"Oral Infections with Toxoplasma Cysts and Oocysts in Felines, Other Mammals, and in Birds."** J Parasitol **58**(5): 928-937.
240. Mitrovic, M., Arapovic, J., Traven, L., Krmpotic, A. and Jonjic, S. (2012). **"Innate Immunity Regulates Adaptive Immune Response: Lessons Learned from Studying the Interplay between Nk and Cd8+ T Cells During Mcmv Infection."** Med Microbiol Immunol **201**(4): 487-495.

241. Miura, H., Quadros, R. M., Gurumurthy, C. B. and Ohtsuka, M. (2018). **"Easi-Crispr for Creating Knock-in and Conditional Knockout Mouse Models Using Long Ssdna Donors."** *Nat Protoc* **13**(1): 195-215.
242. Miyaoka, Y., Berman, J. R., Cooper, S. B., Mayerl, S. J., Chan, A. H., Zhang, B., Karlin-Neumann, G. A. and Conklin, B. R. (2016). **"Systematic Quantification of Hdr and Nhej Reveals Effects of Locus, Nuclease, and Cell Type on Genome-Editing."** *Sci Rep* **6**: 23549.
243. MMRRC. Retrieved 10.11.2020, 2020, from https://www.mmrrc.org/catalog/cellLineSDS.php?mmrrc_id=50961.
244. Moelleken, K. and Hegemann, J. H. (2008). **"The Chlamydia Outer Membrane Protein Omcb Is Required for Adhesion and Exhibits Biovar-Specific Differences in Glycosaminoglycan Binding."** *Mol Microbiol* **67**(2): 403-419.
245. Mojica, F. J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J. and Soria, E. (2005). **"Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements."** *J Mol Evol* **60**(2): 174-182.
246. Mojica, F. J., Diez-Villasenor, C., Soria, E. and Juez, G. (2000). **"Biological Significance of a Family of Regularly Spaced Repeats in the Genomes of Archaea, Bacteria and Mitochondria."** *Mol Microbiol* **36**(1): 244-246.
247. Mojica, F. J., Ferrer, C., Juez, G. and Rodriguez-Valera, F. (1995). **"Long Stretches of Short Tandem Repeats Are Present in the Largest Replicons of the Archaea Haloferax Mediterranei and Haloferax Volcanii and Could Be Involved in Replicon Partitioning."** *Mol Microbiol* **17**(1): 85-93.
248. Mojica, F. J. M., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J. and Almendros, C. (2009). **"Short Motif Sequences Determine the Targets of the Prokaryotic Crispr Defence System."** *Microbiology* **155**(Pt 3): 733-740.
249. Monticelli, L. A., Osborne, L. C., Noti, M., Tran, S. V., Zaiss, D. M. and Artis, D. (2015). **"Il-33 Promotes an Innate Immune Pathway of Intestinal Tissue Protection Dependent on Amphiregulin-Egfr Interactions."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(34): 10762-10767.
250. Moore, E. R. and Ouellette, S. P. (2014). **"Reconceptualizing the Chlamydial Inclusion as a Pathogen-Specified Parasitic Organelle: An Expanded Role for Inc Proteins."** *Front Cell Infect Microbiol* **4**: 157.
251. Mori, T. and Kato, J. (2010). **"Cytomegalovirus Infection/Disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation."** *Int J Hematol* **91**(4): 588-595.
252. Mullally, G., van Aelst, K., Naqvi, M. M., Diffin, F. M., Karvelis, T., Gasiunas, G., Siksnys, V. and Szczelkun, M. D. (2020). **"5' Modifications to Crispr-Cas9 Grna Can Change the Dynamics and Size of R-Loops and Inhibit DNA Cleavage."** *Nucleic Acids Res* **48**(12): 6811-6823.
253. Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L. F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. M. and Aguet, M. (1994). **"Functional Role of Type I and Type II Interferons in Antiviral Defense."** *Science* **264**(5167): 1918-1921.

Literaturverzeichnis

254. Murphy, E., Rigoutsos, I., Shibuya, T. and Shenk, T. E. (2003). **"Reevaluation of Human Cytomegalovirus Coding Potential."** Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13585-13590.
255. Murphy, K. and Weaver, C. (2018). Janeway Immunologie.
256. Nagy, E. and Maquat, L. E. (1998). **"A Rule for Termination-Codon Position within Intron-Containing Genes: When Nonsense Affects Rna Abundance."** Trends Biochem Sci **23**(6): 198-199.
257. Nantais, D. E., Schwemmle, M., Stickney, J. T., Vestal, D. J. and Buss, J. E. (1996). **"Prenylation of an Interferon-Gamma-Induced Gtp-Binding Protein: The Human Guanylate Binding Protein, Hugbp1."** J Leukoc Biol **60**(3): 423-431.
258. Newman, L., Rowley, J., Vander Hoorn, S., Wijesooriya, N. S., Unemo, M., Low, N., Stevens, G., Gottlieb, S., Kiarie, J. and Temmerman, M. (2015). **"Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting."** PLoS One **10**(12): e0143304.
259. Nicholson, T. L., Olinger, L., Chong, K., Schoolnik, G. and Stephens, R. S. (2003). **"Global Stage-Specific Gene Regulation During the Developmental Cycle of Chlamydia Trachomatis."** J Bacteriol **185**(10): 3179-3189.
260. Nishimasu, H. and Nureki, O. (2017). **"Structures and Mechanisms of Crispr Rna-Guided Effector Nucleases."** Curr Opin Struct Biol **43**: 68-78.
261. Nordmann, A., Wixler, L., Boergeling, Y., Wixler, V. and Ludwig, S. (2012). **"A New Splice Variant of the Human Guanylate-Binding Protein 3 Mediates Anti-Influenza Activity through Inhibition of Viral Transcription and Replication."** FASEB J **26**(3): 1290-1300.
262. Nossal, G. J. (1994). **"Negative Selection of Lymphocytes."** Cell **76**(2): 229-239.
263. Ofir, G., Melamed, S., Sberro, H., Mukamel, Z., Silverman, S., Yaakov, G., Doron, S. and Sorek, R. (2018). **"Disarm Is a Widespread Bacterial Defence System with Broad Anti-Phage Activities."** Nat Microbiol **3**(1): 90-98.
264. Ogawa-Goto, K., Tanaka, K., Gibson, W., Moriishi, E., Miura, Y., Kurata, T., Irie, S. and Sata, T. (2003). **"Microtubule Network Facilitates Nuclear Targeting of Human Cytomegalovirus Capsid."** J Virol **77**(15): 8541-8547.
265. Ohshima, J., Lee, Y., Sasai, M., Saitoh, T., Su Ma, J., Kamiyama, N., Matsuura, Y., Pann-Ghill, S., Hayashi, M., Ebisu, S., Takeda, K., Akira, S. and Yamamoto, M. (2014). **"Role of Mouse and Human Autophagy Proteins in Ifn-Gamma-Induced Cell-Autonomous Responses against Toxoplasma Gondii."** J Immunol **192**(7): 3328-3335.
266. Olszewski, M. A., Gray, J. and Vestal, D. J. (2006). **"In Silico Genomic Analysis of the Human and Murine Guanylate-Binding Protein (Gbp) Gene Clusters."** J Interferon Cytokine Res **26**(5): 328-352.
267. Pan, W., Zuo, X., Feng, T., Shi, X. and Dai, J. (2012). **"Guanylate-Binding Protein 1 Participates in Cellular Antiviral Response to Dengue Virus."** Virol J **9**: 292.

