

Funktionen von mGBP7 (murines Guanylat bindendes Protein 7) und TOM1 (Target of Myb1) bei der Immunantwort gegen *Toxoplasma gondii*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sophia Kasbrink

Aus Duisburg

Düsseldorf, Juli 2026

II

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

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2026

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis VIII

Tabellenverzeichnis X

Abbildungsverzeichnis XI

1 Einleitung 1

1.1 *Toxoplasma gondii* 1

1.1.1 *T. gondii* Morphologie 2

1.1.2 Der Lebenszyklus von *T. gondii* 3

1.1.3 Wirtszellinvasion 5

1.1.4 Immunantwort auf *T. gondii* Infektion 6

1.2 mGBP7 9

1.2.1 Struktur und biochemische Eigenschaften 10

1.2.2 Funktion in der Pathogenabwehr 13

1.3 TOM1 18

1.3.1 Struktur und Proteininteraktion 18

1.3.2 Physiologische Funktionen von TOM1 20

1.4 Zielsetzung der Arbeit 26

2 Materialien 27

2.1 Allgemeines 27

2.1.1 Chemikalien 27

2.1.2 Kits, Fertigpuffer und andere Reagenzien 28

2.1.3 Verbrauchsmaterialien 29

2.2 Nukleinsäuren 30

2.2.1 Plasmide 30

2.2.2 Primer 31

2.3 Proteine 32

2.3.1 Enzyme 32

2.3.2 Restriktionsenzyme ... 32
2.3.3 Primärantikörper ... 32
2.3.4 Sekundärantikörper ... 33
2.4 Zellen ... 33
2.4.1 Bakterien- und Parasitenstämme ... 33
2.4.2 Eukaryotische Zelllinien ... 33
2.5 Puffer, Lösungen und Medien ... 35
2.5.1 Stammlösungen und Puffer ... 35
2.5.2 Medien ... 36
2.6 Technische Ausstattung ... 36
2.7 Software ... 37
3 Methoden ... 38
3.1 Tierexperimentelle Methoden ... 38
3.1.1 Herstellung embryonaler Fibroblasten ... 38
3.1.2 Aufreinigung genomischer DNA aus Mausgeweben ... 38
3.2 Zellbiologische Methoden ... 39
3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen ... 39
3.2.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen ... 39
3.2.3 Lentivirale Transduktion zur Herstellung stabiler Zelllinien ... 40
3.2.4 Kultivierung von ME49 *T. gondii* ... 41
3.2.5 Herstellung von Zelllysaten ... 41
3.2.6 IF-Färbung für konfokalmikroskopische Analysen ... 41
3.2.7 Lebenzellmikroskopie an einem Konfokalmikroskop ... 42
3.2.8 Ko-IP / GFP-Trap ... 42
3.2.9 Bestimmung der *T. gondii* Proliferation mittels Luciferase-Assay ... 43
3.3 Molekularbiologische Methoden ... 43
3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ... 43

3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese 44
3.3.3 Enzymatischer Verdau von DNA 44
3.3.4 Klonierung und Transformation in *E. coli* 44
3.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* 45
3.3.6 Isolierung gesamtzellulärer RNA und cDNA-Synthese 45
3.3.7 Sanger-Sequenzierung 46
3.4 Proteinbiochemische Methoden 46
3.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung 46
3.4.2 SDS-PAGE 46
3.4.3 Western Blot 47
3.4.4 Massenspektrometrie 48
4 Ergebnisse 49
4.1 In MEFs exprimiertes TOM1 49
4.2 Interaktion zwischen mGBP7 und TOM1 50
4.2.1 Identifikation der Interaktionsdomäne von mGBP7 51
4.2.2 Kolokalisationsrate von mGBP7 und TOM1 an der *T. gondii* PV 54
4.2.3 Dynamik der Rekrutierung von mGBP7 und TOM1 zur *T. gondii* PV 56
4.3 Interaktionspartner von TOM1 im Kontext einer *T. gondii* Infektion 58
4.4 Einfluss von TOM1 auf die *T. gondii* Proliferation 68
5 Diskussion 71
5.1 In MEFs exprimiertes TOM1 71
5.2 Die Interaktionsdomäne von mGBP7 71
5.3 Rekrutierung von mGBP7 und TOM1 zu der *T. gondii* PV 73
5.4 Die Rolle von TOM1 in der *T. gondii* Abwehr 74
5.5 Funktionsanalyse von TOM1 bei der Proliferation von *T. gondii* 78
5.6 Ausblick 79

6 Zusammenfassung 80

7 Summary 82

8 Eidesststtliche Erklärung 84

9 Literaturverzeichnis 85

10 Anhang 95

10.1.1 Macro zur Bearbeitung der Einzelaufnahmen aus der Lebendzellmikroskopie mittels Fiji 95

10.2 In MEFs exprimiertes TOM1 96

Interaktion zwischen mGBP7 und TOM1 97

10.2.1 Identifikation der Interaktionsdomäne von mGBP7 97

10.2.2 Dynamik der Rekrutierung von mGBP7 und TOM1 zur T. gondii PV 103

10.3 Interaktionspartner von TOM1 im Kontext einer *T. gondii* Infektion 104

10.4 Die Rolle von TOM1 in der *T. gondii* Abwehr 119

11 Danksagung 120

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
BCA	Bicinchoninsäure
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrums
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaar(e)
cDNA	Komplementäre DNA
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DC	Dendritische Zelle
dH_2O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbeccos Phosphat-gepufferte Lösung
DTT	DL-Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
E-Domäne	Effektor-Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESCRT	engl.: *endosomal sorting complex required for transport*
FACS	Fluoreszenz- aktiviertes Cell Sorting (Durchflusszytometrie)
FBS	Fötales Rinderserum
GAT-Domäne	engl.: *GGA and TOM1-Domain*
G-Domäne	GTPase-Domäne
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTL	Genomics & Transcriptomics Labor
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethanschwefelsäure
HHU	Heinrich-Heine-Universität
(h/m)GBP	(Humane/Murine) Guanylat-bindende Proteine
HRP	engl.: *horseradish peroxidase* (Meerrettichperoxidase)
IF	Immunfluoreszenz
IFN-γ	Interferon-γ
IgG	Immunglobulin G

IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
IRGs	engl.: *immunity related GTPases*
ISG	Interferon-stimulierte Gene
KO	engl.: *knock-out*
LB	Lysogenie Brühe
M-Domäne	Mittlere Domäne
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
MPL	Molecular Proteomics Laboratory
MYD88	engl.: *Myeloid Differentiation Primary Response 88*
NF-κB	engl.: *nuclear factor κB*
PAMP	engl.: *pathogen-associated molecular patterns*
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PtdIns3P	Phosphatidolinositol-3-phosphat
PV(M)	Parasitophore Vakuole(nmembran)
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TBD	TOM1-bindende Domäne
TBS-T	engl.: *tris-buffered saline with Tween20*
TE	TRIS und EDTA
T. gondii	*Toxoplasma gondii*
TLR	engl.*: toll-like receptor*
TOLLIP	engl.: *toll interacting protein*
TOM1	engl.: *target of myb 1*
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
VHS-Domäne	VPS27, Hrs und STAM-Domäne
VLS	engl.: *vesicle-like structures*
v/v	Volumen/Volumen
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: MS-Intensitäten für Myosin VI und TOLLIP, aus der MS-Analyse von Eluat-Proben einer mittels anti-HA Antikörpern durchgeführten Ko-IP 59
Tabelle 2: Identifizierte Proteine mit signifikant erhöhten Signalintensitäten (engl. Namen) nach einer Ko-IP mit TOM1.492-HA (C-terminal getaggt) 65
Tabelle 3: Identifizierte Proteine mit signifikant erhöhten Signalintensitäten (engl. Namen) nach einer Ko-IP mit HA-TOM1.492 (N-terminal getaggt) 66
Tabelle 4: Identifizierte Proteine mit signifikant erhöhten Signalintensitäten (engl. Namen) nach einer Ko-IP mit TOM1.ΔVHS-HA 66
Tabelle 5: Liste der ersten 50 identifizierten Proteine der MS-Analyse nach Ko-IP mit TOM1.ΔVHS-HA..... 107
Tabelle 6: Liste der ersten 50 identifizierten Proteine der MS-Analyse nach Ko-IP mit TOM1.492-HA 109
Tabelle 7: Liste der ersten 50 identifizierten Proteine der MS-Analyse nach Ko-IP mit HA-TOM1.492 111

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Querschnitt eines *T. gondii* Tachyzoiten 3
Abbildung 2: Lebenszyklus von *T. gondii* 4
Abbildung 3: Immunantwort auf eine *T. gondii* Infektion 7
Abbildung 4: Homologie-Modell für mGBP7 11
Abbildung 5: Dynamik der Rekrutierung von mGBPs zur *T. gondii* PV 15
Abbildung 6: Einfluss von mGBP2 und mGBP7 während einer *T. gondii* Infektion und Interaktion von mGBP7 mit TOM1 17
Abbildung 7: Struktur der VHS- und GAT-Domäne von TOM1 20
Abbildung 8: Funktion von TOM1 22
Abbildung 9: Interaktion zwischen mGBP7 und TOM1 25
Abbildung 10: Mit UV-Licht bestrahlte Agarose-Gele nach einer Gelelektrophorese 50
Abbildung 11: Western Blots nach GFP-Trap-Aufreinigung 52
Abbildung 12: Verhältnisse der WB-Signalintensitäten der Eluatproben zu den Intensitäten der Lysatproben. 54
Abbildung 13: Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von mit *T. gondii* infizierten MEFs 2,5 h nach der Infektion 55
Abbildung 14: Rekrutierungsrate von mGBP7 und TOM1 zu einer *T. gondii* PV 56
Abbildung 15: Lebendzellmikroskopie-Aufnahmen von mit *T. gondii* infizierten MEFs zu verschiedenen Zeitpunkten 57
Abbildung 16: Silber-Gel von Proben einer mittels anti-HA Antikörpern durchgeführten Ko-IP 59
Abbildung 17: Vergleich der Elutionsmethoden einer mittels anti-HA Antikörpern durchgeführten Ko-IP 61
Abbildung 18: WBs von Proben einer mittels anti-HA Antikörpern durchgeführten Ko-IP 63
Abbildung 19: *Volcano-Plots* der in der MS-Analyse identifizierten Proteine 64
Abbildung 20: *Volcano-Plots* der in der MS-Analyse identifizierten Proteine 65
Abbildung 21: Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von mit *T. gondii* infizierten MEFs 2,5 h nach der Infektion 67
Abbildung 22: *T. gondii* Proliferations-Assay 69
Abbildung 23: *T. gondii* Proliferations-Assay 70

Abbildung 24: Öffnung von hGBPs zur Dimerbildung und Bindung an Membranen 72
Abbildung 25: Vermutete Rolle von TOLLIP in der MyD88-abhängigen Aktivierung proinflammatorischer Reaktionen 76
Anhang 1: Mit UV-Licht bestrahlte Agarose-Gele nach einer Gelelektrophorese 96
Anhang 2: Western Blots nach GFP-Trap-Aufreinigung 97
Anhang 3: Western Blots nach GFP-Trap-Aufreinigung 98
Anhang 4: Western Blots nach GFP-Trap-Aufreinigung 100
Anhang 5: Western Blots nach GFP-Trap-Aufreinigung; A: mGBP7$^{-/-}$ MEFs 102
Anhang 6: Lebendzellmikroskopie-Aufnahmen von mit *T. gondii* infizierten MEFs zu verschiedenen Zeitpunkten 103
Anhang 7: anti-HA-WBs von Proben einer anti-HA Ko-IP 104
Anhang 8: anti-HA-WBs von Proben einer anti-HA Ko-IP 105
Anhang 9: Verteilung der gemessenen MS-Intensitäten von Proben einer mittels anti-HA Antikörpern durchgeführten Ko-IP 106
Anhang 10: *Volcano-Plots* der in der MS-Analyse identifizierten Proteine 114
Anhang 11: *Volcano-Plots* der in der MS-Analyse identifizierten Proteine 115
Anhang 12: *Volcano-Plots* der in der MS-Analyse identifizierten Proteine 116
Anhang 13: *Volcano-Plots* der in der MS-Analyse identifizierten Proteine 117
Anhang 14: Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von mit *T. gondii* infizierten MEFs (WT) 2,5 h nach der Infektion 118
Anhang 15: Western Blots nach RFP-Trap-Aufreinigung 119

1 Einleitung

1.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) ist ein einzelliger eukaryotischer Parasit, der obligat intrazellulär lebt [1]. Er gehört zum Stamm der Apicomplexa, einer Gruppe von intrazellulären Parasiten, denen auch das Humanpathogen *Plasmodium* (Malariaerreger) und die Tierpathogene *Eimeria* (Hühner Kokzidien) und *Sarcocystis* angehören [1].

