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

Rekrutierungsfrequenzen von mGBP-Familienmitgliedern an intrazelluläre Pathogene

Dissertation

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

vorgelegt von

Pia Amelie Henze

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

Zweitgutacher/in: Prof. Dr. med. dent. Alfons Hugger

Zusammenfassung

Die Infektion mit *T. gondii* ist nicht nur beim Menschen, sondern auch bei warmblütigen Tieren weltweit verbreitet (Clough and Frickel, 2017). Immunsupprimierte Menschen oder Frauen mit einer erstmaligen Infektion während einer Schwangerschaft gelten als gefährdet, an der Krankheit Toxoplasmose zu erkranken (Kim and Weiss, 2008). Interferon- γ (IFN- γ) spielt eine wichtige Rolle in der Stimulation von Abwehrmechanismen, die die *T. gondii* Replikation und Infektiösität beeinflussen (Clough and Frickel, 2017, Sturge and Yarovinsky, 2014).

Guanylat-bindende Proteine (GBP) sind eine Familie von Dynamin-ähnlichen 65-73 kDa GTPasen, die als Reaktion auf Interferone und andere entzündungsfördernde Zytokine exprimiert werden (Praefcke, 2018, Boehm et al., 1998). Sie wurden als Schlüsselakteure bei der Vermittlung der Wirtsabwehr gegen intrazelluläre Pathogene wie z.B. T. gondii und bestimmte Viren erkannt (Santos and Broz, 2018). Insgesamt wurden 11 unterschiedliche GBPs (mGBP 1-11) bei Mäusen identifiziert, beim Menschen hingegen wurden bisher sieben GBPs (hGBP 1-7) beschrieben (Kresse et al., 2008, Kim et al., 2012). Die Rolle der mGBPs in der Bekämpfung des Erregers T. gondii konnte in Studien nachgewiesen werden (Degrandi et al., 2013). Es ist auch eine direkte Akkumulation von mGBP2 und mGBP7 an die parasitophore Vakuole (PV) beobachtet worden und dass mGBP2 und mGBP7-defiziente Mäuse nach T. gondii Infektion versterben (Steffens, 2020, Degrandi et al., 2007). In dieser Arbeit wurden die Rekrutierungsfrequenzen von mGBP7, mGBP6 und mGBP2 an das intrazelluläre Pathogen T. gondii detailliert untersucht. Dabei wurde eine Quantifizierung der Akkumulation von mGBP6 an die PV vorgenommen. Die Methode der Wahl für die Analyse der Rekrutierungsfrequenzen war in vorherigen Forschungsarbeiten die Auswertung am Konfokalmikroskop. Teil dieser Forschungsarbeit war die Etablierung einer Methode zur vereinfachten Auszählung und Analyse von doppelt, mGBP transduzierten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) unter Verwendung des Keyence Mikroskopsystems. Dafür wurde ein aus mehreren Einzelaufnahmen der Fluoreszenzfärbung zusammengesetztes Übersichtsbild hergestellt, welches über die Fiji-Software ausgewertet werden konnte. Die Ergebnisse der Zelllinien im Vergleich von zwei Stunden und sechs Stunden nach Infektion ergaben unterschiedliche Rekrutierungsfrequenzen der mGBP-Familienmitglieder. Es zeigte sich, dass mGBP2 am häufigsten an die PV rekrutiert wurde, gefolgt von mGBP7 und mGBP6. In beiden Zelllinien konnte eine Zunahme der PVs beobachtet werden, an denen beide mGBP-Fusionsproteine der Zelllinie rekrutiert wurden. Auffällig war, dass die Anzahl der doppelt positiven PVs bei den mGBP7-defizienten MEFs, die mit mGBP7 und mGBP2 kotransduziert worden sind, zu beiden Messzeitpunkten deutlich höher war als bei der mGBP7/mGBP6 transduzierten Vergleichs-Zelllinie.

Summary

T. gondii infection is common not only in humans but also in warm-blooded animals worldwide (Clough and Frickel, 2017). Immunocompromised individuals or women with a first-time infection during pregnancy are particularly considered at risk for contracting toxoplasmosis. Interferon- γ (IFN- γ) plays a role in stimulating defense mechanisms that affect *T. gondii* replication and infectivity (Clough and Frickel, 2017, Sturge and Yarovinsky, 2014).

Guanylate-binding proteins (GBPs) are a family of dynamin-like 65-73 kDa GTPases expressed in response to interferons and other pro-inflammatory cytokines (Praefcke, 2018, Boehm et al., 1998). They have been recognized as key players in mediating host defense against intracellular pathogens such as T. gondii and certain viruses (Santos and Broz, 2018). A total of 11 distinct GBPs (mGBP 1-11) have been identified in mice, in contrast, 7 GBPs (hGBP 1-7) have been described in humans to date (Kresse et al., 2008, Kim et al., 2012). The role of mGBPs in the control of the pathogen T. gondii has been demonstrated in studies. It has been shown that mGBP2 and mGBP7 accumulate directly to the parasitophoric vacuole (PV) and that mGBP2 and mGBP7-deficient mice die after T. gondii infection (Steffens, 2020, Degrandi et al., 2007). In this work, the recruitment frequencies of mGBP7, mGBP6, and mGBP2 to the intracellular pathogen T. gondii was investigated. In previous research, the method of choice for analyzing recruitment frequencies was confocal microscope evaluation. Part of this research was to establish a method for simplified enumeration and analysis of doubly transduced MEFs using the Kevence microscope system. For this purpose, an overview image composed of several individual fluorescence staining images was produced which could be analyzed using the Fiji software. The results of the two cell lines compared at two hours and six hours post-infection showed different recruitment frequencies of mGBP family members. It was found that mGBP2 was most frequently recruited to the PV, followed by mGBP7 and mGBP6. In both cell lines, an increase in the number of PVs to which both mGBP fusion proteins were recruited was observed. Strikingly, the number of double-positive PVs in mGBP7-deficient MEFs cotransduced with mGBP7 and mGBP2 was significantly higher than in the mGBP7/mGBP6 transduced comparison cell line at both measurement time points.

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat	
°C	Grad Celsius	
3D	Dreidimensional	
cDNA	DNA-Kopie der mRNA	
d	Tag	
DAPI	4',6-Diamidine-2'phenylindol	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	
E-Domäne Effektor Domäne		
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
EMCV	Encephalomyokarditisvirus	
FKS	Fötales Kälberserum	
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer	
G-Domäne	Guanosintriphosphat-bindendes Protein Domäne	
GBP	Guanylat-bindendes Protein	
GDP	Guanosindiphosphat	
GFP	grün fluoreszierendes Protein	
GMP	Guanosinmonophosphat	
GPI	Glycosylphophatidylinositol	
GTP	Guanosintriphosphat	
h	Stunde(n)	
HeLa-Zelllinie	Zervixkarzinomzellen von Henrietta Lacks	
hGBP	humanes GBP	
IFN	Interferon	
IFNGR1/2	Interferon Gamma Rezeptor Ketten 1 und 2	
IL	Interleukin	
IRF1	Interferon regulatory factor 1	
IRGs	immunity related GTPases	
JAK	Januskinase	
JAK1/2	Januskinase 1/2	
kDA	Kilodalton	
KI	Künstliche Intelligenz	
КО	knockout	
KoIP	Ko-Immunpräzipitation	
LPS	Lipopolysaccharid	
Μ	Molar	

mCH	mCherry		
MEF	murine embryonale Fibroblasten		
mGBP	murines GBP		
min	Minute(n)		
ml	Milliliter		
MOI	Multiplicity of Infection		
mRNA	messenger Ribunucleic Acid (Boten RNS)		
NK-Zelle	Natural Killer Zelle		
nm	nanometer		
ns	nicht signifikant		
NuRD	Nucleosome Remodeling and Deacetylase		
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung		
PFA	Paraformaldehyd		
PV	Parasitophore Vakuole		
PVM	parasitophore Vakuolen-Membran		
RNA	Ribonukleinsäure		
ROP	Rhoptry bulb Protein		
rpm	round per minutes		
RT	Raumtemperatur		
SD	Standardabweichung		
sek	Sekunde(n)		
SIM	Structured Illumination Microscopy		
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription		
STED	Stimulated Emission Depletion Microscopy		
T. gondii	Toxoplasma gondii		
TgIST	Toxoplasma Inhibitor of STAT-1-dependent transcription		
TLRs	Toll-like Rezeptoren		
TNF	Tumor Nekrose Faktor		
U	Units		
v/v	Volumen/Volumen		
VLIG	very large inducible GTPases		
VLS	vesicle like structures		
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus		
WT	Wildtyp		

Inhaltsverzeichnis

1	Einl	leitung	1
	1.1	Der intrazelluläre Parasit Toxoplasma gondii	1
	1.2	Invasion der Wirtzelle durch <i>T. gondii</i>	2
	1.3	Der Lebenszyklus von <i>T. gondii</i>	4
	1.4	Der Zetelen IFN wend eine Delle bei der Abereheren T ein die	······································
	1.4	Das Zytokin IFN-y und seine Rolle bei der Abwehr von T. gondu	6
	1.5	Die Guanylat-bindenden Proteine und ihre Rolle bei der Abwehr	gegen
	intraz	elluläre Pathogene	9
	1.6	Konfokal- und Weitfeld-Mikroskopietechniken	16
	1.7	Zielsetzung der Arbeit	19
2	Mat	erial und Methoden	21
	2.1	Material	21
	2.1.1	Chemikalien	21
	2.1.2	Antikörper	21
	2.1.3	Reagenzien und Verbrauchsmaterial	22
	2.1.4	Geräte	22
	2.2	Medien und Puffer	23
	2.2.1	Indirekte Immunfluoreszenz	23
	2.2.2	Medien für Zellkulturen	23
	2.3	Verwendete Zelllinien und Toxoplasma gondii	24
	2.3.1	Zelllinien	24
	2.3.2	Toxoplasmenstamm	24
	2.4	Software	24
	2.5	Methoden	24
	2.5.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	24
	2.5.2	Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen	25
	2.5.3	Kultivierung von <i>T. gondii</i>	25
	2.5.4	In vitro-Infektion mit <i>T. gondii</i>	25
	2.5.5	Immunfluoreszenzfärbung für die mikroskopische Analyse am Keyence-	
	Mik	roskop.	26
	2.5.6	Statistische Analyse	27
			V

3 Ergebnisse	
--------------	--

4

3.1 Die Rekrutierungsfrequenzen von mGBP7, mGBP6 und mGBP2 mit dem
obligat intrazellulären Parasiten <i>T. gondii</i>
3.1.1 Versuchsaufbau: Fluoreszenz-mikroskopische Analysen der Rekrutierung von
mGBP7, mGBP6 und mGBP2 an <i>T. gondii</i> 28
3.1.2 Quantitative Auswertungen der Rekrutierung von mGBP7 und mGBP6 an die <i>T</i> .
gondii PV 35
3.1.3 Vergleich der absoluten und relativen Rekrutierungsfrequenzen von GFP-mGBP7
und mCherry-mGBP6 zwei und sechs Stunden nach Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i> 37
3.1.4 Quantitative Auswertungen der Rekrutierung von mGBP7 und mGBP2 an die <i>T</i> .
gondä PV 38
3.1.5 Vergleich der absoluten und relativen Rekrutierungsfrequenzen von GFP-mGBP7
und mCherry-mGBP2, zwei und sechs Stunden nach Infektion mit <i>T. gondii</i> 39
3.1.6 Vergleich der Rekrutierungsfrequenzen in mGBP7-defizienten MEFs zwei Stunden
nach T. gondii-Infektion: GFP-mGBP7/mCherry-mGBP6 vs. GFP-mGBP7/mCherry-
mGBP2 41
3.1.7 Vergleich der Rekrutierungsfrequenzen in mGBP7-defizienten MEFs sechs
Stunden nach <i>T. gondii</i> -Infektion: GFP-mGBP7/mCherry-mGBP6 vs. GFP-
mGBP7/mCherry-mGBP2 45
Diskussion 49
4.1 Quantitative Untersuchung der Rekrutierung von mGBP/ und mGBP6 an die
<i>T. gondü</i> PV nach zwei und sechs Stunden: Analyse des gegenseitigen Einflusses zweier
mGBP-Familienmitglieder
4.2 Quantitative Untersuchung der Rekrutierung von mGBP7 und mGBP2 an die
T. gondii PV nach zwei und sechs Stunden: Analyse des gegenseitigen Einflusses zweier
mGBP-Familienmitglieder
4.3 Vandeich der Delynytionungefrequenzen von mCDD7/mCDD6 und
4.5 vergieich der Kekruterungstrequenzen von mGBF//mGBF0 und
mGBP2/mGBP7 hach zwei und sechs Stunden in den transduzierten Zeillinien hach 7.
gondu Intektion
4.4 mGBP-Rekrutierung bei anderen intrazellulären Infektionserregern
4.5 Ausblick und Schlussfolgerungen

5	Lite	eraturverzeich	nis					69
	5.1	Abbildungsv	erzeichnis					81
	5.2	Tabellenverz	eichnis					
6	Anl	nang						85
	6.1	Graphische	Darstellung	und	statistische	Auswertung	der	verglichenen
	Rekru	ıtierungsfrequ	enzen					

1 Einleitung

1.1 Der intrazelluläre Parasit Toxoplasma gondii

Toxoplasma gondii ist ein weltweit vorkommendes, intrazelluläres Protozoon, das zur Gruppe der Apicomplexa gehört (Black and Boothroyd, 2000). Dieses Phylum besteht aus einzelligen Parasiten, die sich durch einen Wechsel zwischen sexueller und asexueller Fortpflanzung vermehren, was normalerweise mit einem Wirtswechsel verbunden ist (Black and Boothroyd, 2000). Charakteristisch für Apicomplexa ist der Apikalkomplex, der ihnen während bestimmter Phasen ihres Lebenszyklus zur Wirtszellinvasion dient (Katris et al., 2014). *T. gondii* wurde erstmals 1908 von Charles Nicolle und Louis Manceaux aus einem afrikanischen Nagetier isoliert und entsprechend seiner Form als *Toxoplasma* (griechisch toxon, Bogen) benannt (Black and Boothroyd, 2000).

Aufgrund seiner Fähigkeit, fast alle warmblütigen Wirbeltiere zu infizieren und seines breiten Wirtsspektrums hat Toxoplasma sich zu einem der weltweit am weitesten verbreiteten Parasiten entwickelt (Weiss and Dubey, 2009). Es gibt drei charakterisierte Toxoplasma-Linien, die bisher zwischen den in Europa und Nordamerika verbreiteten Parasiten unterschieden wurden. Obwohl sie starke phänotypische und genetische Ähnlichkeiten aufweisen, unterscheiden sie sich in etwa 1 % ihres Genoms (Darde et al., 1992, Howe and Sibley, 1995, Sibley et al., 2009). Dabei ist die Typ-II Linie die häufigste, die den Menschen infiziert (Sibley et al., 2009, Howe and Sibley, 1995). Die drei verschiedenen Stämme weisen eine unterschiedliche Virulenz auf, wobei Parasiten vom Typ-I am tödlichsten sind und Typ-II und Typ-III Parasiten weniger virulent sind (Howe and Sibley, 1995, Sibley and Ajioka, 2008). T. gondii hat ein breites Wirtsspektrum, jedoch sind nur Katzenartige (Feliformia) die Endwirte für die sexuelle Vermehrung (Dubey et al., 1970, Jones and Dubey, 2012, Su et al., 2003, Frenkel, 1970). Etwa ein Drittel der Weltbevölkerung ist mit T. gondii infiziert (Weiss and Dubey, 2009). In Europa beobachtet man eine Zunahme der Durchseuchungsrate mit zunehmendem Lebensalter, es gibt jedoch vereinzelte Studien, die auf einen rückläufigen Trend der Seroprävalenz in verschiedenen europäischen Ländern hinweisen. In Deutschland erhöht sich die Durchseuchungsrate bei Erwachsenen (ab 18 Jahren) pro Lebensjahr um etwa 1% und bei Menschen über 70 Jahren erreicht sie mehr als 70% (die durchschnittliche Seroprävalenz bei Erwachsenen beträgt 50%). Im internationalen Vergleich liegt diese Rate in Deutschland signifikant über den Werten in den USA (9%) und den Niederlanden (26%), wo vergleichbare Daten verfügbar sind. Darüber hinaus ist die Seroprävalenz sowohl bei Männern als auch bei Frauen im Osten Deutschlands deutlich höher als im Westen (Robert Koch Institut, 2018).

Besonders gefährlich ist die Erstinfektion während der Schwangerschaft, da der Parasit durch die Plazenta auf das ungeborene Kind übertragen werden kann und im schlimmsten Fall zu Fehlgeburten oder schwerwiegenden Missbildungen führt (Kieffer and Wallon, 2013, Thiebaut et al., 2007). Auch immungeschwächte Personen sind gefährdet, da die Infektion gravierende Komplikationen verursachen kann, wie zum Beispiel eine lebensbedrohliche zerebrale Toxoplasmose, die sich klinisch als Enzephalitis manifestiert (Weiss and Dubey, 2009). Bei immunkompetenten Personen verläuft die Infektion hingegen meist asymptomatisch oder äußert sich nur mit leichten, grippeähnlichen Symptomen (Mamidi et al., 2002).

In den letzten Jahren hat die Forschung zu *T. gondii* aufgrund der hohen Risiken, die mit einer kongenitalen Toxoplasmose sowie einer Infektion bei immunsupprimierten Individuen verbunden sind, an wissenschaftlicher und klinischer Bedeutung gewonnen. *T. gondii* hat sich auch als Modellorganismus etabliert, da neuere Techniken eine einfachere genetische Manipulation im Vergleich zu anderen Apicomplexa ermöglichen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die ungeschlechtliche Vermehrung von *T. gondii* in Zwischenwirtszellen in Zellkultur durchgeführt werden kann (Kim and Weiss, 2008).

1.2 Invasion der Wirtzelle durch T. gondii

Um in eine Wirtszelle einzudringen, nutzt *T. gondii* einen parasitengetriebenen Invasionsprozess, bei dem eine Invagination der Wirtsmembran erfolgt. Dabei entsteht eine parasitäre Vakuole (PV), die eine Mischung aus Wirtsmembranlipiden und von dem Parasiten freigesetzten Produkten enthält. Dieser Prozess läuft unabhängig von der Phagozytose ab und erfordert nicht die Bildung eines Phagosoms (Dobrowolski and Sibley, 1996, Mordue et al., 1999, Mordue and Sibley, 1997). Frühere Studien zeigen, dass dieser aktive Invasionsprozess dazu beiträgt, dass *T. gondii* in der Lage ist, fast alle Zellen von warmblütigen Wirbeltieren zu infizieren und sich in diesen zu vermehren (Morisaki et al., 1995, Werk, 1985). Um in Wirtszellen einzudringen, muss ein intrazellulärer Erreger zunächst engen Kontakt mit der Zelloberfläche herstellen. Da die Lipidmembranen des Wirts und des Erregers normalerweise eine negative Nettoladung aufweisen, sind Rezeptor-Liganden-Interaktionen erforderlich, um diese abstoßende Kraft zu überwinden und die feste Bindung zu erreichen, die für Motilität und Invasion erforderlich ist (Black and Boothroyd, 2000). Wie oben bereits erwähnt, ist *T. gondii* unter den bekannten intrazellulären Erregern ungewöhnlich promiskuitiv in seiner Fähigkeit, eine Vielzahl von Wirtszellen zu infizieren. Wenn er *in vitro* kultiviert wird, ist dieser Parasit in der Lage, fast jeden Säugetierzelltyp sowie Insekten- und Fischzelllinien zu infizieren (Werk, 1985, Buckley, 1973). Um diese breite Palette an potenziellen Wirtszellen zu infizieren, müsste Toxoplasma entweder mehrere Rezeptoren für eine Vielzahl von Liganden haben oder einige Rezeptoren exprimieren, die an Liganden binden, die für zahlreiche Zelltypen gemeinsam sind. Um zwischen diesen beiden Szenarien zu unterscheiden, wurde die Oberfläche von Toxoplasma umfassend charakterisiert, um die an diesem Prozess beteiligten Komponenten zu identifizieren (Boothroyd et al., 1998). Die Plasmamembran dieses Parasiten hauptsächlich die besteht aus einer Vielzahl von Proteinen, durch ein Glycosylphophatidylinositol (GPI)-Molekül mit der Membran verbunden sind. Nach Identifizierung der Gene für diese Proteine wurde festgestellt, dass die meisten der Oberflächenproteine aus einer Proteinfamilie bestehen, die mit dem Oberflächenantigen SAG1 verwandt sind (Manger et al., 1998). SAG1 ist das häufigste dieser Oberflächenproteine (May, 2018) und ist zumindest teilweise an den initialen Anheftungsereignissen an die Wirtsmembran beteiligt (Mineo et al., 1993, Mineo and Kasper, 1994, Robert et al., 1991, Grimwood and Smith, 1992).

Die Parasiten bilden bei Infektion der Wirtszelle durch Invagination der Zellmembran des Wirts eine parasitophore Vakuole aus (Clough and Frickel, 2017). Als apikomplexer Parasit dringt *Toxoplasma* aktiv in die Wirtszelle ein. Die PV selbst entsteht durch Einwölbung der Plasmamembran der Wirtszelle in einem Prozess, der innerhalb von 25-40 Sekunden abgeschlossen ist (Morisaki et al., 1995). Sobald der Parasit in die Wirtszelle eingedrungen ist, repliziert er sich schnell innerhalb der PV, was letztendlich zur Ruptur der PV-Membran (PVM) und zum Austritt der *Tachyzoiten* führt (Clough and Frickel, 2017). Die PV ist eine essenzielle Barriere zwischen *Toxoplasma* und seinem Wirt. Der Parasit bezieht über die PV die benötigten Ressourcen, um zu überleben und sich zu vermehren. Dabei nutzt er größere Nährstoffe und Moleküle, die sich im Zytoplasma seines Wirts befinden. Wenn sich der Wirt jedoch verteidigt, kann er den Parasiten abwehren und sogar über weitgehend noch unbekannte Mechanismen abtöten. In diesem Fall dient die PVM als Erkennungsmerkmal für die Zellen des Wirts (Clough and Frickel, 2017).

Nachdem intrazelluläre Pathogene in eine Zelle gelangt sind, werden sie mit dem Endozytoseapparat konfrontiert, der das aufgenommene Material (einschließlich des phagozytierten Mikroorganismus) abbaut. Wenn eine Vakuole durch rezeptorvermittelte Endozytose gebildet wird, wird das Lumen des Kompartiments durch ATP-getriebene Protonenpumpen aus der Plasmamembran schnell angesäuert (Mellman et al., 1986). Diese saure Umgebung spielt eine entscheidende Rolle bei der Vorbereitung der Vakuole auf die

Fusion mit Lysosomen, die hydrolytische Enzyme tragen. Da das Repertoire an Wirtszellen von Toxoplasma professionelle Phagozyten umfasst, muss der Parasit eine Vielzahl zusätzlicher antimikrobieller Effektoren umgehen, einschließlich reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffzwischenprodukte (Black et al., 2000). Die während der Invasion von Toxoplasma gebildete Vakuole (Lingelbach and Joiner, 1998) ist ungewöhnlich, da sie weder ansäuert (Sibley et al., 1985b) noch mit irgendeinem zytoplasmatischen Vesikel verschmilzt (Sibley et al., 2009), auch nicht mit solchen, die zum Zeitpunkt des Parasiteneintritts aufgenommen werden (Sibley et al., 1985a, Jones et al., 1972). Wenn opsonierte Parasiten phagozytiert werden, bildet sich eine Vakuole, die räumlich von der engeren PV abgegrenzt ist. Sobald der Parasit von einem Phagosom aufgenommen wird, wird dieses schnell angesäuert und der Parasit verdaut (Mordue and Sibley, 1997, Morisaki et al., 1995). Um eine Ansäuerung und endozytische Verarbeitung zu verhindern, muss die PV, die durch die Invasion des Parasiten gebildet wird, entweder Protonenpumpen und Oberflächenproteine ausschließen oder eliminieren, die für die Vesikelfusion benötigt werden. Diese Hypothese wird gestützt durch die Beobachtung, dass eine neu gebildete PV glatt und fast vollständig frei von intramembranösen Partikeln ist (Dubremetz et al., 1993).

1.3 Der Lebenszyklus von T. gondii

Toxoplasma ist in der Lage, nahezu jede kernhaltige Zelle von Säugetieren oder Vögeln zu infizieren und sich darin zu vermehren (Dubey, 1998a, Wong and Remington, 1993). Der Lebenszyklus besteht aus einer sexuellen Vermehrung in felinen und einer asexuellen Vermehrung in nicht felinen Zellen (Black and Boothroyd, 2000). Innerhalb seines komplexen Lebenszyklus differenziert *Toxoplasma* in drei unterschiedlichen Stadien. Die infektiösen Stadien dieses einzelligen Parasiten sind *Tachyzoiten* (asexuell), *Bradyzoiten* (asexuell, in Gewebezysten) und *Sporozoiten* (sexuelle Fortpflanzung, in Ooczysten) (Weiss and Kim, 2000).

Während der akuten Infektionsphase differenziert *T. gondii* zu *Tachyzoiten*. In diesem Entwicklungsstadium zeigen sie eine hohe Replikationsrate in der parasitophoren Vakuole, wobei sie sich ungeschlechtlich durch Längenteilung (Endodyogenie) innerhalb von fünf bis neun Stunden replizieren (Dobrowolski and Sibley, 1996, Steffens, 2020). Durch Ruptur der Wirtszelle kommt es zur Freisetzung der Parasiten. Dies ermöglicht die Infektion weiterer Zellen und die Ausbreitung in weitere Organsysteme (Frenkel, 1988). Nach der Infektion eines Tieres differenzieren sich *Tachyzoiten* unter Druck des Immunsystems zu *Bradyzoiten* und

bilden Gewebezysten, die nach 7 bis 10 Tagen erstmals auftreten. Diese Zysten werden hauptsächlich im zentralen Nervensystem und Muskelgewebe gefunden und können während des gesamten Lebens des Wirts bestehen bleiben (Dubey, 1998b). Die Entwicklung von Gewebezysten im gesamten Körper kennzeichnet die chronische Phase der Infektion (Black et al., 2000). Obwohl sich Tachyzoiten und Bradyzoiten phänotypisch nur geringfügig unterscheiden, gibt es einen Unterschied in der Expression von spezifischen Proteinen, die für jedes Stadium charakteristisch sind. Tachyzoiten exprimieren hauptsächlich das Protein SAG1, während Bradyzoiten hauptsächlich das Protein BAG1 exprimieren. Dadurch können sie unterschieden werden (Kim and Weiss, 2008). Während des Bradyzoitenstadiums wird die parasitophore Vakuole zu einer Zystenhülle umgebildet (Dubey, 1998b, Ferguson and Hutchison, 1987). Innerhalb dieser Zyste vermehren sich die Bradyzoiten zwar auch durch Endodvogenie, jedoch mit einer stark reduzierten Replikationsrate, was für die chronische Infektionsphase charakteristisch ist. In diesem Ruhestadium können die Parasiten innerhalb der Zysten für die gesamte Lebensdauer des Wirts verbleiben, ohne Krankheitssymptome hervorzurufen (Bohne et al., 1999). Wird infiziertes Gewebe mit Zysten über den Verdauungstrakt aufgenommen, wird die Zystenhülle durch das saure Milieu und die Enzyme im Magen abgebaut. Die Bradyzoiten sind hingegen resistent gegen die Säure und Pepsin und können so den Magen passieren und das Dünndarmepithel infizieren (Jacobs, 1957, Pettersen, 1979). Innerhalb dieser Zellen differenzieren sie sich in die schnell wachsende Tachyzoitenform, um sich so weiter im Körper zu verbreiten und den asexuellen Zyklus abzuschließen (Black and Boothroyd, 2000). Es kann innerhalb des Wirts zu einer geringen, spontanen Reaktivierung kommen, bei der Bradvzoiten wieder in Tachvzoiten differenzieren. Normalerweise ist die Verbreitung dieser Tachyzoiten durch das Immunsystem verhindert. Beim Auftreten einer Immundefizienz kann diese Reaktivierung unkontrolliert und/oder häufiger vorkommen, mit der Folge einer massiven und potenziell tödlichen Verschlimmerung der Infektion (Kim and Weiss, 2008).

Die Infektion von Katzen mit *Toxoplasma* verläuft zunächst ähnlich wie bei den Zwischenwirten. Nachdem die mit *Bradyzoiten* gefüllte Zyste im Magen der Katze aufgelöst wurde, infizieren die freigesetzten *Bradyzoiten* Zellen des Dünndarmepithels. Hier findet eine Umstellung des Vermehrungszyklus statt und es entstehen männliche und weibliche Gametozyten, was zur sexuellen Vermehrung führt (Dubey, 1992). Nach Verschmelzung der Gametozyten wird eine nicht-infektiöse Oozyste gebildet, die durch das Platzen der infizierten Epithelzellen im Darmlumen ausgeschieden wird und in der Umwelt sporuliert (Freyre et al., 1989). Innerhalb von fünf bis acht Tagen bilden sich acht haploide *Sporozoiten*. Diese können

durch die Aufnahme von kontaminierter Nahrung, Flüssigkeit oder Erde von warmblütigen Vertebraten als Zwischenwirt aufgenommen werden. Der asexuelle Vermehrungszyklus beginnt mit der Differenzierung der *Sporozoiten* zu *Tachyzoiten* in der parasitophoren Vakuole und später zu *Bradyzoiten* in Zysten. Sobald eine Zyste wieder von einem felinen Wirt aufgenommen wird, kommt es zur erneuten sexuellen Vermehrung und Ausbildung von Oozysten, wodurch sich der Infektionszyklus schließt (Black and Boothroyd, 2000, Dubey, 1997, Dubey, 1998b, Weiss and Kim, 2000).

1.4 Das Zytokin IFN-γ und seine Rolle bei der Abwehr von T. gondii

Ein intaktes Immunsystem ist in der Lage, die Ausbreitung des Parasiten erfolgreich zu verhindern und einen schweren Krankheitsverlauf zu vermeiden. Die zelluläre Immunabwehr spielt dabei eine wichtige Rolle und umfasst dabei sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem. Interferon-gamma (IFN- γ), ein Typ-II Interferon, ist seit langem als Stimulator von Abwehrmechanismen gegen die Replikation und Infektiösität von *Toxoplasma* bekannt (Pfefferkorn, 1984, Dimier and Bout, 1998, Sturge and Yarovinsky, 2014).