268. Paz, I., Sachse, M., Dupont, N., Mounier, J., Cederfur, C., Enninga, J., Leffler, H., Poirier, F., Prevost, M. C., Lafont, F. and Sansonetti, P. (2010). "**Galectin-3, a Marker for Vacuole Lysis by Invasive Pathogens.**" Cell Microbiol **12**(4): 530-544.
269. Pedersen, J. S. (1997). "**Analysis of Small-Angle Scattering Data from Colloids and Polymer Solutions: Modeling and Least-Squares Fitting**" Advances in Colloid and Interface Science **70**: 171-172.
270. Pegram, H. J., Andrews, D. M., Smyth, M. J., Darcy, P. K. and Kershaw, M. H. (2011). "**Activating and Inhibitory Receptors of Natural Killer Cells.**" Immunol Cell Biol **89**(2): 216-224.
271. Peipert, J. F. (2003). "**Clinical Practice. Genital Chlamydial Infections.**" N Engl J Med **349**(25): 2424-2430.
272. Pershad, K., Pavlovic, J. D., Graslund, S., Nilsson, P., Colwill, K., Karatt-Vellatt, A., Schofield, D. J., Dyson, M. R., Pawson, T., Kay, B. K. and McCafferty, J. (2010). "**Generating a Panel of Highly Specific Antibodies to 20 Human Sh2 Domains by Phage Display.**" Protein Eng Des Sel **23**(4): 279-288.
273. Pestka, S. (1994). "**Identification of Functional Type I and Type II Interferon Receptors.**" Hokkaido Igaku Zasshi **69**(6): 1301-1319.
274. Pfeffer, K. and Mak, T. W. (1994). "**Lymphocyte Ontogeny and Activation in Gene Targeted Mutant Mice.**" Annu Rev Immunol **12**: 367-411.
275. Pfefferkorn, E. R. (1984). "**Interferon Gamma Blocks the Growth of Toxoplasma Gondii in Human Fibroblasts by Inducing the Host Cells to Degrade Tryptophan.**" Proc Natl Acad Sci U S A **81**(3): 908-912.
276. Pflughoeft, K. J. and Versalovic, J. (2012). "**Human Microbiome in Health and Disease.**" Annu Rev Pathol **7**: 99-122.
277. Phizicky, E. M. and Fields, S. (1995). "**Protein-Protein Interactions: Methods for Detection and Analysis.**" Microbiol Rev **59**(1): 94-123.
278. Picaud, S., Bardot, B., De Maeyer, E. and Seif, I. (2002). "**Enhanced Tumor Development in Mice Lacking a Functional Type I Interferon Receptor.**" J Interferon Cytokine Res **22**(4): 457-462.
279. Pilla-Moffett, D., Barber, M. F., Taylor, G. A. and Coers, J. (2016). "**Interferon-Inducible Gtpases in Host Resistance, Inflammation and Disease.**" J Mol Biol **428**(17): 3495-3513.
280. Pilla, D. M., Hagar, J. A., Haldar, A. K., Mason, A. K., Degrandi, D., Pfeffer, K., Ernst, R. K., Yamamoto, M., Miao, E. A. and Coers, J. (2014). "**Guanylate Binding Proteins Promote Caspase-11-Dependent Pyroptosis in Response to Cytoplasmic Lps.**" Proc Natl Acad Sci U S A **111**(16): 6046-6051.

Literaturverzeichnis

281. Piro, A. S., Hernandez, D., Luoma, S., Feeley, E. M., Finethy, R., Yirga, A., Frickel, E. M., Lesser, C. F. and Coers, J. (2017). **"Detection of Cytosolic Shigella Flexneri Via a C-Terminal Triple-Arginine Motif of Gbp1 Inhibits Actin-Based Motility."** *mBio* 8(6).
282. Praefcke, G. J., Kloep, S., Benschaid, U., Lilie, H., Prakash, B. and Herrmann, C. (2004). **"Identification of Residues in the Human Guanylate-Binding Protein 1 Critical for Nucleotide Binding and Cooperative Gtp Hydrolysis."** *J Mol Biol* 344(1): 257-269.
283. Praefcke, G. J. K. (2018). **"Regulation of Innate Immune Functions by Guanylate-Binding Proteins."** *Int J Med Microbiol* 308(1): 237-245.
284. Prakash, B., Praefcke, G. J., Renault, L., Wittinghofer, A. and Herrmann, C. (2000). **"Structure of Human Guanylate-Binding Protein 1 Representing a Unique Class of Gtp-Binding Proteins."** *Nature* 403(6769): 567-571.
285. Prakash, B., Renault, L., Praefcke, G. J., Herrmann, C. and Wittinghofer, A. (2000). **"Triphosphate Structure of Guanylate-Binding Protein 1 and Implications for Nucleotide Binding and Gtpase Mechanism."** *EMBO J* 19(17): 4555-4564.
286. Presti, R. M., Popkin, D. L., Connick, M., Paetzold, S. and Virgin, H. W. t. (2001). **"Novel Cell Type-Specific Antiviral Mechanism of Interferon Gamma Action in Macrophages."** *J Exp Med* 193(4): 483-496.
287. Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A. and Zhang, F. (2013). **"Genome Engineering Using the Crispr-Cas9 System."** *Nat Protoc* 8(11): 2281-2308.
288. Rasmussen, S. J., Eckmann, L., Quayle, A. J., Shen, L., Zhang, Y. X., Anderson, D. J., Fierer, J., Stephens, R. S. and Kagnoff, M. F. (1997). **"Secretion of Proinflammatory Cytokines by Epithelial Cells in Response to Chlamydia Infection Suggests a Central Role for Epithelial Cells in Chlamydial Pathogenesis."** *J Clin Invest* 99(1): 77-87.
289. Reeves, M. and Sinclair, J. (2008). **"Aspects of Human Cytomegalovirus Latency and Reactivation."** *Curr Top Microbiol Immunol* 325: 297-313.
290. Resh, M. D. (2006). **"Trafficking and Signaling by Fatty-Acylated and Prenylated Proteins."** *Nat Chem Biol* 2(11): 584-590.
291. Reva, B., Antipin, Y. and Sander, C. (2011). **"Predicting the Functional Impact of Protein Mutations: Application to Cancer Genomics."** *Nucleic Acids Res* 39(17): e118.
292. RKI. (2018). "Toxoplasmose." Retrieved 09.09.2020, 2020, from https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Toxoplasmose.html;jsessionid=4CB29C7E5C3E737DD014E3A195E67C34.internet092#doc2390224bodyText2.
293. Roan, N. R., Gierahn, T. M., Higgins, D. E. and Starnbach, M. N. (2006). **"Monitoring the T Cell Response to Genital Tract Infection."** *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(32): 12069-12074.
294. Robert-Gangneux, F. and Darde, M. L. (2012). **"Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis."** *Clin Microbiol Rev* 25(2): 264-296.

295. Roberts, J. A. (1996). **"Tropism in Bacterial Infections: Urinary Tract Infections."** *J Urol* **156**(5): 1552-1559.
296. Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M. and Evans, M. (1986). **"Germ-Line Transmission of Genes Introduced into Cultured Pluripotential Cells by Retroviral Vector."** *Nature* **323**(6087): 445-448.
297. Rucks, E. A., Olson, M. G., Jorgenson, L. M., Srinivasan, R. R. and Ouellette, S. P. (2017). **"Development of a Proximity Labeling System to Map the Chlamydia Trachomatis Inclusion Membrane."** *Front Cell Infect Microbiol* **7**: 40.
298. Russell, W. M. S. B., R.L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. London, Russell, W.M.S.
299. Saadatnia, G. and Golkar, M. (2012). **"A Review on Human Toxoplasmosis."** *Scand J Infect Dis* **44**(11): 805-814.
300. Sachse, K., Bavoil, P. M., Kaltenboeck, B., Stephens, R. S., Kuo, C. C., Rossello-Mora, R. and Horn, M. (2015). **"Emendation of the Family Chlamydiaceae: Proposal of a Single Genus, Chlamydia, to Include All Currently Recognized Species."** *Syst Appl Microbiol* **38**(2): 99-103.
301. Sander, J. D. and Joung, J. K. (2014). **"Crispr-Cas Systems for Editing, Regulating and Targeting Genomes."** *Nat Biotechnol* **32**(4): 347-355.
302. Sanger, F. and Coulson, A. R. (1975). **"A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase."** *J Mol Biol* **94**(3): 441-448.
303. Santos, J. C., Dick, M. S., Lagrange, B., Degrandi, D., Pfeffer, K., Yamamoto, M., Meunier, E., Pelczar, P., Henry, T. and Broz, P. (2018). **"Lps Targets Host Guanylate-Binding Proteins to the Bacterial Outer Membrane for Non-Canonical Inflammasome Activation."** *EMBO J* **37**(6).
304. Sasai, M., Pradipta, A. and Yamamoto, M. (2018). **"Host Immune Responses to Toxoplasma Gondii."** *Int Immunol* **30**(3): 113-119.
305. Schleifer, K. H. (2009). **"Classification of Bacteria and Archaea: Past, Present and Future."** *Syst Appl Microbiol* **32**(8): 533-542.
306. Schneider, W. M., Chevillotte, M. D. and Rice, C. M. (2014). **"Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses."** *Annu Rev Immunol* **32**: 513-545.
307. Schneidman-Duhovny, D., Hammel, M. and Sali, A. (2010). **"Foxs: A Web Server for Rapid Computation and Fitting of Saxs Profiles."** *Nucleic Acids Res* **38**(Web Server issue): W540-544.
308. Schoggins, J. W., Wilson, S. J., Panis, M., Murphy, M. Y., Jones, C. T., Bieniasz, P. and Rice, C. M. (2011). **"A Diverse Range of Gene Products Are Effectors of the Type I Interferon Antiviral Response."** *Nature* **472**(7344): 481-485.