Apicomplexa werden neben ihrer charakteristischen polarisierten Zellstruktur durch den sogenannten Apikalkomplex gekennzeichnet, einer Anordnung aus Zytoskelettbestandteilen und Zellorganellen am apikalen Ende der Zellen, der bei der Invasion der Wirtszellen eine wichtige Rolle spielt [2].

Der Lebenszyklus von *T. gondii* beinhaltet sowohl sexuelle als auch asexuelle Phasen. Der sexuelle Lebenszyklus findet in Katzen (*Felidae*) statt, weshalb diese als Endwirte des Parasiten bezeichnet werden [3]. Neben Katzen kann *T. gondii* eine große Bandbreite an warmblütigen Zwischenwirten infizieren, in denen es sich asexuell vermehrt. *T. gondii* wurde bereits vor über 100 Jahren in Gewebeproben von Säugetieren nachgewiesen. Nicolle und Manceux beschrieben 1908 erstmals die asexuelle Tachyzoitform in Gundi (*Ctenodactylus gundi*), einem afrikanischen Nagetier. Sie benannten den Genus aufgrund ihrer bogenartigen Form *Toxoplasma* (griechisch *toxon* = Bogen, *plasma* = Kreatur) [4]. Zeitgleich identifizierte Splendore 1908 in Brasilien den Parasiten in Kaninchengewebe [5].

Jahrzehnte später wurden Katzen durch mehrere unabhängig arbeitende Arbeitsgruppen als Endwirte identifiziert [6], wie z.B. von Dubey und Frenkel in 1970 [7]. Folgende phylogenetische Analysen resultierten in einer Einordnung in drei klonale Linien (Typ-I – III), wobei Typ-II *T. gondii* für einen Großteil der Infektionen beim Menschen verantwortlich sind [8].

Die drei klonalen Linien (auch als Stammtypen bezeichnet) unterscheiden sich stark in ihrer Virulenz. So wirkt schon ein einzelner Parasit des hochvirulenten Typ-I *T. gondii* im Mausmodell letal [9]. Die in dieser Arbeit verwendeten ME49 Toxoplasmen gehören zu den Typ-II Toxoplasmen und zeigen im Mausmodell eine deutlich geringere Letalität, mit einer mittleren letalen Dosis von ≥ 100 Parasiten, während bei Typ-III Toxoplasmen die mittlere letale Dosis bei ≥ 10^5 Parasiten liegt [10]. Einer der Hauptgründe für die Unterschiede in der Virulenz sind eine Familie von Serinkinasen aus spezialisierten Organellen der Parasiten, den Rhoptrien [11].

Weltweit ist circa ein Drittel der Bevölkerung mit *T. gondii* infiziert, in Deutschland reicht die Infektionsrate von 20 % bei den 18 - 29-Jährigen bis zu 77 % bei den 70 - 79-Jährigen. Die Infektion findet in den meisten Fällen über kontaminierte Nahrungsmittel oder den Kontakt mit Katzenfäkalien statt [12]. Bei gesunden, immunkompetenten Personen verläuft die Infektion meist asymptomatisch und äußert sich nur in seltenen Fällen mit Grippe-ähnlichen Symptomen [13]. Während einer Schwangerschaft stellt eine Erstinfektion jedoch ein hohes Risiko für das ungeborene Kind dar, da eine transplazentale Übertragung des Parasiten von der Mutter auf den Fötus stattfinden kann. Diese kann im schlimmsten Fall zu neurologischen Schäden, schwerwiegenden Fehlbildungen oder sogar zu Fehlgeburten führen [14]. Außerdem können bereits vom Immunsystem unterdrückte Toxoplasmen reaktivieren sobald das Immunsystem kompromittiert ist, z.B. im Zuge einer Immunsuppression nach einer Organ- oder Stammzelltransplantation oder im Fall von HIV/AIDS-Patienten. In diesen Fällen kann eine potentiell lebensgefährliche zerebrale Toxoplasmose auftreten [15].
Zusätzlich zu seiner klinischen Relevanz ist *T. gondii* als Modellorganismus in den wissenschaftlichen Fokus gerückt, da sich Toxoplasmen einfacher genetisch manipulieren lassen als andere Apicomplexa und deren asexuelle Replikation in Zellkultur erfolgen kann [16].

1.1.1 *T. gondii* Morphologie

T. gondii ist ein sichelförmig gebogener einzelliger Parasit. Er verfügt über die für eine eukaryotische Zelle typischen Organellen (Nukleus, Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat), hat allerdings, wie viele der Apicomplexa, nur ein einzelnes, längliches Mitochondrium (Abbildung 1) [17]. An seinem vorderen Pol besitzt er den für die Apicomplexa namensgebenden Apicalkomplex, der essentiell für das Eindringen des Parasiten in Wirtszellen ist [18]. Dieser Komplex besteht aus spezialisierten sekretorischen Organellen (Rhoptrien und Mikronemen) und aus Zytoskelett-Komponenten (Mikrotubuli und Polring) [2]. Zusätzliche sekretorische Organellen, die Dichten Granula, sind im gesamten Zytoplasma von *T. gondii* verteilt. Darüber hinaus besitzt der Parasit ein weiteres für Apicomplexa charakteristisches Organell, den Apicoplasten. Dieser ist u.a. für die Synthese von Fettsäuren und Isoprenoiden verantwortlich [19]. Wie die Plastiden in höheren Pflanzen und Algen besitzen Apicoplasten ein eigenes Genom und sind durch Endosymbiose Bestandteil der Parasiten geworden [20].

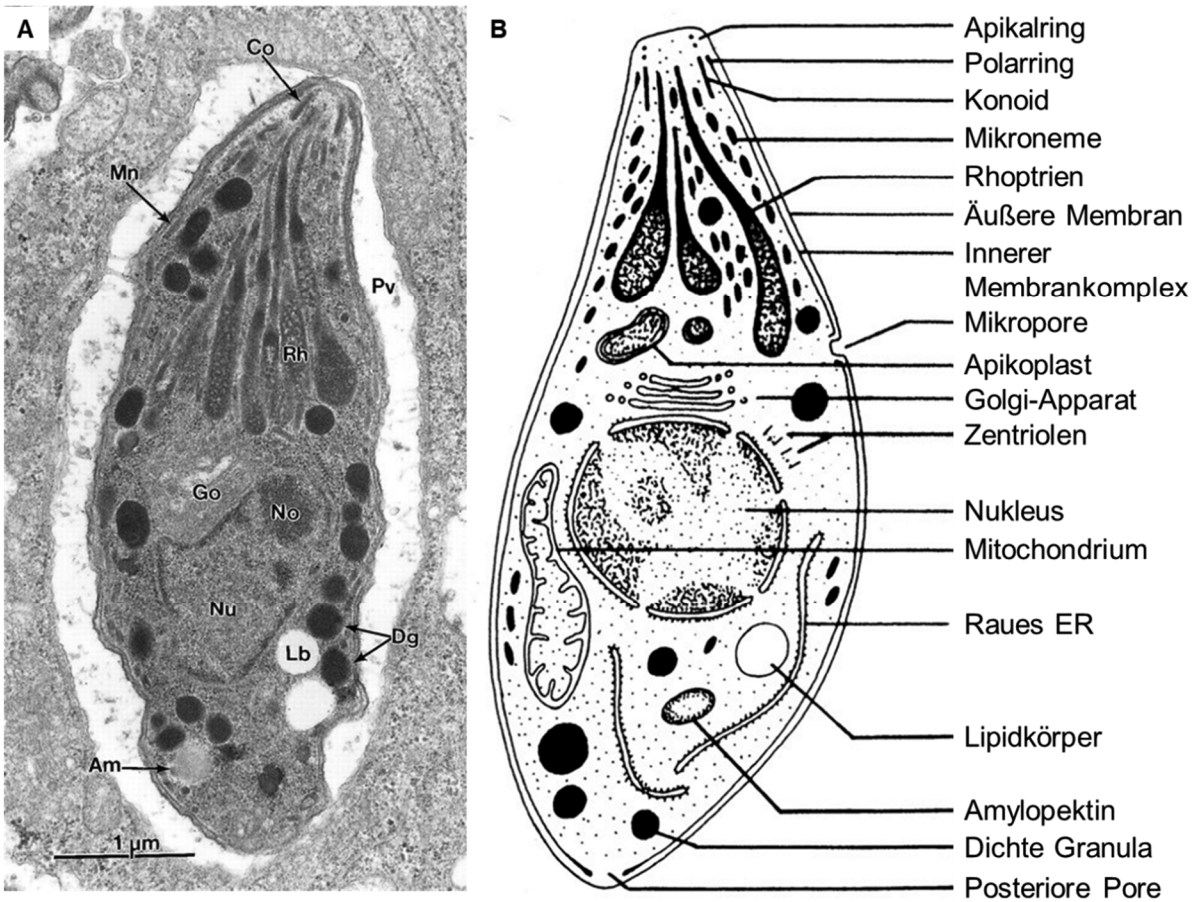


Abbildung 1: Querschnitt eines *T. gondii* Tachyzoiten; A: Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahme eines *T. gondii* Tachyzoiten (Co: Konoid, Mn: Mikronem, Pv: Parasitophore Vakuole, Rh: Rhoptrien, Go: Golgi-Apparat, Nu: Nukleus, Lb: Lipidkörper, Dg: Dichte Granula, Am: Amylopektin); B: graphische Darstellung der mikroskopischen Aufnahme; modifiziert nach Dubey et al., 1998 [2]

Alle infektiösen Stadien von *T. gondii* sind von dem sogenannten Pellikel, einem Membrankomplex, umschlossen. Dieser besteht aus der äußeren Plasmamembran sowie dem inneren Membrankomplex, der von zwei eng anliegenden Membranen gebildet wird [2]. Sobald der Parasit in die Wirtszelle eindringt, erfolgt zudem die Bildung einer parasitophoren Vakuole (PV). Diese ermöglicht *T. gondii* die Ausbildung einer replikativen Nische, die vom Zytoplasma der Wirtszelle abgeschirmt ist [21].

1.1.2 Der Lebenszyklus von *T. gondii*

Toxoplasmen können zwischen einer sexuellen Vermehrungsphase in ihrem Endwirt und einer asexuellen Vermehrungsphase in einem Zwischenwirt wechseln. Hierbei kann *T. gondii* nicht nur zwischen Zwischen- und Endwirten, sondern auch von Zwischenwirt auf Zwischenwirt und von Endwirt auf Endwirt übertragen werden (Abbildung 2) [22].