Interferone sind eine Familie aus Zytokinen die in drei Typen eingeteilt werden können: Interferon I, II und III (Schneider et al., 2014). Beim Menschen besteht die Typ-I-Interferon-Familie aus 13 teilweise homologen IFN- α -Untertypen, einem IFN- β und den weniger definierten Mitgliedern IFN- ε , IFN- κ und IFN- ω (Pestka et al., 2004). Typ-I-Interferone sind starke Stimulatoren der antiviralen Immunität. Obwohl sie an der zellautonomen Immunität gegen intrazelluläre Bakterien und Protozoen teilnehmen können, behindern sie oft eine Typ-II (IFN- γ)-abhängige antimikrobielle Reaktion gegen Pathogene. Die Rezeptoren des Typ-III-Interferons sind hauptsächlich auf den Oberflächen von Epithelzellen zu finden, aber ihre Funktion ähnelt der von Typ-I-Interferonen (Skariah et al., 2022). Interferon- γ ist das einzige Typ-III-Interferon und wird hauptsächlich in Zellen des Immunsystems wie T-Zellen und NK-Zellen exprimiert. Die Rezeptoren von IFN- γ (IFNGR1/2) sind dagegen weit verbreitet und es sind fast alle Zellen dazu befähigt, auf IFN- γ zu reagieren (Skariah et al., 2022). Die IFN- γ -Signalgebung spielt eine wichtige Rolle bei der Etablierung der zellulären Immunität sowie der zellautonomen Immunität (Skariah et al., 2022).

Toxoplasma-Tachyzoiten verhindern in Abwesenheit von Immunabwehrmechanismen die Fusion der PVM mit dem endolysosomalen System des Wirts. Wenn jedoch eine Infektion auftritt und hohe Konzentrationen von IFN- γ induziert werden, werden diese Abwehrmechanismen aktiviert (Clough and Frickel, 2017). Bindet das Zytokin an den IFNGR,

ein Heterodimer bestehend aus dem hochaffinen IFNGR1 und dem niedrig-affinen IFNGR2 (Ivashkiv, 2018), kommt es zur Konformitätsänderung des Rezeptors, wodurch die an die intrazellulären Rezeptorketten gebundenen Januskinasen JAK1 und JAK2 aktiviert, intrazelluläre Rezeptormotive phosphoryliert, der Transkriptionsfaktor STAT1 (pSTAT1) zum Rezeptor rekrutiert und anschließend phosphoryliert wird (Skariah et al., 2022). Das phosphorylierte STAT1 wird in den Zellkern transportiert und es kommt zur Expression von Hunderten von IFN-γ-stimulierten Genen (ISGs) in Kaskaden (Clough and Frickel, 2017). Es wird ein komplexes Abwehrnetzwerk innerhalb der Zellen aktiviert, dass aus mehreren hundert ISGs besteht. Einige dieser Gene haben direkte antimikrobielle Eigenschaften. Bislang wurden etwa 2000 ISGs bei Menschen und Mäusen identifiziert (Rusinova et al., 2013, Schoggins, 2019). Proteine wie Ubiquitin, Immunity-Related GTPases (IRGs), Guanylat-bindende Proteine (GBPs) und Autophagieproteine werden zur Vermittlung der Immunreaktion gegen das Pathogen eingesetzt (Clough and Frickel, 2017).

Die Bewältigung der Toxoplasma-Invasion durch den Wirt wird durch Unterschiede in den Parasitenstämmen beeinflusst (Wong and Remington, 1993, Howe and Sibley, 1995). Bei murinen Zellen führen Autophagieproteine und GTPase-vermittelte Prozesse zu einer Schädigung der PVM, bei humanen und murinen Zellen wird die PVM nach Ubiquitinylierung erkannt (Clough and Frickel, 2017). Daraufhin findet entweder eine endolysosomale Eliminierung oder eine teilweise Autophagie, je nach Zelltyp, statt. Die Zerstörung der PVM beim murinen Wirt durch IRGs und GBPs wurde bereits beschrieben (Martens et al., 2005, Degrandi et al., 2013). Es wurde in zahlreichen Berichten gezeigt, dass die IFN-y-Induktion bei murinen Makrophagen, Fibroblasten und Astrozyten, die Typ-II- und Typ-III-Parasiten enthalten, zum Zusammenbruch der Toxoplasma-PVs führt (Degrandi et al., 2013, Steffens et al., 2020, Martens et al., 2005, Khaminets et al., 2010, Zhao et al., 2009a, Zhao et al., 2009b, Zhao et al., 2008, Ling et al., 2006, Yamamoto et al., 2012, Selleck et al., 2013, Melzer et al., 2008). Der Zusammenbruch der PVM durch IFN-y-Stimulation tritt jedoch nur in murinen Zellen und nicht in humanen Zellen auf (Martens et al., 2005, Zhao et al., 2009b, Clough et al., 2016, Selleck et al., 2015). Die Aktivierung von Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt in Bezug auf den Eintritt oder die Aufnahme von Pathogenen ist entscheidend für die Effektivität der durch IFN-induzierten Immunität in der infizierten Zelle. Unterschiede in der Wirksamkeit der Immunantwort treten auf, je nachdem, ob die Zellen vor oder nach der Infektion aktiviert wurden. Zusätzlich kann die Aktivierung von unbeteiligten Zellen während der Infektion dazu beitragen, die Ausbreitung des Pathogens zu begrenzen (Skariah et al., 2022). T. gondii ist in der Lage, die Gen-Transkription in infizierten Zellen, die durch IFN-y induziert wird, zu verhindern, indem es einen Virulenzfaktor namens TgIST (Toxoplasma Inhibitor of STAT-1dependent transcription) abgibt (Lang et al., 2012, Kim et al., 2007). Obwohl STAT1 phosphoryliert wird und an der Kern-DNA bindet, rekrutiert TgIST den Chromatin-Repressor NuRD an STAT1-abhängigen Promotoren, um die Gen-Transkription zu unterdrücken (Gay et al., 2016, Olias et al., 2016). Das Entfernen von TgIST erhöht die Elimination von Parasiten in IFN-γ-aktivierten Zellen und reduziert die Parasitenvirulenz in Mäusen (Olias et al., 2016). TgIST hemmt auch die Gen-Transkription, die durch Typ-I-IFN in *T. gondii*-infizierten Zellen induziert wird (Matta et al., 2019).

Viele der durch IFN-y induzierbaren Moleküle sind GTP-bindende Proteine (Martens and Howard, 2006, Staeheli et al., 1984, Boehm et al., 1998). Diese GTPasen ähneln dem Protein Dynamin und können aufgrund von Sequenzhomologien, Größe und Vorkommen in vier Kategorien eingeteilt werden (Steffens, 2020). Die Mx-Familie wird vorrangig durch Typ-I Interferone induziert und zeigt antivirale Eigenschaften. Im Gegensatz dazu werden die VLIGs (very large inducible GTPases) sowohl durch Typ-I als auch durch Typ-II Interferone aktiviert (Klamp et al., 2003). Die p47 GTPasen werden hauptsächlich durch IFN-γ induziert, können aber auch durch IFN-α, IFN-β und Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert werden. Diese GTPasen, auch als IRGs (IFN-inducible GTPases) bezeichnet und gehören zu den am besten erforschten GTPasen, die durch IFN induziert werden. Ihr Name leitet sich von ihrem Molekulargewicht von 47 kDa ab. Beim Menschen existiert ein homologer Vertreter namens IRGM, während in der Maus bisher 23 Gene identifiziert wurden, die als bedeutende antimikrobielle Effektorproteine charakterisiert wurden (Boehm et al., 1998, Collazo et al., 2001, MacMicking, 2004, Pilla-Moffett et al., 2016). Die p65 GTPasen, auch Guanylat-bindende Proteine genannt, umfassen die vierte Kategorie und werden hauptsächlich durch Typ-II Interferon induziert und zeigen sowohl in Mensch und Maus antivirale Effekte (Boehm et al., 1998, Martens and Howard, 2006). Es wurden 11 unterschiedliche GBPs (mGBP1-11) bei Mäusen identifiziert, beim Menschen hingegen wurden bisher sieben GBPs (hGBP1-7) beschrieben. IFN-γ reguliert wie bereits erwähnt große GTPasen, die an der Umgestaltung der Toxoplasma-Vakuolen beteiligt sind: die IRGs und GBPs. Es ist noch unklar, wie IRGs und murine GBPs (mGBPs) in murinen Zellen dazu führen, dass die PVM aufgebrochen wird und Toxoplasma dem Zytoplasma ausgesetzt wird. Eine kürzlich durchgeführte Studie hat jedoch gezeigt, dass mGBPs in zwei diskreten subzellulären Reservoiren vorhanden sind und die PVM als große Multimere angreifen, die aus verschiedenen Kombinationen von mGBPs 1, 2, 3, 5 und 6 bestehen (Kravets et al., 2016). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass mGBP2 und mGBP7 direkt an der Plasmamembran des Parasiten lokalisiert sein können und wahrscheinlich deren

Integrität stören (Steffens et al., 2020, Kravets et al., 2016). IRGs und mGBPs sind wichtige Proteine der Wirtsabwehr, die die PVM in murinen Zellen angreifen, um *Toxoplasma* zu zerstören. Im Gegensatz dazu haben humane GBPs (hGBPs) eine Anti-*Toxoplasma*-Wirkung, die nicht unbedingt von der PV-Zielsetzung abhängt (Johnston et al., 2016, Qin et al., 2017). GBPs können komplexe Proteinkomplexe bilden, die spezielle Autophagie- und Ubiquitinproteine enthalten (Skariah et al., 2022). Diese supramolekularen Komplexe arbeiten hoch reguliert zusammen und führen spezifische antimikrobielle Aktivitäten gegenüber verschiedenen Arten von Pathogenen sowohl im Zellinneren als auch in Vakuolen aus (Skariah et al., 2022, Santos et al., 2020). GBPs können auch an zytosolische gram-negative Bakterien binden und dadurch eine Signalkaskade auslösen, die zur Aktivierung von Caspase 4 führt. Dies zeigt eine Verbindung zwischen der Stimulation durch IFN- γ und der Aktivierung des Inflammasoms auf (Santos et al., 2020, Wandel et al., 2020, Finethy et al., 2015, Meunier et al., 2015).

1.5 Die Guanylat-bindenden Proteine und ihre Rolle bei der Abwehr gegen intrazelluläre Pathogene

Eine Familie von IFN-stimulierten Genen (ISGs), die erst kürzlich entdeckt wurde und für die zelluläre Abwehr von großer Bedeutung ist, sind die Guanylat-bindenden Proteine (GBPs) (Huang et al., 2019, Tretina et al., 2019, Boehm et al., 1998, Degrandi et al., 2007, Degrandi et al., 2013). Sie gehören zu den am häufigsten exprimierten Familien von ISGs beim Menschen aufgrund ihrer Reaktion auf IFN-Stimulation, bei der ihre Expression in nur 24 Stunden um bis zu drei Größenordnungen auf bis zu 300.000 Moleküle pro Zelle ansteigen kann (Tretina et al., 2019). Normalerweise sind GBPs auf einem niedrigen Basalniveau in ruhenden Zellen exprimiert (Tretina et al., 2019, Mostafavi et al., 2016). Ihr Name leitet sich von ihrer Affinität zu den Guanylaten GTP, GDP und GMP ab (Cheng and Townley, 1983, Cheng et al., 1991). Die GBPs sind Proteine mit einem Molekulargewicht von 65-73 kDa (Gupta et al., 1979) und zählen zur Dynamin-Superfamilie der GTPasen (Praefcke and McMahon, 2004). Nicht nur Interferone, sondern auch andere Induktionsfaktoren wie TNF-alpha und LPS können zu ihrer Induktion führen (Degrandi et al., 2007). Weitere Studien haben jedoch gezeigt, dass dies mit einer geringeren Induktionsintensität im Vergleich zur Stimulation durch IFN-Typ-II einhergeht (Decker et al., 1989, Decker et al., 1991). Lew et al., 1991).

Die starke Konservierung der GBP-Familie erstreckt sich auf Wirbeltiere, einschließlich Mäusen und Menschen (Vestal and Jeyaratnam, 2011). Murine und humane GBPs zeigen einen

hohen Grad an Homologie, wobei der am meisten konservierte Bereich der GBP-Proteine in den N-terminalen Domänen zu finden ist (Olszewski et al., 2006, Kresse et al., 2008, Degrandi et al., 2007). Neben der N-terminalen katalytischen GTPase-Domäne verfügen diese Proteine auch über eine helikale Domäne, die eine Serie von amphipathischen alpha-helices in ihrer C-Domäne beinhalten (Abdullah et al., 2009). Struktur-Funktions-Studien zeigen, dass sowohl die N- als auch C-terminale Hälfte des Proteins für die Selbstorganisation von GBPs wichtig sind (Tretina et al., 2019).



Abb. 1: Modellsystem von mGBP2. Das Homologiemodell des gesamten mGBP2-Moleküls besteht aus drei verschiedenen Domänen: (i) die G-Domäne (graue Darstellung) mit GTP (grüne Kugeln) und Mg2+ (orange Kugel); (ii) die M-Domäne (grüne Darstellung); (iii) die E-Domäne (blaue Darstellung) und dem Geranylgeranyl-Lipidanker (GG, magenta Kugeln). Der schwarze Rahmen zeigt eine vergrößerte Ansicht der GTP-Bindungsstelle, wobei die verschiedenen G-Motive und Schleifen hervorgehoben sind (siehe Farbcode unten). Zusätzlich werden die Aminosäurereste, die für die GTP-Bindung und -Hydrolyse wichtig sind, zusammen mit ihren Wechselwirkungen (gestrichelte schwarze Linien) mit den verschiedenen Teilen von GTP (α -, β - und γ -Phosphat) oder mit Mg2+ angezeigt. Der braune Rahmen zeigt die Interaktionen zwischen α 4' der G-Domäne und α 12/13 der E-Domäne. Die wichtigen Aminosäurereste werden als Stäbchen dargestellt und Salzbrücken sind durch gestrichelte schwarze Linien (Abbildung aus (Loschwitz et al., 2023)).

GBPs sind an verschiedenen Signalwegen beteiligt, einschließlich der Angiogenese, Immunität und zellulären Proliferation (Guenzi et al., 2003, Guenzi et al., 2001). Dabei konnte bisher eine Rolle bei der Abwehr von bestimmten Viren, Bakterien und Protozoen beschrieben werden (Anderson et al., 1999, Carter et al., 2005, Steffens et al., 2020, Degrandi et al., 2013, Krapp et al., 2016, Nordmann et al., 2012, Lindenberg et al., 2017). Ihre Funktion als Signalisierungsplattform erlangen die GBPs durch die Bildung großer supramolekularer Komplexe. Diese koordinieren sich mit nicht-kanonischen Autophagie-Proteinen und Ubiquitin-Ligasen, um direkt auf mikrobielle Zellwände oder Vakuolen abzuzielen und so intrazelluläre Pathogene zu eliminieren (Santos et al., 2020, Kravets et al., 2016).

Abbildung 1 stellt das Homologiemodell von einem mGBP2-Molekül dar. In diesem Modell wird die molekulare Struktur in drei unterschiedliche Domänen deutlich, die G-Domäne, die

M-Domäne und die E-Domäne. Des Weiteren ist in der Abbildung eine vergrößerte Darstellung der GTP-Bindungsstelle zu sehen, bei der die Aminosäurereste hervorgehoben werden, die für die Bindung und Hydrolyse von GTP von Bedeutung sind. Dabei wird auch deren Wechselwirkung mit den α -, β - und γ -Phosphat-Untereinheiten sowie Magnesium verdeutlicht (Loschwitz et al., 2023).

Es wurden sieben orthologe Gene und ein Pseudogen beim Menschen identifiziert, die in einem Gencluster auf Chromosom 1 lokalisiert sind. Mäuse besitzen 11 Gene und zwei Pseudogene, die in zwei Genclustern auf Chromosom 3 und Chromosom 5 lokalisiert sind (Kresse et al., 2008). Für hGBP1 wurde gezeigt, dass es, wenn es in Zelllinien überexprimiert wird, Infektionen mit dem vesikulärem Stomatitisvirus und Encephalomyokarditisvirus kontrollieren kann (Anderson et al., 1999). Ähnliches wurde auch für das murine mGBP2 beobachtet (Carter et al., 2005), während eine Splice-Variante von hGBP3 eine antivirale Wirkung gegen Influenza vermittelt (Nordmann et al., 2012). Mutationsstudien haben gezeigt, dass unterschiedliche GBP-Restriktionsmechanismen spezifisch auf Subsets von Viren wirken (Anderson et al., 1999, Carter et al., 2005). In jüngster Zeit wurde entdeckt, dass das menschliche hGBP5 die Ausbreitung von HIV-1 und anderen Retroviren hemmt, indem es den Prozess der Verarbeitung des viralen Hüllglykoproteins stört (Krapp et al., 2016). Um die antivirale Wirkung von GBP5 zu erzielen, ist eine Isoprenylierung notwendig, während Protein-Oligomerisierung oder GTPase-Aktivität nicht erforderlich sind (Krapp et al., 2016). Obwohl mehrere Studien gezeigt haben, dass verschiedene GBPs eine gewisse Kontrolle über virale Infektionen ausüben können, ist ihre Rolle bei der Einschränkung im Vergleich zu den antiviralen Eigenschaften von Mx-Proteinen eher schwach (Haller et al., 2015).

In dieser Forschungsarbeit werden mGBPs untersucht. Eine besondere Eigenschaft dieser Proteine ist die Hydrolyse von GTP zu GMP (Kravets et al., 2016, Legewie et al., 2019, Praefcke and McMahon, 2004, Tripathi et al., 2017, Wehner et al., 2012). Die mGBPs besitzen eine N-terminale GTPase-Domäne (G-Domäne), welche durch vier konservierte Sequenzmotive G1 bis G4 charakterisiert ist (Kresse et al., 2008). In der G-Domäne sind vier konservierte Sequenzelemente vorhanden, die die GTP-Bindestelle bilden. Diese Elemente sind das kanonische G1-Motiv oder die P-Schleife (englisch: phosphate-binding loop) GXXXXGK(S/T), das Switch 1 oder G2-(T)-Motiv, das Phosphat- und Magnesium (Mg²⁺)bindende Switch 2 oder die G3-DXXG-Sequenz und das Nukleotid-Spezifität generierende G4-Motiv T(V/L)RD (Kresse et al., 2008). Das G1-Motiv spielt eine koordinierende Rolle für die Phosphate. Die Beteiligung des Threonins im G2-Motiv an der Katalyse ist schwer vorherzusagen, aber in einigen Fällen experimentell bestätigt worden. Das Glycin im G3-Motiv bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem γ-Phosphat von GTP. Das G4-Motiv ist für die Koordination der Basen und Ribose verantwortlich (Praefcke and McMahon 2004). Es konnte nachgewiesen werden, dass während der GTP-Hydrolyse, die G2 und G3 Sequenzeinheiten an der Konformationsänderung in der G-Domäne beteiligt sind (Praefcke and McMahon, 2004, Vopel et al., 2010, Wehner et al., 2012). Neben der N-terminalen GTPase-Domäne gibt es eine mittlere M-Domäne, die aus zwei Helix-Strukturen besteht und zu einer gestreckten Proteinkonformation führt (Nantais et al., 1996). Am C-terminalen Ende befindet sich eine GTPase Effektordomäne (E-Domäne) bestehend aus zwei Helices (a12/13) (Nantais et al., 1996). mGBP1, mGBP2 und mGBP5 besitzen ein zusätzliches C-terminales CaaX Motiv (C=Cystein, a=aliphatische Aminosäure, X=terminale Reste) und bilden eine von zwei strukturellen Gruppen, die auf Chromosom 3 kodiert sind. Studien haben gezeigt, dass die GTPase-Aktivität und die Isoprenylierung der C-terminalen CaaX-Box die Rekrutierung von mGBP2 an die PVM regulieren und essenziell für die Kontrolle der Toxoplasma-Proliferation innerhalb der PV sind (Degrandi et al., 2013, Kravets et al., 2016, Kravets et al., 2012). mGBP3 und mGBP7 können in die zweite Gruppe auf Chromosom 3 eingeordnet werden, die keine zusätzliche CaaX-Isoprenylierungsstelle besitzen (Degrandi et al., 2013, Stickney and Buss, 2000, Kresse et al., 2008). Das CaaX-Motiv wird posttranslational durch eine Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Transferase modifiziert und ermöglicht eine Membraninteraktion der mGBP-Proteine (Cheng et al., 1991, Kravets et al., 2016, Praefcke et al., 1999, Prakash et al., 2000b, Prakash et al., 2000a, Stickney and Buss, 2000). Wenn in diesem Bereich der Sequenz Mutationen eingefügt werden, kann dies zu einer untypischen Verteilung der Proteine in der Zelle führen und ihre antipathogenen Eigenschaften vollständig beeinträchtigen (Degrandi et al., 2013, Kim et al., 2011, Kravets et al., 2016, Tietzel et al., 2009, Vestal et al., 2000). Auf dem Chromosom 5 sind die mGBPs 4, 6, 8, 9, 10 und 11 Gene lokalisiert (Kresse et al., 2008). Eine Analyse ergab, dass für mGBP4 keine funktionelle mRNA im C57BL/6 Hintergrund vorhanden ist. Daher wird vermutet, dass es sich bei mGBP4 um ein defektes Gen handelt (Konermann et al., 2007).

mGBPs spielen eine bedeutende Rolle in der Abwehr sowohl prokaryotischer als auch eukaryotischer Pathogene (Carter et al., 2005, Degrandi et al., 2007, Kravets et al., 2016). Es wurde nachgewiesen, dass Mitglieder der mGBP-Familie in der Lage sind, sich an die PV von *T. gondii* zu binden und dort zu akkumulieren (Degrandi et al., 2007). Es konnte ebenfalls bewiesen werden, dass sie eine wichtige Rolle bei Ruptur-Mechanismen der *Toxoplasma* PVM sowie bei der Kontrolle der parasitären Replikation spielen (Degrandi et al., 2013, Selleck et al., 2013, Yamamoto et al., 2012). Zwischen *Toxoplasma* und dem Wirt stellt die PVM eine

essenzielle Barriere dar. Die Kommunikation über diese Membran ermöglicht es dem Parasiten, auf Nährstoffe und größere Moleküle zuzugreifen und somit zu überleben und sich zu vermehren (Clough and Frickel, 2017). Gleichzeitig kann der Wirt den Parasiten durch Angriffe auf die PVM erkennen und töten, da diese Membran die Erkennungsfläche in Zellen darstellt. Es entsteht ein Wettlauf zwischen Wirt und Parasit, bei dem verschiedene Moleküle die PVM überqueren und miteinander interagieren (Clough and Frickel, 2017). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass mGBP2 in multimerischen Komplexen in Vesikel-ähnlichen Strukturen assembliert. Insbesondere konnten Formationen aus mGBP2/mGBP2, mGBP2/mGBP1 und in geringerem Maße aus mGBP2/mGBP3 Homo- und Heteromultimeren beobachtet werden. Es wurden jedoch keine Interaktionen von mGBP2 und mGBP6 beobachtet (Kravets et al., 2016). Bislang wurde die Untersuchung der Rolle von mGBPs in der angeborenen Immunabwehr gegen Parasiten vorwiegend auf T. gondii beschränkt (Legewie, 2020). Es wurde gezeigt, dass mGBP1, 2, 3, 6, 7 und 9 in embryonalen Fibroblasten und Makrophagen zur T. gondii PV rekrutiert werden (Degrandi et al., 2007). Auch mGBP10 zeigt eine Rekrutierung zur PV hin, eine Assoziation von mGBP5 und mGBP8 mit der PV wurde nur selten beobachtet (Kravets et al., 2016, Lindenberg et al., 2017).

Untersuchungsmethoden wie der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) und die Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) konnten in weiteren Studien neue Informationen über die Interaktion bzw. Kolokalisation von mGBPs liefern. Dabei konnte gezeigt werden, dass mGBP2 mit mGBP1 und in geringerem Ausmaß mit mGBP3 interagiert bzw. kolokalisiert (Kravets et al., 2016). Ko-IP-Experimente belegen zudem, dass mGBP2 an mGBP5 bindet, obwohl in FRET-Experimenten keine Interaktion der beiden Proteine festgestellt werden konnte (Kravets et al., 2016, Virreira Winter et al., 2011). In einer neueren Studie konnte die partielle Kolokalisation von mGBP7 und mGBP6 beobachtet werden. Zudem zeigte sich, dass mGBP7 und mGBP3 nahezu vollständig an die *T. gondii* PV kolokalisieren und korekrutiert werden können, obwohl auch in Abwesenheit von mGBP7 eine Rekrutierung von mGBP2, mGBP3 und mGBP6 erfolgt (Steffens et al., 2020). Es wurde zudem gezeigt, dass die Rekrutierung von mGBP7 eine langsamere Kinetik aufweist als die Rekrutierung von mGBP2 (Steffens et al., 2020).

Eine schematische Darstellung der Lokalisierung und Dynamik von mGBP1, mGBP2, mGBP3, mGBP5, mGBP6 und mGBP7 in mit *T. gondii* infizierten Zellen wird in Abbildung 2 visualisiert. Nach Eintritt in die Wirtszelle wird die PV gebildet. Damit wird auch die Existenz von zwei unterschiedlichen Membranen deutlich, die PVM und die *T. gondii* Membran. Die mGBPs können entweder einzeln oder in Komplexen in zytoplasmatischen vesikelähnlichen

Strukturen (VLS) vorliegen. Dabei wird mGBP2 sowohl einzeln als auch als Komplex, einmal mit mGBP1 und einmal mit mGBP3, abgebildet. Ebenso zeigt sich mGBP7 entweder einzeln oder in einem Komplex mit mGBP6 oder mGBP3. mGBP5 hingegen wird außerhalb der VLS lokalisiert. Die mGBPs lagern sich sowohl an die PVM als auch nach Durchdringung der PV an die *T. gondii* Membran an (Legewie et al., 2019). In der Darstellung ist auch die Zerstörung der PVM dargestellt, was auf die Beteiligung der mGBPs an der Abwehr der *T. gondii* Infektion und der Freisetzung des Parasiten hinweist (Legewie et al., 2019).

In unifizierten Zellen lokalisiert der Großteil der mGBPs nach IFN-γ Stimulation in VLS und bildet große supramolekulare Homo- und Heteromultimere (Degrandi et al., 2013, Kravets et al., 2016). Bei einer *T. gondii*-Infektion relokalisieren die supramolekularen Strukturen der mGBPs zur PVM und bilden bis zu 8000 Protomere aus (Kravets et al., 2016). Dabei können mGBP2 und mGBP7 ins PV-Lumen gelangen und direkt an der Parasitenmembran akkumulieren (Legewie, 2020, Kravets et al., 2016). Analysen zur Kolokalisation zeigten, dass sowohl die GTP-Bindung und Multimerisierung als auch die GTPase-Aktivität für die effiziente Rekrutierung zur PV von *T. gondii* wichtig sind (Kravets et al., 2016). Ebenfalls wurde beobachtet, dass die Lokalisation der CaaX-GBPs in VLS und ihre Abwehrfunktionen von GTP-Hydrolyse, Multimerisierung und Isoprenylierung abhängig sind (Kravets et al., 2012).

Es gibt ebenfalls Hinweise auf ein kooperatives Zusammenspiel von mGBPs und IRGs bei ihrer Redistribution zu PVs hin (Khaminets et al., 2010, Traver et al., 2011). IRGs und GBPs sind entscheidende Vermittler bei den Angriffen des Wirts gegen die PV (Kim et al., 2012) und tragen zur Lyse der PV durch den Wirt bei. Diese Interaktion führt dazu, dass Pathogene in das Zytosol der Wirtszelle freigesetzt werden, gefolgt von der Abtötung dieser aus der PV ausgestoßenen Pathogene und letztlich dem Absterben der Wirtszelle (Ling et al., 2006, Martens and Howard, 2006, Meunier et al., 2015, Yamamoto et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass IRGs die Anlagerung von Ubiquitin an die PV fördern und diese so für die Bindung von GBPs markieren (Haldar et al., 2015). Auch das Adapterprotein p62/SQSTM1 und die E3-Ligasen TRAF6 und TRIM21 bei T. gondii-Infektionen sind an der Ubiquitinierung der PV beteiligt (Haldar et al., 2015, Foltz et al., 2017). Die PVs, die von den GBPs erkannt werden, werden vom Ubiquitin/TRIM21/TRAF6-System ins Visier genommen, wobei dieser Prozess durch IRGs initiert wird (Haldar et al., 2015). Nach der Ubiquitinierung der PV kommt es zu einer koabhängigen Rekrutierung von TRAF6 und p62/SQSTM1. P62 bindet über dessen Ubiquitin-Bindedomäne an die PV und verstärkt gleichzeitig die Assoziation von mGBP1 und mGBP2 mit der PV (Haldar et al., 2015, Li et al., 2017, Wandel et al., 2017).

Eine weitere Studie zeigt, dass zusammen mit dem Protein Irga6 mGBP1 und mGBP2 unabhängig von einer *T. gondii* Infektion ubiquininiert werden (Encheva et al., 2018). Die Ubiquitinierung ist eine posttranslationale Modifikation, bei der spezifische Ligasen einzelne oder mehrere Ubiquitin-Reste an Lysin-Reste von Zielproteinen kovalent binden, um modifizierte Proteine in ihrer Interaktion mit anderen Proteinen zu fördern oder zu hemmen, ihre Aktivität zu beeinflussen, ihre Lokalisation in der Zelle zu verändern oder ihren gezielten Abbau zu beschleunigen (Swatek and Komander, 2016, Komander and Rape, 2012). Dieser Prozess erfordert die Beteiligung von drei Enzymen, die als E1-, E2- und E3-Ligasen bezeichnet werden. Die Identifizierung von ubiquitinierten Lysinen zeigte, dass mGBP1 zehn modifizierte Lysine (K51, K57, K87, K372, K389, K443, K444, K493, K532 und K560) aufwies, während mGBP2 25 modifizierte Lysine (K51, K57, K87, K215, K232, K372, K389, K396, K444, K451, K460, K509, K518, K520, K532, K534, K538, K551, K557, K560, K568, K569, K578, K581 und K585) aufwies (Encheva et al., 2018). Diese Studie ergab auch, dass Irgm1 und Irgm2 durch Ubiquitin-Modifikationen beeinflusst werden können.