Literaturverzeichnis

309. Schreiber, R. D. and Feldman, H. A. (1980). **"Identification of the Activator System for Antibody to Toxoplasma as the Classical Complement Pathway."** *J Infect Dis* **141**(3): 366-369.
310. Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. and Hume, D. A. (2004). **"Interferon-Gamma: An Overview of Signals, Mechanisms and Functions."** *J Leukoc Biol* **75**(2): 163-189.
311. Schütt, C. and Bröker, B. (2011). *Grundwissen Immunologie*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
312. Schwemmler, M. and Staeheli, P. (1994). **"The Interferon-Induced 67-Kda Guanylate-Binding Protein (Hgbp1) Is a Gtpase That Converts Gtp to Gmp."** *J Biol Chem* **269**(15): 11299-11305.
313. Segal, A. W. (2005). **"How Neutrophils Kill Microbes."** *Annu Rev Immunol* **23**: 197-223.
314. Selleck, E. M., Fentress, S. J., Beatty, W. L., Degrandi, D., Pfeffer, K., Virgin, H. W. t., Macmicking, J. D. and Sibley, L. D. (2013). **"Guanylate-Binding Protein 1 (Gbp1) Contributes to Cell-Autonomous Immunity against Toxoplasma Gondii."** *PLoS Pathog* **9**(4): e1003320.
315. Sellge, G. and Kufer, T. A. (2015). **"Prr-Signaling Pathways: Learning from Microbial Tactics."** *Semin Immunol* **27**(2): 75-84.
316. Sharpe, J. J. and Cooper, T. A. (2017). **"Unexpected Consequences: Exon Skipping Caused by Crispr-Generated Mutations."** *Genome Biol* **18**(1): 109.
317. Shenoy, A. R., Wellington, D. A., Kumar, P., Kassa, H., Booth, C. J., Cresswell, P. and MacMicking, J. D. (2012). **"Gbp5 Promotes Nlrp3 Inflammasome Assembly and Immunity in Mammals."** *Science* **336**(6080): 481-485.
318. Shishido, S. N., Varahan, S., Yuan, K., Li, X. and Fleming, S. D. (2012). **"Humoral Innate Immune Response and Disease."** *Clin Immunol* **144**(2): 142-158.
319. Shuai, K., Schindler, C., Prezioso, V. R. and Darnell, J. E., Jr. (1992). **"Activation of Transcription by Ifn-Gamma: Tyrosine Phosphorylation of a 91-Kd DNA Binding Protein."** *Science* **258**(5089): 1808-1812.
320. Shydlovskiy, S., Zienert, A. Y., Ince, S., Dovengerds, C., Hohendahl, A., Dargazanli, J. M., Blum, A., Gunther, S. D., Kladt, N., Sturzl, M., Schauss, A. C., Kutsch, M., Roux, A., Praefcke, G. J. K. and Herrmann, C. (2017). **"Nucleotide-Dependent Farnesyl Switch Orchestrates Polymerization and Membrane Binding of Human Guanylate-Binding Protein 1."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**(28): E5559-E5568.
321. Sibley, L. D., Adams, L. B., Fukutomi, Y. and Krahenbuhl, J. L. (1991). **"Tumor Necrosis Factor-Alpha Triggers Antitoxoplasmal Activity of Ifn-Gamma Primed Macrophages."** *J Immunol* **147**(7): 2340-2345.
322. Sinclair, J. and Sissons, P. (1996). **"Latent and Persistent Infections of Monocytes and Macrophages."** *Intervirology* **39**(5-6): 293-301.

323. Sinzger, C. and Jahn, G. (1996). **"Human Cytomegalovirus Cell Tropism and Pathogenesis."** *Intervirology* **39**(5-6): 302-319.
324. Slaymaker, I. M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D. A., Yan, W. X. and Zhang, F. (2016). **"Rationally Engineered Cas9 Nucleases with Improved Specificity."** *Science* **351**(6268): 84-88.
325. Smith, L. M., McWhorter, A. R., Shellam, G. R. and Redwood, A. J. (2013). **"The Genome of Murine Cytomegalovirus Is Shaped by Purifying Selection and Extensive Recombination."** *Virology* **435**(2): 258-268.
326. Spaete, R. R., Gehrz, R. C. and Landini, M. P. (1994). **"Human Cytomegalovirus Structural Proteins."** *J Gen Virol* **75 (Pt 12)**: 3287-3308.
327. Stamminger, T., Gstaiger, M., Weinzierl, K., Lorz, K., Winkler, M. and Schaffner, W. (2002). **"Open Reading Frame UI26 of Human Cytomegalovirus Encodes a Novel Tegument Protein That Contains a Strong Transcriptional Activation Domain."** *J Virol* **76**(10): 4836-4847.
328. Starr, T. K., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A. (2003). **"Positive and Negative Selection of T Cells."** *Annu Rev Immunol* **21**: 139-176.
329. Steffens, N., Beuter-Gunia, C., Kravets, E., Reich, A., Legewie, L., Pfeffer, K. and Degrandi, D. (2020). **"Essential Role of Mgbp7 for Survival of Toxoplasma Gondii Infection."** *mBio* **11**(1).
330. Stickney, J. T. and Buss, J. E. (2000). **"Murine Guanylate-Binding Protein: Incomplete Geranylgeranyl Isoprenoid Modification of an Interferon-Gamma-Inducible Guanosine Triphosphate-Binding Protein."** *Mol Biol Cell* **11**(7): 2191-2200.
331. Stinski, M. F. and Isomura, H. (2008). **"Role of the Cytomegalovirus Major Immediate Early Enhancer in Acute Infection and Reactivation from Latency."** *Med Microbiol Immunol* **197**(2): 223-231.
332. Su, C., Evans, D., Cole, R. H., Kissinger, J. C., Ajioka, J. W. and Sibley, L. D. (2003). **"Recent Expansion of Toxoplasma through Enhanced Oral Transmission."** *Science* **299**(5605): 414-416.
333. Sumyuen, M. H., Garin, Y. J. and Derouin, F. (1995). **"Early Kinetics of Toxoplasma Gondii Infection in Mice Infected Orally with Cysts of an Avirulent Strain."** *J Parasitol* **81**(2): 327-329.
334. Suzuki, Y. and Joh, K. (1994). **"Effect of the Strain of Toxoplasma Gondii on the Development of Toxoplasmic Encephalitis in Mice Treated with Antibody to Interferon-Gamma."** *Parasitol Res* **80**(2): 125-130.
335. Svergun, D. I., Petoukhov, M. V. and Koch, M. H. (2001). **"Determination of Domain Structure of Proteins from X-Ray Solution Scattering."** *Biophys J* **80**(6): 2946-2953.
336. Takacs, A. C., Swierzy, I. J. and Luder, C. G. (2012). **"Interferon-Gamma Restricts Toxoplasma Gondii Development in Murine Skeletal Muscle Cells Via Nitric Oxide Production and Immunity-Related Gtpases."** *PLoS One* **7**(9): e45440.