Die sexuelle Vermehrung von *T. gondii* findet im Gastrointestinaltrakt von Katzen (*Felidae*) statt. Deren Infektion findet meist über die Aufnahme von Gewebszysten statt. Im Darmlumen wird die Zystenwand enzymatisch aufgelöst, wodurch die darin enthaltenen Bradyzoiten freigesetzt werden. Diese differenzieren in Tachyzoiten und dringen in die Epithelzellen des Darms ein [23]. Dort bilden sie durch eine Anzahl an selbstlimitierenden Zellteilungen einen großen Schizonten aus, aus dem wiederum mehrere Merozoiten hervorgehen [22]. Diese werden nach anschließender Zellruptur ins Darmlumen freigesetzt und befallen weitere Epithelzellen, in denen sie sich erneut schizogen vermehren [24]. Nach mehreren derartigen Zyklen beginnt die Gamogenie, die Bildung der männlichen Mikro- und weiblichen Makro-Gameten. Die Makro-Gameten werden durch die Mikro-Gameten befruchtet und reifen zu einer unsporulierten Oozyste heran [25]. Oozysten werden ca. 1 - 3 Wochen nach der Infektion der Katze ausgeschieden und sporulieren innerhalb weniger Tage unter Bildung zweier Sporozysten, die aus einer Sporozystenwand und jeweils vier länglichen Sporozoiten (haploid) bestehen. Sporulierte Oozysten sind durch eine Oozystenwand umschlossen, die ihr eine hohe Umweltresistenz verleihen und sind dadurch bis zu fünf Jahre infektionsfähig. Sie können nahezu alle warmblütigen Vertebraten (z.B. durch Aufnahme von kontaminierter Nahrung oder Wasser [26, 27]) infizieren, auch wenn sie für Katzen nur in geringerem Maße infektiös sind [23].

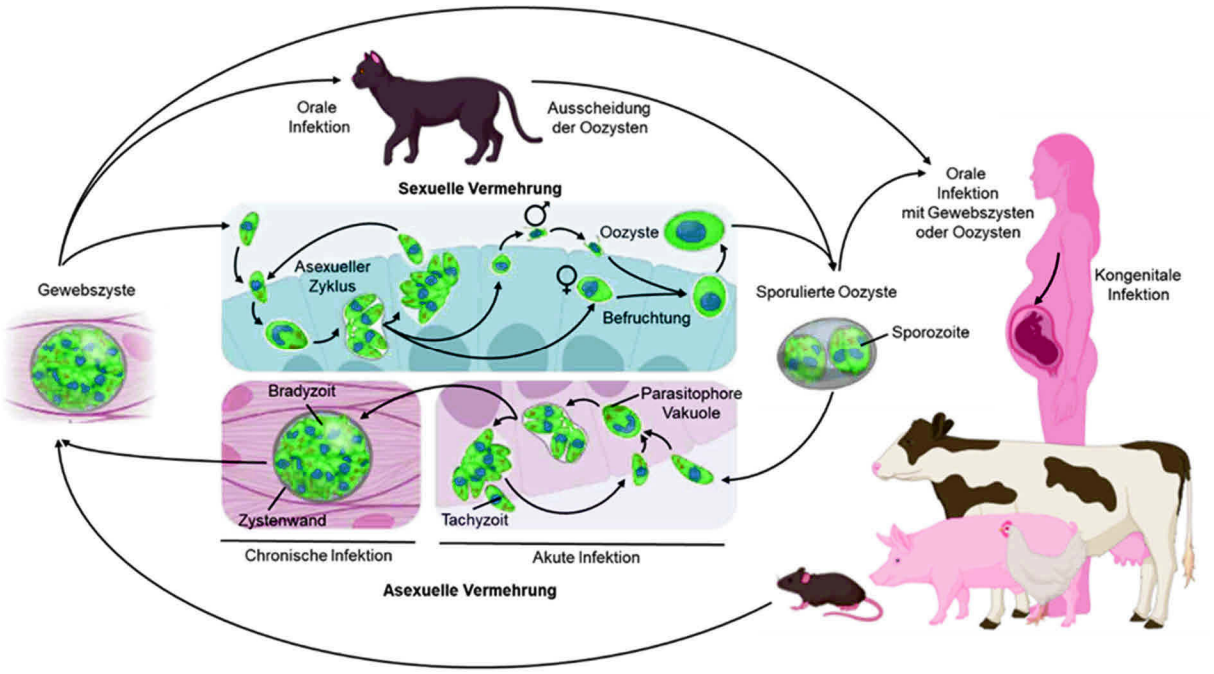


Abbildung 2: Lebenszyklus von *T. gondii*; Übersicht der einzelnen Stufen der sexuellen bzw. der asexuellen Vermehrung in den jeweiligen Wirten des Parasiten; modifiziert nach Lourido, 2019 [28]

Im Darm der Zwischenwirte werden die Oozystenwände und Sporozystenwände enzymatisch aufgelöst, wodurch die Sporozoiten freigesetzt werden. Diese dringen in die Epithelzellen des Darms ein, wo sie in Tachyzoiten differenzieren, die sich schnell replizieren. Die Tachyzoiten verbreiten sich über Blut- und Lymphgefäße im gesamten Wirtskörper, vor allem Makrophagen, Muskelzellen, Neurone sowie Zellen der Choroidea werden befallen [24]. Innerhalb einer Woche führt die einsetzende Immunantwort des Wirtes zu einem Übergang der Tachyzoiten in sich nur langsam teilende Bradyzoiten [1]. Diese werden durch eine 2 - 3 µm dicke Zystenwand sowohl vor dem Immunsystem des Wirtes als auch vor physiologischen Einflüssen geschützt. Nach Aufnahme dieser Gewebszysten (z.B. durch rohes, infiziertes Fleisch) rupturieren die Zysten im Darm des Wirtes und setzen die darin enthaltenen Bradyzoiten frei, die wiederum in Tachyzoiten differenzieren und sich im Wirtskörper ausbreiten [29].

1.1.3 Wirtszellinvasion

T. gondii dringt, wie andere Apicomplexa, über einen aktiven Prozess in die Wirtszelle ein, der sich stark von anderen intrazellulären Mikroorganismen unterscheidet. Während viele Viren und intrazelluläre Bakterien auf Mechanismen der Wirtszelle angewiesen sind, um über Endozytose oder Phagozytose einzudringen, wird die Invasion von *T. gondii* zu einem großen Teil durch einen Aktin-Myosin-Motorkomplex angetrieben, der an der Plasmamembran des Parasiten lokalisiert ist [30, 31].

Zusätzlich wird die Wirtszellinvasion durch die Sekretion verschiedener Proteine aus dem Apikalkomplex vorangetrieben. So sekretieren die Mikronemen bei Wirtszellkontakt adhäsive Proteine wie AMA1 (engl.: *apical membrane protein 1*), in dessen Abwesenheit der Anlagerungsprozess des Parasiten an die Wirtszelle stark beeinträchtigt ist [32]. Zusammen mit RON2 (engl.: *Rhophtry neck protein 2*) ermöglicht es die Bildung einer gleitenden Kontaktzone zwischen dem Parasiten und der Wirtszelle, durch die *T. gondii* in die Zelle eindringt [33]. Hierbei stülpt sich die Wirtszellmembran um den eindringenden Parasiten und bildet die parasitophore Vakuolenmembran (PVM). Doch auch viele weitere Proteine sind an diesem komplexen Prozess beteiligt. So sind einige Proteine der Rhoptrien (RON2, -4 und -5) in der Lage, während der Invasion Proteine der Wirtszelle zur Kontaktzone zu rekrutieren und für das Eindringen des Parasiten zu nutzen [34]. Zusätzlich scheinen Komplexe aus Proteinen der Mikroneme (MIC1-4-6, MIC3-8) relevant für die Anlagerung von *T. gondii* an die Wirtszelle zu sein.

Diese Vielfalt an beteiligten Proteinen könnte eine mögliche Erklärung für das breite Wirtsspektrum von *T. gondii* sein [35, 36].

Die während der Invasion gebildete parasitophore Vakuolenmembran (PVM) bietet dem Parasiten eine replikative Nische, in der er vor den Einflüssen der Wirtszelle geschützt ist und sich gleichzeitig mit Nährstoffen für die eigenen Replikation versorgen lässt [37]. Hierfür wird die Wirtszellmembran modifiziert, indem bestimmte Proteine (z.B. Proteine mit Glykosylphosphatidylinostol-Anker) und Lipide (z.B. Ganglioside und Cholesterol) inkorporiert [38-40], und andere (z.B. Zelladhäsionmoleküle, CD44 und Caveolin) gezielt ausgeschlossen werden [38]. Zudem ermöglichen Proteine der Dichten Granula, GRA17 und GRA23, den Ionenaustausch und die Nährstoffaufnahme über die PVM [41, 42]. Zusätzlich kann *T. gondii* Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum und das Mikrotubuli-organisierende Zentrum der Wirtszelle rekrutieren, was die Nährstoffaufnahme erleichtert und dem Metabolismus des Parasiten dient [43, 44].

1.1.4 Immunantwort auf *T. gondii* Infektion

Für Personen mit intaktem Immunsystem verläuft eine Infektion mit *T. gondii* in der Regel harmlos, da das Pathogen schnell detektiert und die Replikation durch die Immunantwort unterdrückt wird [45]. Da für diese Arbeit murine Zellen verwendet wurden, wird im Folgenden die Immunantwort auf eine *T. gondii* Infektion in Mäusen beschrieben.

Zu Beginn der Immunreaktion steht die Erkennung des Pathogens. In Mäusen gibt es hierfür 13 TLR- (engl.: *toll-like receptor*) Familienmitglieder, die verschiedene pathogen-assoziierte Komponenten (PAMPs, engl.: *pathogen-associated molecular patterns*) erkennen und daraufhin die Produktion diverser Chemokine und Zytokine induzieren [46]. Im Falle einer *T. gondii* Infektion erfolgt die Detektion hauptsächlich über die Erkennung des Proteins Profilin durch TLR11 und TLR12-Rezeptoren dendritischer Zellen (DCs) [47, 48]. Zusätzlich werden Glykosylphosphatidylinostol-Ankerproteine der PVM über TLR2 und TLR4 von Monozyten und Makrophagen detektiert [49]. Durch Interaktion dieser TLRs mit MYD88 (engl.: *Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88*), einem Adaptorprotein, werden weitere Signalkaskaden aktiviert. So aktiviert MYD88 beispielsweise den Transkriptionsfaktor NF-κB (engl.: *nuclear factor κB*), der seinerseits im Nukleus die Transkription von Zytokinen wie Interleukin-12 (IL-12) induziert [50]. IL-12 wird hauptsächlich von dendritischen Zellen (DCs) ausgeschüttet [51], aber auch Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten sind an der

IL-12-Produktion beteiligt [52-54]. Diese früh nach der Infektion auftretende IL-12-Produktion ist für die Kontrolle der *T. gondii* Infektion essentiell [55, 56].