Es konnten Unterschiede in der Funktionsweise der mGBPs in Bezug auf die drei *Toxoplasma*-Typen festgestellt werden. Die Assemblierung von mGBPs an die PV erfolgt hauptsächlich bei den weniger virulenten Typ-II und Typ-III *Toxoplasmen* (Yamamoto et al., 2012, Degrandi et al., 2007). Im Gegensatz dazu können die virulenteren Typ-I *T. gondii* diesen koordinierten Abwehrmechanismus der mGBPs beeinträchtigen (Degrandi et al., 2007), indem sie Effektormoleküle wie ROP16, ROP18, ROP5 und GRA15 sezernieren (Virreira Winter et al., 2011). Diese Proteine könnten direkt an der Phosphorylierung von mGBPs beteiligt sein oder indirekt durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie STAT3 und STAT6 (Virreira Winter et al., 2011, Hunter and Sibley, 2012). Des Weiteren hemmen andere *T. gondii*-Proteine wie TgIST die Aktivierung von STAT1, was die durch IFN- γ induzierte mGBP-Expression einschränkt (Gay et al., 2016, Olias et al., 2016). Bei *T. gondii*-Infektionen wurde p62 als Schlüsselkomponente für die Rekrutierung von mGBP2 zur PV vorgeschlagen (Sasai et al., 2017, Selleck et al., 2013, Haldar et al., 2014). Ebenso sind E2-ähnliche Enzyme wie ATG3 und ATG5 sowie das murine ATG8-Homolog Gate-16 an diesem Prozess beteiligt (Sasai et al., 2017, Selleck et al., 2013, Haldar et al., 2014).

Die meisten Studien mit mGBP-defizienten Mäusen (mGBP1-/-, mGBP2-/- und GBPchr3-/-) wurden mit dem Typ-II-Stamm ME49 von *T. gondii* durchgeführt. Dabei zeigten mGBP1-, mGBP2- und mGBP7-defiziente Mäuse eine Anfälligkeit gegenüber einer Infektion mit diesem Parasitenstamm (Tretina et al., 2019, Degrandi et al., 2013, Selleck et al., 2013, Steffens et al., 2020).



Abb. 2: Schematische Darstellung der Lokalisierung und Dynamik von mGBPs in *T. gondii* infizierten Zellen. Es werden vesikelähnliche Strukturen (VLS), die murinen Guanylat-bindenden Proteine (mGBP) und die parasitophore Vakuole (PV) dargestellt. Hier werden die mGBPs in farblich unterschiedlichen hexagonalen Strukturen abgebildet. Dabei ist mGBP1 rot, mGBP2 lila, mGBP3 grau, mGBP6 gelb und mGBP7 grün dargestellt (Abbildung aus (Steffens et al., 2020)).

1.6 Konfokal- und Weitfeld-Mikroskopietechniken

In der optischen Mikroskopie sind die Konfokal- und Weitfeld-Mikroskopie gängige Techniken zur Erzeugung hochauflösender Bilder von biologischen Proben. Beide Techniken haben Vorund Nachteile. Die Weitfeld-Mikroskopie ist eine einfache und kostengünstige Methode, die ein breites Sichtfeld und schnelle Bildgebung bietet. Da alle Bereiche der Probe beleuchtet werden, entsteht ein hoher Kontrast. Die Weitfeld-Mikroskopie eignet sich gut für die Beobachtung von Prozessen in Echtzeit, z.B. Zellteilung oder Molekülbewegungen. Jedoch ist ihre laterale und axiale Auflösung geringer als die der Konfokal-Mikroskopie, was dazu führen kann, dass Details in der Probe nicht scharf genug abgebildet werden (May, 2018). Die Konfokal-Mikroskopie ist eine fortgeschrittenere Technik, die eine höhere laterale und axiale Auflösung ermöglicht. Diese Technik verwendet ein punktuelles Beleuchtungssystem, das nur eine dünne Schicht der Probe beleuchtet, wodurch eine höhere räumliche Auflösung erreicht wird. Auch 3D-Bilder und die Eliminierung von Hintergrundrauschen sind möglich. Die Konfokal-Mikroskopie ist jedoch teurer und anspruchsvoller als die Weitfeld-Mikroskopie und erfordert geschultes Personal.

Die Spot-Scanning-Laser-Konfokalmikroskopie ist ein gängiges Werkzeug zur Erstellung optischer Schnitte. Dabei wird ein einzelner Punkt fokussierten Lichts schnell entlang der Querachsen einer Probe verschoben, um die Fluoreszenz markierter Komponenten anzuregen. Die Fluoreszenzemission der Probe wird durch eine konfokale Lochblende gefiltert, um Licht zurückzuweisen, das aus Bereichen stammt, die von der Fokusebene entfernt sind. Das Emissionslicht wird von einem Photomultiplier detektiert, um das Bild seriell zu erzeugen. Obwohl der Spot-Scanning-Ansatz langsamer als parallele Scantechniken ist, bietet er große Flexibilität in Bezug auf Bildgröße und Erfassungsstrategien. Auch die Außer-Fokus-Unterscheidung ist hoch (Coker and Davidson, o.J.). Im Gegensatz dazu kann die Weitfeld-Fluoreszenz nur dann ein scharfes Bild einer dicken biologischen Probe erzeugen, wenn ihre axiale Abmessung kleiner ist als die durch die Objektivparameter vorgegebene wellenoptische Tiefenschärfe. In Fällen, in denen diese Bedingung erfüllt ist, werden die Informationen aus dem fokussierten Bild aus der interessierenden Probenebene mit Informationen aus dem unscharfen Bild gemischt, die aus Bereichen außerhalb der Fokusebene stammen. Dadurch wird der Bildkontrast reduziert und der Anteil des erkannten Streulichts erhöht (Coker and Davidson, o.J.). Werden mehrere Fluorophore beobachtet, kommt es auch zu einer Farbmischung der Bildinformationen aller beteiligten Kanäle (Coker and Davidson, o.J.).

In Abbildung 3 wird schematisch die Funktionsweise der Weitfeld-Mikroskopie und Konfokalmikroskopie dargestellt. Abbildung 4 beschreibt die Lichtwege der beiden Mikroskopietechniken. Die Konfokalmikroskopie und die Weitfeldmikroskopie haben unterschiedliche Anwendungen in der Mikroskopie aufgrund ihrer verschiedenen Eigenschaften. Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie eignet sich gut für die Erstellung von optischen Schnitten aus dicken Proben und die Darstellung feiner Details sowie von 3D-Bildern (May, 2018). Die Begrenzung, wie Licht durch eine Lochblende zum Photomultiplier gelangt, ermöglicht eine optische Scheibendicke von weniger als 500 Nanometern unter geeigneten Bedingungen (Coker and Davidson, o.J.). Auf der anderen Seite eignet sich die Weitfeld-Mikroskopie gut für die schnelle Bildgebung und die Beobachtung von dynamischen

Prozessen (May, 2018). Beide Techniken haben ihre Vor- und Nachteile, und die Wahl der Mikroskopie-Technik hängt von den spezifischen Anforderungen und der Art der Probe ab, die untersucht werden soll.



Abb. 3: Schemata der Weitfeld-Mikroskopie (A) und Konfokalmikroskopie (B). In einem Weitfeldmikroskop (Abbildung 3A) wird die von der markierten Probe emittierte Fluoreszenz mit demselben Objektiv, das für das Anregungslicht verwendet wird, auf den Detektor fokussiert. Der dichroitische Spiegel fungiert als Filter für spezifische Wellenlängen und leitet die Fluoreszenz zum Okular oder einem Detektor weiter. B) In einem konfokalen Mikroskop (Abbildung 3B) wird Licht von einem Laser emittiert. Eine bestimmte Lichtwellenlänge passiert ein Pinhole und wird durch den dichroitischen Spiegel zur Probe reflektiert. Das Pinhole erlaubt nur Licht aus der Fokusebene den Detektor zu erreichen. Dadurch wird die Aufnahme von unscharfem Licht reduziert, was die Bildqualität verbessert (Abbildung 3). Der angeregte Fluorophor emittiert sekundäre Fluoreszenz, die durch den dichroitischen Spiegel hindurchgeht und am Pinhole des Photomultiplier (PMT)-Detektors als konfokaler Punkt fokussiert wird (Abbildung aus (Proteintech Group, o.J.)).



Abb. 4: Lichtwege in Weitfeld- und konfokaler Mikroskopie (Abbildung aus (Proteintech Group, o.J.)).

Teil dieser Promotionsarbeit war die Etablierung einer neuen, vereinfachten Methode zur Auszählung und Analyse der mit mehreren mGBPs transduzierten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) unter Verwendung des Keyence Mikroskopsystems. Dabei wurde ein Übersichtsbild erstellt, welches über die Fiji Software ausgewertet werden konnte, um die Rekrutierungsfrequenzen von mGBPs an die *T. gondii* PVM zu ermitteln. Das Konfokalmikroskop ermöglicht eine äußerst präzise Darstellung der untersuchten Zellen mit hoher Auflösung und Detailgenauigkeit. Allerdings ist seine Handhabung aufwändiger und erfordert eine umfangreichere Schulung und Einarbeitung in den Umgang mit dem Mikroskop sowie der dazugehörigen Software. Das Keyence BZ-X810 ist ein platzsparendes, invertiertes Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop mit einer eingebauten Dunkelkammer und einem integrierten Probenbehälter. Diese Eigenschaften ermöglichen eine Fluoreszenzbildgebung auch in hellen Räumen. Das Keyence-Mikroskop ist ideal zur Analyse von Objektträgern, Schalen und Multi-Well-Platten geeignet und ermöglicht eine schnelle und effiziente Arbeitsweise.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

T. gondii ist ein weit verbreiteter Parasit, der obligat intrazellulär lebt und der Erreger der Infektionskrankheit Toxoplasmose. Während der Infektion bildet der Parasit eine spezielle PV aus, die ihn vor den Abwehrmechanismen der Wirtszelle schützt und in der er sich repliziert (Carruthers and Boothroyd, 2007, Sibley, 2011).

Mitglieder der IFN-induzierten mGBP GTPase-Familie sammeln sich direkt an der PV von *T. gondii* an und können durch Ruptur oder Permeabilisierung der PV zur Eliminierung des Parasiten führen (Kravets et al., 2012, Kravets et al., 2016, Steffens et al., 2020, Degrandi et al., 2013). Des Weiteren wird den mGBPs eine bedeutende Funktion bei der Kontrolle der parasitären Vermehrung in vivo zugesprochen (Degrandi et al., 2013, Yamamoto et al., 2012, Selleck et al., 2013, Steffens et al., 2020). Die genauen molekularen Mechanismen und die Rekrutierungskinetiken und -frequenzen an die PV, die zu der wirksamen Abwehrleistung von mGBPs führen, sind bisher nicht vollständig verstanden. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass Mitglieder der mGBP-Familie, insbesondere mGBP2 und mGBP7, zur *T. gondii*-PV rekrutiert werden und sich dort ansammeln können. Dadurch vermitteln sie eine zelluläre Immunität (Degrandi et al., 2007, Degrandi et al., 2015, Pilla-Moffett et al., 2016, Pilla et al., 2014, Steffens et al., 2020). Durch Gene-targeting in Mäusen konnte auch die entscheidende Rolle

von mGBP2 und insbesondere von mGBP7 für das Überleben von T. gondii infizierten Mäusen nachgewiesen werden (Legewie et al., 2019, Degrandi et al., 2007, Degrandi et al., 2013, Steffens et al., 2020). Ziel der Arbeit ist es, die Rekrutierungsfrequenzen und Rekrutierungskinetiken der mGBP-Familienmitglieder mGBP2, mGBP6 und mGBP7 an die T. gondii PV in MEFs mittels Weitfeldmikroskopie zu ermitteln. Dabei sollen die Rekrutierungsfrequenzen zwei Stunden nach Infektion und sechs Stunden nach Infektion bestimmt werden, um eventuelle Unterschiede in den zeitlichen Rekrutierungsmustern festzustellen. Zusätzlich soll eine neue Methode (Weitfeldmikroskopie / Auswertung der Quantifizierung Imagedaten) in der Forschungsgruppe zur vereinfachten der Rekrutierungsfrequenzen etabliert werden. Die Ergebnisse und Analysen dieser Forschungsarbeit sollen offene Fragen hinsichtlich der Rekrutierungsfrequenzen von mGBP2, mGBP6 und mGBP7 beantworten. Zudem soll eine Quantifizierung der Rekrutierungsfrequenz von mGBP6 in Kombination mit mGBP7 an die PV von T. gondii beschrieben werden. In vorherigen Studien konnte eine Kolokalisation von mGBP6 und 7 an der PV nachgewiesen werden. Eine gegenseitige Beeinflussung der mGBPs auf die Rekrutierungsfähigkeit zum Parasiten konnte dabei jedoch nicht belegt werden, da auch in mGBP7 defizienten Zellen eine Rekrutierung von mGBP6 erfolgte (Steffens, 2020). mGBP2 und mGBP7 zeigten in Studien keine Kolokalisation, jedoch konnte ein deutlicher Einfluss auf die mGBP7-Rekrutierung an die PV durch mGBP2 beobachtet werden. Zur Zeit wird eine Rekrutierungshierarchie angenommen, in der mGBP2 primär an die PV rekrutiert wird, gefolgt von der Rekrutierung von mGBP7 (Steffens, 2020).

In dieser Forschungsarbeit sollen die Rekrutierungsfrequenzen nach zwei Stunden und auch nach sechs Stunden nach Infektion detailliert untersucht werden. Es wird davon ausgegangen, dass sich die mGBP2/mGBP7s Rekrutierungshierarchie bestätigen lässt und dass mGBP6 nach mGBP2 und mGBP7 rekrutiert wird. Zusätzlich wird angenommen, dass die Frequenzen der einzelnen rekrutierten mGBPs nach sechs Stunden höher als nach zwei Stunden sind, sich aber Stunden nach Infektion Unterschiede auch im Vergleich zu zwei in den Rekrutierungsfrequenzen beobachten lassen. Die Ermittlung der Rekrutierungsfrequenzen als auch die Bestätigung der Rekrutierungshierarchie könnten wichtige Informationen liefern, die bei der Entwicklung von Behandlungsmöglichkeiten gegen T. gondii Berücksichtigung finden können

In Zukunft kann die Analyse der Rekrutierungsfrequenzen weiterer mGBP-Familienmitglieder Antworten zu dem Rekrutierungsverhalten an die PV von *T. gondii* liefern. Dabei könnten unter Verwendung der in dieser Arbeit neu etablierten Mikroskopie- und Auswertungsmethodik diese Untersuchungen einfacher und schneller durchgeführt und ausgewertet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle		
Beta-Mercaptoethanol	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific,		
-	Waltham, Massachusetts, USA		
Dimethylsulfoxid Hybri-Max (DMSO)	Sigma-Aldric, St. Louis, Missouri, USA		
Ethanol	Merck, Darmstadt		
FKS (Fötales Kälberserum)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach		
Fluoromount-G	SouthernBiotech, Birmingham, USA		
Gelatine Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA		
Interferon-γ, murin	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt		
Paraformaldehyd (PFA)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA		
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Thermo Fischer Scientific, Waltham,		
	Massachusetts, USA		
Saponin	Calbiochem, Merck Millipore, Burlington,		
	Massachusetts, USA		
Trypsin/EDTA	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach		
Ziegenserum	DaKoCytomation, Glostrup, Dänemark		

2.1.2 Antikörper

Antikörper	verwendete	Generierung	Bezugsquelle		
	Konzentration				
Anti-Toxoplasma	1:200 in Saponin-	Maus	LSBio, LifeSpan		
gondii (SAG1)	Antikörperlösung		BioSciences, Inc		
Sekundär-			Invitrogen		
Antikörper:			Thermo Fischer		
			Scientific,		
Anti-Maus-IgG-	1:200 in Saponin-	Ziege	Waltham,		
Alexa Fluor 405	Antikörperlösung		Massachusetts,		
			USA		

2.1.3	Reagenzien	und	Verbrauchsmaterial
-------	------------	-----	--------------------

Reagenzien und Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Cryotubes:	Thermo Fischer Scientific, Waltham,
1 ml	Massachusetts, USA
1,8 ml	
Handschuhe, Micro-Touch Nitra-Tex	Ansell, Brüssel, Belgien
Imaging Dish Cover Glass 1.5	VWR International, Langenfeld
Objektträger	Engelbrecht GmbH, Medizin- und
	Labortechnik, Edermünde
Parafilm M	American National Can, Chicago, USA
Pipettenspitzen (steril und unsteril):	Starlab International, Hamburg
10 µl	
20 μl	
200µl	
1000 μl	
Röhrchen Tubes 15 ml, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen Tubes 15 ml	Greiner Bio-One, Thermo Fischer Scientific,
	Waltham, Massachusetts, USA
Stripetten:	Costar, Corning, New York, USA
5 ml	
10 ml	
25 ml	
50 ml	
Tubes: Ennandouf Tubes 0.5 ml 1.5ml 2 ml	Ennondorf Homburg
Eppendori Tubes 0,5 mi, 1,5 mi, 2 mi, Safa Saal Mianatubas 1 5 ml	Sarstadt Nürmbracht
Zellkulturnletton / Well Distos:	
2-well plate	Costar Corning New York USA
24-well plate	Costar Corning New York USA
Zellkulturflaschen mit Filter	Falcon Corning New York USA
T25	
T75	
T162	
Zellschaber	Greiner Bio-One, Thermo Fischer Scientific,
	Waltham, Massachusetts, USA

2.1.4 Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Abzug	Wrt-Laborbau, Stadtlohn
Brutschränke: BBD6220	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Masachusetts, USA
Hera Cell 240	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Masachusetts, USA
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C	Liebherr, Bulle, Schweiz

Gefriertruhe -80°C	Ewald Innovationstechnik GmbH		
Sentertrane of C	Rođenhurg		
Kühlschrank	Liebherr Bulle Schweiz		
	De la Charte I		
Kühlschrank	Bosch, Stuttgard		
Mikroskope:			
Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen		
Axio Observer	Zeiss, Oberkochen		
Nikon Eclipse TE-2000-S	Nikon, Chiyoda, Japan		
Zeiss LSM780 mit Airyscan	Zeiss, Oberkochen		
Keyence BX-Z 810	Keyence, Neu-Isenburg		
Zeiss Elyra OS (CAI, HHU Düsseldorf)	Zeiss, Oberkochen		
Leica TCS SP8 STED 3X (CAI, HHU	U Leica Mikrosysteme, Wetzlar		
Düsseldorf)			
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen		
Pipetten	Thermo Fischer Scientific, Waltham,		
	Massachusetts, USA		
Sterilbank HeraSafe	Thermo Fischer Scientific, Waltham,		
	Massachusetts, USA		
Stickstofftank	Air Liquide, Paris, Frankreich		
Zentrifugen:	früher Heraeus Instruments, jetzt Thermo		
Megafuge 1.0R	Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts,		
	USA		

2.2 Medien und Puffer

2.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Fixierungslösung	4% PFA in PBS pH 7,4
Permeabilisierungslösung	0,02% Saponin in PBS
Blockierungslösung	0,002% Saponin in PBS, 2% Ziegenserum
Antikörperlösung	0,002% Saponin in PBS; 2% Ziegenserum
Waschlösung	PBS

2.2.2 Medien für Zellkulturen

Medium für:	Zusammensetzung
MEF-Zelllinien und Hs27-Zelllinien	IMDM
	10% (v/v) FKS
	(inaktiviert für 30 min bei 56°C)
	$0,1\%$ (v/v) β -Mercaptoethanol
Einfrier-Medium	IMDM
	10% (v/v) FKS
	(inaktiviert für 30 min bei 56°C)
	$0,1\%$ (v/v) β -Mercaptoethanol
	10% (v/v) DMSO

2.3 Verwendete Zelllinien und Toxoplasma gondii

2.3.1 Zelllinien

Zellen	Eigenschaften	Referenzen
Hs27	Humane Vorhaut Fibroblasten,	ATCC, Manassas,
	ATCC#CKL-1054	virginia, USA
MEF-Zelllinien:	Murine embryonale Fibroblasten,	Isoliert und präpariert
- MEFs mGBP 7-/- +	isoliert am Tag14.5 p.c aus von Dr. Cornelia	
GFP-mGBP7 +	C57BL/6 Embryonen und durch Beuter-Gunia. Die	
mCherry mGBP2	lentivirale Transduktion mit lentivirale	
- MEFs mGBP 7-/- +	einem mCherry-mGBP6 bzw. Transduktion erfolgte	
GFP-mGBP7 +	mGBP2 und einem GFP-mGBP7	durch Dr. Nora
mCherry mGBP6	Fusionskonstrukt versehen Steffens	

2.3.2 Toxoplasmenstamm

Organismus	Genotyp	Ref	erenzen
Toxoplasma gondii ME49	Obligat, intraze	lulär AT	CC, Manassas, Virginia,
	replizierende Protozoa,	Typ USA	A, Parmley et al., 1994
	II Stamm		

2.4 Software

Name	Hersteller
EndNote X7	Clarivate Analytics, London, Großbritannien
Fiji	Fiji contributors Rueden et al.
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Dotmatics, Boston, USA
Keyence Viewer BXZ 810	Keyence
Keyence Analyzer BXZ 810	
Microsoft Office 365	Microsoft
Zen 2012 (blue edition)	Zeiss, Oberkochen

2.5 Methoden

2.5.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Die eukaryotischen Zelllinien werden je nach Kulturgefäß und Zelldichte unter sterilen Bedingungen in einem Verhältnis von 1:2, 1:3 oder 1:4 zur Primärkultur in Oberflächenbeschichtete Zellkulturflaschen oder Wellplatten ausgesät. Nach zwei bis drei Tagen werden die Zelllinien mit einer Konfluenz von 80-100% passagiert. Um die adhärenten Zellen zu passagieren, werden diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend durch Trypsin/EDTA (0,25%) für 3 min bei 37°C im Brutschrank abgelöst. Im Anschluss wird mit frischem Nährmedium mit FKS die Enyzmaktivität des Trypsins gestoppt, die abgelösten Zellen vereinzelt und für fünf Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit frischem Nährmedium resuspendiert. Die Zellen in der Zellsuspension werden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und im Anschluss in die entsprechenden Kultivierungsgefäße überführt und bei 37°C bei 8% CO₂ inkubiert.

2.5.2 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Um die Zelllinien einzufrieren, wird ein mit 10% DMSO (v/v) zugesetztes Medium verwendet. Das verwendete DMSO trägt zu einer erhöhten Zellviabilität bei, indem es die Eiskristallbildung während des Einfrierprozesses verhindert. Um die Zellen zusätzlich zu schonen, werden die Zellen in Cryotubes überführt und langsam in drei Schritten eingefroren. Als ersten Schritt werden die Cryotubes bei -20°C für 30 min heruntergekühlt, anschließend über Nacht bei -80°C weiter heruntergekühlt, um sie als letzten Schritt in flüssigen Stickstoff zu lagern. Werden die Zellen wieder aufgetaut, muss dies schnell erfolgen, da das DSMO toxisch wirkt und die Zellen beschädigen könnte. Man verwendet hierbei 10ml eines vorgewärmten Mediums, welches zu den Zellen gegeben wird, sobald diese aufgetaut sind. Die Zellsuspension wird für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wird im Anschluss in die entsprechenden Kulturvierungsgefäße überführt.

2.5.3 Kultivierung von T. gondii

Für die Kultivierung von ME49-*T. gondii* werden zunächst Hs27-Zelllinien in einer T25-Zellkulturflasche kultiviert. Auf den Hs27 Zellmonolayer werden 1 x 10⁶ *Tachyzoiten* überführt. Diese *Tachyzoiten* infizieren die Wirtszellen, bilden eine parasitophore Vakuole aus und führen durch ihre parasitäre Replikation die Zelllyse nach ca. 48 h herbei. Aus dem Überstand werden die *Tachyzoiten* entnommen und bei Raumtemperatur für 5 min bei 700 rpm zentrifugiert, das gewonnene Zellpellet enthält Rückstände der Wirtszellen und wird verworfen. Um die Parasiten im Überstand zu pelletieren, erfolgt ein weiterer Zentrifugationsschritt für 15 min bei 1400 rpm. Der hierbei gewonnene Überstand wird verworfen und die pelletierten Parasiten mit frischem Medium resuspendiert und gezählt. Nach dem Zählen wurden die Zellen entweder auf neue Hs27-Zellen für die Kultivierung ausgesät oder für weitere Versuche verwendet.

2.5.4 In vitro-Infektion mit T. gondii

Die lentiviral transduzierten Zelllinien wurden am Vortag mit einer Zahl von 1 x 10⁴ Zellen/Well auf sterilen Deckgläschen in 24-Well Platten ausgesät und bei 37°C inkubiert. Die Deckgläschen wurden zuvor für mindestens 15 min mit einer 10%igen Gelatinelösung vorbehandelt, um die Adhäsion der Zellen an dem Deckgläschen zu verbessern. Eine Hälfte der ausgesäten Zellen wurden mit 100 Units/ml IFN-γ stimuliert, die andere Hälfte der ausgesäten Zellen wurde zur Kontrolle nicht mit IFN-γ stimuliert. Die *T. gondii Tachyzoiten* wurden kultiviert, geerntet, aufgereinigt und anschließend in einem Verhältnis von 10:1 auf die Zellen gegeben. Die Infektionszeit betrug zwei oder sechs Stunden bei 37°C. Im Anschluss wurden die infizierten Zellen für die Immunfluoreszenz-Analyse verwendet.

2.5.5 Immunfluoreszenzfärbung für die mikroskopische Analyse am Keyence-Mikroskop

Wie zuvor beschrieben, wurden die zu analysierenden Zellen auf sterilen, autoklavierten und mit Gelatine vorbehandelten Deckgläschen in 24-Well-Platten ausgesät, mit IFN-γ stimuliert und mit *T. gondii Tachyzoiten* infiziert. Nach einer Infektionszeit von zwei Stunden oder nach einer Infektionszeit von sechs Stunden wurde das Medium abgenommen und die infizierten Zellen vorsichtig in drei Waschritten mit je 1ml pro Well PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte in mehreren Arbeitsschritten die Immunfluoreszenzfärbung:

Zeit	Arbeitsschritt
10 min	Fixierung mit PFA (4%)
15 min	Permeabilisierung mit 0,02% Saponin in
	PBS
20 min	Zellblockierung mit 0,002% Saponin in PBS
60 min	Inkubation 1. Antikörperlösung
	Saponin (0,002%) in PBS + 2% goat serum
	+ SAG1 (1:200)
45 min	Inkubation 2. Antikörperlösung
	Saponin (0,002%) in PBS + 2% goat serum
	+ Anti-Maus-IgG-AK gekoppelt mit
	AlexaFluor405 (1:200)

Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die Zellen dreimal mit je 1 ml PBS pro Well gewaschen. Die Inkubation erfolgte unter abgedunkelten Bedingungen. Die fluorophoren mGBPs wurden nicht zusätzlich angefärbt, da die N-terminal mit GFP oder mCherry fusionierten Fluoreszenz-Konstrukte im Fluoreszenzmikroskop direkt detektiert werden können. Die Deckgläschen werden nach den Färbeschritten mit dem Eindeckmedium Fluoromount-G auf Objektträgern fixiert und für mikroskopische Analysen verwendet (Mikroskop: Keyence BZ-X810).

2.5.6 Statistische Analyse

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte mit Standard-Abweichung (± SD) dargestellt. Für Berechnungen der statistischen Signifikanz wurde die Software Graphpad Prism 9 verwendet. Für Berechnungen der statistischen Signifikanz wurde der unpaired two-tailed Student's t-test verwendet. Die Signifikanzen wurden folgendermaßen dargestellt:

p< 0,05 entspricht *

p<0,01 entspricht **

p< 0,001 entspricht ***.
3 Ergebnisse

3.1 Die Rekrutierungsfrequenzen von mGBP7, mGBP6 und mGBP2 mit dem obligat intrazellulären Parasiten *T. gondii*

3.1.1 Versuchsaufbau: Fluoreszenz-mikroskopische Analysen der Rekrutierung von mGBP7, mGBP6 und mGBP2 an *T. gondii*

Zu Beginn dieser Forschungsarbeit sollte die Rekrutierungsfrequenz von mGBP7, mGBP6 und mGBP2 in *T. gondii* infizierten Zellen untersucht werden.

Dafür wurden doppelt transduzierte MEFs verwendet. Es handelte sich dabei zum einen um mGBP7 defiziente embryonale Fibroblasten von Mäusen, die durch lentivirale Transduktion mit einem N-terminalen GFP-mGBP7 Fusionskonstrukt und einem mCherry-mGBP6 Konstrukt versehen wurden, zum anderen um mGBP7-defiziente embryonale Fibroblasten von Mäusen, die durch lentivirale Transduktion mit einem N-terminalen GFP-mGBP7 Fusionskonstrukt und einem mCherry-mGBP6 Fusionskonstrukt und einem mCherry-mGBP2 Konstrukt versehen wurden. Diese Zellen wurden in Vorarbeiten zu dieser Promotion durch Frau Dr. Nora Steffens generiert und standen für die weiteren Analysen zur Verfügung.

Die MEFs wurden einen Tag vor der Durchführung der Fluoreszenzfärbung mit IFN- γ (100U/ml) stimuliert, in 24 Well-Platten ausgesät und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Am Tag der Fluoreszenzfärbung wurden die MEFs mit *T. gondii* im Verhältnis 10:1 zu den ausgesäten Zellen (10.000 Zellen pro Well/Deckgläschen) infiziert. Die Fixierung fand für beide Zelllinien zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion statt, einmal zwei Stunden und einmal sechs Stunden nach Infektion. Für die Verwendung fixierter Proben wurden Saponin-enthaltende Permeabilisierungs-, Blockierungs- und Antikörperlösungen verwendet und für die *T. gondii*-Visualisierung ein primärer anti-SAG1 Antikörper genutzt (bindet an das *T.gondii*-Oberflächenantigen SAG1). Als sekundärer Antikörper wurde ein mit AlexaFluor405-gekoppelter Ziege anti-Maus IgG-Antikörper, der bei einer Wellenlänge von 405 nm angeregt und mikroskopisch detektiert werden kann, eingesetzt. Die Rekrutierungsfrequenzen der mGBP-Proteine an die PV der *T. gondii* Parasiten wurden nach Fluoreszenzfärbung im Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ-X810 (Keyence BZ-X810, Software:BZ-X810 Analyzer) ausgewertet. Die Analyse erfolgte mittels der Fiji Software.

Ein Teil dieser Forschungsarbeit war die Etablierung einer Methode zur vereinfachten Auszählung und Analyse der doppelt transduzierten MEFs unter Verwendung des Keyence Mikroskopsystems. Um eine erleichterte und strukturierte Quantifizierung der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP-Familienmitglieder zu ermöglichen, wurde ein aus mehreren Einzelaufnahmen der Fluoreszenzfärbung zusammengesetztes Übersichtsbild hergestellt, welches über die Fiji-Software ausgewertet werden konnte.