Literaturverzeichnis

337. Taniguchi, Y., Appiah-Kwarteng, C., Murakami, M., Fukumoto, J., Nagamune, K., Matsuo, T., Masatani, T., Kanuka, H., Hoshina, T., Kitoh, K. and Takashima, Y. (2018). **"Atypical Virulence in a Type Iii Toxoplasma Gondii Strain Isolated in Japan."** Parasitol Int **67**(5): 587-592.
338. Taylor, G. A. (2007). **"Irg Proteins: Key Mediators of Interferon-Regulated Host Resistance to Intracellular Pathogens."** Cell Microbiol **9**(5): 1099-1107.
339. Tenter, A. M., Heckerroth, A. R. and Weiss, L. M. (2000). **"Toxoplasma Gondii: From Animals to Humans."** Int J Parasitol **30**(12-13): 1217-1258.
340. Terns, R. M. and Terns, M. P. (2014). **"Crispr-Based Technologies: Prokaryotic Defense Weapons Repurposed."** Trends Genet **30**(3): 111-118.
341. Thorn, K. (2017). **"Genetically Encoded Fluorescent Tags."** Mol Biol Cell **28**(7): 848-857.
342. Thurston, T. L., Wandel, M. P., von Muhlinen, N., Foeglein, A. and Randow, F. (2012). **"Galectin 8 Targets Damaged Vesicles for Autophagy to Defend Cells against Bacterial Invasion."** Nature **482**(7385): 414-418.
343. Tietzel, I., El-Haibi, C. and Carabeo, R. A. (2009). **"Human Guanylate Binding Proteins Potentiate the Anti-Chlamydia Effects of Interferon-Gamma."** PLoS One **4**(8): e6499.
344. Todaro, G. J. and Green, H. (1963). **"Quantitative Studies of the Growth of Mouse Embryo Cells in Culture and Their Development into Established Lines."** J Cell Biol **17**: 299-313.
345. Torgerson, P. R. and Mastroiacovo, P. (2013). **"The Global Burden of Congenital Toxoplasmosis: A Systematic Review."** Bull World Health Organ **91**(7): 501-508.
346. Tretina, K., Park, E. S., Maminska, A. and MacMicking, J. D. (2019). **"Interferon-Induced Guanylate-Binding Proteins: Guardians of Host Defense in Health and Disease."** J Exp Med **216**(3): 482-500.
347. Trilling, M., Le, V. T., Fiedler, M., Zimmermann, A., Bleifuss, E. and Hengel, H. (2011). **"Identification of DNA-Damage DNA-Binding Protein 1 as a Conditional Essential Factor for Cytomegalovirus Replication in Interferon-Gamma-Stimulated Cells."** PLoS Pathog **7**(6): e1002069.
348. Trilling, M., Le, V. T., Rashidi-Alavijeh, J., Katschinski, B., Scheller, J., Rose-John, S., Androsiac, G. E., Jonjic, S., Poli, V., Pfeffer, K. and Hengel, H. (2014). **"Activated" Stat Proteins: A Paradoxical Consequence of Inhibited Jak-Stat Signaling in Cytomegalovirus-Infected Cells."** J Immunol **192**(1): 447-458.
349. Tripal, P., Bauer, M., Naschberger, E., Mortinger, T., Hohenadl, C., Cornali, E., Thurau, M. and Sturzl, M. (2007). **"Unique Features of Different Members of the Human Guanylate-Binding Protein Family."** J Interferon Cytokine Res **27**(1): 44-52.

350. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R. and Gordon, J. I. (2007). **"The Human Microbiome Project."** *Nature* **449**(7164): 804-810.
351. Uusi-Makela, M. I. E., Barker, H. R., Bauerlein, C. A., Hakkinen, T., Nykter, M. and Ramet, M. (2018). **"Chromatin Accessibility Is Associated with Crispr-Cas9 Efficiency in the Zebrafish (Danio Rerio)."** *PLoS One* **13**(4): e0196238.
352. Vasta, G. R. (2009). **"Roles of Galectins in Infection."** *Nat Rev Microbiol* **7**(6): 424-438.
353. Verhelst, J., Hulpiiau, P. and Saelens, X. (2013). **"Mx Proteins: Antiviral Gatekeepers That Restrain the Uninvited."** *Microbiol Mol Biol Rev* **77**(4): 551-566.
354. Visconti, A., Le Roy, C. I., Rosa, F., Rossi, N., Martin, T. C., Mohny, R. P., Li, W., de Rinaldis, E., Bell, J. T., Venter, J. C., Nelson, K. E., Spector, T. D. and Falchi, M. (2019). **"Interplay between the Human Gut Microbiome and Host Metabolism."** *Nat Commun* **10**(1): 4505.
355. Voigt, V., Forbes, C. A., Tonkin, J. N., Degli-Esposti, M. A., Smith, H. R., Yokoyama, W. M. and Scalzo, A. A. (2003). **"Murine Cytomegalovirus M157 Mutation and Variation Leads to Immune Evasion of Natural Killer Cells."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23): 13483-13488.
356. Vopel, T., Hengstenberg, C. S., Peulen, T. O., Ajaj, Y., Seidel, C. A., Herrmann, C. and Klare, J. P. (2014). **"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* **53**(28): 4590-4600.
357. Wandel, M. P., Pathe, C., Werner, E. I., Ellison, C. J., Boyle, K. B., von der Malsburg, A., Rohde, J. and Randow, F. (2017). **"Gbps Inhibit Motility of Shigella Flexneri but Are Targeted for Degradation by the Bacterial Ubiquitin Ligase IpaH9.8."** *Cell Host Microbe* **22**(4): 507-518 e505.
358. Wang, B. (2018). Improving Crispr-Cas9's Rate of Homology-Directed Repair. *Genetic Engineering & Biotechnology News*, Mary Ann Liebert, Inc. **38**.
359. Wang, D., Zhang, C., Wang, B., Li, B., Wang, Q., Liu, D., Wang, H., Zhou, Y., Shi, L., Lan, F. and Wang, Y. (2019). **"Optimized Crispr Guide Rna Design for Two High-Fidelity Cas9 Variants by Deep Learning."** *Nat Commun* **10**(1): 4284.
360. Wang, H. W. and Wang, J. W. (2017). **"How Cryo-Electron Microscopy and X-Ray Crystallography Complement Each Other."** *Protein Sci* **26**(1): 32-39.
361. Wang, H. Z., K. (2017). **"Overview of Interferon: Characteristics, Signaling and Anti-Cancer Effect."** *Arch Biotechnol Biomed.*(1): 001-016.
362. Wehner, M., Kunzelmann, S. and Herrmann, C. (2012). **"The Guanine Cap of Human Guanylate-Binding Protein 1 Is Responsible for Dimerization and Self-Activation of GTP Hydrolysis."** *FEBS J* **279**(2): 203-210.
363. Weiss, L. M. and Dubey, J. P. (2009). **"Toxoplasmosis: A History of Clinical Observations."** *Int J Parasitol* **39**(8): 895-901.

Literaturverzeichnis

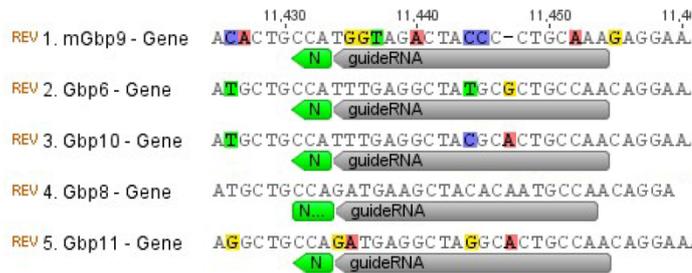
364. West, S. A., Smith, T. G. and Read, A. F. (2000). **"Sex Allocation and Population Structure in Apicomplexan (Protozoa) Parasites."** *Proc Biol Sci* **267**(1440): 257-263.
365. WHO. (2016). "Who Guidelines for the Treatment of Chlamydia Trachomatis." from <https://www.who.int/reproductivehealth/publications/rts/chlamydia-treatment-guidelines/en/>.
366. Wichels, A., Biel, S. S., Gelderblom, H. R., Brinkhoff, T., Muyzer, G. and Schutt, C. (1998). **"Bacteriophage Diversity in the North Sea."** *Appl Environ Microbiol* **64**(11): 4128-4133.
367. Wiesenfeld, H. C., Heine, R. P., Krohn, M. A., Hillier, S. L., Amortegui, A. A., Nicolazzo, M. and Sweet, R. L. (2002). **"Association between Elevated Neutrophil Defensin Levels and Endometritis."** *J Infect Dis* **186**(6): 792-797.
368. Wilkinson, G. W., Tomasec, P., Stanton, R. J., Armstrong, M., Prod'homme, V., Aicheler, R., McSharry, B. P., Rickards, C. R., Cochrane, D., Llewellyn-Lacey, S., Wang, E. C., Griffin, C. A. and Davison, A. J. (2008). **"Modulation of Natural Killer Cells by Human Cytomegalovirus."** *J Clin Virol* **41**(3): 206-212.
369. Witkin, S. S., Minis, E., Athanasiou, A., Leizer, J. and Linhares, I. M. (2017). **"Chlamydia Trachomatis: The Persistent Pathogen."** *Clin Vaccine Immunol* **24**(10).
370. Wu, J. and Chen, Z. J. (2014). **"Innate Immune Sensing and Signaling of Cytosolic Nucleic Acids."** *Annu Rev Immunol* **32**: 461-488.
371. www.ppdictionary.com. (2020). "Chlamydia Pneumoniae." Retrieved 21.09.2020, 2020, from <https://ppdictionary.com/bacteria/bwum/pneumoniae.htm>.
372. Wyrick, P. B. (2010). **"Chlamydia Trachomatis Persistence in Vitro: An Overview."** *J Infect Dis* **201 Suppl 2**: S88-95.
373. Xu, J., Lian, W., Jia, Y., Li, L. and Huang, Z. (2017). **"Optimized Guide Rna Structure for Genome Editing Via Cas9."** *Oncotarget* **8**(55): 94166-94171.
374. Xu, X., Duan, D. and Chen, S. J. (2017). **"Crispr-Cas9 Cleavage Efficiency Correlates Strongly with Target-Sgrna Folding Stability: From Physical Mechanism to Off-Target Assessment."** *Sci Rep* **7**(1): 143.
375. Yamamoto, M., Okuyama, M., Ma, J. S., Kimura, T., Kamiyama, N., Saiga, H., Ohshima, J., Sasai, M., Kayama, H., Okamoto, T., Huang, D. C., Soldati-Favre, D., Horie, K., Takeda, J. and Takeda, K. (2012). **"A Cluster of Interferon-Gamma-Inducible P65 Gtpases Plays a Critical Role in Host Defense against Toxoplasma Gondii."** *Immunity* **37**(2): 302-313.
376. Yamamoto, Y. and Gerbi, S. A. (2018). **"Making Ends Meet: Targeted Integration of DNA Fragments by Genome Editing."** *Chromosoma* **127**(4): 405-420.
377. Yarovinsky, F. (2014). **"Innate Immunity to Toxoplasma Gondii Infection."** *Nat Rev Immunol* **14**(2): 109-121.
378. Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hienny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S. and Sher, A. (2005). **"Tlr11 Activation of Dendritic Cells by a Protozoan Profilin-Like Protein."** *Science* **308**(5728): 1626-1629.