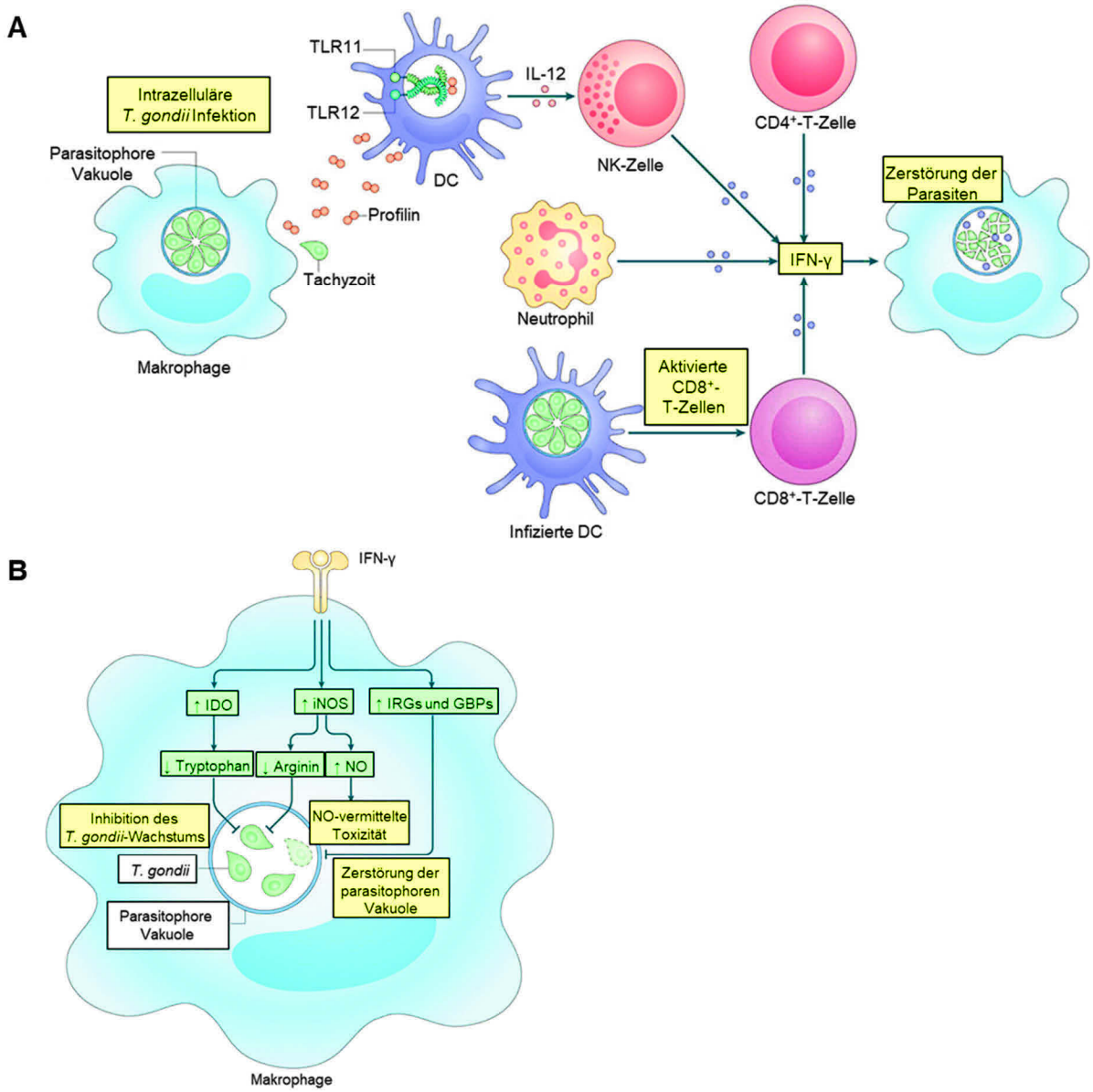


Abbildung 3: Immunantwort auf eine *T. gondii* Infektion; A: nach einer *T. gondii* Infektion wird Profilin von TLR11 und -12 auf DCs detektiert, was zu einer Ausschüttung von IL-12 führt; dies stimuliert diverse Zellen des Immunsystems zur IFN-γ-Produktion; B: die Detektion von IFN-γ durch IFN-**γ**-Rezeptoren (IFN-**γ**-R) der Makrophagen führt intrazellulär zur Hochregulierung einiger Proteine (IDO, iNOS, IRGs und GBPs), die zur Bekämpfung der eingedrungenen Parasiten beitragen; modifiziert nach Yarovinsky et al., 2014 [57]

Die Ausschüttung von IL-12 regt u.a. die Proliferation von Natürlichen Killerzellen (NK)-Zellen, $CD8^+$-T-Zellen und $CD4^+$-T-Zellen an [56]. Die aktivierten $CD4^+$-T-Zellen aktivieren ihrerseits B-Zellen, die daraufhin zu Plasmazellen differenzieren. Diese sezernieren Antikörper, die die Parasiten beladen, welche daraufhin, z.B. durch Makrophagen, phagozytiert werden [58]. Zusätzlich sorgt die Ausschüttung von IL-12 auch für die Synthese von Interferon-γ (IFN-γ) (Abbildung 3A). Diese erhöhte IFN-γ-Produktion ist ähnlich wie die IL-12-Produktion für die Kontrolle der *T. gondii* Infektion essentiell [59, 60].

Die IFN-γ-vermittelte Pathogenabwehr setzt sich aus mehreren Bestandteilen zusammen (Abbildung 3B). So wird die Synthese des Enzyms iNOS (engl.: *nitric oxide synthase*) induziert, welches durch NO-Produktion die Replikation des Parasiten hemmt. Das entstandene NO kann in die *T. gondii* PV diffundieren und dort die metabolischen Enzyme des Parasiten hemmen [57, 61]. Zusätzlich werden durch die IFN-γ induzierte Aktivierung der Wirtszellen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet, deren Rolle bei der *T. gondii* Abwehr jedoch umstritten ist und stark von Wirt- und Zelltyp abhängig zu sein scheint [57, 62].

Ein weiterer, bedeutender Bestandteil der IFN-γ-vermittelten Pathogenabwehr ist die Hochregulierung zweier Guanosintriphosphat-Hydrolase (GTPase)-Familien, die an der Disruption der PV beteiligt sind. Diese Familien sind die IRGs (engl.: *immunity related GTPases*) und die Guanylat-bindenden Proteine (GBPs).

Der Mechanismus der Rekrutierung dieser GTPasen zur PV wird weiterhin erforscht, es scheint jedoch eine gewisse Abhängigkeit der beiden Familien voneinander zu geben. So wurde z.B. gezeigt, dass mGBP2 in der Abwesenheit einiger IRGs nicht an der PV akkumuliert [62]. Andersherum führt die Deletion von mGBPs auf Chromosom 3 ($mGBP^{Chr3-/-}$) zu einer verringerten Rekrutierung von IRGs [63]. Als Schutz vor diesen GTPasen exprimiert *T. gondii* u.a. ROP17 und ROP18, die IRGs durch Phosphorylierung von der PV lösen können [64, 65]. Dies unterstreicht den Selektionsdruck, der durch diese Gruppe von Proteinen auf *T. gondii* ausgeübt wird.

Zusätzlich zu dieser IFN-γ-induzierten Immunität spielt auch die Autophagie bei der Immunabwehr gegen *T. gondii* eine Rolle [66]. Während des Autophagie-Prozesses bildet sich eine Ubiquitin-ähnliche Maschinerie aus mehreren Autophagie-Proteinen (ATGs), die die Rekrutierung von ATG8-Proteinen wie LC3 (engl.: *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) zur so genannten Isolationsmembran initiieren [67]. Das Membran-gebundene LC3 bindet seinerseits an die Adaptorproteine NDP52

(engl.: *nuclear dot protein 52 kDa*) und p62/SQSTM1 (engl.: *Sequestosome 1*), die ihrerseits ubiquitinierte Proteine des Pathogens binden [68, 69]. Auf diese Weise wird das Pathogen von der Isolationsmembran umhüllt, wodurch sich ein Autophagosom bildet. Nach Fusion mit Lysosomen beginnt der hydrolytische Abbau des umschlossenen Pathogens. So konnte nach der Ruptur der *T. gondii* PVM eine Akkumulation von LC3-positiven Membranen um den Parasiten herum beobachtet werden [66]. Zusätzlich sind ATGs an der Rekrutierung der zuvor beschriebenen GTPasen, den IRGs und mGBPs, zur PVM involviert. So ist ATG5 für die Rekrutierung von Irga6 und Irgb6 [70, 71] und ATG3 für die Rekrutierung mGBP2 und anderen IRGs zur *T. gondii* PV verantwortlich [72, 73].

1.2 mGBP7

Im Zuge der zytosolischen Immunantwort wird durch Interferon die Expression von mehr als 2000 Interferon-stimulierten Genen (ISGs) induziert [74]. Die bereits erwähnten GBPs gehören zu den mit am stärksten exprimierten ISGs [75-77]. Sie gehören zur Dynamin-Superfamilie [78]. Deren Mitglieder nutzen die Energie der GTP-Hydrolyse, um diverse strukturelle Änderungen auszuführen, die notwendig zur Umformung von Zellmembranen sind oder Fusionsereignisse initiieren [79, 80]. Darüber hinaus besitzen GBPs die Fähigkeit zur Nukleotid-abhängigen Selbstassemblierung, um größere Oligomere zu bilden, wie viele weitere Dynamin-ähnliche Proteine [81]. Sie können sowohl Homo- als auch Heterooligomere bilden und sind zytosolisch in sogenannten VLS (engl.: *vesicle-like structures*) lokalisiert [82, 83].

GBPs erschienen früh in der Evolution der Eukaryoten, Orthologe sind selbst in Protisten, Amöben, Algen und Pflanzen zu finden [84, 85]. Unter Vertebraten weisen GBPs einen hohen Grad an Konservierung auf, so besitzen z.B. die humanen GBPs (hGBPs) und die murinen GBPs (mGBPs) eine Aminosäuren-Sequenzidentität von 40 - 98% [86]. Allerdings unterscheiden sich hGBPs und mGBPs deutlich in ihrer Anzahl. Während in Menschen 7 GBPs exprimiert werden, sind in Mäusen 11 GBPs zu finden [87]. Auch bezüglich der Lokalisation der Genloci gibt es Unterschiede zwischen den Spezies. So sind beim Menschen alle 7 GBP-codierenden Sequenzen in einem einzigen Cluster auf Chromosom 1 lokalisiert, während in der Maus zwei Cluster vorhanden sind, eines auf Chromosom 3 (mGBP1, mGBP2, mGBP3, mGBP5 und mGBP7) und eines auf Chromosom 5 (mGBP4, mGBP6, mGBP8, mGBP9, mGBP10 und mGBP11) [87].

Die Konservierung der GBPs unter den Vertebraten deutet auf eine entscheidende Funktion der mGBPs im Zuge der zytosolischen Immunantwort hin. Tatsächlich konnte die bedeutende Rolle von mGBPs in der Immunabwehr gegen verschiedene intrazelluläre Pathogene wie z.B. *T. gondii*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Francisella novicida (F. novicida)* und *Legionella pneumophila* gezeigt werden [74]. Im Zuge einer *T. gondii* Infektion scheint vor allem mGBP7 eine Schlüsselfunktion auszuüben [88].

1.2.1 Struktur und biochemische Eigenschaften

Die Mitglieder der GBP-Familie weisen einen hohen Grad an Homologie auf und lassen sich strukturell in zwei Bereiche unterteilen: die N-terminale, globuläre GTPase (G)-Domäne und den C-terminalen, helikalen Bereich. Dieser besteht aus einer stabilisierenden Mittleren (M)-Domäne und einer Effektor (E)-Domäne (Abbildung 4A) [89].

Die G-Domäne enthält die GTP-Bindestelle, die vier konservierte Sequenzelemente beinhaltet: das kanonischen G1 Motiv oder den P-Loop (engl.: *phosphate-binding loop*) GXXXXGK(S/T), das Switch 1/ G2 (T)-Motiv, die Phosphat- und Magnesium (Mg2+)-bindende Switch 2/ G3 DXXG-Sequenz und das Nukleotid-Spezifität generierende T(V/L)RD G4-Motiv (s. Abbildung 4) [87]. Interessanterweise weicht das T(V/L)RD G4-Motiv von dem klassischen N/TKXD Motiv anderer GTP-bindender Proteine ab [90, 91]. Die helikale M-Domäne gibt dem Protein seine längliche Form durch zwei Helixbündel, (α7–11), die sich von der G-Domäne fort erstrecken [92]. Die C-terminale E-Domäne besteht aus zwei α-Helices (α12/13), die sich entlang der M-Domäne zurück Richtung G-Domäne falten. Dies ermöglicht es der langen α12-Helix über acht Kontakte mit der M-Domäne und über vier Kontakte mit der G-Domäne zu interagieren [92].