Eine Analyse von Rekrutierungsfrequenzen in vorherigen Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe erfolgte bisher an einem Konfokalmikroskop (Zeiss LSM 780). Dieses Mikroskop zeichnet sich durch eine sehr hohe Auflösung und detaillierte Darstellung der mikroskopierten Zellen aus, die Anwendung ist jedoch aufwendiger und erfordert eine längere Einarbeitung und Schulung im Umgang mit Mikroskop und Software.

Das Keyence BZ-X810 ist ein kompaktes, invertiertes Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop und zeichnet sich durch eine in das Gehäuse des Mikroskops eingebaute Dunkelkammer und integriertem Probenbehälter aus, was eine Fluoreszenzbildgebung selbst in hellen Räumen ermöglicht. Das Keyence-Mikroskop ist für die Auswertung von Objektträgern, Schalen und Multi-Well-Platten geeignet und ermöglicht eine schnellere und effizientere Arbeitsweise. Es verfügt über verschiedene Betrachtungs- und Aufnahmemodule und unterschiedliche Analysemodule. Für diese Forschungsarbeit war insbesondere die Bildzusammensetzung als erweitertes Betrachtungsmodul von Bedeutung. Über diese Funktion können kontinuierlich mehrere Bilder erfasst werden, sodass die gesamte Probe in hoher Vergrößerung erfasst und anschließend als ein einzelnes Bild mit hoher Auflösung ausgewertet werden kann. So können bis zu 50.000 x 50.000 Pixel miteinander verbunden werden, ohne dass dabei Kacheleffekte oder Helligkeitsunterschiede auftreten.

Um diese Funktion zu nutzen, wurden die zu untersuchenden Fusionsproteine und fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen *T. gondii* bei spezifischen Wellenlängenspektren angeregt und anschließend die emittierten Wellenlängen detektiert. Zu diesem Zweck verwendet das Keyence-Mikroskopsystem Bandpassfilter, die nur Signale aus einem Frequenzband durchlassen. Frequenzbereiche unterhalb und oberhalb des Durchlassbereichs werden blockiert oder gedämpft. Das GFP-Protein wird bei 470/40 nm angeregt und bei 575/50 nm detektiert, mCherry bei 545/25 nm angeregt und bei 605/70 nm detektiert. Die *T. gondii* SAG-1 und Alexa-405 Färbung wird nach Anregung bei 360/40 nm bei 460/50 nm mikroskopiert. Die einzelnen Filter sind in der Software als Channel sortiert. Zur besseren Beurteilung der Zellen können diese entweder unter Berücksichtigung aller drei Channel oder jeweils nur einem oder zwei Channel dargestellt werden. Dafür können die einzelnen Filter ein-und ausgeschaltet werden, oder es können unter gleichzeitiger Aktivierung der Filter mehrere Fluoreszenzbilder zur Betrachtung und Erfassung überlagert werden (Overlay).

Nach Sichtung und Beurteilung der Qualität der infizierten Zellen und der Fluoreszenzfärbung wurde die Belichtung, der Kontrast, die Sensitivität und die Schärfe für die Darstellung der Zellen im Phasenkontrast Bild sowie für mGBP-Fusionsproteine bzw. die *T. gondii* Färbung angepasst, sodass eine gleichzeitige Beurteilung der jeweiligen Parameter möglich war.

Um ein großes, zusammengefügtes Übersichtsbild der Fluoreszenzfärbung zu gewinnen, wurde die Stitch-Funktion des Keyence-Mikroskopsystems verwendet. Die Stitch-Funktion ermöglicht das Zusammenfügen von mehreren Einzelaufnahmen eines zuvor definierten Aufnahmebereichs. Zur Nutzung dieser Funktion wurde zunächst ein zentrales Sichtfeld bei 40-facher Vergrößerung scharf eingestellt und als Mittelpunkt definiert. Im Anschluss wurde die Anzahl an Bildern um den Mittelpunkt herum festgelegt. Für die folgenden Untersuchungen wurde die Anzahl der Bilder auf X-20 Bilder sowie Y-20 Bilder festgelegt.

Das Mikroskop fertigt sowohl Aufnahmen unter Berücksichtigung aller drei Fluoreszenz-Channels als Overlay-Aufnahme an, als auch Bilder nur unter Verwendung des jeweils einzelnen Fluoreszenz-Channels für die Darstellung von mCherry- und GFP-Fusionsproteinen, sowie der fluoreszenzmarkierten T. gondii Parasiten. Dies entspricht insgesamt einer Menge von ca. 1600 Bildern, die pro Erfassungszeitraum und dem definierten Aufnahmebereich der Probe (bei X=20, Y=20) aufgenommen wurden. Während der Aufnahme wurde durch die Auto-Focus-Capture Funktion der Fokus für jedes Sichtfeld vor der Erfassung automatisch angepasst. Die so gewonnen Einzelbilder wurden im Anschluss zu einem einzelnen Übersichtsbild zusammengefügt, welches zur weiteren Analyse als tif.-Datei gespeichert wurde (Abb. 1). Diese Datei konnte über die Analyse Software Fiji geöffnet und die Übersichtsbilder ausgewertet werden. Für die Auswertung konnten die Übersichtsbilder in ihre einzelnen Channel aufgeteilt werden, sodass eine Betrachtung und Zählung der einzelnen Fluoreszenzen (GFP / mCherry / Alexa405) möglich war. Dafür mussten die Übersichtsbilder in der Software als zusammengesetztes Bild generiert und über das Channel-Tool in die einzelnen Fluoreszenzen aufgeteilt werden. Ähnlich wie in der Keyence Software konnten so die einzelnen Channel oder ein überlappendes Bild der Fluoreszenzen dargestellt werden.

Das Multipoint-Tool der Fiji-Software ermöglicht das Markieren mehrerer Punkte im Übersichtsbild. Jede Markierung wird dabei wahlweise durch einen Punkt oder ein Kreuz dargestellt. Die Menge der gesetzten Markierungen wird automatisch durch die Fiji-Software hochgezählt und entsprechend eines zuvor festgelegten Counters hinterlegt.

Für die Zählung der Zellen, der intrazellulären *T. gondii* Parasiten sowie der rekrutierten mGBP-Proteine wurde das Multipoint-Tool verwendet und jede Kondition einem Counter zugeordnet:

Counter	Kondition
0	Mit T. gondii infizierte Zelle
1	GFP-mGBP7 positive PV
2	mCherry-mGBP2 positive PV
3	mCherry- mGBP2 + GFP-mGBP7 / doppelt positive PV
4	Doppelt negative PV
5	Nur GFP-mGBP7 positive PV
6	Nur mCherry-mGBP2 positive PV

Tabelle 1: Zuordnung der untersuchten Konditionen im angefertigten Übersichtsbild zum entsprechenden

Counter in der Multipoint-Funktion der Software Fiji für mCherry-mGBP2/GFP-mGBP7

kotransduzierte MEFs.

Counter	Kondition
0	Mit T. gondii infizierte Zelle
1	GFP-mGBP7 positive PV
2	mCherry-mGBP6 positive PV
3	mCherry-mGBP6 + GFP-mGBP7 / doppelt positive PV
4	Doppelt negative PV
5	Nur GFP-mGBP7 positive PV
6	Nur mCherry-mGBP6 positive PV

Tabelle 2: Zuordnung der untersuchten Konditionen im angefertigten Übersichtsbild zum entsprechenden Counter in der Multipoint-Funktion der Software Fiji für mCherry-mGBP6/GFP-mGBP7 kotransduzierte MEFs.

Unter Berücksichtigung des entsprechenden Counters konnten für jede Kondition die entsprechenden parasitophoren Vakuolen markiert und im Anschluss ausgezählt werden. Zusätzlich zu den PVs wurde auch die Zahl der mit *T. gondii* infizierten Zellen bestimmt und die Gesamtzahl der gebildeten PVs ermittelt. Bei der Auszählung wurden nur Zellen berücksichtigt, in denen eine eindeutige Akkumulation der untersuchten mGBP festgestellt werden konnte und in denen sich maximal drei parasitophore Vakuolen von *T. gondii* ausgebildet hatten (Abb. 2). Die ermittelten Werte wurden in eine Tabelle übertragen und für eine bessere Vergleichbarkeit die absoluten Messwerte prozentual umgerechnet, wobei die Zahl der ermittelten, auswertbaren Vakuolen in den Zellen gleich 100% gesetzt worden ist.

Für jede Zelllinie wurden für die untersuchten Zeitpunkte zwei und sechs Stunden nach Infektion je drei Versuche durchgeführt, aus deren Ergebnissen Mittelwerte gebildet wurden, die im weiteren Verlauf dieser Dissertation miteinander verglichen werden.



Abb. 5: Beispiel einer über das Keyence-Mikroskop angefertigten Übersichtsaufnahme von *T. gondii* infizierten, mCherry-mGBP2/GFP-mGBP7 MEFs. *T. gondii* wurde mit anti-SAG1/Ziege anti-Maus-IgG/Alexa405 gefärbt. Das Übersichtsbild wurde aus 1.600 Einzelaufnahmen zusammengesetzt und anschließend die Zahl der infizierten MEFs und die gebildeten PVs gezählt. Die Einzelaufnahmen wurden mit 40facher Vergrößerung aufgenommen. Die Zellzählung und Markierung der entsprechend PVs erfolgte nach der in Tabelle 1 festgelegten Konditionen mit den dazu ausgewählten Countern im Multipoint-Tool. Dabei wurden unter Berücksichtigung des entsprechenden Counters für jede Kondition die entsprechenden parasitophoren Vakuolen markiert und im Anschluss ausgezählt. Eine Markierung wird dabei durch ein Kreuz (+) und zusätzlich mit einer dem Counter zugeordneten Zahl gekennzeichnet. Die entsprechenden Zahlen sind dabei Tabelle 1 bzw. Tabelle 2 zu entnehmen. Zusätzlich zu den PVs wurde auch die Zahl, der mit *T. gondii* infizierten Zellen bestimmt und die Gesamtzahl der gebildeten PVs ermittelt. Bei der Auszählung wurden nur Zellen berücksichtigt, in denen eine eindeutige Akkumulation der untersuchten mGBP festgestellt werden konnte und in denen sich maximal drei parasitophore Vakuolen von *T. gondii* ausgebildet hatten. Der Markerbalken entspricht 250 μm.



Abb. 6: Beispielaufnahmen für die ausgezählten Konditionen im Übersichtsbild. Es wurde das mittels Keyence-Mikroskop erstellte Übersichtsbild (s. Abb. 1) in 75%iger Vergrößerung betrachtet und die PVs mittels Multipoint-Tool ausgezählt. a) Beispielbild einer parasitophoren Vakuole in einer doppelt transduzierten MEF an die sich beide untersuchten mGBP-Familienmitglieder akkumuliert hatten (doppelt positiv) b) Beispielbild einer parasitophoren Vakuole in einem doppelt transduzierten MEF die nur mGBP7 akkumuliert hatte c) Beispielbild einer parasitophoren Vakuole an die nur mGBP2 rekrutiert wurde d) Beispielbild einer Vakuole an der keine Rekrutierung der mGBP-Familienmitglieder stattgefunden hatte. Der Markerbalken entspricht 50 µm.



Abb. 7: Hochauflösende konfokal-mikroskopische Aufnahmen der mGBP6/mGBP7 und mGBP2/mGBP7 doppelt transduzierten Zelllinien. Die Zellen wurden einen Tag vor der Infektion mit IFN-γ stimuliert und eine Fluoreszenzfärbung zwei Stunden und sechs Stunden nach Infektion durchgeführt. Für die *T. gondii*-Visualisierung wurde ein primärer anti-SAG1 Antikörper genutzt. Als sekundärer Antikörper wurde ein mit Alexa-Fluor405-gekoppelter Antikörper eingesetzt. Der Markerbalken entspricht 20 µm. a) Aufnahme der mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP6 MEF-Zelllinie mit einer *T. gondii*-Infektion zwei Stunden und sechs Stunden nach Infektion. b) Aufnahme der mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP2 MEF-Zelllinie mit einer *T. gondii*-Infektion zwei Stunden und sechs Stunden nach Infektion.

3.1.2 Quantitative Auswertungen der Rekrutierung von mGBP7 und mGBP6 an die *T. gondii* PV



MEFs mGBP7 -/- + GFP-mGBP7 + mCherry-mGBP6

Abb. 8: Analyse der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP6- und mGBP7-Fusionsproteine zwei Stunden und sechs Stunden nach *T. gondii* Infektion von mit IFN-γ stimulierten mGBP6 und mGBP7 transduzierten mGBP7-^{-/-} MEFs. Dabei sind die Frequenzen von nur mGBP7-positiven (Grün)-, nur mGBP6positiven (Rot)- und doppelt positiven T. gondii-PVs (Orange) dargestellt. Es wurden 34 PVs zwei Stunden nach Infektion ausgezählt und 81 PVs sechs Stunden nach Infektion ausgezählt.

Abbildung 8 zeigt die Akkumulationsfrequenzen an die *T. gondii* PVs in mGBP7 defizienten MEFs, die mit GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP6 doppelt transduziert worden sind. Die gezählten mGBP-positiven *T. gondii*-PVs werden unterschieden in mGBP7-positive PVs, mGBP6-positive PVs und mGBP7- und mGBP6-doppelt positive PVs. Die Frequenzen der mGBP-positiven Parasiten PVs sind prozentual dargestellt, wobei die Gesamtzahl der gezählten PVs 100% entspricht.

Es konnte beobachtet werden, dass sich im Verlauf zwischen zwei Stunden und sechs Stunden deutlich mehr Zellen mit *T. gondii* infiziert und sich mehr als doppelt so viele parasitophore Vakuolen ausgebildet hatten (2h: n=34 PVs, 6h: n=81 PVs). Dies spiegelt sich auch in der Zunahme der PVs wider, an denen überhaupt eine Akkumulation der untersuchten mGBP-Familienmitglieder stattgefunden hatte. Zum Zeitpunkt von zwei Stunden nach Infektion konnten insgesamt 68% PVs, die eine mGBP-Rekrutierung aufwiesen, bestimmt werden, nach sechs Stunden beobachtete man einen Anstieg der Rekrutierungsfrequenz um 9%. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, dass sich die Anzahl der PVs, an denen nur mGBP7 akkumulierte, zwischen zwei Stunden und sechs Stunden nur sehr geringfügig voneinander unterscheidet (2h: n=26,8%, 6h: n=27,9%) und dass die Akkumulationsfrequenz von PVs mit

einer Rekrutierung von nur mGBP6-Fusionsproteinen im Zeitvergleich von 8,8% auf 2,5% abgenommen hat. Betrachtet man jedoch die Anzahl der PVs an die nur mGBP7 rekrutiert wurde, zusammen mit den PVs, die eine Korekrutierung aufwiesen, so zeigte sich, dass die Gesamtzahl der mGBP7 positiven PVs von ungefähr 60% bei zwei Stunden nach Infektion auf ungefähr 75% bei sechs Stunden nach Infektion anstieg. Somit gab es eine Zunahme der mGBP7 Rekrutierung von 15%. Für die gesamte mGBP6 Rekrutierung kann man eine Zunahme der Frequenz im untersuchten Zeitintervall von ca. 8% beobachten. Einen Unterschied gibt es ebenfalls in der Akkumulationsfrequenz der doppelt positiven PVs die im Vergleich von zwei Stunden nach sechs Stunden des Beobachtungszeitraums um 15,5% zugenommen hat. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei zwei Stunden und sechs Stunden nach einer T. gondii-Infektion in MEF-Zellen die Akkumulationsfrequenz von doppeltpositiven Parasiten PVs (orange dargestellt) deutlich höher ist im Vergleich zu mGBP6- (rot dargestellt) oder mGBP7-Fusionsproteinen (grün dargestellt). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Akkumulationsfrequenz von nur mGBP7-positiven PVs nach zwei Stunden (26,8%) und nach sechs Stunden (27,9%) die Akkumulationsfrequenz von nur mGBP6-Fusionsproteinen (2h: n=8,8%, 6h: n=2,5%) zu beiden Messzeitpunkten jeweils um ungefähr 20-25% übersteigt. Dies deutet darauf hin, dass mGBP7 eine höhere Rekrutierungsfrequenz als mGBP6 aufweist. Die Akkumulation von nur mit mGBP6-Fusionsproteinen akkumulierten PVs ist gering und hat ein Maximum bei ca. 8,8% bei zwei Stunden nach Infektion. Tabelle 3 enthält die absoluten Daten der ermittelten Rekrutierungsfrequenzen. Die Untersuchung konzentrierte sich auf verschiedene Zustände, deren Werte nach einem Zeitraum von zwei und sechs Stunden verglichen wurden. Um trotz der variablen Gesamtzahl der PVs eine vergleichende Beurteilung der Rekrutierungsfrequenzen vornehmen zu können, wurden die relativen Durchschnittswerte der Rekrutierungsfrequenzen in Tabelle 4 gegenübergestellt und die statistische Signifikanz ermittelt. Der Vergleich der Werte nach zwei und sechs Stunden ergab folgende Unterschiede: Die Anzahl der gebildeten parasitophoren Vakuolen zeigte nach zwei Stunden (34 Vakuolen) im Vergleich zu sechs Stunden (81 Vakuolen) einen signifikanten Unterschied. Allerdings wurde kein signifikanter Unterschied in der Gesamtanzahl der GFPmGBP7-positiven parasitophoren Vakuolen festgestellt, ebenso bei den PVs, die ausschließlich auf GFP-mGBP7 positiv reagierten. Auch bei der Betrachtung sämtlicher weiterer untersuchter Bedingungen konnte keine statistische Signifikanz festgestellt werden.

3.1.3 Vergleich der absoluten und relativen Rekrutierungsfrequenzen von GFPmGBP7 und mCherry-mGBP6 zwei und sechs Stunden nach Infektion mit *Toxoplasma gondii*

Kondition	Mittelwert ± SD	Mittelwert ± SD
	2h nach Infektion	6h nach Infektion
Gesamtanzahl	34 ± 3.79	81 ± 5.03
gebildeter PVs		
GFP-mGBP7 positiv	20 ± 2.65	60 ± 3.21
(Gesamt)		
GFP-mGBP7 positiv	9 ± 4.58	23 ± 6.11
mCherry-mGBP6	14 ± 5.57	39 ± 2.52
positiv (Gesamt)		
mCherry-mGBP6 positiv	3 ± 2.00	2 ± 1.00
$CEP m CPP7 \pm m Charmy$	11 + 4.16	27 + 4.04
mGBP6 positiv	11 ± 4.10	5/±4.04
doppelt negative PV	11 ± 2.65	19 ± 2.89
mit Toxoplasma gondii	34 ± 3.21	71 ± 4.73
infizierte Zellen		

Tabelle 3: Absolute Daten inklusive Standardabweichung (SD) der Rekrutierung und

Akkumulation der mGBP6- und mGBP7-Fusionsproteine zwei Stunden und sechs Stunden nach *T. gondii* Infektion von mGBP6 und mGBP7 transduzierten mGBP7^{-/-} MEFs. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben, die aus den Daten von jeweils drei Versuchsdurchführungen ermittelt wurden.

Kondition	Mittelwert (relativ) 2h nach Infektion Die Gesamtzahl ausgezählter PVs	Mittelwert (relativ) 6h nach Infektion Die Gesamtzahl ausgezählter PVs	Statistische Signifikanz
	entspricht 100%	entspricht 100%	
GFP-mGBP7 positiv (Gesamt)	58,2 ± 1.40	74,0 ± 3.31	0.0016
GFP-mGBP7 positiv	26,8 ± 10.5	27,9 ± 6.03	ns
mCherry-mGBP6 positiv (Gesamt)	41,2 ± 16.5	48,2 ± 6.02	ns
mCherry-mGBP6 positiv	8,8 ± 5.46	2,5 ± 1.11	ns
GFP-mGBP7 + mCherry- mGBP6 positiv	32,4 ± 11.3	46,6 ± 7.79	ns
doppelt negative PV	32,0 ± 6.19	23,1 ± 2.23	ns

Tabelle 4: Relative Daten inklusive Standardabweichung (SD) der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP6- und mGBP7-Fusionsproteine zwei Stunden und sechs Stunden nach *T. gondii* Infektion von mGBP6 und mGBP7 transduzierten mGBP7-/- MEFs. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben, die aus den Daten von jeweils drei Versuchsdurchführungen ermittelt wurden. Für die Berechnungen der statistischen Signifikanz wurde der unpaired two-tailed Student's t-test verwendet. Die Abkürzung ns entspricht keiner statistischen Signifikanz (nicht signifikant).

3.1.4 Quantitative Auswertungen der Rekrutierung von mGBP7 und mGBP2 an die *T. gondi*i PV



MEFs mGBP7 -/- + GFP-mGBP7 + mCherry-mGBP2

Abb. 9: Analyse der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine zwei Stunden und sechs Stunden nach *T. gondii* Infektion von mGBP2 und mGBP7 transduzierten mGBP7-^{/-} MEFs. Dabei sind die Frequenzen von nur mGBP7-positiven (Grün)-, nur mGBP2-positiven (Rot)- und doppelt positiven *T. gondii*-PVs (Orange) dargestellt. Es wurden 43 PVs zwei Stunden nach Infektion ausgezählt und 55 PVs sechs Stunden nach Infektion ausgezählt.

In dieser Abbildung (Abb. 9) sind die Akkumulationsfrequenzen an die parasitophoren Vakuolen von *T. gondii* bei mGBP7 defizienten MEFs, die mit GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP2 doppelt transduziert worden sind, nach zwei und nach sechs Stunden dargestellt. Die gezählten mGBP-positiven *T. gondii*-PVs werden unterschieden in mGBP7-positive *T. gondii* (Grün), mGBP2-positive *T. gondii* (Rot) und mGBP7+mGBP6-positive *T. gondii* PVs (Orange). Die Frequenzen der mGBP-positiven PVs wurden prozentual dargestellt, wobei die Gesamtzahl der gezählten PVs gleich 100% gesetzt wurde. Es haben sich im Verlauf zwischen zwei Stunden und sechs Stunden mehr Zellen mit *T. gondii* infiziert und sich ca. 10% mehr parasitophore Vakuolen ausgebildet (2h: n=43 PVs, 6h: n=55 PVs). Es wurde eine um 4,5%ige Reduktion der mit den untersuchten mGBPs akkumulierten PVs beobachtet (2h: n=80%, 6h: n=75,9%). Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, dass sich die Frequenzen der nur mGBP7 akkumulierten PVs zwischen zwei Stunden und sechs Stunden nur sehr geringfügig voneinander unterscheiden und dabei um ca. 6,3% abnehmen. Dabei konnte zwei Stunden nach Infektion ein Wert von 1,3% beobachtet werden. Die Akkumulationsfrequenz von mGBP2-Fusionsproteinen an den

PVs hatte sich im zeitlichen Vergleich von zwei bis sechs Stunden von 15,7% auf ca. 8,9% reduziert.

Betrachtet man alle PVs, an die eine Rekrutierung von mGBP7 stattgefunden hatte, so sieht man im Vergleich der beiden Fixierungszeitpunkte eine Zunahme von 64,7% auf 67%. Bei der Gesamtzahl der PVs, die mGBP2 positiv waren, stieg die ermittelte Rekrutierungsfrequenz von 72,8% auf 74,6%. Diese Beobachtung zeigt eine nur geringfügige Veränderung im zeitlichen Vergleich für beide mGBP-Familienmitglieder. Einen leichten Unterschied gab es in der Akkumulationsfrequenz der doppelt positiven PVs die nach sechs Stunden um 8,6% zugenommen hatte. Zwei Stunden nach Infektion wurde eine Rekrutierungshäufigkeit von 57,1% und sechs Stunden nach Infektion eine Rekrutierungshäufigkeit von 65,7% beobachtet. Die Ergebnisse zeigen, dass doppelt positive PVs (orange) zwei und sechs Stunden nach *T. gondii*-Infektion in den untersuchten MEF-Zelllinien häufiger rekrutieren als mGBP6-(rot) oder mGBP7-Fusionsproteine (grün).

Es wurde zusätzlich beobachtet, dass nur mGBP7-Fusionsproteine nach zwei und sechs Stunden etwa 8% seltener an die PV rekrutierten als nur mGBP2-Fusionsproteine.

¥7 14.4		
Kondition	Mittelwert ± SD	Mittelwert ± SD
	2h nach Infektion	6h nach Infektion
	42 + 1 15	
Gesamtanzani	43 ± 1.15	55 ± 6.11
gebildeter PVs		
GFP-mGBP7 positiv	28 ± 5.03	36 ± 4.58
(Gesamt)		
GFP-mGBP7 positiv	3 ± 4.93	1 ± 0.58
	21 + 2 00	
mCherry-mGBP2	31 ± 3.00	41 ± 7.09
positiv (Gesamt)		
mCherry-mGBP2 positiv	7 ± 3.79	5 ± 2.65
GFP-mGBP7 +	24 ± 1.53	36 ± 5.00
mCherry-mGBP2 positiv		
doppelt negative PV	8 ± 1.53	13 ± 1.00
mit Toxoplasma gondii	41 ± 2.08	52 ± 4.16
infizierte Żellen		

3.1.5 Vergleich der absoluten und relativen Rekrutierungsfrequenzen von GFPmGBP7 und mCherry-mGBP2, zwei und sechs Stunden nach Infektion mit *T. gondii*

 Tabelle 5: Absolute Daten inklusive Standardabweichung (SD) der Rekrutierung und Akkumulation der

mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine zwei Stunden und sechs Stunden nach T. gondii Infektion von

mGBP2 und mGBP7 transduzierten mGBP7-/- MEFs. Die Daten sind als Mittelwerte mit

Standardabweichung angegeben, die aus den Daten von jeweils drei Versuchsdurchführungen ermittelt wurden.

Kondition	Mittelwert (relativ) 2h nach Infektion Die Gesamtzahl ausgezählter PVs entspricht 100%	Mittelwert (relativ) 6h nach Infektion Die Gesamtzahl ausgezählter PVs entspricht 100%	Statistische Signifikanz
GFP-mGBP7 positiv (Gesamt)	$64,7 \pm 10.1$	65,8 ± 3.00	ns
GFP-mGBP7 positiv	7,6 ± 11.2	1,3 ± 1.14	ns
mCherry-mGBP2 oder 6 positiv (Gesamt)	72,8 ± 8.74	74,0 ± 4.82	ns
mCherry-mGBP2 oder 6 positiv	15,7 ± 9.17	8,9 ± 4.26	ns
GFP-mGBP7 + mCherry-mGBP2 oder 6 positiv	57,1 ± 4.19	65,7 ± 2.23	ns
doppelt negative PV	19,6 ± 3.98	24,1 ± 4.42	ns

Tabelle 6: Relative Daten inklusive Standardabweichung (SD) der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine zwei Stunden und sechs Stunden nach *T. gondii* Infektion von mGBP2 und mGBP7 transduzierten mGBP7-^{/-} MEFs. Die Daten sind als Mittelwerte mit

Standardabweichung angegeben, die aus den Daten von jeweils drei Versuchsdurchführungen ermittelt wurden. Für die Berechnungen der statistischen Signifikanz wurde der unpaired two-tailed Student's t-test verwendet. Die Abkürzung ns entspricht keiner statistischen Signifikanz (nicht signifikant).

Tabelle 5 beschreibt die absoluten Daten der ermittelten Rekrutierungsfrequenzen der mGBP7 defizienten und mit GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP2 kotransduzierten MEFs im Vergleich von zwei und sechs Stunden nach Infektion. Für die Vergleichbarkeit sind in Tabelle 6 die relativen Mittelwerte und die statistische Signifikanz dargestellt. In Bezug auf die besagte Analyse konnte bei sämtlichen acht betrachteten Konditionen keine statistische Signifikanz festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die beobachteten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen nicht ausreichend stark waren, um die Nullhypothese auf einem signifikanten Niveau zu widerlegen.

3.1.6 Vergleich der Rekrutierungsfrequenzen in mGBP7-defizienten MEFs zwei Stunden nach *T. gondii*-Infektion: GFP-mGBP7/mCherry-mGBP6 vs. GFPmGBP7/mCherry-mGBP2



Abb. 10: Analyse der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine (links) und der mGBP6- und mGBP7-Fusionsproteine (rechts) innerhalb der doppelt transduzierten MEF-Zelllinien nach zwei Stunden. Dabei sind die Rekrutierungsfrequenzen von nur mGBP7-positiven (Grün)-, nur mGBP2-positiven bzw. nur mGBP6-positiven (Rot)- und von doppelt positiven *T. gondii*-PVs (Orange) dargestellt.

In Abbildung 10 ist ein Vergleich der Akkumulationsfrequenzen an die *T. gondii* PV bei mGBP7 defizienten MEFs, die mit GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP2 doppelt transduziert worden sind und den MEFs, die mit GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP6 doppelt transduziert worden sind, dargestellt. Die gezählten mGBP-positiven *T. gondii*-PVs werden unterschieden in mGBP7-positive *T. gondii* (Grün), mGBP2-positive *T. gondii* (Rot) bzw. mGBP6-positive (Rot) und mGBP7+mGBP6-positive *T. gondii* (Orange) bzw. mGBP7+mGBP2-positive

T. gondii (Orange) PVs. In Abbildung 11 wurden zusätzlich die Gesamtzahl der mGBP7 positiven *T. gondii* (Dunkelgrün), die Gesamtzahl der mGBP6 bzw. mGBP2-positiven (Dunkelrot) und die Zahl der doppelt negativen PVs (Blau) dargestellt.

Es werden zunächst die Rekrutierungsfrequenzen zwei Stunden nach Infektion betrachtet. Bei der Auswertung zeigte sich, dass bei den doppelt transduzierten MEFs mit mGBP7 und mGBP2 eine um 12,4% höhere Rekrutierung von mGBPs an die PVs erfolgte als im Vergleich zur mGBP7/mGBP6 Zelllinie. Dementsprechend lassen sich auch bei den mGBP7/mGBP2 korekrutierten MEFs 19,6% PVs ohne Rekrutierung beobachten und bei den mGBP7/mGBP6 korekrutierten MEFs 32%.