379. Young, H. A. and Hardy, K. J. (1995). **"Role of Interferon-Gamma in Immune Cell Regulation."** *J Leukoc Biol* **58**(4): 373-381.
380. Yu, Y., Clippinger, A. J. and Alwine, J. C. (2011). **"Viral Effects on Metabolism: Changes in Glucose and Glutamine Utilization During Human Cytomegalovirus Infection."** *Trends Microbiol* **19**(7): 360-367.
381. Yurochko, A. D. (2008). **"Human Cytomegalovirus Modulation of Signal Transduction."** *Curr Top Microbiol Immunol* **325**: 205-220.
382. Zeng, B., Shi, S., Ashworth, G., Dong, C., Liu, J. and Xing, F. (2019). **"Ilc3 Function as a Double-Edged Sword in Inflammatory Bowel Diseases."** *Cell Death Dis* **10**(4): 315.
383. Zhang, J. M. and An, J. (2007). **"Cytokines, Inflammation, and Pain."** *Int Anesthesiol Clin* **45**(2): 27-37.
384. Zhang, T., Wolfe, C., Pierle, A., Welle, K. A., Hryhorenko, J. R. and Ghaemmaghami, S. (2017). **"Proteome-Wide Modulation of Degradation Dynamics in Response to Growth Arrest."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**(48): E10329-E10338.
385. Zhang, X. H., Tee, L. Y., Wang, X. G., Huang, Q. S. and Yang, S. H. (2015). **"Off-Target Effects in Crispr/Cas9-Mediated Genome Engineering."** *Mol Ther Nucleic Acids* **4**: e264.
386. Zhu, J. and Paul, W. E. (2010). **"Heterogeneity and Plasticity of T Helper Cells."** *Cell Res* **20**(1): 4-12.
387. Zhu, Z., Shi, Z., Yan, W., Wei, J., Shao, D., Deng, X., Wang, S., Li, B., Tong, G. and Ma, Z. (2013). **"Nonstructural Protein 1 of Influenza A Virus Interacts with Human Guanylate-Binding Protein 1 to Antagonize Antiviral Activity."** *PLoS One* **8**(2): e55920.
388. Zimmermann, A., Trilling, M., Wagner, M., Wilborn, M., Bubic, I., Jonjic, S., Koszinowski, U. and Hengel, H. (2005). **"A Cytomegaloviral Protein Reveals a Dual Role for Stat2 in Ifn- γ Signaling and Antiviral Responses."** *J Exp Med* **201**(10): 1543-1553.
389. Zimmermann, P., Manz, B., Haller, O., Schwemmle, M. and Kochs, G. (2011). **"The Viral Nucleoprotein Determines Mx Sensitivity of Influenza A Viruses."** *J Virol* **85**(16): 8133-8140.
390. Zou, Z., Meng, Z., Ma, C., Liang, D., Sun, R. and Lan, K. (2017). **"Guanylate-Binding Protein 1 Inhibits Nuclear Delivery of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Virions by Disrupting Formation of Actin Filament."** *J Virol* **91**(16).
391. Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L. and Trono, D. (1998). **"Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient in Vivo Gene Delivery."** *J Virol* **72**(12): 9873-9880.
392. 485 Zündorf, I. and Dingermann, T. (2018). **Crispr/Cas9 Revolutioniert Die Gentechnik!** *trillium Immunologie*.
393. Zurcher, T., Pavlovic, J. and Staeheli, P. (1992). **"Mouse Mx2 Protein Inhibits Vesicular Stomatitis Virus but Not Influenza Virus."** *Virology* **187**(2): 796-800.

Literaturverzeichnis

Anhang

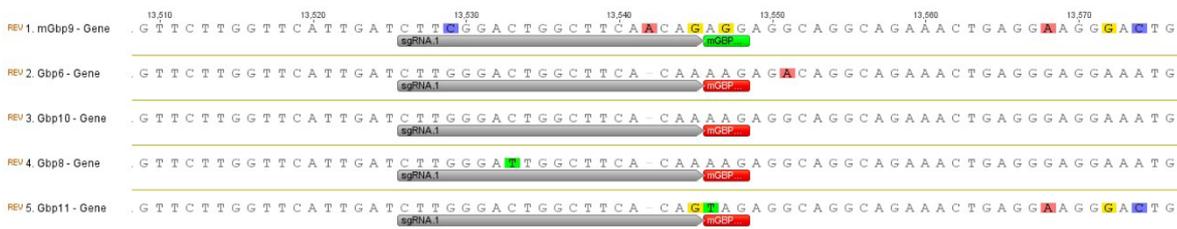
Motiv. Farblich unterlegte Basen sind Unterschiede in der Basensequenz im Vergleich zu den anderen mGBP-Genen.



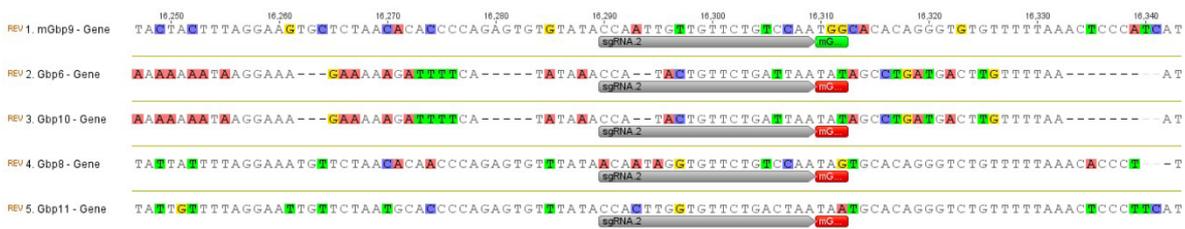
AbbS. 2 Sequenzvergleich der gRNA mit weiteren mGBP-Genen: Strategie 1.

Grauer Pfeil: mGBP9-spezifischer gRNA-Sequenzbereich in den einzelnen mGBP-Genen des Chr5-Clusters.
 Grüner Pfeil: PAM-Motiv (NGG)

vor Exon 3 (← 5'-Ende)