GBPs besitzen aufgrund ihrer G-Domäne eine hohe intrinsische GTPase-Aktivität (k_{cat} = 2 – 100 min^{-1}) [75, 93, 94]. Besonders hohe Aktivitäten konnten für mGBP2 (k_{cat} = 102 min^{-1}) und hGBP1 (k_{cat} = 95 min^{-1}) ermittelt werden [95, 96]. mGBP7 hat im Vergleich zu diesen GBPs eine fünffach geringere Aktivität (k_{cat} = 20 min^{-1}), weist allerdings eine zweifach höhere Affinität zu GTP (K_D = 0.22 µM) auf als mGBP2 und eine fünffach höhere Affinität als hGBP1 [89, 91, 95-97]. Bezüglich der katalytischen Effizienz scheinen sich diese Enzyme demnach zu ähneln. Eine mögliche Erklärung für die

unterschiedlichen Affinitäten könnte in einer Variation im Nukleotid-Spezifität generierenden T(V/L)RD G4-Motiv liegen. Während mGBP7 hier ein TVRD-Motiv besitzt, finden sich bei mGBP2 und hGBP1 TLRD-Motive [87, 91].

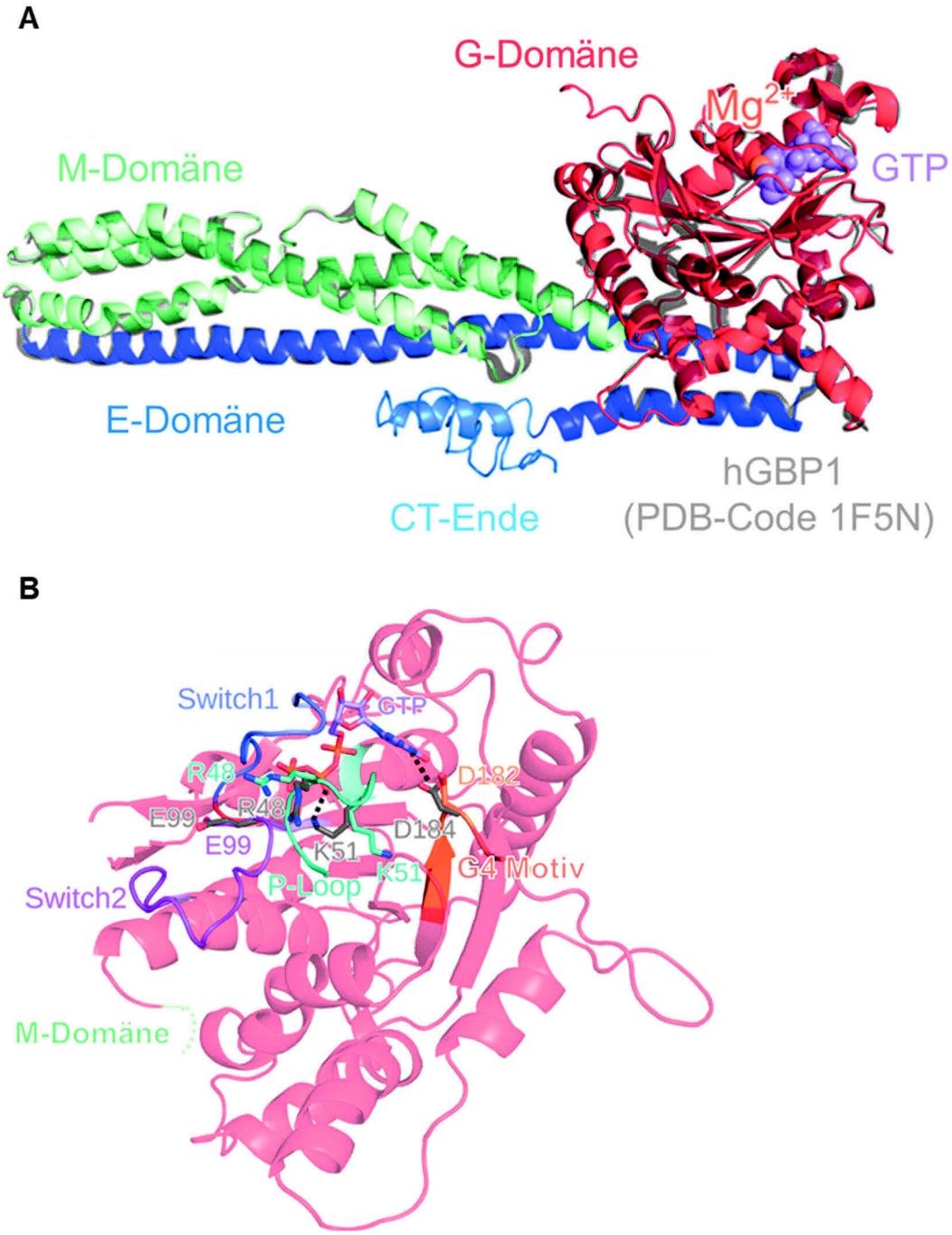


Abbildung 4: Homologie-Modell für mGBP7; A: Kartoon-Darstellung des Homologie-Modells für mGBP7, erstellt mittels I-TASSER [98] (C-Wert -0,18), unterlegt mit der Kristallstruktur von hGBP1 (PDB-Code 1F5N) in grau; B: Kartoon-Darstellung der G-Domäne von mGBP7, die vier GTP-bindenden Loops (Kartoon-Darstellung) mit ihren essentiellen AS-Resten (Stick-Darstellung) sind in den jeweiligen Farben hervorgehoben; modifiziert nach Legewie et al., 2019 [89]

Für einige GBPs konnte gezeigt werden, dass diese nach GTP-Bindung durch den Kontakt der G-Domänen Dimere bilden, wodurch deren enzymatische Aktivität erhöht wird [96, 99, 100]. Diese Dimerisierung induziert die Verschiebung eines konservierten Arginin-Restes aus dem P-Loop in Richtung des γ-Phosphats und erleichtert dessen Abspaltung durch Stabilisierung des Übergangszustandes der GTP-Hydrolyse [101]. Eine Studie konnte zudem für hGBP1 mittels quantenmechanischen/ molekularmechanischen Methoden zeigen, dass S73 aus Switch 1 essentiell für die Hydrolyse ist [102]. Dieses wird erst durch die Dimerisierung in das aktive Zentrum des Enzyms eingeführt, wodurch die Bedeutung der GBP-Dimerisierung für die GTP-Hydrolyse bekräftigt wird [102].

Eine charakteristische Eigenschaft der GBPs ist deren Fähigkeit GTP nicht nur zu GDP, sondern dieses in einem konsekutiven Schritt auch zu GMP hydrolysieren zu können [95]. Dies wird durch eine Änderung in der Nukleotidkonformation an der Ribose ermöglicht, die die Interaktion mit dem Guanin aufrecht erhält und das β-Phosphat in die Position des γ-Phosphats bewegt [92, 93]. Es wurde beobachtet, dass diese Fähigkeit in den diversen GBPs unterschiedlich stark ausgeprägt ist. So reichen die Produktverhältnisse von 0 % GMP (hGBP5 und mGBP5) bis zu 85 – 90 % GMP (hGBP1) für die verschiedenen GBPs und die jeweiligen experimentellen Konditionen [78, 85, 96, 103, 104], für mGBP7 wurden ≥50 % GMP ermittelt [89]. Eine Studie konnte kürzlich für hGBP1 zeigen, dass die GMP-Produktion für die NLRP3 (engl.: *NOD-, LRR- and pyrin-domain containing protein 3*)-Inflammasom-Aktivierung essentiell ist und somit zur Immunabwehr beiträgt [105].

Trotz der hohen Homologie der GBPs gibt es auch Unterschiede in der Proteinstruktur zwischen den einzelnen Mitgliedern der Familie. So weisen nur drei der 11 mGBPs, mGBP1, mGBP2 und mGBP5, ein C-terminales CaaX-Motiv auf, welches nach posttranslationaler Isoprenylierung für die Membraninteraktion dieser Proteine verantwortlich ist [95, 100, 106, 107]. In mGBP7 übernimmt das elongierte, 49 Aminosäuren (AS)-lange C-terminale Ende des Proteins diese Funktion als Membrananker [89]. Zusätzlich konnte für mGBP2 und mGBP7 gezeigt werden, dass deren Lokalisation in VLS abhängig von der Isoprenylierung des Caax-Motivs (mGBP2) bzw. von dem Vorhandensein der 49 C-terminalen AS (mGBP7) war [89, 95]. Weitere Studien konnten demonstrieren, dass Mutationen im CaaX-Motiv sowie Deletionen des C-Terminus nicht nur die Assemblierung von GBPs von Membranen verhindern, sondern zusätzlich

auch die zellautonome Immunität, insbesondere die Inflammasom-Aktivierung, beeinträchtigen [85, 95, 108-110]. Der C-Terminus der GBPs scheint demnach für die Membranbindung der Proteine und für ihre Funktion in der Pathogenabwehr essentiell zu sein.
Im Zuge einer *T. gondii*-Infektion konnte beobachtet werden, dass GBPs an der PVM sehr große Komplexe von bis zu 8000 monomeren Einheiten bilden [82].
Dies legt die Vermutung nahe, dass GBPs in der Immunabwehr als Mechanoenyzme agieren könnten, um durch die Ruptur von Membranen die Eliminierung von Pathogenen zu erleichtern [82, 111, 112].

1.2.2 Funktion in der Pathogenabwehr

GBPs gehören zu den am stärksten exprimierten ISGs und weisen eine hohe Plastizität in ihrer Reaktion auf physiologische Stimuli auf [84]. Die induzierte Expression von hGBP1 und hGBP5 kann beispielsweise um drei Größenordnungen erhöht werden und 24 h nach IFN-γ-Stimulation bis zu 300 000 Moleküle pro Tag erreichen [75, 113]. In Abwesenheit von aktivierenden Immunsignalen werden GBPs auf einem geringen Level in Immunzellen und sowie in Gewebszellen der Lunge, Leber, Niere, des Verdauungstraktes, des Gehirns und der Haut exprimiert [114].
Die Expression von GBPs wird primär durch IFN-γ stimuliert, aber auch IFN-α/β, IL-1α/β, TNF und TLR-Aktivierung können die Expression von einigen GBPs hochregulieren [115]. Diese Variationen in der Induktion der Expression von GBPs beruhen auf Unterschieden in ihren Promotorelementen. In den Promotorregionen der jeweiligen *GBP*-Gene befinden sich einige GAS (engl.: *IFN γ-activated sequence*)- und ISRE (engl.: *IFN-stimulated response element*)-Motive sowie in seltenen Fällen auch NF-κB-Bindestellen. Diese verschiedenen Elemente wechselwirken mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren bzw. Transkriptionsfaktorkomplexen aus STAT und IRF (engl.: *IFN-regulatory factor*)-Molekülen, wodurch die Transkription der *GBP*-Gene initiiert wird [84, 86, 116]. mGBP7 wird beispielsweise durch Typ-I und Typ-II IFN hochreguliert, was auf GAS- sowie ISRE-Motive im Promotorbereich schließen lässt [117].
GBPs spielen in der Immunantwort auf Infektionen durch diverse Erreger (Bakterien, Viren und Parasiten) eine zentrale Rolle.
Ein Beispiel für eine antibakterielle Funktion der mGBPs ist die *F. novicida*-Infektion. Hier konnte für mGBP^{Chr3} KO Zellen gezeigt werden, dass diese nicht nur an der Ruptur der PV beteiligt sind, sondern nach deren Lyse an dem zytosolischen Pathogen

selbst lokalisieren [112]. Darüber hinaus konnte eine *in vitro*-Studie für *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) demonstrieren, dass eine Vielzahl von mGBPs (mGBP1, -2, -3, -6, -7, -9 und -10) zu der Chlamydien-Inklusion rekrutieren [118]. Die Inklusion stellt ein vakuolenartiges Kompartiment innerhalb der Wirtszelle dar, in dem sich Chlamydien vermehren, ähnlich zur *T. gondii* PV. Diese Rekrutierung ist, wie für die *T. gondii*-Infektion beschrieben, auch hier von den Autophagie-Proteinen ATG5 und ATG3 abhängig [73].