Abb. 11: Vergleich der Analysen der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine (links) und mGBP6- und mGBP7-Fusionsproteine (rechts) innerhalb der doppelt transduzierten MEF-Zelllinien nach zwei Stunden. Dabei sind insgesamt mGBP7-positive (Dunkelgrün)-, insgesamt mGBP2-positive bzw. mGBP6-positive (Dunkelrot)- und doppelt negative *T. gondii*-PVs (Blau) dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Akkumulationsfrequenz von mGBP2 an die T. gondii PVs mit 72,8% deutlich höher war als die Frequenz von 41,2% bei mGBP6. Darüber hinaus ergab sich aus dem Vergleich der nur mGBP2 positiven PVs mit den nur mGBP6 positiven PVs, dass ungefähr doppelt so viele PVs eine Rekrutierung von mGBP2 als von mGBP6 aufwiesen. In mit mGBP7 und mGBP6 doppelt transduzierten Zelllinien betrug die Rekrutierungshäufigkeit von nur mGBP7-positiven PVs 26,8% und war damit etwa 20% höher als in mit mGBP2 und mGBP7 transduzierten Zelllinien (n=7,6%). Vergleicht man jedoch die Rekrutierungsfrequenzen aller PVs, an die mGBP7 rekrutiert wurde, ist ersichtlich, dass die Rekrutierungsfrequenz bei den mGBP7 defizienten MEFs mit mGBP7 und mGBP2 um etwa 6% höher lag als die der mGBP7-defizienten MEFs mit mGBP7 und mGBP6. Dies spiegelte sich auch in der deutlich höheren Akkumulation von ca. 25% doppelt positiver PVs in dieser Zelllinie wider. Diese lag bei den mCherry-mGBP2/GFP-mGBP7 MEFs bei 57,1% und bei den mCherry-mGBP6/GFP-mGBP7 MEFs bei 32,4%. Im Vergleich der beiden Zelllinien zum Zeitpunkt zwei Stunden nach Infektion, zeigte sich, dass mGBP2 am häufigsten an die PV rekrutiert wurde (2h: n=72,8%), gefolgt von mGBP7 (2h: n=58,2-64,7%). Die niedrigste Rekrutierungsfrequenz wies mGBP6 mit 41,2% auf.

Tabelle 7 stellt einen Vergleich der absoluten Daten zwischen mGBP7-defizienten MEFs, die mit GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP2 kotransduziert wurden und mGBP7-defizienten MEFs, die mit GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP6 kotransduziert wurden, zwei Stunden nach Infektion dar. Tabelle 8 stellt für die bessere Vergleichbarkeit die Messwerte als relative

Mittelwerte dar und beinhaltet die statistische Signifikanz. Im Zuge dieser Analyse wurden signifikante Unterschiede bei mehreren Konditionen identifiziert. Insbesondere zeigte sich eine statistisch bedeutsame Abweichung in der Anzahl der insgesamt mCherry-mGBP2 bzw. mCherry-mGBP6 positiven PVs. Zudem wurde ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der doppelt positiven PVs festgestellt, wobei bei der Zelllinie mit GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP2 eine deutlich höhere Anzahl von PVs ermittelt wurde. Ein weiterer Befund war der signifikante Unterschied in der Anzahl der mit doppelt negativen PVs bei den beiden Zelllinien. Für die anderen betrachteten Konditionen konnte keine statistische Signifikanz festgestellt werden.

Kondition	MEFs mGBP7 -/- + GFP-mGBP7 + mCherry-mGBP2 2h nach Infektion	MEFs mGBP7 -/- + GFP- mGBP7 + mCherry- mGBP6 2h nach Infektion
	Mittelwert ± SD	Mittelwert ± SD
Gesamtanzahl gebildeter PVs	43 ± 1.15	34 ± 3.79
GFP-mGBP7 positiv	28 ± 5.03	20 ± 2.65
(Gesamt)		
GFP-mGBP7 positiv	3 ± 4.93	9 ± 4.58
mCherry-mGBP2 oder 6 positiv (Gesamt)	31 ± 3.00	14 ± 5.57
mCherry-mGBP2 oder 6 positiv	7 ± 3.79	3 ± 2.00
GFP-mGBP7 + mCherry- mGBP2 oder 6 positiv	24 ± 1.53	11 ± 4.16
doppelt negative PV	8 ± 1.53	11 ± 2.65
mit <i>T. gondii</i> infizierte Zellen	41 ± 2.08	34 ± 3.21

 Tabelle 7: Absolute Daten inklusive Standardabweichung (SD) der Rekrutierung und Akkumulation der

 mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine und mGBP6-Fusionsproteine zwei Stunden nach *T. gondii*

 Infektion von mCherry-mGBP2 und GFP-mGBP7 transduzierten mGBP7^{-/-} MEFs und mCherry-mGBP6

 und GFP-mGBP7 transduzierten mGBP7^{-/-} MEFs. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen

 angegeben, die aus den Daten von jeweils drei Versuchsdurchführungen ermittelt wurden.

Kondition	MEFs mGBP7 -/- + GFP-mGBP7 + mCherry-mGBP2 2h nach Infektion	MEFs mGBP7 -/- + GFP-mGBP7 + mCherry-mGBP6 2h nach Infektion	Statistische Signifikanz
	Whitewert (relativ)	White wert (relativ)	
GFP-mGBP7	$64,7 \pm 10.11$	$58,2 \pm 1.41$	ns
positiv (Gesamt)			
GFP-mGBP7 positiv	7,6 ± 11.21	$26,8 \pm 10.48$	ns
mCherry-mGBP2 oder	$72,8 \pm 8.74$	$41,2 \pm 16.47$	0.0426
6 positiv			
(Gesamt)			
mCherry-mGBP2 oder	$15,7 \pm 9.17$	$8,8 \pm 5.46$	ns
6 positiv			
GFP-mGBP7 +	57,1 ± 4.19	$32,4 \pm 11.31$	0.0240
mCherry-mGBP2 oder			
6 positiv			
doppelt negative PV	19,6 ± 3.98	32,0 ± 6.19	0.0433

 Tabelle 8: Relative Daten inklusive Standardabweichung (SD) der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine und mGBP6-Fusionsproteine zwei Stunden nach *T. gondii*

 Infektion von mCherry-mGBP2 und GFP-mGBP7 transduzierten mGBP7^{-/-} MEFs und mCherry-mGBP6 und GFP-mGBP7 transduzierten mGBP7^{-/-} MEFs. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen angegeben, die aus den Daten von jeweils drei Versuchsdurchführungen ermittelt wurden. Für die Berechnungen der statistischen Signifikanz wurde der unpaired two-tailed Student's t-test verwendet. Die Abkürzung ns entspricht keiner statistischen Signifikanz (nicht signifikant). Die Gesamtzahl ausgezählter PVs entspricht 100%.

3.1.7 Vergleich der Rekrutierungsfrequenzen in mGBP7-defizienten MEFs sechs Stunden nach *T. gondii*-Infektion: GFP-mGBP7/mCherry-mGBP6 vs. GFPmGBP7/mCherry-mGBP2

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen den Vergleich der Akkumulationsfrequenzen an die *T. gondii* PVs bei mGBP7 defizienten MEFs, die mit GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP2 doppelt transduziert worden sind und den MEFs, die mit GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP6 doppelt transduziert worden sind nach sechs Stunden.



Abb. 12: Analyse der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine (links) und mGBP6- und mGBP7-Fusionsproteine (rechts) innerhalb der doppelt transduzierten MEF-Zelllinien nach sechs Stunden. Dabei sind die Rekrutierungsfrequenzen von nur mGBP7-positiven (Grün)-, nur mGBP2- positiven bzw. nur mGBP6-positiven (Rot)- und von doppelt positiven *T. gondii*-PVs (Orange) dargestellt.



Abb. 13: Vergleich der Analyse der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine (links) und mGBP6- und mGBP7-Fusionsproteine (rechts) innerhalb der doppelt transduzierten MEF-Zelllinien nach sechs Stunden. Dabei sind insgesamt mGBP7-positive (Dunkelgrün)-, insgesamt mGBP2-positive bzw. mGBP6-positive (Dunkelrot)- und doppelt negative *T. gondii*-PVs (Blau) dargestellt. Vergleicht man beide infizierte Zelllinien sechs Stunden nach Infektion, ließen sich andere Ergebnisse als zwei Stunden nach Infektion feststellen. In diesem Fall gab es kaum Unterschiede in der Akkumulationsfrequenz der mGBPs an die PV. Insgesamt wurde in der mCherry-mGBP2/GFP-mGBP7-Zelllinie eine Rekrutierungshäufigkeit von 75,9% der PVs beobachtet, die generell eine mGBP-Rekrutierung zeigten, während sie in der mCherrymGBP6/GFP-mGBP7-Zelllinie 77% betrug. Die nur mit mGBP2 akkumulierten PVs überstiegen in ihrer Rekrutierungsfrequenz die der nur mGBP6 positiven PVs um 7,4%, wobei 8,9% PVs nur mGBP2 und 2,5% PVs nur mGBP6 rekrutiert hatten. Betrachtet man die Gesamtrekrutierung von mGBP2, ließen sich auch nach sechs Stunden deutlich höhere Frequenzen um 25,8% feststellen als bei den insgesamt mGBP6 positiven PVs. Bei mit mGBP7 und mGBP6 doppelt transduzierten MEFs wurden nur mGBP7-positive PVs mit einer um 26,6% höheren Häufigkeit rekrutiert als bei den mGBP7/mGBP2 positiven MEFs. Beim Vergleich der Gesamtmenge von mGBP7, welches an die PV rekrutiert wurde, zeigten die beiden Zelllinien weniger Unterschiede, wobei mit mGBP7 und mGBP2 transduzierte MEFs ein Ergebnis von 65,8% zeigten und die Vergleichszelllinie eine um etwa 10% höhere Rekrutierungshäufigkeit von 74%. Die Anzahl doppelt positiver PVs betrug 65,7% in den mGBP7- und mGBP2-transduzierten Zelllinien, was signifikant höher war als in mGBP7- und mGBP6-transduzierten MEFs, wo 46,6% beobachtet wurden. Dies entspricht einem Unterschied von 19,1% zwischen den beiden Zelllinien. Auch im Vergleich sechs Stunden nach Infektion zeigte sich, dass mGBP6 am wenigsten an die PV rekrutiert wurde (n=48,2%). Bei mGBP2 und mGBP7 zeigten sich nahezu identische Werte in den Rekrutierungsfrequenzen von ungefähr 74%. Die erhaltenen Ergebnisse in Tabelle 9 präsentieren ergänzend die absoluten Ergebnisse der umfassenden Analyse der Rekrutierungsfrequenzen der kontransduzierten mGBP7-defizienten MEFs. Der Untersuchungszeitpunkt erstreckte sich über einen Zeitraum von sechs Stunden nach Infektion mit T. gondii.

Um die Messwerte vergleichbar zu machen, wurden relative Mittelwerte ermittelt und in Tabelle 10 gegeneinander aufgetragen, ebenso wird die statistische Signifikanz dargestellt.

Die durchgeführte Vergleichsanalyse deckte bedeutsame Unterschiede in den Rekrutierungsfrequenzen zwischen den beiden betrachteten Zuständen auf. Insbesondere manifestierte sich ein signifikanter Unterschied in der Gesamtanzahl der gebildeten PVs. Hierbei war eine höhere Anzahl von PVs in der GFP-mGBP7/mCherry-mGBP6 kotransduzierten Zelllinie zu verzeichnen. Weiterhin konnte eine signifikante Diskrepanz bei der Quantifizierung der insgesamt GFP-mGBP7 positiven PVs sowie bei den PVs, die ausschließlich auf GFP-mGBP7 positiv reagierten, ermittelt werden. In beiden Fällen wurden bei der mGBP7/mCherry-mGBP6 kotransduzierten Zelllinie erhöhte Werte festgestellt. Hinsichtlich der Gesamtzahl der mCherry-Fusionsproteine ergab sich eine signifikante Differenz zwischen den Zelllinien, jedoch wurde bei den PVs, die ausschließlich eine Rekrutierung von mCherry-mGBP2 oder mCherry-mGBP6 aufwiesen keine statistische Signifikanz festgestellt. Die doppelt positiven PVs beider MEFs zeigten einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich. Jedoch wies die Anzahl der doppelt negativen PVs keinen signifikanten Unterschied auf.

Kondition	MEFs mGBP7 -/- + GFP-mGBP7 + mCherry-mGBP2 6h nach Infektion	MEFs mGBP7 -/- + GFP- mGBP7 + mCherry- mGBP6 6h nach Infektion
	Mittelwert ± SD	Mittelwert ± SD
Gesamtanzahl gebildeter PVs	55 ± 6.11	81 ± 5.03
GFP-mGBP7 positiv	36 ± 4.58	60 ± 3.21
(Gesamt)		
GFP-mGBP7 positiv	1 ± 0.58	23 ± 6.11
mCherry-mGBP2 oder 6 positiv (Gesamt)	41 ± 7.09	39 ± 2.52
mCherry-mGBP2 oder 6 positiv	5 ± 2.65	2 ± 1.00
GFP-mGBP7 + mCherry- mGBP2 oder 6 positiv	36 ± 5.00	37 ± 4.04
doppelt negative PV	13 ± 1.00	19 ± 2.89
mit T. gondii infizierte Zellen	52 ± 4.16	71 ± 4.73

 Tabelle 9: Absolute Daten inklusive Standardabweichung (SD) der Rekrutierung und Akkumulation der

 mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine und mGBP6-Fusionsproteine sechs Stunden nach *T. gondii*

 Infektion von mCherry-mGBP2 und GFP-mGBP7 transduzierten mGBP7-^{/-} MEFs und mCherry-mGBP6

 und GFP-mGBP7 transduzierten mGBP7-^{/-} MEFs. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD angegeben, der aus

 den Daten von jeweils drei Versuchsdurchführungen ermittelt wurde. Für die Berechnungen der statistischen

 Signifikanz wurde der unpaired two-tailed Student's t-test verwendet. Die Abkürzung ns entspricht keiner

 statistischen Signifikanz (nicht signifikant).

Kondition	MEFs mGBP7 -/- + GFP-mGBP7 + mCherry-mGBP2 6h nach Infektion Mittelwert (relativ) Die Gesamtzahl ausgezählter PVs entspricht 100%	MEFs mGBP7 -/- + GFP-mGBP7 + mCherry-mGBP6 6h nach Infektion Mittelwert (relativ) Die Gesamtzahl ausgezählter PVs entspricht 100%	Statistische Signifikanz
GFP-mGBP7 positiv (Gesamt)	65,8 ± 3.00	74,0 ± 3.31	0.0335
GFP-mGBP7 positiv	$1,3 \pm 1.14$	27,9 ± 6.03	0.0017
mCherry-mGBP2 oder 6 positiv (Gesamt)	$74,0 \pm 4.82$	$48,2 \pm 6.02$	0.0044
mCherry-mGBP2 oder 6 positiv	8,9 ± 4.26	2,5 ± 1.11	ns
GFP-mGBP7 + mCherry-mGBP2 oder 6 positiv	65,7 ± 2.23	46,6 ± 7.79	0.0150
doppelt negative PV	24,1 ± 4.42	23,1 ± 2.23	ns

Tabelle 10: Relative Daten inklusive Standardabweichung (SD) der Rekrutierung und Akkumulation dermGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine und mGBP6-Fusionsproteine sechs Stunden nach *T. gondii*Infektion von mCherry-mGBP2 und GFP-mGBP7 transduzierten mGBP7-/- MEFs und mCherry-mGBP6und GFP-mGBP7 transduzierten mGBP7-/- MEFs. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD angegeben, der ausden Daten von jeweils drei Versuchsdurchführungen ermittelt wurde. Für die Berechnungen der statistischenSignifikanz wurde der unpaired two-tailed Student's t-test verwendet. Die Abkürzung ns entspricht keinerstatistischen Signifikanz (nicht signifikant).

4 Diskussion

Guanylat-bindende Proteine sind wichtige Effektorproteine bei der Abwehr gegen intrazelluläre Pathogene wie Bakterien, Viren und Protozoen (Anderson et al., 1999, Degrandi et al., 2013, Yamamoto et al., 2012, Meunier and Broz, 2016, Pilla-Moffett et al., 2016). Durch ihre Wechselwirkung mit den parasitophoren Vakuolen von T. gondii oder den Replikationskomplexen von Viren hemmen sie die Replikation dieser Erreger (MacMicking, 2004, Kim et al., 2016). Der genaue molekulare Mechanismus hinter dieser antimikrobiellen Funktion von GBPs ist noch nicht vollständig geklärt. Bisher konnten hGBP1, hGBP5 und mGBP2 und mGBP7 hinsichtlich ihrer biochemischen und strukturellen Eigenschaften detailliert analysiert werden (Praefcke et al., 2004, Wehner and Herrmann, 2010, Abdullah et al., 2009, Kravets et al., 2012, Prakash et al., 2000b, Ince et al., 2017, Steffens, 2020, Legewie et al., 2019). Darüber hinaus wurden bisher die zellulären Wechselwirkungen von GBP mit CaaX-Isoprenylierungsmotiven, einschließlich hGBP1, hGBP5, mGBP1 und mGBP2 untersucht, um aufzuklären, welche Prozesse zu einer Pathogenrepression führen können (Selleck et al., 2013, Shenoy et al., 2012, Kim et al., 2012, Wehner and Herrmann, 2010, Kravets et al., 2016, Degrandi et al., 2013, Wandel et al., 2017). In nachfolgenden Forschungsarbeiten wurde weiterhin die biochemische und strukturelle Charakterisierung von mGBP7 vorgenommen und die Interaktion mit anderen mGBP-Familienmitgliedern und Membranlipiden analysiert (Legewie et al., 2019, Steffens, 2020). Dabei konnte auch die essenzielle Rolle von mGBP7 bei der Abwehr von T. gondii beschrieben werden (Steffens et al., 2020). Mehrere wissenschaftliche Untersuchungen haben sich mit der Analyse und Beschreibung von mGBP2 und mGBP7 befasst und dabei die entscheidende Funktion dieser Proteine bei der Bekämpfung von Pathogenen innerhalb von Zellen separat nachgewiesen. Für mGBP6 sind bisher nur wenig Daten vorhanden und wurde deshalb in Kombination mit mGBP7 in dieser Forschungsarbeit hinsichtlich des Rekrutierungsverhaltens an die T. gondii Membran untersucht.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnten die Rekrutierungsfrequenzen von GFP-mGBP7, mCherry-mGBP6 und mCherry-mGBP2 nach zwei und nach sechs Stunden nach Infektion von MEFs mit *T. gondii* bestimmt werden. Zudem wurde das erste Mal eine Rekrutierungsanalyse von mGBP2, mGBP7 und mGBP6 sechs Stunden nach *T. gondii* Infektion durchgeführt. Es zeigte sich, dass mGBP2 am häufigsten an die PV rekrutiert wurde, gefolgt von mGBP7 und mGBP6. In beiden Zelllinien konnte über die Zeit eine Zunahme der PVs beobachtet werden, an denen beide mGBP-Fusionsproteine der Zelllinie zusammen rekrutiert worden waren. Auffällig war dabei, dass die Anzahl der doppelt positiven PVs bei den mGBP7-defizienten

MEFs, die mit mGBP7 und mGBP2 kotransduziert worden sind, zu beiden Messzeitpunkten deutlich höher war als bei der Vergleichs-Zelllinie, die mit mGBP7 und mGBP6 kotransduziert worden war. Es konnte bei beiden Zelllinien gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt sechs Stunden nach Infektion mehr Zellen mit *T. gondii* infiziert worden waren und sich auch mehr PVs in den Zellen ausgebildet hatten. Dabei konnte auch eine Mehrfachinfektion der Zellen auftreten. Alle Zellen mit bis zu drei ausgebildeten PVs wurden bei der Auswertung berücksichtigt. Es ist wichtig darauf hinzuweisen, dass bei den Zellzählungen der Zelllinie mit den GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP6- Fusionsproteinen nach sechs Stunden im Vergleich zu allen anderen Versuchen deutlich mehr infizierte Zellen und somit auch deutlich mehr gebildete PVs zu beobachten waren.

Die Konfokalmikroskopie und die Weitfeldmikroskopie haben unterschiedliche Anwendungen in der Mikroskopie aufgrund ihrer verschiedenen Eigenschaften. Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie eignet sich gut für die Erstellung von optischen Schnitten aus dicken Proben und die Darstellung feiner Details sowie von 3D-Bildern (May, 2018). Die Begrenzung, wie Licht durch eine Lochblende zum Photomultiplier gelangt, ermöglicht eine optische Scheibendicke von weniger als 500 Nanometern unter geeigneten Bedingungen (Coker and Davidson, o.J.). Auf der anderen Seite eignet sich die Weitfeld-Mikroskopie gut für die schnelle Bildgebung und die Beobachtung von dynamischen Prozessen (May, 2018). Beide Techniken haben ihre Vor- und Nachteile, und die Wahl der Mikroskopie-Technik hängt von den spezifischen Anforderungen und der Art der Probe ab, die untersucht werden soll.

Die Methode zur Bestimmung der Rekrutierungsfrequenzen der mGBP-Familienmitglieder in dieser Arbeit nutzte die Keyence-Mikroskopsoftware zur Erstellung eines Übersichtsbildes, was eine schnellere Auswertung ermöglichte. Allerdings gibt es einige Einschränkungen, die bei der Anwendung berücksichtigt werden müssen. Das Übersichtsbild wurde in den festgelegten Grenzen (X=20 Aufnahmen, Y=20 Aufnahmen) erstellt. Zum einen ermöglichte dies eine ausreichend scharfe Darstellung auch nach Vergrößerung des Übersichtsbildes in der Fiji Software, zum anderen wurde so weitgehend verhindert, dass Aufnahmen über den Rand der Deckgläschens hinaus aufgenommen wurden. In dem festgelegten Aufnahmebereich konnten nicht immer 100 infizierte Zellen festgestellt werden, wie es in vorherigen Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe gängig war.

Die neue Methode birgt eine zusätzliche Herausforderung. Das vergrößerte Übersichtsbild weist im Vergleich zu Konfokalmikroskop-Aufnahmen generell eine schlechtere Auflösung und Bildschärfe auf. Insbesondere bei unklaren Ergebnissen kann dies zu Unsicherheiten führen, welche im Vergleich zur Auswertung mittels Konfokalmikroskopie verstärkt auftreten.

Deshalb wurden bei der Auszählung nur Zellen berücksichtigt, in denen eine eindeutige Akkumulation der untersuchten mGBP festgestellt werden konnte und in denen sich maximal drei parasitophore Vakuolen von *T. gondii* ausgebildet hatten. Die ermittelten Werte wurden in eine Tabelle übertragen und für eine bessere Vergleichbarkeit die absoluten Messwerte prozentual umgerechnet, wobei die Zahl der ermittelten, auswertbaren Vakuolen in den Zellen gleich 100% gesetzt worden ist.

Mit der Anwendung der neuen mikroskopischen Methode, ergaben sich in dieser Arbeit im Vergleich mit den Experimenten vorheriger Forschungsarbeiten höhere Werte für die Rekrutierungsfrequenzen (Lindenberg et al., 2017, Steffens, 2020). Dies kann unter anderem durch den unterschiedlichen Versuchsaufbau erklärt werden, da, anders als in den vorherigen Forschungsarbeiten, nicht immer 100 mit *T. gondii* infizierte Zellen analysiert werden konnten. Die Analyse von Rekrutierungsfrequenzen in vorherigen Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe erfolgte an einem Konfokalmikroskop (Zeiss LSM 780). Ein nennenswerter Unterschied besteht darin, dass im Weitfeldmikroskop ganze Zellen mikroskopiert werden, während im Konfokalmikroskop Schnittebenen der Zellen dargestellt werden.

4.1 Quantitative Untersuchung der Rekrutierung von mGBP7 und mGBP6 an die *T. gondii* PV nach zwei und sechs Stunden: Analyse des gegenseitigen Einflusses zweier mGBP-Familienmitglieder

Das murine Guanylat-bindende Protein 2 ist bereits gut erforscht und in mehreren Arbeiten analysiert und beschrieben worden (Steffens, 2020, Kravets et al., 2016, Degrandi et al., 2013, Degrandi et al., 2007). Auch die Rolle von mGBP7 wurde bereits genauer untersucht (Steffens et al., 2020, Legewie et al., 2019, Lindenberg et al., 2017, Degrandi et al., 2007, Kresse et al., 2008). Da bisher nur begrenzte Daten zu mGBP6 vorliegen, wurde in dieser Forschungsarbeit eine Untersuchung seines Rekrutierungsverhaltens an die *T. gondii* PV allein und in Kombination mit mGBP7 durchgeführt.

In einer Forschungsarbeit von Steffens et al. konnte eine unterschiedliche Kinetik der Rekrutierung von mGBP7 und mGBP6 an die *T. gondii* Membran beschrieben werden. Nach einer Beobachtungszeit von 120 Minuten zeigte ein Live-Cell-Imaging-Video die sichtbare Akkumulation von mGBP7 und mGBP6 an der Plasmamembran des Parasiten (Steffens, 2020). Dabei können die beiden mGBP-Familienmitglieder einzeln oder kolokalisiert an der PVM vorliegen (Steffens, 2020). Die mGBP6-mGBP7-Kolokalisation war dabei im Zytosol nachweisbar und war sowohl in nicht infizierten Zellen als auch in *T. gondii*-infizierten Zellen

nach zwei Stunden Infektionsdauer zu finden (Steffens, 2020). STED-Mikroskopie zeigte die enge Lokalisierung der beiden Fusionsproteine um die PVM von *T. gondii* (Steffens, 2020).

Im zeitlichen Verlauf von zwei bis sechs Stunden kam es zu einem Anstieg der Rekrutierung von mGBP6 und mGBP7 an die PV. Vor allem sechs Stunden nach Infektion kam es deutlich häufiger zu einer Korekrutierung an die PV. Dies führte auch zu einer erhöhten Rekrutierungshäufigkeit von mGBP7- und mGBP6-Fusionsproteinen, wobei die Anzahl der PVs, die allein mGBP7 oder allein mGBP6 rekrutierten, wenig variierte. Eine Zunahme der ausgebildeten parasitophoren Vakuolen im zeitlichen Verlauf könnte durch die Zunahme der infizierten MEFs erklärt werden. Je länger der Zeitpunkt bis zur Fixierung dauert, desto länger können die *Toxoplasmen* mit den MEFs in Kontakt kommen und können diese infizieren. Bei mehr ausgebildeten PVs können auch häufiger mGBPs an diese rekrutiert werden.

Auffällig ist, dass mGBP7 zu beiden Messzeitpunkten häufiger an die PV rekrutiert wurde als mGBP6. Die Ursache hierfür ist bisher noch unklar. Eine Interaktion zwischen mGBP6 und mGBP7 konnte in vorherigen Forschungsarbeiten nicht nachgewiesen werden. Hierfür könnten in der Zukunft FRET Untersuchungen wie für die mGBP2/mGBP7 Interaktionsanalyse (Kravets et al., 2016) durchgeführt werden. Sowohl mGBP7 als auch mGBP6 beinhalten kein Isoprenylierungsmotiv. Für mGBP2 konnte nachgewiesen werden, dass das Isoprenylierungsmotiv des C-Terminus für die Akkumulation an die *T. gondii* PV erforderlich ist (Degrandi et al., 2013). Bei mGBP7 sind die C-terminalen 40 Aminosäuren für die Rekrutierung an die PVM essenziell (Legewie et al., 2019). mGBP6 zeigte in unstimulierten Zellen eine partielle Kolokalisation mit mGBP7, die nach IFN- γ -Stimulation nur leicht erhöht war. mGBP7 kann auch in mGBP1-, mGBP2- oder mGBP6-positiven Kompartimenten nach IFN- γ -Stimulation von Zellen gefunden werden, jedoch nur in einem viel geringerem Ausmaß (Steffens et al., 2020).

Die Analyse der Rekrutierung von mGBPs an Inklusionen von *C. trachomatis* und an PVs von *Toxoplasma gondii* in NIH3T3-Fibroblasten in früheren Untersuchungen ergab, dass mGBP6 im Vergleich zu *C. trachomatis* Inklusionen eine relativ erhöhte Akkumulationshäufigkeit an *T. gondii*-PVs aufwies (Lindenberg et al., 2017). Vor allem mGBP1, mGBP2, mGBP3, mGBP6 und mGBP7 kolokalisieren an die *T. gondii* PV, dabei zeigten mGBP2 und mGBP6 die häufigste Rekrutierung. Unter den von Lindenberg et al. untersuchten mGBPs wies mGBP2 die höchste Rekrutierungsfrequenz auf (Lindenberg et al., 2017). Dies deckt sich zum Teil mit den Ergebnissen dieser Forschungsarbeit. Die höchste Rekrutierungsfrequenz wies ebenfalls mGBP2 auf, jedoch lag die Rekrutierung von mGBP7 ca.10-25% höher als die Rekrutierung von mGBP6. Es kann vermutet werden, dass diese

Unterschiede durch die gegenseitige Beeinflussung der mGBP-Familienmitglieder zustande kommen, wobei in dem Versuch von Lindenberg et. al nur die Expression jeweils eines einzelnen mGBPs untersucht wurde. Insgesamt wurden deutlich höhere Rekrutierungsfrequenzen in dieser Forschungsarbeit für die untersuchten mGBPs ermittelt. Dies kann durch den unterschiedlichen Versuchsaufbau erklärt werden, der sich unter anderem in der MOI, der gewählten Zelllinie und der untersuchten Zellzahl unterscheidet (Lindenberg et al., 2017). Hervorzuheben ist, dass in diesem Versuch murine embryonale Fibroblasten verwendet wurden, während in den Experimenten von Lindenberg et al. NIH3T3-Fibroblasten eingesetzt wurden. Für die unterschiedlichen Zelltypen zeigen sich unterschiedliche Rekrutierungsverhalten, die in weiteren Forschungsarbeiten systematisch weiter untersucht werden könnten. Dabei wäre auch die Untersuchung des Rekrutierungsverhalten der mGBPs in Makrophagen interessant.

Bisher gibt es keine klaren Erkenntnisse darüber, ob und wie mGBP7 die Expression oder Funktion von mGBP6 beeinflussen kann. Die meisten Studien haben sich auf die individuelle Charakterisierung der Proteine und ihre Funktionen konzentriert, anstatt ihre Interaktionen miteinander zu untersuchen. Daher sind weitere Forschungsarbeiten erforderlich, um die möglichen Interaktionen zwischen mGBP6 und mGBP7 besser zu verstehen.

Es wird vermutet, dass eine effektive Rekrutierung von mGBP7 zur Eliminierung von *T. gondii* beiträgt (Steffens et al., 2020). Die Rolle von mGBP6 bei der Abwehr gegen *T. gondii* ist jedoch bisher noch unklar und sollte in weiteren Forschungsarbeiten genauer untersucht werden. Dazu könnte auch die Etablierung und die Erforschung der Infektionssuszeptibilität einer mGBP6-defizienten Mauslinie beitragen.