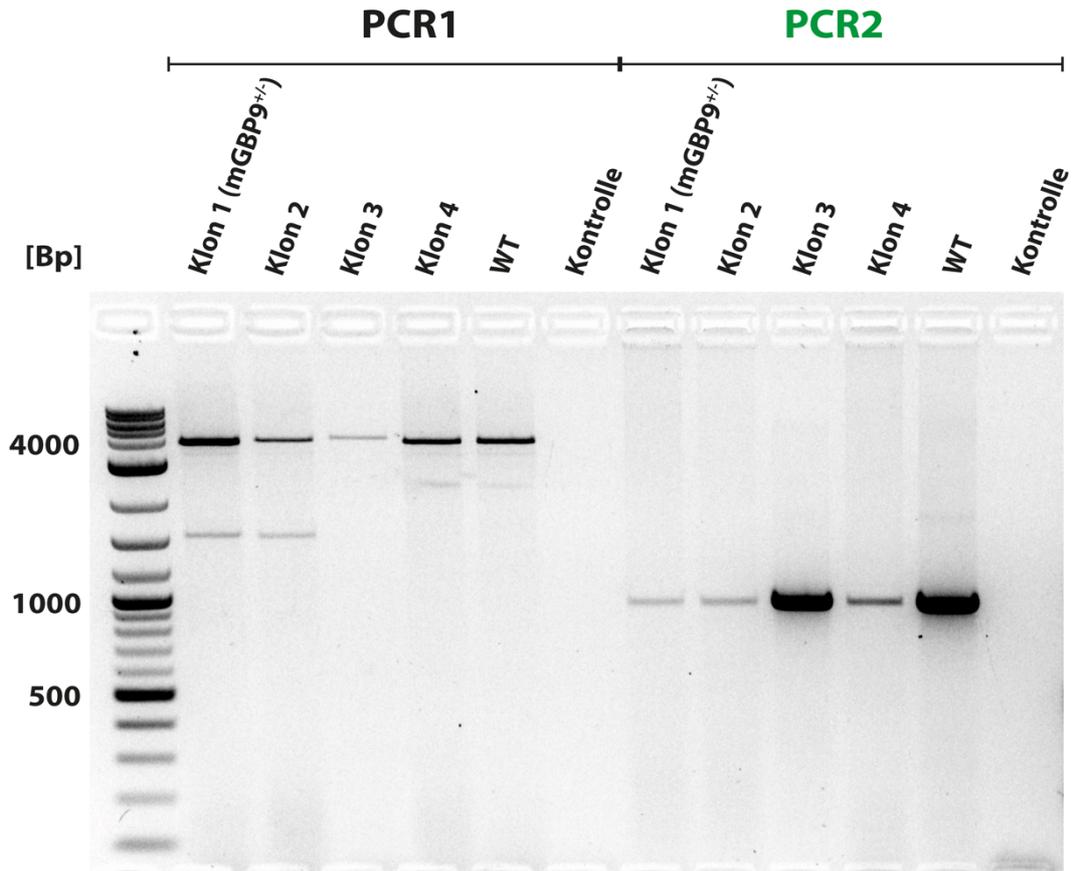


hinter Exon 3 (3'-Ende →)



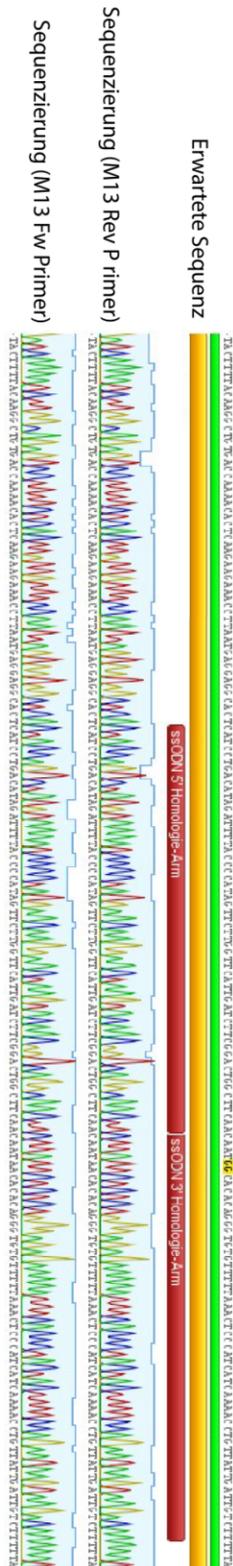
AbbS. 3 Sequenzvergleiche der gRNAs mit weiteren mGBP-Genen: Strategie 2.

Grauer Pfeil: mGBP9-spezifischer gRNA-Sequenzbereich in den einzelnen mGBP-Genen des Chr5-Clusters.
 Grüner Kasten: PAM-Motiv (NGG). Roter Kasten: Verändertes PAM-Motiv. Farblich unterlegte Basen sind Unterschiede in der Basensequenz im Vergleich zu den anderen mGBP-Genen.



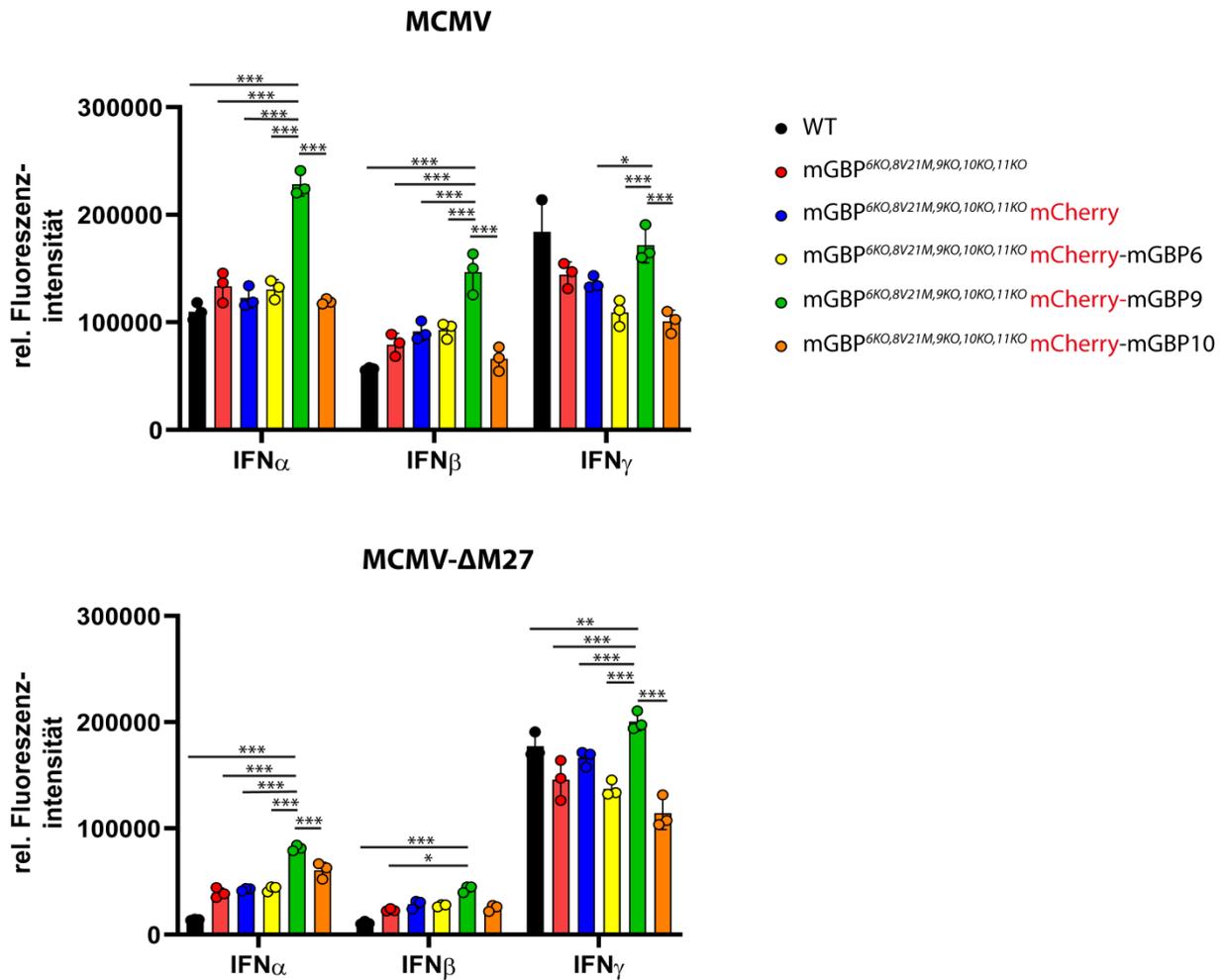
AbbS. 4 PCR-Testverfahren zur Identifikation positiver Klone im zweiten CRISPR/Cas9 Genomeditierungs-Ansatz.

Über zwei spezifische Primer-Paare (Abb. 13 A: Schwarze und grüne Pfeile) wird der CRISPR/Cas9 Ziel-Sequenzbereich des mGBP9 Gens von potentiell mGBP9-defizienten Klonen und mGBP9-wildtypischen (WT) ES-Zellen amplifiziert. Im Falle einer erfolgreichen Genomeditierung wurde das Exon 3 des mGBP9 Gens deletiert. Eine erfolgreiche Deletion kann anhand der in 4.1.2.2 beschriebenen PCR-Fragmentgrößen verifiziert werden. Die PCR-Ansätze mit genomischer DNA von vier ausgewählten Klonen des zweiten CRISPR/Cas9 Genomeditierungs-Ansatzes (Klon 1 – 4) bzw. von WT-Zellen sowie einer H₂O-Kontrolle wurden auf einem 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt. Klon 1 stellt den heterozygot mGBP9-defizienten Klon dar (s. Abb. 13). Die Basenpaarlängen des Markers sind an der linken Seite des Gels angegeben.