Auch in der Immunatwort auf virale Infektion sind GBPs relevant. So konnte beispielsweise für hGBP1 und mGBPs gezeigt werden, dass sie die Replikation des VSV (engl.: *vesicular stomatitis virus*) und des EMCV (engl.: *Encephalomyocarditisvirus*) inhibieren [119, 120]. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass mGBP1 und mGBP2 an der Kontrolle der Infektion mit murinem Norovirus (MNV) beteiligt sind [121]. Hierbei rekrutiert das ATG8-Protein LC3 mGBP1 und mGBP2 nach Bindung an den Replikationskomplex und inhibiert auf diese Weise die MNV-Replikation.

Die antiparasitären Funktionen von mGBPs wurden vor allem anhand der Immunabwehr gegen *T. gondii* erforscht. Für die meisten mGBPs (mGBP1, -2, -3, -6, -7, -9 und -10) konnte gezeigt werden, dass diese im Zuge einer Infektion zur *T. gondii* PV rekrutiert werden, auch wenn der genaue Mechanismus dieser Rekrutierung noch nicht entschlüsselt wurde [82, 115]. Ebenso ist der Mechanismus der folgenden Ruptur der PV noch zu erforschen, wobei die Zerstörung der Membran durch die Funktion der mGBPs als Mechanoenzyme eine mögliche Hypothese darstellt [84]. Nach der Ruptur sind mGBP2 und mGBP7 zusätzlich in der Lage, in das PV-Lumen des Parasiten zu gelangen und direkt an der Membran des Parasiten zu akkumulieren, auch wenn die Rekrutierung von mGBP7 in einer deutlich langsameren Kinetik als die mGBP2-Rekrutierung erfolgt (Abbildung 5A) [82, 88]. Hierbei scheinen die einzelnen mGBPs nicht allein zu agieren. So wurde gezeigt, dass mGBP2 mit mGBP1 und in einem geringeren Ausmaß auch mit mGBP3 interagiert (Abbildung 5B) [82]. Darüber hinaus konnte für mGBP7 und mGBP3 eine nahezu vollständige Kolokalisation und gemeinsame Rekrutierung zur *T. gondii* PV, sowie für mGBP7 und mGBP6 eine partielle Kolokalisation gezeigt werden [88].

Die Rolle von mGBPs in der Immunantwort auf eine *T. gondii* Infektion wurde auch in in vivo-Experimenten erforscht. So wurden in einer Studie mGBP2$^{-/-}$-Mäuse und Wildtyp-Mäuse mit 40 Zysten von *T. gondii* ME49 infiziert, was in einer Mortalität von ≥70 % 60 Tage nach der Infektion für die mGBP2$^{-/-}$-Mäuse resultierte, während diese bei den

Wildtyp-Mäusen ≤30 % entsprach (Abbildung 6A) [122]. In einer ähnlichen Studie wurden mGBP7$^{-/-}$-Mäuse mit ebenfalls 40 Zysten von *T. gondii* ME49 infiziert [88]. Hier

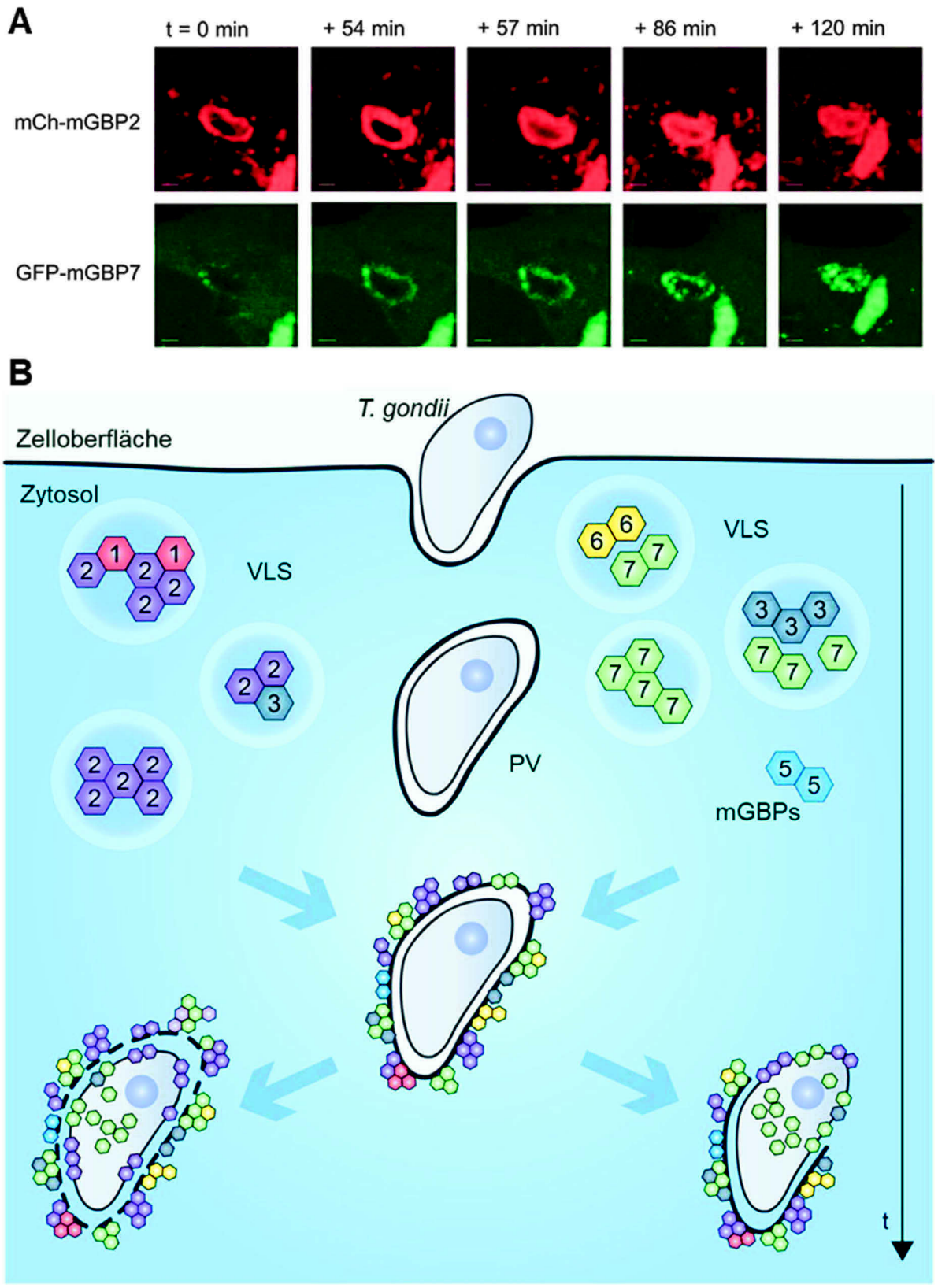


Abbildung 5: Dynamik der Rekrutierung von mGBPs zur *T. gondii* PV; A: Lebendzellmikroskopie-Aufnahmen von GFP-mGBP7- und mCh-mGBP2-exprimierenden MEFs, ü. N. stimuliert mit IFN-γ und infiziert mit *T. gondii*; Maßstabsbalken: 5 µm; B: Schematische Übersicht der mGBP-Lokalisation und Dynamik in mit *T. gondii* infizierten Zellen; modifiziert nach Steffens et al.,2020 [88]

wurde für diese Mäuse eine Mortalität von 100 % an Tag 10 beobachtet, vergleichbar mit der Mortalitätsrate der IFN-γ-R$^{-/-}$-Mäuse (Abbildung 6B).

Die weiterführende Analyse dieser mGBP7$^{-/-}$-Mäuse zeigte, dass die Tiere im Laufe der parasitären Infektion einen starken Aszites entwickeln und in ihren Organen (Milz, Leber und Lunge) eine signifikant erhöhte Parasitenlast vorhanden war als in den Organen der Wildtyp-Mäuse. Zudem wiesen die mGBP7$^{-/-}$-Mäuse eine erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine (IL12p70, IFN-γ, TNF) und reaktiver NO-Spezies als Reaktion auf die Infektion auf [88]. Diese *in vivo*-Studien wiesen auf eine essentielle Funktion von mGBP2 und mGBP7 in der Immunantwort auf eine *T. gondii*-Infektion hin, wobei insbesondere mGBP7 eine nicht-redundante Rolle in der Pathogenabwehr zu erfüllen scheint.

Da mGBP7 diese wichtige Funktion aller Wahrscheinlichkeit nach im Zusammenspiel mit anderen Proteinen ausübt, wurden in einer vorangegangenen Arbeit Interaktionspartner von mGBP7 im Zuge einer *T. gondii*-Infektion ermittelt [123]. Ko-Immunopräzipitations (Ko-IP)-Experimente mit folgender Massenspektrometrie ergaben mehrere potentielle Interaktionspartner (Abbildung 6C). Unter diesen ist TOM1 (engl.: *target of myb 1*), ein Adaptorprotein, aufgrund seiner Rolle im endosomalen Proteintransport von besonderem Interesse [124]. Western-Blot (WB)-Analysen ergaben, dass TOM1 nur mit mGBP7 und nicht mit mGBP2 interagiert und dass diese Interaktion ausschließlich im Kontext einer *T. gondii*-Infektion stattfindet (Abbildung 6D) [123]. Darüber hinaus konnte eine Kolokalisation von mGBP7 und TOM1 an der *T. gondii* PV gezeigt werden (Abbildung 6E).

Eine genauere Untersuchung der Interaktion zwischen mGBP7 und TOM1 sowie die Identifikation weiterer Interaktionspartner von TOM1 im Kontext einer *T. gondii*-Infektion könnte wichtige Hinweise auf den Mechanismus liefern, mit dem mGBP7 und ggf. weitere mGBPs zur PV rekrutiert werden.