4.2 Quantitative Untersuchung der Rekrutierung von mGBP7 und mGBP2 an die *T. gondii* PV nach zwei und sechs Stunden: Analyse des gegenseitigen Einflusses zweier mGBP-Familienmitglieder

In vorherigen Forschungsarbeiten wurde die Rekrutierung von mGBP2 auf mGBP7 untersucht. Nach einer Infektion mit dem intrazellulären Protozoen konnte die Rekrutierung von mGBP2 und mGBP7 an die PVM nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine unterschiedliche Kinetik, wobei zwei Stunden nach *T. gondii*-Infektion mGBP2 in hoher Dichte rekrutiert wurde und mGBP7 in geringerer Zahl folgt (Steffens, 2020). Diese Beobachtung konnte auch bei dieser Analyse der Rekrutierungsfrequenzen gemacht werden. Dabei zeigte sich insgesamt eine Rekrutierung von 72,8% von mGBP2, mGBP7 zeigte eine ungefähr 10% geringere Rekrutierung zwei Stunden nach Infektion. Im Zeitvergleich änderten sich die

Rekrutierungsfrequenzen für beide mGBP-Familienmitglieder nur geringfügig, wobei auch bei dieser Zelllinie eine Zunahme der doppelt positiven PVs festgestellt werden konnte.

Dies spiegelt sich auch in den Rekrutierungsfrequenzen der einzeln akkumulierten mGBPs wider, wobei die Anzahl der nur mGBP7 positiven PVs deutlicher geringer war als die der nur mGBP2 positiven PVs. Dies könnte daraufhin deuten, dass mehr mGBP7 an die bereits mit mGBP2 rekrutierten PVs akkumulieren konnte. Auch in Untersuchungen von Steffens et al. konnte beobachtet werden, dass 90 min nach Infektion ungefähr die Hälfte aller PVs nur mGBP2 positiv waren. Nach über 90 Minuten konnte eine Zunahme der PVs beobachtet werden, an denen sowohl mGBP7 als auch mGBP2 gemeinsam akkumuliert hatten (Steffens et al., 2020). Ein Rekrutierungsverlauf konnte in vorheriger Forschungsarbeit durch STED-Mikroskopie bestätigt werden, wobei sechs Stunden nach Infektion mGBP2 und mGBP7 in ähnlicher Proteindichte an der PVM von T. gondii nachgewiesen werden konnten, was zuvor durch die SIM-Mikroskopie bei zwei Stunden nach Infektion noch nicht nachgewiesen werden konnte (Steffens, 2020). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass es eine Rekrutierungshierarchie gibt, in der mGBP2 hauptsächlich an die PV rekrutiert wird, gefolgt von mGBP7 (Steffens, 2020). Diese Vermutung stützt sich auf der Beobachtung, dass die Rekrutierung und Akkumulation von mGBP7 an T. gondii-PVs in Abwesenheit von mGBP2 signifikant reduziert war (Steffens, 2020). Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit reichen noch nicht aus, um diese Rekrutierungshierachie zu bestätigen, liefern jedoch Hinweise, die eine solche Hierarchie nahelegen. Es sollten in einem nachfolgenden Versuch noch detailliertere kinetische Untersuchungen durchgeführt werden. Im Vergleich der Rekrutierungsfrequenzen von GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP2 nach zwei und nach sechs Stunden der mGBP7-defizienten MEFs die mit GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP2 kotransduziert worden waren, konnten keine großen Unterschiede in ihrer Gesamtzahl (nur GFP-mGBP7 positive PVs plus doppelt positive PVs und nur mCherry-mGBP2 positive PVs plus doppelt positive PVs) festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch, dass die Zahl der doppelt rekrutierten PVs im Vergleich von zwei zu sechs Stunden Infektionsdauer um 10% zugenommen hat. Dies spricht dafür, dass nach Anlagerung von mGBP2 mehr mGBP7 zusätzlich an die PVM angelagert wurde.

In der Forschungsarbeit von Steffens et al. wurde 90 Minuten nach *T. gondii* Infektion die hauptsächliche und primäre Anlagerung von mGBP2 an die PV beschrieben (Steffens, 2020). In einer früheren Studie von Degrandi et al. wurde die Kinetik der mGBP2 Anlagerung an die PV untersucht. Etwa 10 Minuten nach der Infektion wurde mGBP2 bereits an der PV nachgewiesen, wobei ein Maximum nach etwa 20 Minuten beobachtet wurde (Degrandi et al.,

2013). Beide Beobachtungen lassen vermuten, dass bereits zwei Stunden nach Infektion mit *T. gondii* das Maximum der Akkumulation von mGBP2 erreicht sein müsste, dies könnte die nur geringe Zunahme der Rekrutierungsfrequenz der mGBP2 Fusionsproteine nach sechs Stunden erklären.

Eine Möglichkeit für die schnellere mGBP2-Rekrutierung im Vergleich zu mGBP7 könnte das Vorhandensein des mGBP2-Isoprenylierungsmotivs CaaX sein (Stickney and Buss, 2000, Degrandi et al., 2013). Dieses CaaX Motiv (C=Cystein, a=aliphatische Aminosäure, X=terminale Reste) wird posttranslational entweder durch eine Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Transferase modifiziert. Dies hat eine Förderung der direkten Membranbindung zur Folge (Kravets et al., 2016, Stickney and Buss, 2000, Cheng et al., 1991, Praefcke et al., 1999, Prakash et al., 2000a, Kravets et al., 2012). Für mGBP2 ist das Isoprenylierungsmotiv CTIL beschrieben worden (Degrandi et al., 2007). Die Rekrutierung an die PV erfordert eine spezifische Isoprenylierung, aber auch andere Motive der Cterminalen Helix beeinflussen die Rekrutierungseffizienz (Degrandi et al., 2013). Dies konnte durch Punktmutation der mGBP2-Isoprenylierungs-Erkennungssequenz und Herstellung von chimären Proteinen nachgewiesen werden. Diese chimären Proteine wurden aus der G-Domäne von mGBP5 (lokalisiert auf Chromosom 3 mit Isoprenylierungsmotiv) und der Cterminalen Region von mGBP2 (mGBP5-2-Protein), sowie der umgekehrten Version aus der G-Domäne von mGBP2 und der C-terminalen Region von mGBP5 (mGBP2-5-Protein) hergestellt (Degrandi et al., 2013). Nach der Punktmutation der Isoprenylierungs-Erkennungssequenz von mGBP2 CTIL zu STIL wurde keine Akkumulation des Proteins an die PV mehr beobachtet. Stattdessen wurde eine fehlerhafte Verteilung im Zytosol festgestellt. Ähnliche Effekte wurden bei den chimären Proteinen mGBP2-5 und mGBP5-2 beobachtet. Das chimäre Protein mGBP5-2 zeigte keine Lokalisierung in vesikelartigen Strukturen, sondern sammelte sich an der T. gondii PV in infizierten Zellen an. Im Gegensatz dazu zeigte das chimäre Protein mGBP2-5 weder eine vesikelartige Verteilung noch eine Ansammlung an der PV. Zusätzlich waren mGBP2-Proteine, die das C-terminale CaaX-Motiv von mGBP5 enthielten, welches für posttranslationale Modifikationen verantwortlich ist, immer noch in der Lage, zu der T. gondii PV umzulokalisieren, wenn auch in geringerem Umfang (Degrandi et al., 2013). Wurde das C-terminale Isoprenylierungsmotiv von mGBP5 an das GFP-mGBP2 Fusionsprotein isoliert übertragen, so konnte die Fähigkeit zur Akkumulation an T. gondii PVs wieder beobachtet werden. Daher konnte gezeigt werden, dass das C-terminale Isoprenylierungsmotiv entscheidend für die Rekrutierung von mGBP2 an T. gondii ist und dass die C-terminale mGBP2 E-Domäne eine wichtige Rolle bei der stabilen Akkumulation von mGBP2 an die PV spielt (Degrandi et al., 2013). Da weder mGBP7 noch mGBP6 ein Isoprenylierungsmotiv enthalten, lassen sich die verschiedenen Rekrutierungsraten von mGBP2 und mGBP7 am ehesten durch den aktiven Proteintransport von mGBP2 und das Vorhandensein der CaaX-Box erklären (Steffens, 2020). Diese CaaX Box ist nur bei drei der insgesamt elf mGBP-Proteine (mGBP1, mGBP2 und mGBP5) vorhanden (Degrandi et al., 2007). Wie zuvor beschrieben, wird das Isoprenylierungsmotiv von mGBP2 funktionell verwendet, um an der PV-Membran zu interagieren. In früheren Arbeiten konnte eine funktionelle PV-Membranakkumulation des mGBP2-Proteins nachgewiesen werden (Kravets et al., 2012, Degrandi et al., 2013; Kravets et al., 2016, Steffens et al., 2020). Diese Akkumulation war schneller und effizienter im Vergleich direkt zu mGBP7 in doppelt transduzierten Zelllinien. Isoprenyliertes mGBP1 hat eine ähnliche Funktion wie mGBP2 bei einer *T. gondii*-Infektion (Selleck et al., 2013; Yamamoto et al., 2012; Degrandi et al., 2013).

Die Ergebnisse der Forschungsarbeit von Steffens et al. zeigten eine direkte Akkumulation von mGBP2 an die PVM und zeigten eine lokale Verteilung von mGBP7 innerhalb des dichten mGBP2-Netzwerkes. Dies führte zu der Hypothese, dass mGBP7 zunächst mit dem bereits primär an der T. gondii-PVM akkumulierenden mGBP2 interagiert und erst dann direkt an die Membran rekrutiert wird (Steffens, 2020). In dieser Forschungsarbeit wurde auch eine Rekrutierung von GFP-mGBP7 in Abwesenheit von mCherry-mGBP2 Fusionsproteinen an die PVM beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass mGBP2 zwar die Rekrutierung von mGBP7 beeinflusst und fördert, dafür aber nicht zwingend notwendig ist. Der positive Einfluss von mGBP2 auf die mGBP7 Rekrutierung kann durch die hohe Anzahl von doppelt positiven PVs angenommen werden. In der mit GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP6 doppelt transduzierten Zelllinie wurden ähnliche Werte in den Rekrutierungsfrequenzen von mGBP7 wie bei der mit mGBP7 und mGBP2 kotransduzierten Zelllinie beobachtet. Im Vergleich der Ergebnisse sechs Stunden nach Infektion wurden sogar höhere Rekrutierungsfrequenzen von mGBP7 festgestellt. Auffälligerweise sind dabei deutlich seltener doppelt positive PVs zu beobachten. Dass mGBP2 einen Einfluss auf die mGBP7 Rekrutierung hat, wurde in anderen Forschungsarbeiten diskutiert (Steffens, 2020, Yamamoto et al., 2012). In Abwesenheit von mGBP2 tritt die Destabilisierung der PVM deutlich reduziert auf (Degrandi et al. 2013). Zusätzlich wurde eine langsamere Rekrutierungsrate und Akkumulation von mGBP7 im Vergleich zu mGBP2 beobachtet (Steffens, 2020). In der Arbeit von Degrandi et al. wurde eine unvollständige Letalität bei mGBP2-defizienten Mäusen nach einer T. gondii-Infektion beobachtet (Degrandi et al., 2013). Die Ergebnisse der Arbeit konnten die Wirksamkeit von mGBP2 bei der Immunantwort gegen T. gondii belegen. Da mGBP2-defiziente Mäuse nur eine unvollständige Mortalität aufwiesen, wird angenommen, dass andere Faktoren notwendig zu sein scheinen, um die Parasitenreplikation vollständig zu kontrollieren und T. gondii beseitigen zu können (Steffens et al., 2020). In der akuten Phase der T. gondii-Infektion lag die Sterblichkeit mGBP2-defizienter Tiere bei 30%, während die Kontrolle der T. gondii-Replikation in den Wildtyp Tieren noch weitgehend gewährleistet blieb. In der chronischen Phase der Infektion, in der eine Sterblichkeitsrate von ca. 70% bei den mGBP2 defizienten Tieren beobachtet wurde, ist die Immunantwort nicht mehr ausreichend (Degrandi et al., 2013). Eine verringerte Rekrutierungsrate und eine verringerte Akkumulation von mGBP7 in Abwesenheit von mGBP2 wurde als Ursache diskutiert. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen starben bei Abwesenheit von mGBP7 alle infizierten Mäuse innerhalb von 10 Tagen nach der T. gondii-Infektion, trotz der effizienten Rekrutierung und Akkumulation von mGBP2 an die PVM (Steffens, 2020). Diese Ergebnisse werden durch die Daten von Yamamoto et al. unterstützt. Die Studie untersuchte die Auswirkungen des Fehlens mehrerer mGBPs (mGBP1, mGBP2, mGBP3, mGBP5, mGBP7 und GBP2PS), die auf Chromosom 3 lokalisiert sind, auf die Kontrolle der Vermehrung von T. gondii. Durch die Deletion aller auf Chromosom 3 liegenden mGBPs in den mGBP^{Chr3}-defizienten Mäusen, konnte die Kontrolle des Parasiten nicht aufrechterhalten werden. Jedoch konnte die in vitro-Rekonstitution von mGBP7 die Kontrolle der Vermehrung wiederherstellen. Im Gegensatz dazu war die Rekonstitution von mGBP2 unzureichend in diesem Zusammenhang (Yamamoto et al., 2012). Es wird angenommen, dass mGBP2 eine wichtige Rolle bei der T. gondii-Infektion einnimmt. Es beeinflusst die Rekrutierung von mGBP7 und ist vermutlich für die Destabilisierung der PVM durch Assoziation mit dem C-terminalen Isoprenylierungsmotiv verantwortlich. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine effektive Rekrutierung von mGBP7 dazu beiträgt, die Eliminierung von T. gondii einzuleiten (Steffens et al., 2020).

4.3 Vergleich der Rekrutierungsfrequenzen von mGBP7/mGBP6 und mGBP2/mGBP7 nach zwei und sechs Stunden in den transduzierten Zelllinien nach *T. gondii* Infektion

Bei Betrachtung der in dieser Forschungsarbeit gewonnenen Ergebnisse für die Rekrutierungsfrequenzen der mGBP-Familienmitglieder mGBP2, mGBP7 und mGBP6 fällt bei beiden verglichenen Zelllinien die höhere Anzahl an mit *T. gondii* infizierten Zellen sechs Stunden nach Infektion auf im Vergleich mit den Ergebnissen zwei Stunden nach Infektion. Vor allem bei den mCherry-mGBP6/GFP-mGBP7-MEFs wurde eine hohe Zunahme der infizierten Zellen beobachtet. Zusätzlich zu der höheren Infektionsrate haben sich auch mehr

parasitophore Vakuolen in den untersuchten MEFs ausgebildet. Es liegt nahe, dass bei mehr ausgebildeten PVs auch mehr Rekrutierung der mGBPs erfolgt und sich dadurch auch erhöhte Rekrutierungsanzahlen für die untersuchten mGBP-Familienmitglieder ergeben. Warum sich diese erhöhten Werte der infizierten Zellen gerade in dieser Zelllinie zum Zeitpunkt nach sechs Stunden ermitteln ließen, konnte nicht genau geklärt werden. Eine mögliche Erklärung könnte in dem Versuchsaufbau liegen. Sowohl die MEFs als auch die *Toxoplasmen* sind lebende Zellen, dies stellt wie bei allen Versuchen an lebenden Zellen, besondere Herausforderungen für den Versuchsaufbau dar. Lebende Zellen sind komplexe Systeme, die viele biochemische und physiologische Prozesse beinhalten. Es ist besonders wichtig, geeignete Kontrollen und Protokolle zu verwenden, um zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Selbst bei geeigneten Protokollen für die Versuche, kann es zu einer gewissen Variabilität bei Versuchen kommen.

Bei den mCherry-mGBP2/GFP-mGBP7-MEFs zeigte sich im Vergleich zu den mGBP7defizienten MEFs die mit GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP6 kotransduziert worden waren, eine deutlich höhere Rekrutierungsfrequenz doppelt positiver PVs. Dabei zeigten sich Unterschiede nach zwei und nach sechs Stunden zwischen 20 und 30% im Vergleich zu den doppelt positiven PVs der mit GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP2 kotransduzierten Zelllinie. Dies könnte ein Hinweis auf den Einfluss von mGBP2 auf mGBP7 sein. Wie bereits diskutiert, kann bezüglich einer Interaktion zwischen mGBP2 und mGBP7 spekuliert werden und die Hypothese einer Rekrutierungshierarchie aufgestellt werden. Die deutlich höhere Korekrutierung von mGBP7 und mGBP2 als von mGBP7 und mGBP6 doppelt transduzierten MEFs kann durch diese Interaktion möglicherweise erklärt werden. Auffällig ist, dass mGBP7 ähnliche Rekrutierungsfrequenzen in beiden Zelllinien sechs Stunden nach Infektion aufweist. Zusätzlich wurde im zeitlichen Verlauf eine unterschiedliche Kinetik bei den beiden Zelllinien beobachtet. Bei den mCherry-mGBP2/GFP-mGBP7-MEFs gab es nur eine geringe Veränderung in den Rekrutierungsfrequenzen der untersuchten mGBP-Familienmitglieder im Vergleich von zwei und sechs Stunden. Wie bereits diskutiert, wurde in vorherigen Forschungsarbeiten ein Maximum der Rekrutierung von mGBP2 bereits nach 20 bzw. 90 Minuten nach T. gondii Infektion gefunden (Degrandi et al., 2013, Steffens, 2020). In Untersuchungen von Kravets et al, konnte bereits 30 min nach Invasion der untersuchten MEFs mit dem ME49 T. gondii Stamm mGBP2 an der PVM nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte eine mGBP7-Akkumulation erst 90 min nach Infektion beobachtet werden (Steffens et al., 2020, Kravets et al., 2016). Zusätzlich zeigte sich, dass in Abwesenheit von mGBP2, mGBP7 deutlich langsamer an die PV rekrutiert wurde (Steffens,

2020). Dies könnte die Kinetik bei der mCherry-mGBP2/GFP-mGBP7-Zelllinie erklären. Im Vergleich dazu, zeigt sich eine andere Kinetik bei den mCherry-mGBP6/GFP-mGBP7-MEFs. In dieser Zelllinie kann vor allem eine Zunahme der rekrutierten mGBP7-Proteine sechs Stunden nach Infektion beobachtet werden. Die mGBP6-Rekrutierung zeigte ebenfalls eine Zunahme, aber in geringerem Ausmaß. Eine gegenseitige Beeinflussung dieser beiden mGBP-Familienmitglieder wurde bisher nicht nachgewiesen.

Bei Betrachtung der Ergebnisse zeigte von den untersuchten mGBP-Familienmitgliedern mGBP2 die höchste Rekrutierungsfrequenz zu beiden Fixierungszeitpunkten, gefolgt von mGBP7. Die niedrigste Rekrutierung zeigte mGBP6. In vorherigen Forschungsarbeiten konnte die Lokalisation von unter anderem mGBP7 in VLS im Zytosol von IFN- γ -stimulierten Zellen nachgewiesen werden (Degrandi et al., 2007, Kravets et al., 2016, Degrandi et al., 2013). Zusätzlich konnte eine Kolokalisation von mGBP2 mit mGBP1, in geringerem Ausmaß mit mGBP3, aber nicht mit mGBP6 in den zytosolischen VLS und an der PVM von *T. gondii* beobachtet werden. mGBP7 kolokalisiert ebenfalls mit mGBP3, sowohl nach Stimulation mit IFN- γ als auch ohne. Eine Kolokalisation mit mGBP6 kolokalisierte in unstimulierten Zellen nur wenig mit mGBP7, nach IFN- γ Stimulation nahm die Kolokalisation nur geringfügig zu (Steffens et al., 2020).

In der Forschungsarbeit von Kravets et al. konnte beobachtet werden, dass mGBP2 schnell an die PVM von *T. gondii* akkumuliert, diese passieren kann und anschließend den Parasiten direkt attackiert, indem es an der *T. gondii* Membran akkumuliert (Kravets et al., 2016). Ebenfalls konnte mGBP7 sechs Stunden nach Infektion sowohl in der PV als auch im Zytosol des Parasiten nachgewiesen werden (Steffens et al., 2020). mGBP6 lokalisiert sich wie mGBP2 in VLS und wird an die PVM von *T. gondii* rekrutiert. Es existiert jedoch in anderen VLS und interagiert nicht mit mGBP2 über FRET und Ko-IP (Kravets et al., 2016). Die unterschiedliche Lokalisierung von mGBP-Multimeren legt nahe, dass es zukünftig notwendig ist, die funktionellen Rollen verschiedener mGBPs bei der *Toxoplasma*-Immunität weiter systematisch aufzuklären (Kravets et al., 2016). Eine direkte Interaktion und Bildung von Homo- und Heteromultimeren von mGBP2 und mGBP6 konnte weder im Zytosol noch an der PVM bewiesen werden (Kravets et al., 2016).



Abb. 14: Analyse der Rekrutierung und Akkumulation der mCherry-mGBP2- und GFP-mGBP7-Fusionsproteine zwei Stunden nach Infektion. Dabei wurden nur GFP-mGBP7-positive (Grün)-, nur mCherrymGBP2-positive (Rot)- und doppelt positive *T. gondii*-Parasiten (Orange) dargestellt. a) Ergebnisse dieser Dissertation b) Ergebnisse aus der Promotionsarbeit von Frau Dr. Nora Steffens (Abbildung aus (Steffens, 2020)).

Im Rahmen vorhergegangener Forschungsarbeiten wurden ebenfalls Rekrutierungsfrequenzen von mGBP2 und mGBP7 in den doppelt transduzierten MEFs untersucht. In Abbildung 15 wurden die Ergebnisse der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Analysen mit den Analysen in der von Frau Dr. Nora Steffens angefertigten Dissertation von 2020 verglichen.

Dr. Nora Steffens untersuchte in ihrer Dissertation mit dem Titel "Analyse der dynamischen mGBP-Rekrutierung zu Pathogen-enthaltenden Membrankompartimenten" unter anderem die Rekrutierung und Akkumulation von mGBP2 und mGBP7. Hierbei wurden Rekrutierungsfrequenzanalysen im Abstand von 30, 60, 90, 120, 150 und 180 Minuten nach der Infektion durchgeführt. Das Durchführen von Analysen der Rekrutierung von mGBP2 und mGBP7 sechs Stunden nach Infektion wurde bisher noch nicht durchgeführt, jedoch wurde es in dieser aktuellen Forschungsarbeit untersucht. Vergleicht man die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Daten aus der Promotion von Frau Dr. Steffens, so ist zunächst ersichtlich, dass im Rahmen der aktuellen Untersuchung ca. 30% mehr Rekrutierung von mGBPs an die PVs festgestellt werden konnte. Somit unterscheiden sich auch die Akkumulationsfrequenzen der einzelnen mGBP-Familienmitglieder voneinander. Die prozentuale Anzahl der nur mGBP2 positiven PVs (Rot) und nur mGBP7 positiven PVs (Grün) unterscheiden sich allerdings in beiden Versuchen nur geringfügig voneinander. Der größte Unterschied zeigt sich in den Ergebnissen der doppelten Rekrutierungen (Orange), wobei bei den im Jahr 2020 durchgeführten Untersuchungen Werte um die 30% ermittelt, worden sind. Im Vergleich dazu ergaben sich bei der aktuellen Rekrutierungsanalyse Werte um ca. 60%. Im Rahmen der Forschungsarbeit von Frau Dr. Steffens wurden pro Ansatz, Zeit und Zelllinie mindestens 100 Parasiten ausgezählt, um die Rekrutierungsfrequenzen der mGBP an die *T. gondii* PV zu ermitteln. Bei der Forschung, die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurde, wurden die mit *T. gondii* infizierten MEFs und die in den MEFs gebildeten PVs bezogen auf das gesamte Übersichtsbild ausgezählt, wobei bei den Versuchen unterschiedliche Zahlen für die parasitophoren Vakuolen ermittelt worden sind, die 100 Parasiten nicht erreicht hatten. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Ausgangssituationen für die Rekrutierungsanalysen, welches eine Erklärung für die unterschiedlichen Werte sein könnte. Zudem wurde in der Arbeit von Steffens et al. konfokale Mikroskopie verwendet während in dieser Arbeit das Keyence Mikroskopsystem eingesetzt wurde, welches möglicherweise größere Schichtdicken mit Rekrutierung um die PV umfassen kann. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, sollten in Zukunft beide Mikroskopiearten detailliert verglichen werden.



a)



b)

Abb. 15: Analyse der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP-Fusionsproteine zwei Stunden nach Infektion. a) Ergebnisse aus der Forschungsarbeit von Lindenberg et al.. Für 16 Stunden wurden NIH3T3-Fibroblasten, die einzelne mGBP-Proteine mit fluoreszierenden Proteinen fusioniert stabil überexprimieren, mit IFN- γ behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 2 Stunden mit *T. gondii* infiziert und mit SAG1 und DAPI zur Färbung der Nukleinsäuren versehen. Mithilfe der konfokalen Mikroskopie wurden etwa 200 Zellen auf das Vorhandensein von intrazellulären Parasiten mittels DIC untersucht und daraufhin die Kolokalisation mit den einzelnen mGBP-Proteinen analysiert. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten und werden als durchschnittliche Prozentsätze ±SD dargestellt (Abbildung aus (Lindenberg et al., 2017)). b) Analyse der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine und mGBP6- und mGBP7 Fusionsproteine 2 Stunden nach Infektion. Dabei wurden die Gesamtzahlen von mGBP7-positive (Grün)-, mGBP2-positive (Rot)- und mGBP6 (Rot) dargestellt. Die mit mGBP2 und mGBP7 transduzierten mGBP7-/-MEFs wurden mit IFN- γ stimuliert und anschließend für zwei Stunden mit *T. gondii* infiziert und fluoreszenzgefärbt. Mithilfe eines Übersichtsbildes und der Keyence Mikroskopsoftware wurde die Fluoreszenzfärbung auswertet. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten und werden als durchschnittliche Prozentwerte ± SD dargestellt.

Die Promotionsarbeit von Lindenberg et al. beschäftigte sich mit der Rekrutierung von mGBP-Familienmitgliedern an *Chlamydia trachomatis* Inklusionen und *T. gondii* PVs (Lindenberg et al., 2017). Im Rahmen dieser Forschung wurde auch die Rekrutierung an die *T. gondii* PV untersucht und die Rekrutierungsfrequenz der einzelnen mGBPs an die PV dargestellt. Dafür wurden NIH3T3 Fibroblasten mit *T. gondii* (Stamm ME49) infiziert. Nach IFN-γ-Stimulation wurden die Zellen infiziert und nach zwei Stunden fixiert. Um die mGBPs sichtbar zu machen, waren die Zellen mittels eines lentiviralen Gentransferprotokolls mit GFP-Fusionsproteinen (Degrandi et al., 2013) stabil transduziert worden. Dazu wurden 293FT-Zellen transient mit einem Expressionsvektor pWPXL (Degrandi et al., 2007) transfiziert, der ein einzelnes mGBP enthielt, das am N-Terminus mit mCherry oder GFP fusioniert war. Gleichzeitig wurden ein lentivirales Glykoprotein pLP/VSVG und ein Verpackungsvektor psPAX2 co-transfiziert. GFP- oder mCherry-positive Fibroblasten wurden mit Durchflusszytometrie sortiert und anschließend kultiviert. Die Bewertung erfolgte durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit dem LSM780 Konfokalmikroskop (Zeiss) und der Life Cell Imaging Technologie (Lindenberg et al., 2017). mGBP1, mGBP2, mGBP3, mGBP6 und mGBP7 kolokalisierten, nach Stimulation mit IFN-y, mit hoher Frequenz an die PV von T. gondii. Interessanterweise wurde bei dieser Infektion neben mGBP2 vor allem mGBP6 rekrutiert. mGBP9 und mGBP10 wurden häufiger für PVs rekrutiert, während mGBP5 und mGBP8 kaum für T. gondii rekrutiert wurden. mGBP9 zeichnet sich dadurch aus, dass es bei einer Chlamydien-Infektion eine mit mGBP2 vergleichbare Kolokalisationshäufigkeit aufweist, während es bei einer T. gondii-Infektion deutlich seltener rekrutiert wird als mGBP2. Diese Quantifizierung legt nahe, dass nicht alle mGBPs gleichermaßen zur zellautonomen Immunität beitragen (Lindenberg et al., 2017). Die Ergebnisse für mGBP2, mGBP7 und mGBP6 können mit den Ergebnissen dieser Studie verglichen werden. Wichtig ist es dabei zu beachten, dass nur jeweils ein einzelnes mGBP im Versuch um Lindenberg et al. exprimiert wurde und so eine gegenseitige Beeinflussung durch mGBP-Familienmitglieder ausgeschlossen war. Bei andere der Analyse der Rekrutierungsfrequenz bei der Forschungsarbeit von Lindenberg et al. konnte die höchste Rekrutierungsfrequenz an die Toxoplasma PV mit ungefähr 40% bei mGBP2 beobachtet werden, gefolgt von mGBP6 mit ungefähr 35%. mGBP7 zeigte im Vergleich dieser drei mGBPs die geringste Rekrutierung von ca. 15%.

In dieser Forschungsarbeit wurde die höchste Rekrutierungsfrequenz ebenfalls für mGBP2 ermittelt. Die Rekrutierung von mGBP7 lag jedoch um ungefähr 20% höher als bei mGBP6. Insgesamt wurden deutlich höhere Werte für die Rekrutierungsfrequenzen der untersuchten mGBPs in dieser Arbeit ermittelt. mGBP2 wurde mit einer Rekrutierungsfrequenz von 72%, mGBP7 mit ca. 60% und mGBP6 mit ungefähr 40% beschrieben. Die deutlich höheren Werte können zum einen dadurch erklärt werden, dass ein anderer Versuchsaufbau vorlag, der sich unter anderem in der *Multiplicity of infection* (MOI), der gewählten Zelllinie und untersuchten Zellzahl unterscheidet (Lindenberg et al., 2017). Zusätzlich wurde, wie in dieser Arbeit bereits erwähnt, immer nur die Rekrutierung eines einzeln exprimierten mGBPs in der Lindenberg Arbeit untersucht. Eine gegenseitige Beeinflussung durch andere transduzierte mGBP-Familienmitglieder ist bei diesem Ansatz nicht vorhanden. Wie bereits beschrieben, könnte eine Wirkung von mGBP2 auf die Rekrutierung und Akkumulation von mGBP7 vermutet werden. In vorherigen Versuchen wurde eine geringere und langsamere Rekrutierung in Abwesenheit von mGBP2 beobachtet (Steffens, 2020). Dies könnte eine Erklärung für die deutlich höheren mGBP7-Rekrutierungsfrequenzen sein, jedoch wurden ähnlich hohe mGBP7
Ergebnisse in der mit mGBP6 und mGBP7 kotransduzierten Zelllinie ermittelt. Eine Erklärung könnte in einer Beeinflussung der Rekrutierung von mGBP7 durch mGBP6 liegen, zusätzlich konnte in diesem Versuch eine höhere Infektionsrate der MEFs durch *T. gondii* festgestellt werden. Am wahrscheinlichsten sind die Unterschiede auf die unterschiedliche Zellbiologie von NIH3T3 und MEF-Zellen zurückzuführen. Daher sollten immer mehrere unterschiedliche Zelllinien zukünftig untersucht werden.