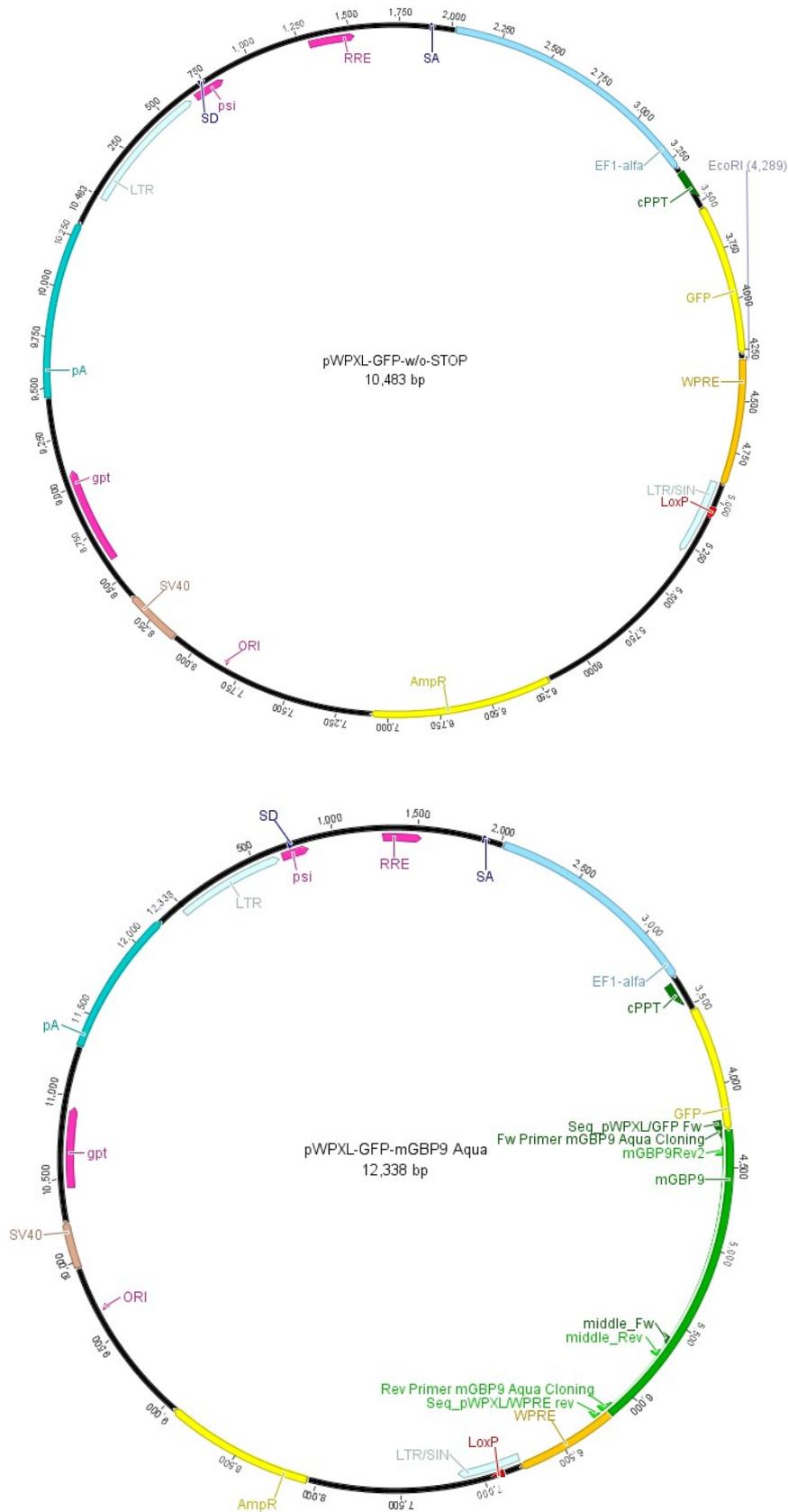
AbbS. 5 Sequenzierungsanalyse der heterozygot mGBP9-defizienten ES Zelllinie.

Der genomische Zielbereich der zweiten CRISPR/Cas9 Genomeditierungs-Strategie wurde nach der Editierung mittels spezifischer Primer amplifiziert und anschließend in den pCR[®]2.1 Vektor kloniert. Die klonierte Zielsequenz wurde anschließend mittels der Primer M13 Fw und M13 Rev sequenziert. Dargestellt ist die mittels Geneious 5.5.6 vorhergesagte Deletionssequenz (Gelb: Erwartete Sequenz) und je Primer exemplarisch ein Ergebnis der Sequenzierungsanalyse. Die roten Kästen (ssODN 5' Homologie-Arm und ssODN 3' Homologie-Arm) stellen das integrierte ssODN dar.



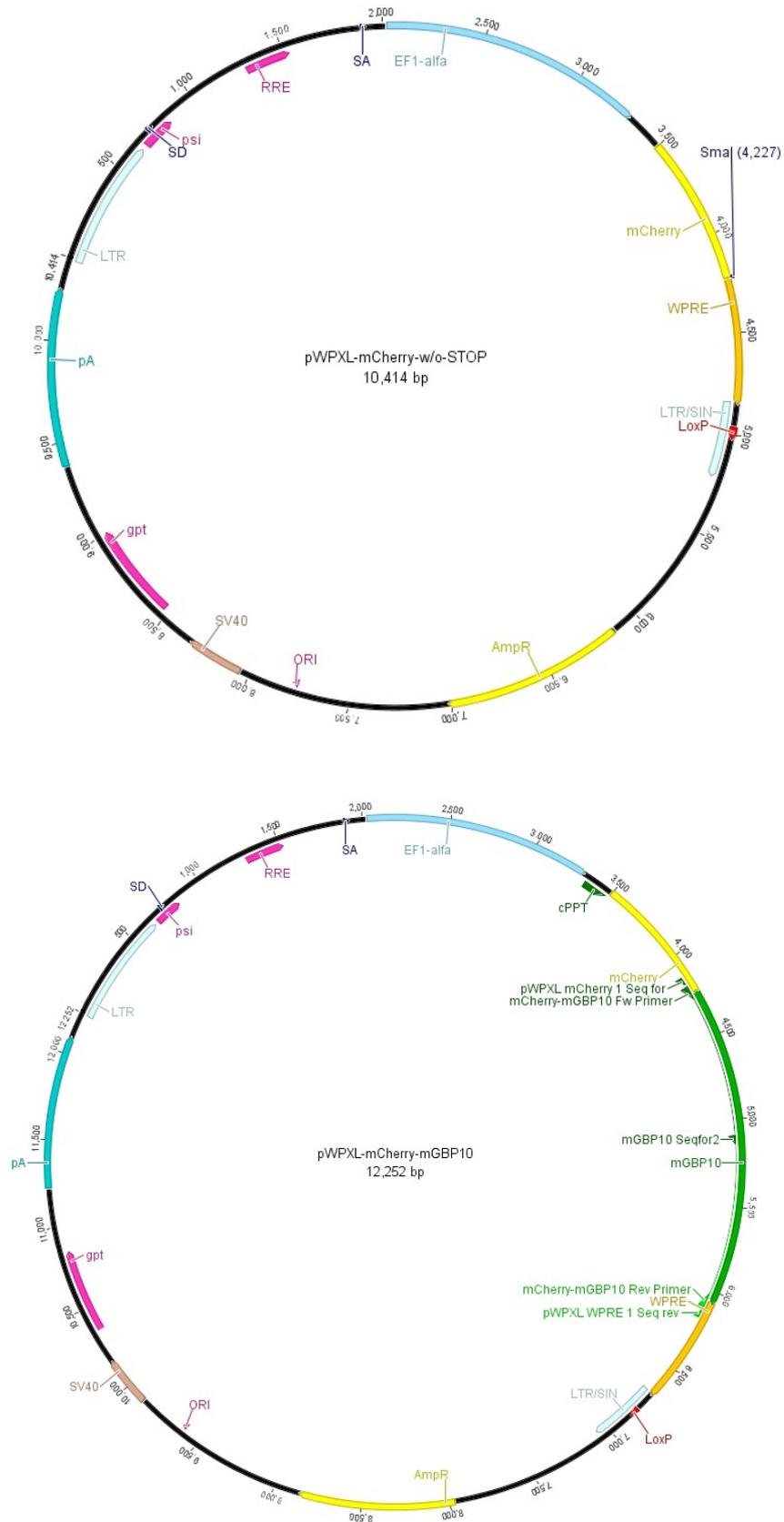
AbbS. 6 Relative Fluoreszenzintensitäten des MCMV Infektionsexperiments.