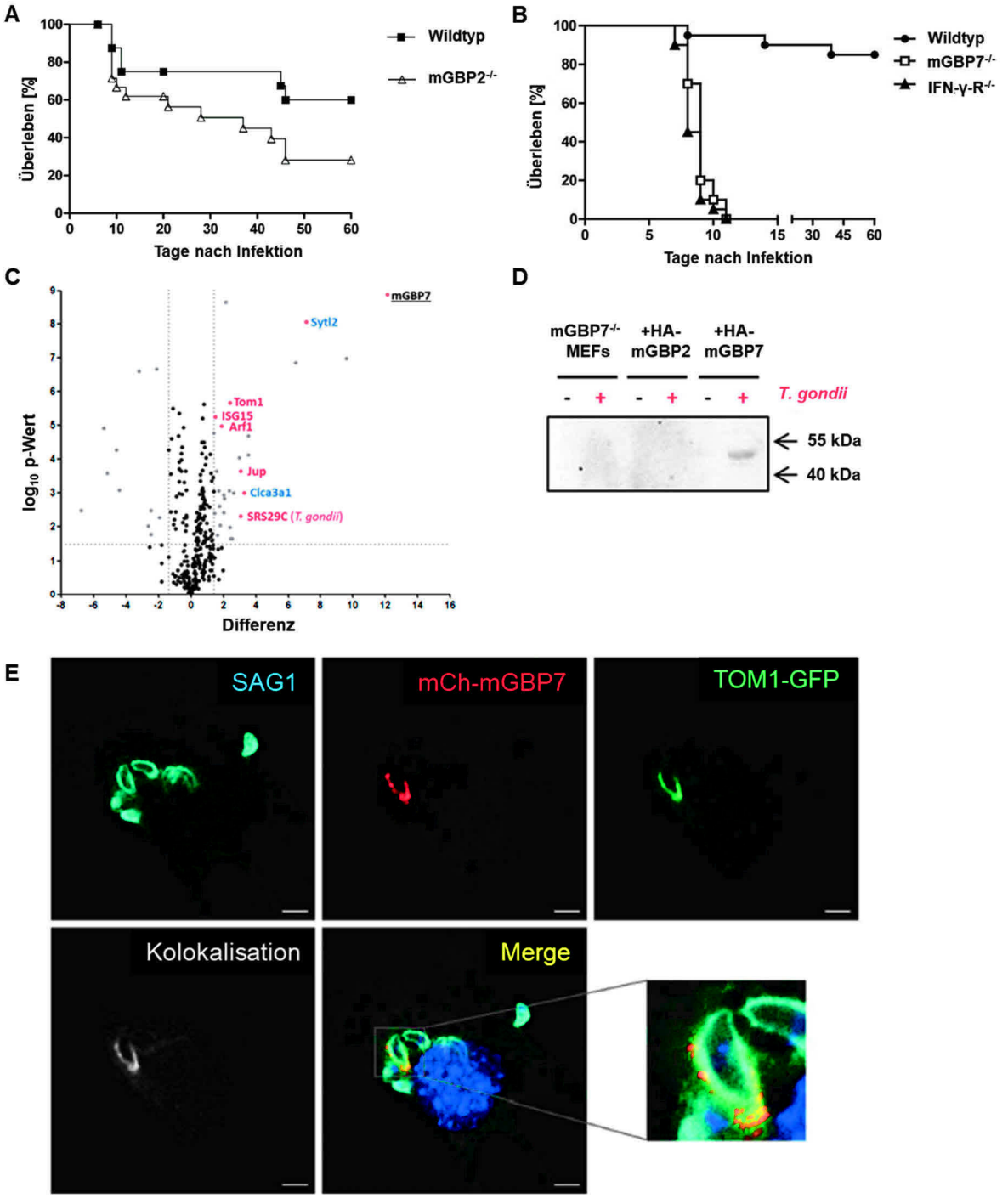


Abbildung 6: Einfluss von mGBP2 und mGBP7 während einer *T. gondii* Infektion und Interaktion von mGBP7 mit TOM1; A: Wildtyp (n=14) und mGBP2$^{-/-}$-Mäuse (n=19) wurden i. p. mit 40 Zysten von ME49 *T. gondii* infiziert und über 60 Tage überwacht; gezeigt ist die Überlebensrate in Prozent; modifiziert nach Degrandi et al., 2013 [122]; B: Wildtyp, IFN γ R$^{-/-}$- und mGBP7$^{-/-}$-Mäuse (n=20) wurden i. p. mit 40 Zysten von ME49 *T. gondii* infiziert und über 60 Tage überwacht; gezeigt ist die Überlebensrate in Prozent; modifiziert nach Steffens et al., 2020 [88]; C: Volcano Plots zu den quantitativen MS-Daten der anti-HA-mGBP7 Ko-IPs (+ IFN-γ, mGBP7$^{-/-}$ MEFs + HA-mGBP7) im Vergleich zu den Kontroll-Ko-IPs (+ IFN-γ, mGBP7$^{-/-}$ MEFs); x-Achse: Differenz der Abundanzänderung; y-Achse: die berechnete Signifikanz für diese Differenz; blau: mögliche Interaktionspartner in Abwesenheit einer Infektion; rot: mögliche Interaktionspartner im Kontext einer Infektion; D: Western-Blot nach Ko-IP (s. C) mit einem polyklonalen anti-TOM1 (Ag11706) Antikörper; theoretische Masse von TOM1: 54 kDa; E: Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von mCh-mGBP7 und TOM1-GFP exprimierenden mGBP7$^{-/-}$ MEFs; diese wurden 16 h vor der Infektion mit IFN-γ stimuliert und 2,5 h nach Infektion fixiert; *T. gondii* wurde durch AK-Färbung von SAG1 visualisiert (Sekundärantikörper: Alexa Fluor 633). Maßstabsbalken: 5 µm; modifiziert nach Legewie, 2020 [123]

1.3 TOM1

TOM1 wurde ursprünglich als Protein identifiziert, dessen Expression durch das v-Myb-Onkogen induziert wird [125]. Es ist in den meisten Gewebszellen vorhanden, mit einer verstärkten Expression in den Zellen der Skelettmuskulatur, des Herzens, der Plazenta und der Leber [126]. TOM1 ist hauptsächlich frei im Zytosol lokalisiert und interagiert als Adaptorprotein mit diversen Proteinen, wie z.B. Clathrin, Endofin und TOLLIP (engl.: *toll interacting protein*) [127, 128]. Darüber hinaus kann es mit ubiquitinierten Proteinen interagieren [128, 129]. Diese Fähigkeit ist relevant für seine Funktion als ESCRT-Protein (engl.: *endosomal sorting complex required for transport*). ESCRT-Proteinkomplexe sind essentiell für den lysosomalen Abbau von ubiquitinierten Transmembran-Rezeptoren (Cargo) [130].

Um Signale abzuschwächen, können Zellen Membranproteine an der Zelloberfläche ubiquitinieren und über Endozytose internalisieren. Daraufhin werden diese Proteine zur Proteolyse an das endolysosomale Membranssystem geliefert. Dort wird der Cargo anhand von dessen Ubiquitin-Einheiten von der ESCRT-Maschinerie erkannt. Diese ermöglicht starke Veränderungen der Form der Endosomenmembran, die zu Membraneinstülpung und -abspaltung führen, sodass Cargo-beinhaltende intralumenale Vesikel entstehen [131]. Auf diese Weise ist der Cargo räumlich eingeschlossen, was einen effizienten proteolytischen Prozess ermöglicht. TOM1 gehört zu den Proteinen, die an den frühesten Schritten der Sortierung des Cargos beteiligt sind [130].

Kürzliche Studien haben zudem weitere physiologische Funktionen von TOM1 aufgedeckt. So spielt TOM1 bei den Prozessen der Autophagie, der Immunantwort und Neuroinflammation eine Rolle, die Überschneidungen mit seiner Funktion in der Cargo-Sortierung aufweist [132-135]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass TOM1 während einer bakteriellen Infektion seine Funktion ändert und Phosphatidylinositol-abhängig zum Zellüberleben beiträgt [136, 137]. Dies zeigt, dass TOM1 mit einer großen Bandbreite an Interaktionspartnern an physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt ist.

1.3.1 Struktur und Proteininteraktion

TOM1 ist modular aufgebaut mit einer N-terminalen VHS (VPS27 (engl.: *vacuolar protein sorting*), Hrs (engl.: *hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*), und STAM (engl.: *signal transducing adaptor molecule*))-Domäne, einer mittleren GAT

(GGA (engl.: *Golgi-localized, γ-ear containing, ARF* (engl.: *ADP-ribosylation factor-binding protein*)-*binding*) und einer TOM1)- Domäne sowie einer langen, C-terminalen Domäne [129].

Die VHS-Domäne ist an der Cargoerkennung von TOM1 beteiligt. Sie besteht aus acht α-Helices, die eine rechtsdrehende Superhelix-Struktur bilden (Abbildung 7A) [138, 139]. Die Aminosäurereste der Helices α1-5 und α7 sind hochgradig konserviert unter den VHS-Domänen, was deren Relevanz für die Interaktionsfähigkeit mit Ubiquitin und anderen Proteinen unterstreicht [140]. So konnte gezeigt werden, dass die aliphatischen Reste der Helices α2 und α4 an das hydrophobe Patch von Ubiquitin binden [141]. Darüber hinaus wurde für einen positiv-geladenen Bereich eine Bindung an Phosphoinositide berichtet, mit einer leichten Präferenz zu Phosphatidylinositol 5-phosphate (PtdIns5P) [136]. Phosphatidylinositole sind Phospholipide und unterscheiden sich voneinander durch eine Phosphorylierung an den 3, 4, und/oder 5-OH-Positionen ihres Inositolrings [142]. Sie spielen u.a. eine Schlüsselrolle in der Regulation endosomaler und lysosomaler Funktion in Koordination mit Effektorproteinen [142, 143]. Interessanterweise enthält TOM1 eine weitere Phosphatidylinositol-Bindestelle. So wurde eine schwache Bindung von PtdIns3P an einen Bereich der GAT-Domäne, der an der Interaktion mit mit TOLLIP beteiligt ist, berichtet [144].

Die GAT-Domäne ist ein Bündel aus drei α-Helices, über die TOM1 mit TOLLIP interagiert (Abbildung 7B) [129]. Diese Interaktion erfolgt über einen gekoppelten Mechanismus aus Proteinfaltung und-bindung, in dem die ersten beiden α-Helices der GAT-Domäne TOLLIPs TOM1-bindende Domäne (TBD) an dessen N-Terminus falten, während α3 der GAT-Domäne mit der C2 (engl: *central PtdIns3P-binding conserved 2*)-Domäne von TOLLIP interagiert und so deren Bindung an Phosphatidylinositol 3-phosphat (PtdIns3P) inhibiert [144, 145]. Diese Inhibierung der PtdIns3P-Bindung an TOLLIP durch TOM1 ist möglicherweise essentiell für die Ubiquitin-bindende Funktion der C2-Domäne von TOLLIP in der Cargo-Erkennung [146]. Aufgrund der geringen Affinitäten der Ubiquitin-bindenden Domänen von TOM1 und TOLLIP für Ubiquitin ist es denkbar, dass die simultane Bindung von ubiquitiniertem Cargo eine verstärkte Ansammlung der Cargos für einen effizienteren Abbau ermöglicht [146-148]. Interessanterweise ist die α3 Helix der GAT-Domäne in der Abwesenheit von TOLLIP in der Lage Cargo mittels dessen Ubiquitin zu binden, sodass TOM1 auch zu TOLLIP-unabhängiger Cargoerkennung fähig ist, auch wenn diese in Komplexen mit anderen ESCRT-0-Proteinen wie Endofin und Hrs erfolgen kann [144, 149].

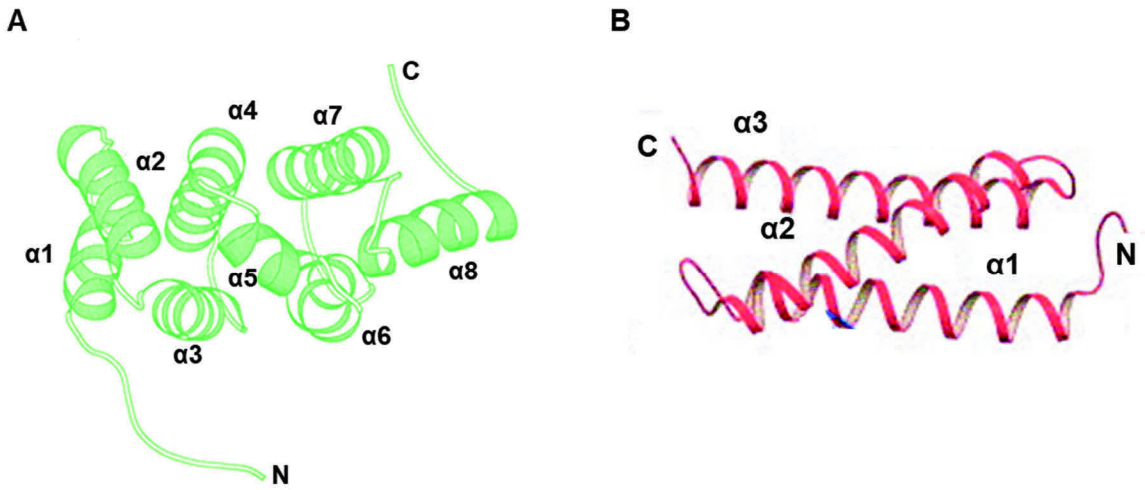


Abbildung 7: Struktur der VHS- und GAT-Domäne von TOM1; A: Kartoon-Darstellung der VHS-Domäne von TOM1; modifiziert nach Misra et al., 2000 [139]; Kartoon-Darstellung der GAT-Domäne von TOM1; modifiziert nach Akutsu et al., 2005 [150]

Die C-terminale Domäne von TOM1 (AS 300-492) interagiert mit der C-terminalen Region von Endofin [127, 151]. Endofin ist an frühen Endosomen lokalisiert, weil dessen FYVE (Fab1, YOTB, Vac1, EEA1)-Domäne mit PtdIns3P, das in die Endosomenmembran eingebettet ist, interagiert [152]. Durch die Bindung an Endofin wird TOLLIP an diese Kompartimente rekrutiert, wodurch auch Clathrin an die endosomalen Membranen lokalisiert [151]. Clathrin ist ein wichtiger Akteur im vesikulären Transport und interagiert mit diversen Proteinen über deren Clathrin-Box [153]. Bei TOM1 befindet sich dessen kanonische Clathrin-Box in der C-terminalen Domäne (AS 321-326) [128]. Darüber hinaus enthält die C-terminale Domäne ein Myosin VI-bindendes Motiv (MBM, AS 392-463), über das TOM1 mit der Cargo-bindenden Domäne von Myosin VI interagiert [132, 154]. Myosin VI transportiert als Motorprotein Cargo entlang der Aktin-Filamente und ist zusammen mit TOM1 für die Aktinfilament-abhängige, räumliche Organisation der Endosomen relevant [155, 156]. Durch seine diversen Interaktionspartner ist die Funktion von TOM1 als Adaptorprotein für diversen physiologischen und pathologischen Prozesse essentiell.