4.4 mGBP-Rekrutierung bei anderen intrazellulären Infektionserregern

Seit der Entdeckung von mGBPs wurden beim Menschen sieben orthologe Gene und ein Pseudogen identifiziert. Diese menschlichen GBP-Gene befinden sich in einem Gencluster auf Chromosom 1 (Olszewski et al., 2006). Im Gegensatz dazu haben Mäuse 11 Gene und zusätzlich zwei Pseudogene, die sich in zwei Genclustern auf Chromosom 3 (mGBP1, mGBP2, mGBP3, mGBP5 und mGBP7; allgemein als GBPchr3 bezeichnet) und Chromosom 5 (mGBP4, mGBP6, mGBP8, mGBP9, mGBP10, mGBP11) befinden (Kresse et al., 2008). hGBP1 wurde in früheren Arbeiten als das humane Ortholog von mGBP2 beschrieben. Dabei wurde beschrieben, dass hGBP1 die Ko-Rekrutierung von hGBP2, hGBP3, hGBP4 und hGBP6 an *Shigella flexneri* in HeLa-Zellen begünstigt (Piro et al., 2017; Wandel et al., 2017). Diese Ergebnisse unterstützen die Existenz einer Hierarchie der Rekrutierung von GBPs an Pathogenen sowie spezifischer Eigenschaften von GBP bei verschiedenen Spezies und

Erregern.

Das humane GBP1-Protein teilt eine hohe Homologie mit mGBP2. Aufgrund dieser ähnlichen Struktur von Human- und Maus-GBP zeigte sich wie erwartet die am stärksten konservierte Region unter den GBP-Proteinen in den N-terminalen G-Domänen (Cheng et al., 1983). In den 1990er Jahren konnte gezeigt werden, dass hGBP1 Infektionen mit dem vesikulären Stomatitis-Virus und dem Enzephalomyokarditis-Virus kontrolliert, wenn dieses in entsprechenden Zelllinien überexprimiert wurde (Anderson et al., 1999). Später wurde festgestellt, dass mGBP2 diese Pathogene in ähnlicher Weise einschränkt (Carter et al., 2005). Während der Verlust der GTP-Bindung in den hGBP1- und mGBP2-Mutantenvarianten ihre Fähigkeit aufhob, die virale Produktion des Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV) abzuschwächen, hatten diese Mutationen keine Wirkung auf die Verringerung der Replikation des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV), was darauf hindeutet, dass verschiedene GBP-Restriktionsmechanismen spezifisch auf Virusuntergruppen wirken (Anderson et al., 1999, Carter et al., 2005). Obwohl all diese Studien darauf hinwiesen, dass viele GBPs eine gewisse Kontrolle über Virusinfektionen ausüben können, ist ihre Rolle bei der Restriktion im Vergleich zu den antiviralen Eigenschaften von Mx-Proteinen relativ schwach (Haller et al., 2015).

In Studien mit T. gondii wurde erstmals festgestellt, dass mGBPs Protozoeninfektionen kontrollieren (Degrandi et al., 2007). Mäuse, die mit diesen Pathogenen infiziert sind, weisen hohe Konzentrationen verschiedener GBPs auf. Zuvor konnte die Rolle von IRG bzw. 47KDa GTPasen bei der Kontrolle von bakteriellen und Protozoeninfektionen nachgewiesen werden (Taylor et al., 2000, Collazo et al., 2001). Wie für IRG beschrieben, waren mGBP1 und mGBP2 auf T. gondii-PVs lokalisiert, banden jedoch nicht an PVs, die von virulenten T. gondii-Stämmen erzeugt wurden (Degrandi et al., 2007). Später wurde berichtet, dass humanes GBP1 und GBP2 an intrazelluläre C. trachomatis binden und bei Überexpression das Bakterienwachstum hemmen (Tietzel et al., 2009). Eine Studie von Britzen-Laurent et al. untersuchte die kooperativen Effekte zwischen verschiedenen humanen GBPs und ergab, dass alle untersuchten GBPs (hGBP1, hGBP2 und hGBP5) heterodimerisieren können, was zu einer Hierarchie bei ihrer Lokalisierung führt. Zum Beispiel kann hGBP1, hGBP5 und hGBP2 in sein eigenes zelluläres Kompartiment rekrutieren, während hGBP5 die Position von hGBP2 verändert. Darüber hinaus können hGBP1, hGBP2 und hGBP5 abhängig von ihrer Isoprenylierung nicht isoprenylierte GBPs in ihr Kompartiment umleiten (Britzen-Laurent et al., 2010). Dies könnte auch für murine GBPs gelten. Eine kürzlich durchgeführte Studie zeigt, dass nach Stimulation mit IFN-y alle mGBPs exprimiert werden und eine diskrete vesikelähnliche Struktur im Cytoplasma aufweisen (Degrandi et al., 2007). Wenn sie jedoch einzeln exprimiert werden, verteilt sich mGBP1 gleichmäßig im Cytoplasma, während mGBP2 ein vesikelartiges Lokalisierungsmuster aufweist (Vestal et al., 2000). Ähnlich können Maus-IRG-Proteine, die ebenfalls zur Dynamin -GTPase-Familie gehören, Heterodimere bilden und ihre subzelluläre Lokalisation gegenseitig regulieren (Hunn et al., 2008).

4.5 Ausblick und Schlussfolgerungen

Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass murines GBP2, das als funktionelles Homolog von hGBP1 betrachtet wird, die Phosphoinositol-3-Kinase bindet und inaktiviert. Dies hemmt die Aktivität von Rac, was wiederum die Zellproliferation hemmt (Messmer-Blust et al., 2010). Die Rolle der meisten mGBP-Familienmitglieder bei der Abwehr von *T. gondii* ist noch weitgehend unbekannt. Für einige der Proteine konnte gezeigt werden, dass sie für die *T. gondii* Abwehr sehr wichtig sind. So konnten für mGBP1, mGBP2 und mGBP7 wichtige Rollen bei der Abwehr von Parasiten beschrieben werden. mGBP1^{-/-}, mGBP2^{-/-} und mGBP7^{-/-} Mäuse zeigten eine hohe Mortalität nach Infektion mit Typ-II *T. gondii*-Stämmen (Selleck et al., 2013).

Interessanterweise verlief eine Infektion mit einem mutanten hochvirulenten T. gondii Stamm (RH Δ ku80 Δ rop18) in der Abwesenheit von mGBP1 schwerer als in den Wildtyp Kontrollen. Dies weist auf eine interessante Interaktion von GBPs mit T. gondii Virulenzfaktoren hin, die in der Zukunft eingehender untersucht werden sollten. Denkbar wären hier auch zunächst in vitro Experimente der hier benutzten Zelllinien nach Infektion mit unterschiedlichen T. gondii Mutanten (Selleck et al., 2013). Zwischen mGBP7 und mGBP3, beides eng verwandte Proteine, wurde eine nahezu vollständige Kolokalisation und Co-Rekrutierung an die PVM beobachtet (Steffens, 2020). Bis heute gibt es keine mGBP3^{-/-} oder mGBP6^{-/-}Mauslinien. Es wäre jedoch interessant, die einzelnen Rollen von mGBP3 und mGBP6 sowie die gegenseitige Abhängigkeit zwischen mGBP3/6 und mGBP7 in Zukunft genauer zu untersuchen. Interessanterweise wurde auch gezeigt, dass mGBP3 teilweise kolokalisiert und mit mGBP2 interagiert (Kravets et al., 2016). Es wird eine herausfordernde Aufgabe sein, die hierarchische Struktur, die Wechselwirkungen und Synergien von GBPs bei einer T. gondii-Infektion und mit anderen IFN-induzierenden Molekülen wie IRGs aufzuklären. Ob ähnliche Beobachtungen bei der Abwehr auf bakterielle Infektionen übertragen werden können, bei denen mGBPs Schlüsselfaktoren bei der Kontrolle der Pathogenese sind, bleibt abzuwarten (Ngo and Man, 2017, Santos and Broz, 2018, Coers, 2017). Diese Ergebnisse liefern weitere wichtige Beweise für die synergistische Rolle von GBP bei der Wirtsverteidigung.

Die Forschung zur Beeinflussung der mGBPs untereinander und ihrer Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Pathogene hat bereits wichtige Erkenntnisse geliefert. Um das Verständnis weiter zu vertiefen und Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln, sind jedoch weitere Untersuchungen und Lösungsansätze erforderlich.

Diese Forschungsarbeit hat das Ziel erreicht, die Rekrutierungsfrequenzen von mGBP2, mGBP6 und mGBP7 zwei und sechs Stunden nach Infektion zu untersuchen. Es wurde dabei erfolgreich eine Methode entwickelt, um diese Frequenzen anhand eines Übersichtsbildes zu bestimmen. Obwohl diese Methode für die Auswertung geeignet war, besteht weiterhin Optimierungspotenzial. Insbesondere eine Erhöhung der untersuchten Zellanzahl könnte eine genauere Analyse ermöglichen. Alternativ könnte die Implementierung von KI-gesteuerten Auswertungsverfahren erwogen werden, um den Prozess zu verbessern.

Die Ergebnisse der Studie zeigen Unterschiede in den Rekrutierungsfrequenzen zu den untersuchten Zeitpunkten. Ursprünglich wurde vermutet, dass nach sechs Stunden nach der Infektion mit *T. gondii* eine maximale Rekrutierung der mGBP-Familienmitglieder stattfinden würde. Allerdings waren die Unterschiede in der Rekrutierung zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nicht signifikant. Es scheint vielmehr, dass eine maximale Rekrutierung der

mGBP-Familienmitglieder bereits nach zwei Stunden nach der Infektion beobachtet werden kann.

Interessanterweise konnten keine klaren Hinweise auf eine Rekrutierungshierarchie gefunden werden, wie ursprünglich angenommen. Dennoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass bestimmte GBPs möglicherweise eine höhere Priorität bei der Rekrutierung haben als andere. Diese Vermutungen müssen jedoch in weiteren Studien genauer untersucht werden.

Eine Beeinflussung der mGBPs untereinander und eine Rekrutierungshierachie konnte bisher für mGBP7 und mGBP2 angenommen werden. Es gilt des Weiteren herauszufinden, ob auch andere mGBP-Familienmitglieder in ähnlicher Form miteinander interagieren und welche Rolle die einzelnen Proteine in der Abwehr gegen intrazelluläre Pathogene spielen. Eine genauere Untersuchung der Kinetik von mGBP7 und mGBP6 durch Live Cell Imaging könnte dabei interessante Informationen liefern. Es wäre wichtig, die Dynamik der Rekrutierung und die zeitlichen Abläufe genauer zu verstehen. Durch die Kombination von Live Cell Imaging mit fortschrittlichen Bildgebungs- und Analysetechniken könnten möglicherweise neue Einblicke in die Interaktionen und Funktionen dieser Proteine gewonnen werden. Eine kontinuierliche Überwachung über einen längeren Zeitraum könnte Aufschluss darüber geben, wie sich die mGBPs im Verlauf der Infektion verhalten und welche Faktoren ihre Aktivität beeinflussen.

Das systematische Ermitteln weiterer Rekrutierungsfrequenzen als auch die Untersuchung von Rekrutierungshierachien könnte wichtige Informationen liefern, die bei der Entwicklung von Behandlungsmöglichkeiten gegen *T. gondii* berücksichtigt werden sollten. Dabei könnten unter Verwendung der neu etablierten Methode unter Verwendung des Keyence-Mikroskopsystems diese Untersuchungen einfacher und schneller durchgeführt werden.

Die systematische Untersuchung aller mGBPs ist ein weiterer wichtiger Schritt. Es wäre lohnenswert, die Interaktionen zwischen den verschiedenen mGBPs umfassend zu analysieren, um mögliche Synergieeffekte oder ergänzende Funktionen aufzudecken. Dies könnte helfen, ein ganzheitliches Bild der mGBP-Familie und ihrer Zusammenarbeit bei der Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen zu zeichnen.

Bei dieser Forschungsarbeit konnten nur geringe Zahlen von infizierten Zellen ermittelt werden. Um aussagekräftigere Ergebnisse für die Rekrutierungsfrequenzanalysen zu erzielen, sollte die Anzahl der untersuchten Zellen erhöht werden. Untersuchungen mit bis zu 1000 Zellen würden eine robustere Statistik ermöglichen und zuverlässigere Schlussfolgerungen ermöglichen. Hierbei könnte die Implementierung einer KI-gesteuerten Bildanalyse- und Auswertungsmethode helfen, den Analyseprozess zu automatisieren und die Effizienz zu steigern.

In den bisherigen Experimenten wurden Zellen generiert, bei denen ein mGBP ausgeknockt wurde. Um die Auswirkungen der mGBPs auf die Abwehrmechanismen genauer zu erforschen, könnten Doppel-Knockout-Mäuse erzeugt werden. Durch die gleichzeitige Deaktivierung von zwei mGBPs mittels der CRISPR-Cas-Technologie ließen sich deren individuelle und kombinierte Funktionen besser verstehen. Solche Studien könnten wertvolle Einblicke in die spezifischen Rollen und Wechselwirkungen der mGBPs liefern.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der in zukünftigen Forschungen berücksichtigt werden sollte, ist die Untersuchung der Rekrutierungsfrequenzen der mGBPs in unterschiedlichen Zelltypen. Es ist bekannt, dass verschiedene Zelltypen unterschiedliche Abwehrmechanismen und Reaktionsmuster aufweisen können. Durch die Analyse der Rekrutierungsfrequenzen in verschiedenen Zelltypen können potenzielle zelltypspezifische Unterschiede in der Aktivität und Interaktion der mGBPs aufgedeckt werden. Dies könnte wichtige Informationen liefern, um das Verständnis der Proteinfunktionen in verschiedenen Geweben zu verbessern.

Des Weiteren wäre es interessant, die Rekrutierungsfrequenzen der mGBPs bei Infektion mit anderen intrazellulären Erregern zu untersuchen, wie zum Beispiel *C. trachomatis* und *Legionella pneumophila*. Durch den Vergleich der Rekrutierungsmuster und -frequenzen bei verschiedenen Erregern können möglicherweise Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den Abwehrmechanismen der mGBPs identifiziert werden. Dies könnte zu einem umfassenderen Verständnis der Rolle der mGBPs bei der Abwehr verschiedener intrazellulärer Pathogene führen und möglicherweise therapeutische Ansätze eröffnen, die über eine spezifische Erregerspezifität hinausgehen.

Insgesamt eröffnen diese vorgeschlagenen Ansätze die Möglichkeit, das Verständnis der mGBPs und ihrer Interaktionen weiter zu vertiefen. Dieses Wissen könnte zu neuen Erkenntnissen in der Entwicklung von Therapien gegen intrazelluläre Pathogene, wie beispielsweise *T. gondii*, führen und damit neue Wege für die Behandlung solcher Infektionen eröffnen.

5 Literaturverzeichnis

ABDULLAH, N., SRINIVASAN, B., MODIANO, N., CRESSWELL, P. & SAU, A. K. 2009. Role of individual domains and identification of internal gap in human guanylate binding protein-1. *J Mol Biol*, 386, 690-703.

ANDERSON, S. L., CARTON, J. M., LOU, J., XING, L. & RUBIN, B. Y. 1999. Interferoninduced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. *Virology*, 256, 8-14.

BLACK, M. W., ARRIZABALAGA, G. & BOOTHROYD, J. C. 2000. Ionophore-resistant mutants of Toxoplasma gondii reveal host cell permeabilization as an early event in egress. *Mol Cell Biol*, 20, 9399-408.

BLACK, M. W. & BOOTHROYD, J. C. 2000. Lytic cycle of Toxoplasma gondii. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64, 607-23.

BOEHM, U., GUETHLEIN, L., KLAMP, T., OZBEK, K., SCHAUB, A., FUTTERER, A., PFEFFER, K. & HOWARD, J. C. 1998. Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. *J Immunol*, 161, 6715-23.

BOHNE, W., HOLPERT, M. & GROSS, U. 1999. Stage differentiation of the protozoan parasite Toxoplasma gondii. *Immunobiology*, 201, 248-54.

BOOTHROYD, J. C., HEHL, A., KNOLL, L. J. & MANGER, I. D. 1998. The surface of Toxoplasma: more and less. *Int J Parasitol*, 28, 3-9.

BRITZEN-LAURENT, N., BAUER, M., BERTON, V., FISCHER, N., SYGUDA, A., REIPSCHLAGER, S., NASCHBERGER, E., HERRMANN, C. & STURZL, M. 2010. Intracellular trafficking of guanylate-binding proteins is regulated by heterodimerization in a hierarchical manner. *PLoS One*, *5*, e14246.

BUCKLEY, S. M. 1973. Survival of Toxoplasma gondii in mosquito cell lines and establishment of continuous infection in Vero cell cultures. *Exp Parasitol*, 33, 23-6.

CARRUTHERS, V. & BOOTHROYD, J. C. 2007. Pulling together: an integrated model of Toxoplasma cell invasion. *Curr Opin Microbiol*, 10, 83-9.

CARTER, C. C., GORBACHEVA, V. Y. & VESTAL, D. J. 2005. Inhibition of VSV and EMCV replication by the interferon-induced GTPase, mGBP-2: differential requirement for wild-type GTP binding domain. *Arch Virol*, 150, 1213-20.

CHENG, Y. S., COLONNO, R. J. & YIN, F. H. 1983. Interferon induction of fibroblast proteins with guanylate binding activity. *J Biol Chem*, 258, 7746-50.

CHENG, Y. S., PATTERSON, C. E. & STAEHELI, P. 1991. Interferon-induced guanylatebinding proteins lack an N(T)KXD consensus motif and bind GMP in addition to GDP and GTP. *Mol Cell Biol*, 11, 4717-25.

CLOUGH, B. & FRICKEL, E. M. 2017. The Toxoplasma Parasitophorous Vacuole: An Evolving Host-Parasite Frontier. *Trends Parasitol*, 33, 473-488.

CLOUGH, B., WRIGHT, J. D., PEREIRA, P. M., HIRST, E. M., JOHNSTON, A. C., HENRIQUES, R. & FRICKEL, E. M. 2016. K63-Linked Ubiquitination Targets Toxoplasma gondii for Endo-lysosomal Destruction in IFNgamma-Stimulated Human Cells. *PLoS Pathog*, 12, e1006027.

COKER, A. B. & DAVIDSON, M. W. o.J. Comparison Between Confocal and WidefieldMicroscopy[Online].Available:https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/opticalsectioning/confocalwidefield/indexflash.html[Accessed 25.02.2023].

COLLAZO, C. M., YAP, G. S., SEMPOWSKI, G. D., LUSBY, K. C., TESSAROLLO, L., VANDE WOUDE, G. F., SHER, A. & TAYLOR, G. A. 2001. Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection. *J Exp Med*, 194, 181-8.

DARDE, M. L., BOUTEILLE, B. & PESTRE-ALEXANDRE, M. 1992. Isoenzyme analysis of 35 Toxoplasma gondii isolates and the biological and epidemiological implications. *J Parasitol*, 78, 786-94.

DEGRANDI, D., KONERMANN, C., BEUTER-GUNIA, C., KRESSE, A., WURTHNER, J., KURIG, S., BEER, S. & PFEFFER, K. 2007. Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense. *J Immunol*, 179, 7729-40.

DEGRANDI, D., KRAVETS, E., KONERMANN, C., BEUTER-GUNIA, C., KLUMPERS, V., LAHME, S., RASCH, E., MAUSBERG, A. K., BEER-HAMMER, S. & PFEFFER, K. 2013. Murine guanylate binding protein 2 (mGBP2) controls Toxoplasma gondii replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 294-9.

DIMIER, I. H. & BOUT, D. T. 1998. Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit Toxoplasma gondii replication: a role for intracellular iron. *Immunology*, 94, 488-95.

DOBROWOLSKI, J. M. & SIBLEY, L. D. 1996. Toxoplasma invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell*, 84, 933-9.

DUBEY, J. P. 1992. Isolation of Toxoplasma gondii from a naturally infected beef cow. J Parasitol, 78, 151-3.

DUBEY, J. P. 1997. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of Toxoplasma gondii. *J Eukaryot Microbiol*, 44, 592-602.

DUBEY, J. P. 1998a. Advances in the life cycle of Toxoplasma gondii. Int J Parasitol, 28, 1019-24.

DUBEY, J. P. 1998b. Comparative infectivity of Toxoplasma gondii bradyzoites in rats and mice. *J Parasitol*, 84, 1279-82.

DUBEY, J. P., MILLER, N. L. & FRENKEL, J. K. 1970. Toxoplasma gondii life cycle in cats. *J Am Vet Med Assoc*, 157, 1767-70.

DUBREMETZ, J. F., ACHBAROU, A., BERMUDES, D. & JOINER, K. A. 1993. Kinetics and pattern of organelle exocytosis during Toxoplasma gondii/host-cell interaction. *Parasitol Res*, 79, 402-8.

ENCHEVA, V., FOLTZ, C., SNIJDERS, A. P. & FRICKEL, E. M. 2018. Murine Gbp1 and Gbp2 are ubiquitinated independent of Toxoplasma gondii infection. *BMC Res Notes*, 11, 166.

FERGUSON, D. J. & HUTCHISON, W. M. 1987. The host-parasite relationship of Toxoplasma gondii in the brains of chronically infected mice. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 411, 39-43.

FINETHY, R., JORGENSEN, I., HALDAR, A. K., DE ZOETE, M. R., STROWIG, T., FLAVELL, R. A., YAMAMOTO, M., NAGARAJAN, U. M., MIAO, E. A. & COERS, J. 2015. Guanylate binding proteins enable rapid activation of canonical and noncanonical inflammasomes in Chlamydia-infected macrophages. *Infect Immun*, 83, 4740-9.

FOLTZ, C., NAPOLITANO, A., KHAN, R., CLOUGH, B., HIRST, E. M. & FRICKEL, E. M. 2017. TRIM21 is critical for survival of Toxoplasma gondii infection and localises to GBP-positive parasite vacuoles. *Sci Rep*, **7**, 5209.

FRENKEL, J. K. 1970. Pursuing toxoplasma. J Infect Dis, 122, 553-9.

FRENKEL, J. K. 1988. Pathophysiology of toxoplasmosis. Parasitol Today, 4, 273-8.

FREYRE, A., DUBEY, J. P., SMITH, D. D. & FRENKEL, J. K. 1989. Oocyst-induced Toxoplasma gondii infections in cats. *J Parasitol*, 75, 750-5.

GAY, G., BRAUN, L., BRENIER-PINCHART, M. P., VOLLAIRE, J., JOSSERAND, V., BERTINI, R. L., VARESANO, A., TOUQUET, B., DE BOCK, P. J., COUTE, Y., TARDIEUX, I., BOUGDOUR, A. & HAKIMI, M. A. 2016. Toxoplasma gondii TgIST co-opts host chromatin repressors dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN-gamma-mediated host defenses. *J Exp Med*, 213, 1779-98.

GRIMWOOD, J. & SMITH, J. E. 1992. Toxoplasma gondii: the role of a 30-kDa surface protein in host cell invasion. *Exp Parasitol*, 74, 106-11.

GUENZI, E., TOPOLT, K., CORNALI, E., LUBESEDER-MARTELLATO, C., JORG, A., MATZEN, K., ZIETZ, C., KREMMER, E., NAPPI, F., SCHWEMMLE, M., HOHENADL,

C., BARILLARI, G., TSCHACHLER, E., MONINI, P., ENSOLI, B. & STURZL, M. 2001. The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines. *EMBO J*, 20, 5568-77.

GUENZI, E., TOPOLT, K., LUBESEDER-MARTELLATO, C., JORG, A., NASCHBERGER, E., BENELLI, R., ALBINI, A. & STURZL, M. 2003. The guanylate binding protein-1 GTPase controls the invasive and angiogenic capability of endothelial cells through inhibition of MMP-1 expression. *EMBO J*, 22, 3772-82.

HALDAR, A. K., FOLTZ, C., FINETHY, R., PIRO, A. S., FEELEY, E. M., PILLA-MOFFETT, D. M., KOMATSU, M., FRICKEL, E. M. & 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, E5628-37.

HALDAR, A. K., PIRO, A. S., PILLA, D. M., YAMAMOTO, M. & COERS, J. 2014. The E2like conjugation enzyme Atg3 promotes binding of IRG and Gbp proteins to Chlamydia- and Toxoplasma-containing vacuoles and host resistance. *PLoS One*, 9, e86684.

HALLER, O., STAEHELI, P., SCHWEMMLE, M. & KOCHS, G. 2015. Mx GTPases: dynamin-like antiviral machines of innate immunity. *Trends Microbiol*, 23, 154-63.

HOWE, D. K. & SIBLEY, L. D. 1995. Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*, 172, 1561-6.

HUANG, S., MENG, Q., MAMINSKA, A. & MACMICKING, J. D. 2019. Cell-autonomous immunity by IFN-induced GBPs in animals and plants. *Curr Opin Immunol*, 60, 71-80.

HUNN, J. P., KOENEN-WAISMAN, S., PAPIC, N., SCHROEDER, N., PAWLOWSKI, N., LANGE, R., KAISER, F., ZERRAHN, J., MARTENS, S. & HOWARD, J. C. 2008. Regulatory interactions between IRG resistance GTPases in the cellular response to Toxoplasma gondii. *EMBO J*, 27, 2495-509.

HUNTER, C. A. & SIBLEY, L. D. 2012. Modulation of innate immunity by Toxoplasma gondii virulence effectors. *Nat Rev Microbiol*, 10, 766-78.

INCE, S., KUTSCH, M., SHYDLOVSKYI, S. & HERRMANN, C. 2017. The human guanylate-binding proteins hGBP-1 and hGBP-5 cycle between monomers and dimers only. *FEBS J*, 284, 2284-2301.

IVASHKIV, L. B. 2018. IFNgamma: signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 18, 545-558.

JACOBS, L. 1957. The interrelation of toxoplasmosis in swine, cattle, dogs, and man. *Public Health Rep (1896)*, 72, 872-82.

JOHNSTON, A. C., PIRO, A., CLOUGH, B., SIEW, M., VIRREIRA WINTER, S., COERS, J. & FRICKEL, E. M. 2016. Human GBP1 does not localize to pathogen vacuoles but restricts Toxoplasma gondii. *Cell Microbiol*, 18, 1056-64.

JONES, J. L. & DUBEY, J. P. 2012. Foodborne toxoplasmosis. Clin Infect Dis, 55, 845-51.

JONES, T. C., YEH, S. & HIRSCH, J. G. 1972. The interaction between Toxoplasma gondii and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *J Exp Med*, 136, 1157-72.

KATRIS, N. J., VAN DOOREN, G. G., MCMILLAN, P. J., HANSSEN, E., TILLEY, L. & WALLER, R. F. 2014. The apical complex provides a regulated gateway for secretion of invasion factors in Toxoplasma. *PLoS Pathog*, 10, e1004074.

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. & HOWARD, J. C. 2010. Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the Toxoplasma gondii parasitophorous vacuole. *Cell Microbiol*, 12, 939-61.

KIEFFER, F. & WALLON, M. 2013. Congenital toxoplasmosis. *Handb Clin Neurol*, 112, 1099-101.

KIM, B. H., SHENOY, A. R., KUMAR, P., BRADFIELD, C. J. & MACMICKING, J. D. 2012. IFN-inducible GTPases in host cell defense. *Cell Host Microbe*, 12, 432-44.

KIM, B. H., SHENOY, A. R., KUMAR, P., DAS, R., TIWARI, S. & MACMICKING, J. D. 2011. A family of IFN-gamma-inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection. *Science*, 332, 717-21.

KIM, K. & WEISS, L. M. 2008. Toxoplasma: the next 100years. Microbes Infect, 10, 978-84.

KIM, S. K., FOUTS, A. E. & BOOTHROYD, J. C. 2007. Toxoplasma gondii dysregulates IFNgamma-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling. *J Immunol*, 178, 5154-65.

KOMANDER, D. & RAPE, M. 2012. The ubiquitin code. Annu Rev Biochem, 81, 203-29.

KONERMANN, C., KRESSE, A., BEUTER-GUNIA, C., WURTHNER, J., DEGRANDI, D., PFEFFER, K. & BEER, S. 2007. In silico and in vitro characterization of mGBP4 splice variants. *DNA Cell Biol*, 26, 847-51.

KRAPP, C., HOTTER, D., GAWANBACHT, A., MCLAREN, P. J., KLUGE, S. F., STURZEL, C. M., MACK, K., REITH, E., ENGELHART, S., CIUFFI, A., HORNUNG, V., SAUTER, D., TELENTI, A. & KIRCHHOFF, F. 2016. Guanylate Binding Protein (GBP) 5 Is an Interferon-Inducible Inhibitor of HIV-1 Infectivity. *Cell Host Microbe*, 19, 504-14.

KRAVETS, E., DEGRANDI, D., MA, Q., PEULEN, T. O., KLUMPERS, V., FELEKYAN, S., KUHNEMUTH, R., WEIDTKAMP-PETERS, S., SEIDEL, C. A. & PFEFFER, K. 2016. Guanylate binding proteins directly attack Toxoplasma gondii via supramolecular complexes. *Elife*, 5.

KRAVETS, E., DEGRANDI, D., WEIDTKAMP-PETERS, S., RIES, B., KONERMANN, C., FELEKYAN, S., DARGAZANLI, J. M., PRAEFCKE, G. J., SEIDEL, C. A., SCHMITT, L., SMITS, S. H. & PFEFFER, K. 2012. The GTPase activity of murine guanylate-binding protein 2 (mGBP2) controls the intracellular localization and recruitment to the parasitophorous vacuole of Toxoplasma gondii. *J Biol Chem*, 287, 27452-66.

KRESSE, A., KONERMANN, C., DEGRANDI, D., BEUTER-GUNIA, C., WUERTHNER, J., PFEFFER, K. & BEER, S. 2008. Analyses of murine GBP homology clusters based on in silico, in vitro and in vivo studies. *BMC Genomics*, 9, 158.