Das GFP Signal der 96 Well Platten (Abb. 11) wurde mittels Multimode-Reader gemessen. Dargestellt sind die relativen Fluoreszenz-Intensitäten der IFN α - (250 U/ml), IFN β - (250 U/ml) und IFN γ - (500 U/ml) stimulierten Zellen. Gezeigt sind die Daten aus einem Experiment (3 Replikate). Statistische Analyse: Two-way ANOVA. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung der Replikate sowie die statistische Signifikanz (*: $p < 0,033$; **: $p < 0,002$; ***: $p < 0,001$).



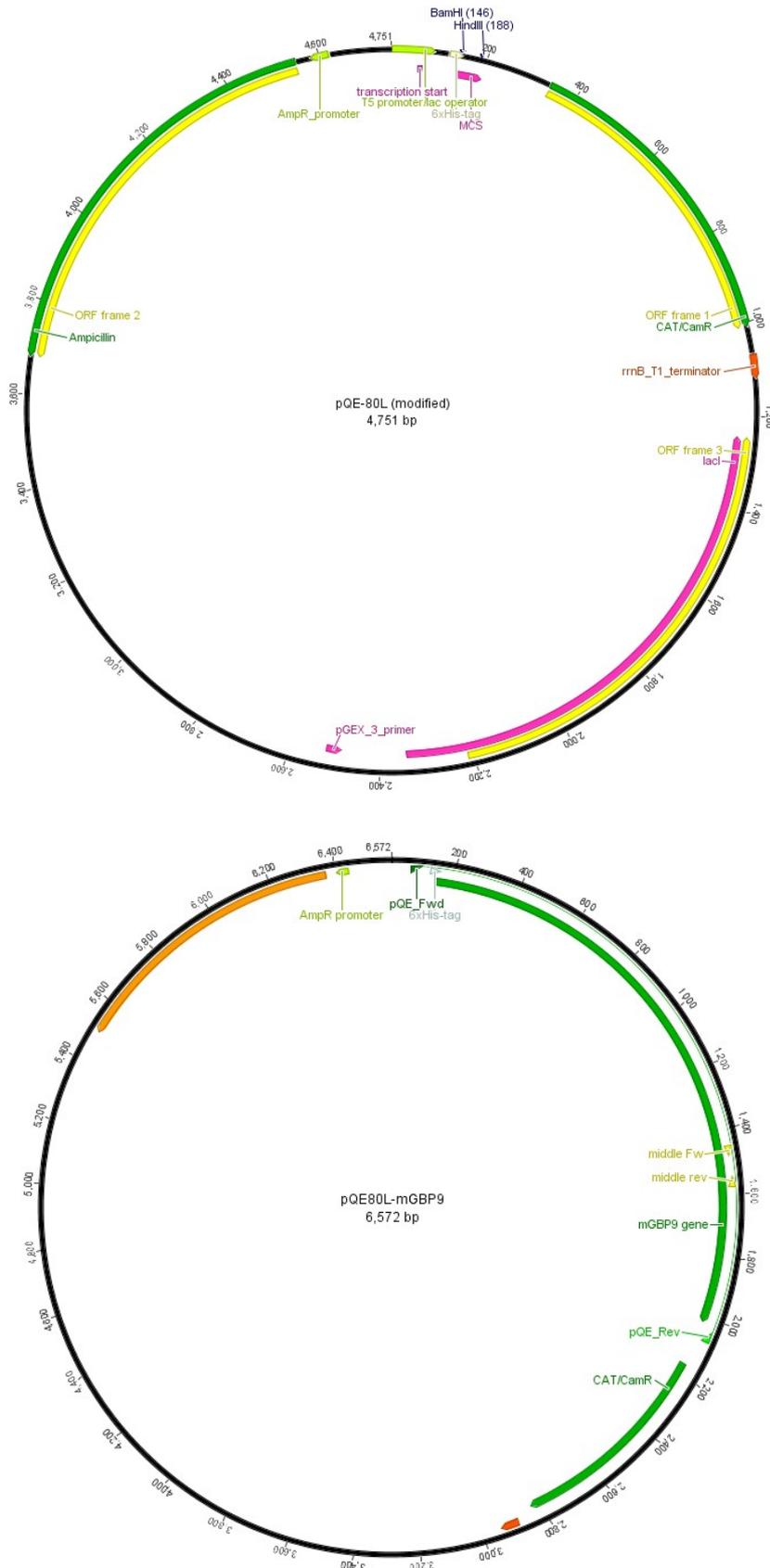
Abbs. 7 Plasmidkarten zur GFP-mGBP9 Fusionskonstrukt-Klonierung.

Oben: pWPXL-GFP (ohne GFP Stopp-Codon) Ausgangsvektor. Unten: pWPXL-GFP-mGBP9 mit mGBP9-Gen als Insertionssequenz. Das Plasmid wurde mittels *AQUA-Cloning* generiert (3.2.8.3). Grüne Pfeile: Klonierungs- und Sequenzierungsprimer.



AbbS. 8 Plasmidkarten zur mCherry-mGBP10 Fusionskonstrukt-Klonierung.

Oben: pWPXL-mCherry (ohne mCherry Stopp-Codon) Ausgangsvektor. Unten: pWPXL-mCherry-mGBP10 mit mGBP9-Gen als Insertionssequenz. Das Plasmid wurde mittels *AQUA-Cloning* generiert (3.2.8.3). Grüne Pfeile: Klonierungs- und Sequenzierungsprimer.



Abbs. 9 Plasmidkarten zur His6-mGBP9 Fusionskonstrukt-Klonierung.

Oben: pQE80L-Leervektor. Unten: pQE80L-Vektor mit mGBP9-Gen als Insertionssequenz. Das Plasmid wurde mittels klassischer Klonierung generiert (3.2.8.1). Grüne/gelbe Pfeile: Sequenzierungsprimer.

Eidesstattliche Erklärung

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 19.05.2021

(Jens Lichte)

Eidesstattliche Erklärung

Danksagung

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Klaus Pfeffer dafür danken, dass du mir die Möglichkeit gegeben hast, meine akademische Laufbahn in diesem tollen Institut beenden zu dürfen. Trotz deines dauerhaft ausgelasteten Terminkalenders und der vielen externen Termine hast du wirklich schöne Atmosphäre geschaffen, die ich sehr vermissen werde. Vielen Dank einfach nochmal für alles.

Des Weiteren geht ein großer Dank auch an meinen Mentor Herrn Prof. Hans Hegemann. Ohne die enge Zusammenarbeit mit seinem Institut hätte der Chlamydien-Forschungsschwerpunkt dieser Arbeit nicht so umfangreich werden können. Außerdem haben die sachlich, kritischen Besprechungen auch gerne mal zu neuen Denkanstößen verholfen. Auch dafür nochmals vielen Dank.

Weiter geht es mit meinem Betreuer Dr. Daniel Degrandi. Bei dir möchte ich mich vor allem für das ständige parat stehen, die vielen offenen Ohren und die Unterstützung bei eigentlichem allem, was ich so angefasst habe, bedanken. Die Zeit mit dir war einfach Grandiosi.

Ein nicht geringerer Dank geht auch an Dr. Katja Möllecken, die für mich die Spezialistin der Chlamydien-Welt ist. Durch die vielen *Brain-Stormings*, aber auch die netten Gespräche zu weniger arbeitsbezogenen Dingen hat mir das Arbeiten bei euch immer sehr viel Freude bereitet.

Natürlich möchte ich mich auch im einzelnen bei der gesamten AG Pfeffer bedanken. Liebe Uschi, ohne dich wäre alles doof, weil niemand sonst wohl das gleiche Tierantrags-Pensum geschafft hätte, schafft oder geschaffen haben wird, wie du. Danke für deine enorme Hilfe und die ein oder andere, wirklich unerwartete Zwerchfell-Massage. Julia, Karin und Nicole, ihr seid einfach am großartigsten. Ohne euch wäre es nur halb so schön und lustig geworden. Ich habe allerdings bis heute nicht verstanden, wie ihr meine blöden Witze ausgehalten habt. Danke euch dreien für die nicht weniger enorme Hilfe im Labor, im Büro und drum herum. Ihr habt mich wirklich gut auf das Leben da draußen vorbereitet.

Es fehlen noch Dr. Anne, Dr. Larissa, Dr. Nora und Dr. Shabnam aus der AG Pfeffer sowie Dr. Lisa und Doktor in Spee Christoph. Vielen Dank, dass ich die Zeit mit euch zusammen durchstehen und Leid und Freud mit euch teilen durfte. Für immer im Herzen.

And last but not least, noch ein besonderer Dank an Sonja, einfach weil es dich gibt, und natürlich an meine Familie, ohne deren Unterstützung ich diese Dissertation wahrscheinlich nicht geschafft hätte.