LANG, C., HILDEBRANDT, A., BRAND, F., OPITZ, L., DIHAZI, H. & LUDER, C. G. 2012. Impaired chromatin remodelling at STAT1-regulated promoters leads to global unresponsiveness of Toxoplasma gondii-infected macrophages to IFN-gamma. *PLoS Pathog*, *8*, e1002483.

LEGEWIE, L. 2020. *Murines GBP7 und interagierende Proteine in der Wirtsabwehr*. Doktor Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

LEGEWIE, L., LOSCHWITZ, J., STEFFENS, N., PRESCHER, M., WANG, X., SMITS, S. H. J., SCHMITT, L., STRODEL, B., DEGRANDI, D. & PFEFFER, K. 2019. Biochemical and structural characterization of murine GBP7, a guanylate binding protein with an elongated C-terminal tail. *Biochem J*, 476, 3161-3182.

LI, P., JIANG, W., YU, Q., LIU, W., ZHOU, P., LI, J., XU, J., XU, B., WANG, F. & SHAO, F. 2017. Ubiquitination and degradation of GBPs by a Shigella effector to suppress host defence. *Nature*, 551, 378-383.

LINDENBERG, V., MOLLEKEN, K., KRAVETS, E., STALLMANN, S., HEGEMANN, J. H., DEGRANDI, D. & PFEFFER, K. 2017. Broad recruitment of mGBP family members to Chlamydia trachomatis inclusions. *PLoS One*, 12, e0185273.

LING, Y. M., SHAW, M. H., AYALA, C., COPPENS, I., TAYLOR, G. A., FERGUSON, D. J. & YAP, G. S. 2006. Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of Toxoplasma gondii in primed effector macrophages. *J Exp Med*, 203, 2063-71.

LINGELBACH, K. & JOINER, K. A. 1998. The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci*, 111 (Pt 11), 1467-75.

LOSCHWITZ, J., STEFFENS, N., WANG, X., SCHAFFLER, M., PFEFFER, K., DEGRANDI, D. & STRODEL, B. 2023. Domain motions, dimerization, and membrane interactions of the murine guanylate binding protein 2. *Sci Rep*, 13, 679.

MACMICKING, J. D. 2012. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol*, 12, 367-82.

MAMIDI, A., DESIMONE, J. A. & POMERANTZ, R. J. 2002. Central nervous system infections in individuals with HIV-1 infection. *J Neurovirol*, 8, 158-67.

MANGER, I. D., HEHL, A. B. & BOOTHROYD, J. C. 1998. The surface of Toxoplasma tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infect Immun*, 66, 2237-44.

MARTENS, S. & HOWARD, J. 2006. The interferon-inducible GTPases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 559-89.

MARTENS, S., PARVANOVA, I., ZERRAHN, J., GRIFFITHS, G., SCHELL, G., REICHMANN, G. & HOWARD, J. C. 2005. Disruption of Toxoplasma gondii parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS Pathog*, 1, e24.

MATTA, S. K., OLIAS, P., HUANG, Z., WANG, Q., PARK, E., YOKOYAMA, W. M. & SIBLEY, L. D. 2019. Toxoplasma gondii effector TgIST blocks type I interferon signaling to promote infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 17480-17491.

MAY, M. 2018. *Focal Wars: Widefield vs. Confocal* [Online]. Available: <u>https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/355647-Focal-Wars-Widefield-vs-Confocal/</u> [Accessed 09.11.2023].

MELLMAN, I., FUCHS, R. & HELENIUS, A. 1986. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem*, 55, 663-700.

MELZER, T., DUFFY, A., WEISS, L. M. & HALONEN, S. K. 2008. The gamma interferon (IFN-gamma)-inducible GTP-binding protein IGTP is necessary for toxoplasma vacuolar disruption and induces parasite egression in IFN-gamma-stimulated astrocytes. *Infect Immun*, 76, 4883-94.

MESSMER-BLUST, A. F., BALASUBRAMANIAN, S., GORBACHEVA, V. Y., JEYARATNAM, J. A. & 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, 2514-28.

MEUNIER, E. & BROZ, P. 2016. Interferon-inducible GTPases in cell autonomous and innate immunity. *Cell Microbiol*, 18, 168-80.

MEUNIER, E., WALLET, P., DREIER, R. F., COSTANZO, S., ANTON, L., RUHL, S., DUSSURGEY, S., DICK, M. S., KISTNER, A., RIGARD, M., DEGRANDI, D., PFEFFER, K., YAMAMOTO, M., HENRY, T. & BROZ, P. 2015. Guanylate-binding proteins promote activation of the AIM2 inflammasome during infection with Francisella novicida. *Nat Immunol*, 16, 476-484.

MINEO, J. R. & KASPER, L. H. 1994. Attachment of Toxoplasma gondii to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). *Exp Parasitol*, 79, 11-20.

MINEO, J. R., MCLEOD, R., MACK, D., SMITH, J., KHAN, I. A., ELY, K. H. & KASPER, L. H. 1993. Antibodies to Toxoplasma gondii major surface protein (SAG-1, P30) inhibit

infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J Immunol*, 150, 3951-64.

MORDUE, D. G., DESAI, N., DUSTIN, M. & SIBLEY, L. D. 1999. Invasion by Toxoplasma gondii establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med*, 190, 1783-92.

MORDUE, D. G. & SIBLEY, L. D. 1997. Intracellular fate of vacuoles containing Toxoplasma gondii is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *J Immunol*, 159, 4452-9.

MORISAKI, J. H., HEUSER, J. E. & SIBLEY, L. D. 1995. Invasion of Toxoplasma gondii occurs by active penetration of the host cell. *J Cell Sci*, 108 (Pt 6), 2457-64.

MOSTAFAVI, S., YOSHIDA, H., MOODLEY, D., LEBOITE, H., ROTHAMEL, K., RAJ, T., YE, C. J., CHEVRIER, N., ZHANG, S. Y., FENG, T., LEE, M., CASANOVA, J. L., CLARK, J. D., HEGEN, M., TELLIEZ, J. B., HACOHEN, N., DE JAGER, P. L., REGEV, A., MATHIS, D., BENOIST, C. & IMMUNOLOGICAL GENOME PROJECT, C. 2016. Parsing the Interferon Transcriptional Network and Its Disease Associations. *Cell*, 164, 564-78.

NANTAIS, D. E., SCHWEMMLE, M., STICKNEY, J. T., VESTAL, D. J. & BUSS, J. E. 1996. Prenylation of an interferon-gamma-induced GTP-binding protein: the human guanylate binding protein, huGBP1. *J Leukoc Biol*, 60, 423-31.

NORDMANN, A., WIXLER, L., BOERGELING, Y., WIXLER, V. & LUDWIG, S. 2012. A new splice variant of the human guanylate-binding protein 3 mediates anti-influenza activity through inhibition of viral transcription and replication. *FASEB J*, 26, 1290-300.

OLIAS, P., ETHERIDGE, R. D., ZHANG, Y., HOLTZMAN, M. J. & SIBLEY, L. D. 2016. Toxoplasma Effector Recruits the Mi-2/NuRD Complex to Repress STAT1 Transcription and Block IFN-gamma-Dependent Gene Expression. *Cell Host Microbe*, 20, 72-82.

OLSZEWSKI, M. A., GRAY, J. & VESTAL, D. J. 2006. In silico genomic analysis of the human and murine guanylate-binding protein (GBP) gene clusters. *J Interferon Cytokine Res*, 26, 328-52.

PESTKA, S., KRAUSE, C. D. & WALTER, M. R. 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*, 202, 8-32.

PETTERSEN, E. K. 1979. Destruction of Toxoplasma gondii by HC1 solution. *Acta Pathol Microbiol Scand B*, 87, 217-20.

PFEFFERKORN, E. R. 1984. Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 908-12.

PILLA, D. M., HAGAR, J. A., HALDAR, A. K., MASON, A. K., DEGRANDI, D., PFEFFER, K., ERNST, R. K., YAMAMOTO, M., MIAO, E. A. & COERS, J. 2014. Guanylate binding

proteins promote caspase-11-dependent pyroptosis in response to cytoplasmic LPS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 6046-51.

PILLA-MOFFETT, D., BARBER, M. F., TAYLOR, G. A. & COERS, J. 2016. Interferon-Inducible GTPases in Host Resistance, Inflammation and Disease. *J Mol Biol*, 428, 3495-513.

PRAEFCKE, G. J., GEYER, M., SCHWEMMLE, M., ROBERT KALBITZER, H. & HERRMANN, C. 1999. Nucleotide-binding characteristics of human guanylate-binding protein 1 (hGBP1) and identification of the third GTP-binding motif. *J Mol Biol*, 292, 321-32.

PRAEFCKE, G. J., KLOEP, S., BENSCHEID, U., LILIE, H., PRAKASH, B. & 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, 257-69.

PRAEFCKE, G. J. & MCMAHON, H. T. 2004. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol*, *5*, 133-47.

PRAEFCKE, G. J. K. 2018. Regulation of innate immune functions by guanylate-binding proteins. *Int J Med Microbiol*, 308, 237-245.

PRAKASH, B., PRAEFCKE, G. J., RENAULT, L., WITTINGHOFER, A. & HERRMANN, C. 2000a. Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTPbinding proteins. *Nature*, 403, 567-71.

PRAKASH, B., RENAULT, L., PRAEFCKE, G. J., HERRMANN, C. & WITTINGHOFER, A. 2000b. Triphosphate structure of guanylate-binding protein 1 and implications for nucleotide binding and GTPase mechanism. *EMBO J*, 19, 4555-64.

PROTEINTECH GROUP, I. o.J. *IF imaging: Widefield versus confocal microscopy* [Online]. Available: <u>https://www.ptglab.com/news/blog/if-imaging-widefield-versus-confocal-microscopy/</u> [Accessed 09.11.2023].

QIN, A., LAI, D. H., LIU, Q., HUANG, W., WU, Y. P., CHEN, X., YAN, S., XIA, H., HIDE, G., LUN, Z. R., AYALA, F. J. & XIANG, A. P. 2017. Guanylate-binding protein 1 (GBP1) contributes to the immunity of human mesenchymal stromal cells against Toxoplasma gondii. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 1365-1370.

ROBERT KOCH INSTITUT. 2018. *RKI-Ratgeber: Toxoplasmose* [Online]. Available: <u>https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Toxoplasmose.html#</u> <u>doc2390224bodyText3</u> [Accessed 29.10.23 2023].

ROBERT, R., DE LA JARRIGE, P. L., MAHAZA, C., COTTIN, J., MAROT-LEBLOND, A. & SENET, J. M. 1991. Specific binding of neoglycoproteins to Toxoplasma gondii tachyzoites. *Infect Immun*, 59, 4670-3.

RUSINOVA, I., FORSTER, S., YU, S., KANNAN, A., MASSE, M., CUMMING, H., CHAPMAN, R. & HERTZOG, P. J. 2013. Interferome v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic Acids Res*, 41, D1040-6.

SANTOS, J. C., BOUCHER, D., SCHNEIDER, L. K., DEMARCO, B., DILUCCA, M., SHKARINA, K., HEILIG, R., CHEN, K. W., LIM, R. Y. H. & BROZ, P. 2020. Human GBP1 binds LPS to initiate assembly of a caspase-4 activating platform on cytosolic bacteria. *Nat Commun*, 11, 3276.

SANTOS, J. C. & BROZ, P. 2018. Sensing of invading pathogens by GBPs: At the crossroads between cell-autonomous and innate immunity. *J Leukoc Biol*, 104, 729-735.

SASAI, M., SAKAGUCHI, N., MA, J. S., NAKAMURA, S., KAWABATA, T., BANDO, H., LEE, Y., SAITOH, T., AKIRA, S., IWASAKI, A., STANDLEY, D. M., YOSHIMORI, T. & YAMAMOTO, M. 2017. Essential role for GABARAP autophagy proteins in interferon-inducible GTPase-mediated host defense. *Nat Immunol*, 18, 899-910.

SCHNEIDER, W. M., CHEVILLOTTE, M. D. & RICE, C. M. 2014. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol*, 32, 513-45.

SCHOGGINS, J. W. 2019. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? Annu Rev Virol, 6, 567-584.

SELLECK, E. M., FENTRESS, S. J., BEATTY, W. L., DEGRANDI, D., PFEFFER, K., VIRGIN, H. W. T., MACMICKING, J. D. & SIBLEY, L. D. 2013. Guanylate-binding protein 1 (Gbp1) contributes to cell-autonomous immunity against Toxoplasma gondii. *PLoS Pathog*, 9, e1003320.

SELLECK, E. M., ORCHARD, R. C., LASSEN, K. G., BEATTY, W. L., XAVIER, R. J., LEVINE, B., VIRGIN, H. W. & SIBLEY, L. D. 2015. A Noncanonical Autophagy Pathway Restricts Toxoplasma gondii Growth in a Strain-Specific Manner in IFN-gamma-Activated Human Cells. *mBio*, 6, e01157-15.

SHENOY, A. R., WELLINGTON, D. A., KUMAR, P., KASSA, H., BOOTH, C. J., CRESSWELL, P. & MACMICKING, J. D. 2012. GBP5 promotes NLRP3 inflammasome assembly and immunity in mammals. *Science*, 336, 481-5.

SIBLEY, L. D. 2011. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunol Rev*, 240, 72-91.

SIBLEY, L. D. & AJIOKA, J. W. 2008. Population structure of Toxoplasma gondii: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annu Rev Microbiol*, 62, 329-51.

SIBLEY, L. D., KHAN, A., AJIOKA, J. W. & ROSENTHAL, B. M. 2009. Genetic diversity of Toxoplasma gondii in animals and humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364, 2749-61.

SIBLEY, L. D., KRAHENBUHL, J. L. & WEIDNER, E. 1985a. Lymphokine activation of J774G8 cells and mouse peritoneal macrophages challenged with Toxoplasma gondii. *Infect Immun*, 49, 760-4.

SIBLEY, L. D., WEIDNER, E. & KRAHENBUHL, J. L. 1985b. Phagosome acidification blocked by intracellular Toxoplasma gondii. *Nature*, 315, 416-9.

SKARIAH, S., SULTAN, A. A. & MORDUE, D. G. 2022. IFN-induced cell-autonomous immune mechanisms in the control of intracellular protozoa. *Parasitol Res*, 121, 1559-1571.

STAEHELI, P., PROCHAZKA, M., STEIGMEIER, P. A. & HALLER, O. 1984. Genetic control of interferon action: mouse strain distribution and inheritance of an induced protein with guanylate-binding property. *Virology*, 137, 135-42.

STEFFENS, N. 2020. Analyse der dynamischen mGBP-Rekrutierung zu Pathogenenthaltenden Membrankompartimenten. Dissertation, Heinrich-Heine-Univerisät.

STEFFENS, N., BEUTER-GUNIA, C., KRAVETS, E., REICH, A., LEGEWIE, L., PFEFFER, K. & DEGRANDI, D. 2020. Essential Role of mGBP7 for Survival of Toxoplasma gondii Infection. *mBio*, 11.

STICKNEY, J. T. & BUSS, J. E. 2000. Murine guanylate-binding protein: incomplete geranylgeranyl isoprenoid modification of an interferon-gamma-inducible guanosine triphosphate-binding protein. *Mol Biol Cell*, 11, 2191-200.

STURGE, C. R. & YAROVINSKY, F. 2014. Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during Toxoplasma gondii infection. *Infect Immun*, 82, 3090-7.

SU, C., EVANS, D., COLE, R. H., KISSINGER, J. C., AJIOKA, J. W. & SIBLEY, L. D. 2003. Recent expansion of Toxoplasma through enhanced oral transmission. *Science*, 299, 414-6.

SWATEK, K. N. & KOMANDER, D. 2016. Ubiquitin modifications. Cell Res, 26, 399-422.

TAYLOR, G. A., COLLAZO, C. M., YAP, G. S., NGUYEN, K., GREGORIO, T. A., TAYLOR, L. S., EAGLESON, B., SECREST, L., SOUTHON, E. A., REID, S. W., TESSAROLLO, L., BRAY, M., MCVICAR, D. W., KOMSCHLIES, K. L., YOUNG, H. A., BIRON, C. A., SHER, A. & VANDE WOUDE, G. F. 2000. Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene IGTP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 751-5.

THIEBAUT, R., LEPROUST, S., CHENE, G. & GILBERT, R. 2007. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. *Lancet*, 369, 115-22.

TIETZEL, I., EL-HAIBI, C. & CARABEO, R. A. 2009. Human guanylate binding proteins potentiate the anti-chlamydia effects of interferon-gamma. *PLoS One*, *4*, e6499.

TRAVER, M. K., HENRY, S. C., CANTILLANA, V., OLIVER, T., HUNN, J. P., HOWARD, J. C., BEER, S., PFEFFER, K., COERS, J. & TAYLOR, G. A. 2011. Immunity-related GTPase M (IRGM) proteins influence the localization of guanylate-binding protein 2 (GBP2) by modulating macroautophagy. *J Biol Chem*, 286, 30471-30480.

TRETINA, K., PARK, E. S., MAMINSKA, A. & MACMICKING, J. D. 2019. Interferoninduced guanylate-binding proteins: Guardians of host defense in health and disease. *J Exp Med*, 216, 482-500.

TRIPATHI, R., GLAVES, R. & MARX, D. 2017. The GTPase hGBP1 converts GTP to GMP in two steps via proton shuttle mechanisms. *Chem Sci*, *8*, 371-380.

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

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

VIRREIRA WINTER, S., NIEDELMAN, W., JENSEN, K. D., ROSOWSKI, E. E., JULIEN, L., SPOONER, E., CARADONNA, K., BURLEIGH, B. A., SAEIJ, J. P., PLOEGH, H. L. & FRICKEL, E. M. 2011. Determinants of GBP recruitment to Toxoplasma gondii vacuoles and the parasitic factors that control it. *PLoS One*, 6, e24434.

VOPEL, T., SYGUDA, A., BRITZEN-LAURENT, N., KUNZELMANN, S., LUDEMANN, M. B., DOVENGERDS, C., STURZL, M. & HERRMANN, C. 2010. Mechanism of GTPaseactivity-induced self-assembly of human guanylate binding protein 1. *J Mol Biol*, 400, 63-70.

WANDEL, M. P., KIM, B. H., PARK, E. S., BOYLE, K. B., NAYAK, K., LAGRANGE, B., HEROD, A., HENRY, T., ZILBAUER, M., ROHDE, J., MACMICKING, J. D. & RANDOW, F. 2020. Guanylate-binding proteins convert cytosolic bacteria into caspase-4 signaling platforms. *Nat Immunol*, 21, 880-891.

WANDEL, M. P., PATHE, C., WERNER, E. I., ELLISON, C. J., BOYLE, K. B., VON DER MALSBURG, A., ROHDE, J. & 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, 507-518 e5.

WEHNER, M. & HERRMANN, C. 2010. Biochemical properties of the human guanylate binding protein 5 and a tumor-specific truncated splice variant. *FEBS J*, 277, 1597-605.

WEHNER, M., KUNZELMANN, S. & HERRMANN, C. 2012. The guanine cap of human guanylate-binding protein 1 is responsible for dimerization and self-activation of GTP hydrolysis. *FEBS J*, 279, 203-10.

WEISS, L. M. & DUBEY, J. P. 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol*, 39, 895-901.

WEISS, L. M. & KIM, K. 2000. The development and biology of bradyzoites of Toxoplasma gondii. *Front Biosci*, 5, D391-405.

WERK, R. 1985. How does Toxoplasma gondii enter host cells? Rev Infect Dis, 7, 449-57.

WONG, S. Y. & REMINGTON, J. S. 1993. Biology of Toxoplasma gondii. AIDS, 7, 299-316.

YAMAMOTO, M., OKUYAMA, M., MA, J. S., KIMURA, T., KAMIYAMA, N., SAIGA, H., OHSHIMA, J., SASAI, M., KAYAMA, H., OKAMOTO, T., HUANG, D. C., SOLDATI-FAVRE, D., HORIE, K., TAKEDA, J. & TAKEDA, K. 2012. A cluster of interferon-gammainducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against Toxoplasma gondii. *Immunity*, 37, 302-13.

ZHAO, Y., FERGUSON, D. J., WILSON, D. C., HOWARD, J. C., SIBLEY, L. D. & YAP, G. S. 2009a. Virulent Toxoplasma gondii evade immunity-related GTPase-mediated parasite vacuole disruption within primed macrophages. *J Immunol*, 182, 3775-81.

ZHAO, Y. O., KHAMINETS, A., HUNN, J. P. & HOWARD, J. C. 2009b. Disruption of the Toxoplasma gondii parasitophorous vacuole by IFNgamma-inducible immunity-related GTPases (IRG proteins) triggers necrotic cell death. *PLoS Pathog*, *5*, e1000288.

ZHAO, Z., FUX, B., GOODWIN, M., DUNAY, I. R., STRONG, D., MILLER, B. C., CADWELL, K., DELGADO, M. A., PONPUAK, M., GREEN, K. G., SCHMIDT, R. E., MIZUSHIMA, N., DERETIC, V., SIBLEY, L. D. & VIRGIN, H. W. 2008. Autophagosomeindependent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens. *Cell Host Microbe*, 4, 458-69.

5.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 1	Modellsystem von mGBP2	10
Abb. 2	Schematische Darstellung der Lokalisierung und Dynamik von mGBPs in <i>T. gondii</i> infizierten Zellen	16
Abb. 3	Schemata der Weitfeld-Mikroskopie (A) und Konfokalmikroskopie (B)	18
Abb. 4	Lichtwege in Weitfeld- und konfokaler Mikroskopie	18
Abb. 5	Beispiel einer über das Keyence-Mikroskop angefertigten Übersichtsaufnahme von <i>T. gondii</i> infizierten, mCherry-mGBP2/GFP- mGBP7 MEFs	32
Abb. 6	Beispielaufnahmen für die ausgezählten Konditionen im Übersichtsbild	33
Abb. 7	Hochauflösende konfokal-mikroskopische Aufnahmen der mGBP6/mGBP7 und mGBP2/mGBP7 doppelt transduzierten Zelllinien	34

- Abb. 8Analyse der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP6- und 35
mGBP7-Fusionsproteine zwei Stunden und sechs Stunden nach T.
gondii Infektion von mit IFN- γ stimulierten mGBP6 und mGBP7
transduzierten mGBP7-/- MEFs
- Abb. 9 Analyse der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP2- und 38 mGBP7-Fusionsproteine zwei Stunden und sechs Stunden nach *T. gondii* Infektion von mGBP2 und mGBP7 transduzierten mGBP7^{-/-} MEFs
- Abb. 10 Analyse der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP2- und 41 mGBP7-Fusionsproteine (links) und der mGBP6- und mGBP7-Fusionsproteine (rechts) innerhalb der doppelt transduzierten MEF-Zelllinien nach zwei Stunden
- Abb. 11Vergleich der Analysen der Rekrutierung und Akkumulation der 42
mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine und mGBP6- und mGBP7-
Fusionsproteine innerhalb der doppelt transduzierten MEF-Zelllinien
nach zwei Stunden
- Abb. 12 Analyse der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP2- und 45 mGBP7-Fusionsproteine (links) und mGBP6- und mGBP7 Fusionsproteine (rechts) innerhalb der doppelt transduzierten MEF Zelllinien nach sechs Stunden.
- Abb. 13 Vergleich der Analyse der Rekrutierung und Akkumulation der 45 mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine und mGBP6- und mGBP7-Fusionsproteine innerhalb der doppelt transduzierten MEF-Zelllinien nach sechs Stunden
- Abb. 14Analyse der Rekrutierung und Akkumulation der mCherry-mGBP2-60und GFP-mGBP7-Fusionsproteine zwei Stunden nach Infektion
- Abb. 15Analyse der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP- 61-
Fusionsproteine 2 Stunden nach Infektion.62

5.2 Tabellenverzeichnis

Titel Tabelle Seite Tabelle 1 Zuordnung der untersuchten Konditionen im angefertigten Übersichtsbild zum entsprechenden Counter in der Multipoint-Funktion der Software Fiji für mCherry-mGBP2/GFP-mGBP7 kotransduzierte MEFs

- Tabelle 2 Zuordnung der untersuchten Konditionen im angefertigten 31 Übersichtsbild zum entsprechenden Counter in der Multipoint-Funktion der Software Fiji für mCherry-mGBP6/GFP-mGBP7 kotransduzierte MEFs
- **Tabelle 3** Absolute Daten inklusive Standardabweichung (SD) der Rekrutierung 37 und Akkumulation der mGBP6- und mGBP7-Fusionsproteine zwei Stunden und sechs Stunden nach T. gondii Infektion von mGBP6 und mGBP7 transduzierten mGBP7-/- MEFs
- Tabelle 4 Absolute Daten inklusive Standardabweichung (SD) der Rekrutierung 37 und Akkumulation der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine zwei Stunden und sechs Stunden nach T. gondii Infektion von mGBP2 und mGBP7 transduzierten mGBP7-/- MEFs
- **Tabelle 5** Absolute Daten inklusive Standardabweichung (SD) der Rekrutierung 39 und Akkumulation der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine und mGBP6 Fusionsproteine zwei Stunden nach T. gondii Infektion von mCherry-mGBP2 und GFP-mGBP7 transduzierten mGBP7-/- MEFs und mCherry-mGBP6 und GFP-mGBP7 transduzierten mGBP7-/-**MEFs**
- **Tabelle 6** Absolute Daten inklusive Standardabweichung (SD) der Rekrutierung 40 und Akkumulation der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine und mGBP6 Fustionsproteine sechs Stunden nach T. gondii Infektion von mCherry-mGBP2 und GFP-mGBP7 transduzierten mGBP7-/- MEFs und mCherry-mGBP6 und GFP-mGBP7 transduzierten mGBP7-/-**MEFs**
- **Tabelle 7** Absolute Daten inklusive Standardabweichung (SD) der Rekrutierung 43 und Akkumulation der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine und mGBP6-Fusionsproteine zwei Stunden nach T. gondii Infektion von

31

mCherry-mGBP2 und GFP-mGBP7 transduzierten mGBP7^{-/-} MEFs und mCherry-mGBP6 und GFP-mGBP7 transduzierten mGBP7^{-/-} MEFs.

- Tabelle 8Relative Daten inklusive Standardabweichung (SD) der Rekrutierung44und Akkumulation der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine und
mGBP6-Fusionsproteine zwei Stunden nach *T. gondii* Infektion von
mCherry-mGBP2 und GFP-mGBP7 transduzierten mGBP7-/-
MEFs44MEFs.MEFs.
- Tabelle 9 Absolute Daten inklusive Standardabweichung (SD) der Rekrutierung 47 und Akkumulation der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine und mGBP6-Fusionsproteine sechs Stunden nach *T. gondii* Infektion von mCherry-mGBP2 und GFP-mGBP7 transduzierten mGBP7^{-/-} MEFs und mCherry-mGBP6 und GFP-mGBP7 transduzierten mGBP7^{-/-} MEFs
- Tabelle 10 Relative Daten inklusive Standardabweichung (SD) der Rekrutierung 48 und Akkumulation der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine und mGBP6-Fusionsproteine sechs Stunden nach *T. gondii* Infektion von mCherry-mGBP2 und GFP-mGBP7 transduzierten mGBP7^{-/-} MEFs und mCherry-mGBP6 und GFP-mGBP7 transduzierten mGBP7^{-/-} MEFs.

6 Anhang

6.1 Graphische Darstellung und statistische Auswertung der verglichenen Rekrutierungsfrequenzen























Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meine aufrichtige Dankbarkeit für die Unterstützung während meiner Promotion ausdrücken. Ohne die Hilfe, Unterstützung und Anleitung wäre es mir nicht möglich gewesen, diese Arbeit erfolgreich abzuschließen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Professor Klaus Pfeffer, der mich als Doktorvater während meiner Promotionszeit betreut und unterstützt hat und dieses interessante Forschungsthema bereitgestellt hat. Seine fachliche Kompetenz, Erfahrung und wertvolle Ratschläge waren für mich von unschätzbarem Wert. Ich danke ihm für seine Anleitung, kritischen Rückmeldungen und für seine unermüdliche Unterstützung und Ermutigung. Seine Fähigkeit, Arbeitsabläufe zu planen und Termine zu koordinieren, hat mir immer wieder geholfen, den Überblick über meine Arbeit zu behalten.

Ebenso einen herzlichen Dank an Professor Hugger für seine exzellente Betreuung während meiner Promotionsarbeit, die einen reibungslosen Ablauf ermöglichte.

Auch Dr. Daniel Degrandi, als Arbeitsgruppenleiter, danke ich für seine fachliche Expertise und Unterstützung. Ich bin sehr dankbar für seine Unterstützung und für die vielen wertvollen Ratschläge, die er mir gegeben hat. Auch für die wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, der Datenauswertung und des Schreibens dieser Arbeit bin ich sehr dankbar.

Karin Buchholz möchte ich für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und der geduldigen Einarbeitung danken. Ohne ihre Hilfe und ihr Engagement wäre die Durchführung der Experimente wesentlich schwieriger gewesen.

Ebenso danke ich der Arbeitsgruppe Pfeffer, insbesondere Marcel Helle, Veronica Raba, Julia Mock und Nicole Küpper, für ihre Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche, der gelegentlichen Betreuung meiner Zellen und der sofortigen Hilfe bei Fragen meinerseits.

Ein besonderer Dank gilt Gabriele Weichelt für ihre herausragende Arbeit bei der Terminplanung und Koordination. Neben Ihrer hervorragenden Arbeit als Terminplanerin möchte ich auch Ihre netten Gespräche erwähnen, die oft genau zur richtigen Zeit kamen und mir halfen, mich zu entspannen und neue Kraft zu schöpfen. Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene und der Virologie für die gute Atmosphäre und besonders für die vielen Kooperationen, Hilfestellungen und netten Gespräche beim Mittagessen.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern bedanken, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Ebenso danke ich meinen Freunden, die immer für mich da waren und mir zur Seite gestanden haben. Eure aufmunternden Worte, eure Hilfe bei der Organisation von Freizeitaktivitäten und eure stete Ermutigung haben mir sehr geholfen, auch in stressigen Zeiten den Überblick zu behalten.

Und nicht zuletzt möchte ich meinem Freund Malek für seine emotionale Unterstützung danken. Er hat mich während meiner gesamten Promotionszeit ermutigt und unterstützt. Seine Unterstützung war für mich von unschätzbarem Wert.

Nochmals vielen Dank für eure Unterstützung.

Eure Pia