1.3.2 Physiologische Funktionen von TOM1

Entbehrlich gewordene Membranproteine werden mittels Ubiquitinierung modifiziert, internalisiert und zur Oberfläche der Endosomen transportiert. Dort werden sie entweder recycelt und zur Plasmamembran zurücktransportiert oder in späten Endosomen

bzw. Lysosomen abgebaut [130]. Die ESCRT-Maschinerie erkennt Cargo, das mit einem einzelnen Ubiquitin oder mit Polyubiquitin-Ketten konjugiert ist, und transportiert diese zu intraluminalen Vesikeln. Die ESCRT-Maschinerie besteht aus vier Kern-Komplexen (ESCRT-0, -I, -II und -III), sowie aus einigen unterstützenden Hilfs-Proteinen [157]. Jeder dieser ESCRT-Komplexe beinhaltet Proteine mit Ubiquitin-bindenden Domänen zur Cargoerkennung sowie Proteine mit PtdIns3P-bindenden Domänen als Membrananker. In Säugetieren besteht der kanonische ESCRT-0-Komplex aus Hrs und STAM1/2-Proteinen [158]. Sowohl Hrs als auch STAM1/2 binden Cargo über ihr doppelseitiges Ubiquitin-interagierendes Motiv (UIM) und ihre VHS-Domäne [141, 159, 160]. Zur Verankerung in der Membran interagiert die FYVE-Domäne von Hrs mit PtdIns3P [161]. Zusätzlich zu dem kanonischen ESCRT-Komplex wurden funktionell verwandte Proteine, wie TOM1, TOM1-L1, TOM1-L2, TOLLIP und Endofin, als alternative ESCRT-0-Cargotransporter vorgeschlagen [162-164]. Die Fähigkeit von TOM1 in Kooperation mit TOLLIP Cargo zu transportieren wurde in mehreren Fällen beschrieben, so z.B. für den Delta-Opiodrezeptor, den Interleukin-1-Rezeptor Typ-1 (IL-1R1) und für Cargo in Vesikeln mitochondrialen Ursprungs (s. Abbildung 8A) [133, 165, 166].

Im Zusammenspiel mit Myosin VI erfüllt TOM1 eine Funktion in dem Prozess der Autophagie. Bei diesem Prozess schließen aus Doppelmembranen bestehende Autophagosomen große Proteine, beschädigte Organellen oder Pathogene ein und bauen diese nach der Fusion mit Lysosomen ab. Um mit Lysosomen fusionieren zu können verschmelzen Autophagosome mit multivesikulären Körpern, die verschiedene Protein-Komplexe (z.B. ESCRT-Komplexe) enthalten, zu Amphisomen [167]. Myosin VI erkennt Autophagie-Rezeptoren und interagiert daraufhin mit TOM1 [132]. Über einen Mehrfachbindungsmechanismus wird so die Amphisombildung vermittelt [132, 154]. TOLLIP ist möglicherweise ebenfalls an diesem Prozess beteiligt, da es an Autophagosomen lokalisiert und die Aktivität der Lipidkinase VSP34, die die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen reguliert, kontrolliert [168, 169].

Darüber hinaus spielt TOM1 eine Rolle in der Regulation der Immunantwort. So wurde es bereits in einer frühen Studie als negativer Regulator der IL-1β- und TNF-α-Entzündungssignale vorgeschlagen [170]. Später wurde berichtet, dass TOM1 in Kooperation mit TOLLIP IL-1R1 zu späten Endosomen transportiert, sodass durch den Abbau des Rezeptors die Entzündungsreaktion rechtzeitig reduziert wird [133].

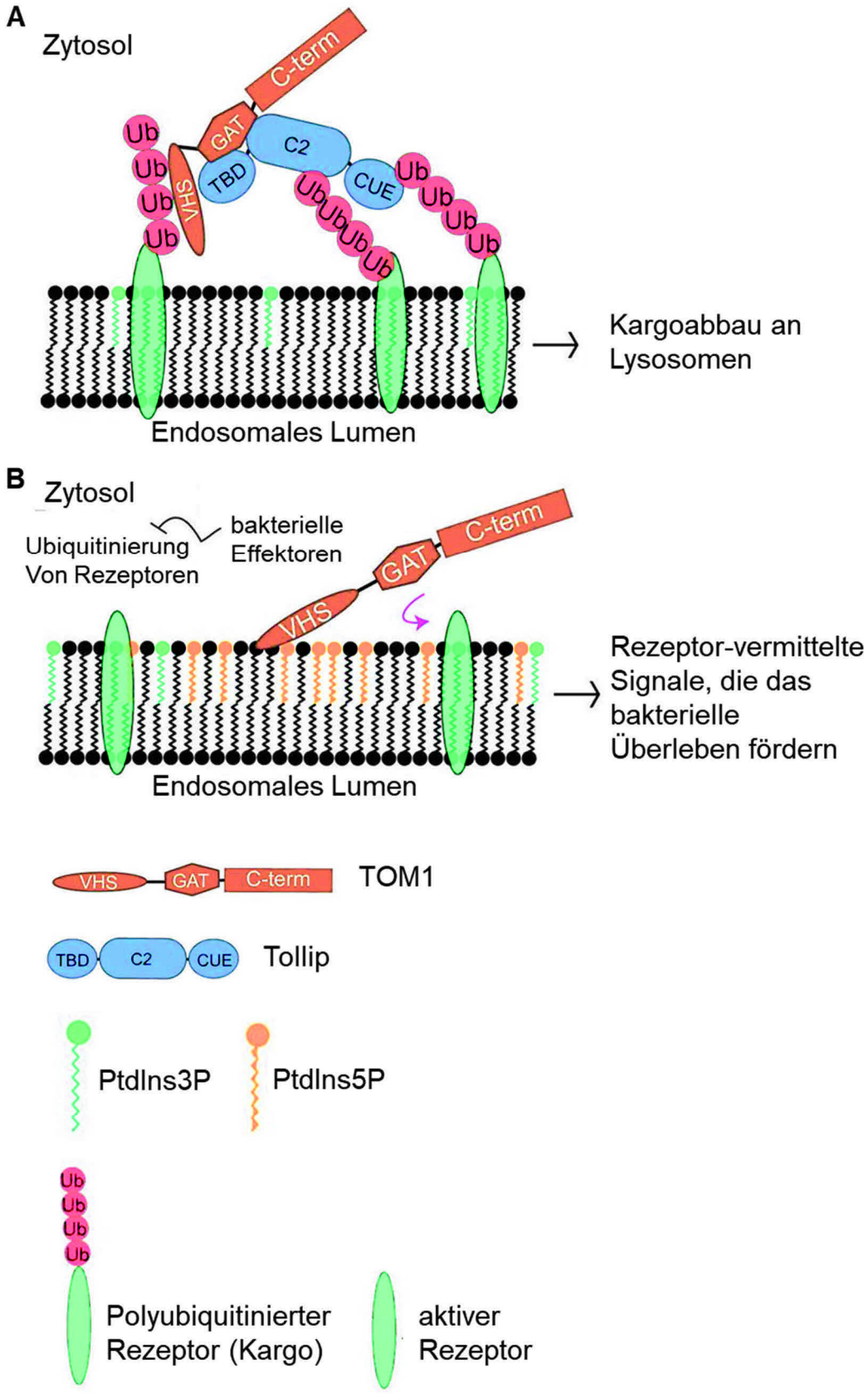


Abbildung 8: Funktion von TOM1; A: Cargo wird durch vesikulären Transport zu den frühen Endosomen gebracht; TOM1 wird über PtdIns3P-gebundenes TOLLIP zu diesen Kompartimenten rekrutiert; B: im Zuge einer bakteriellen Infektion akkumuliert PtdIns5P an Signalendosomen, was den TOM1-vermittelten Rezeptorabbau unterbindet und das bakterielle Überleben und die Profileration begünstigt; modifiziert nach Roach et al., [130]

TOM1 ist ebenfalls am TLR2/4-Signalweg während der Zystischen Fibrose beteiligt. Diese Erbkrankheit ist durch eine chronische Entzündung der Atemwege charakterisiert, weshalb vermutet wird, dass TOM1 analog zu IL-1R1 auch das Recycling von TLR2/4 moduliert und so eine antiinflammatorische Funktion erfüllt [171]. Auch im Zuge der Alzheimer-Krankheit scheint TOM1 eine positive Rolle zu spielen. Dieser neurodegenerative-Prozess ist durch die Akkumulation von β-Amyloid in sogenannten senilen Plaques gekennzeichnet [172]. Die Internalisierung dieses β-Amyloids, vermittelt durch den FcγRIIb2-Rezeptor, wird einer Studie zufolge negativ durch TOM1 reguliert [134].

Vor wenigen Jahren wurde zudem von der ersten krankheitsverursachenden TOM1-Mutation in Menschen berichtet [135]. Die von einer heterozygoten *TOM1* G307D Missense-Mutation betroffene Mutter litt unter wiederkehrenden Atemwegsinfekten und Oligoarthritis seit dem Teenageralter und entwickelte eine Antikörper-Defizienz. Ihr neugeborener Sohn, der die Mutation geerbt hatte, entwickelte u.a. Hypogammaglobulinämie und Autoimmunenteropathie und litt unter einer interstitiellen Lungenerkrankung. In den Zellen der Patienten wurde eine Beeinträchtigung der Autophagie und eine Neigung zur Apoptose festgestellt. Darüber hinaus waren mehrere Signalwege des Immunsystems beeinträchtigt [135]. Um die Auswirkungen dieser Mutation genauer zu ermitteln, wurden in einer folgenden Studie Unterschiede zwischen TOM1 G307D und dem WT auf zellulärer Ebene untersucht [173]. In dieser Studie konnte zwar keine signifikante Änderung in der Bindungsaffinität zu TOLLIP gefunden werden, aber die Fähigkeit von TOM1, durch die Bindung TOLLIPs Affinität zu PtdIns3P zu reduzieren, war in TOM1 G307D eingeschränkt. Dadurch bleiben im Fall der Mutante beide Proteine länger an endosomale Membranen gebunden und sind weniger effizient in ihrer Cargo-Transportfunktion. Darüber hinaus war die Interaktion zwischen TOM1 G307D und Myosin VI im Vergleich zum WT deutlich reduziert. Dies führte zu einer verringerten Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen, ein Prozess, an dem diese beiden Proteine beteiligt sind, und erklärt die beobachtete Beeinträchtigung der Autophagie in Patientenzellen [173]. Zusammengefasst unterstreicht diese Mutation die wichtige Funktion von TOM1 und seiner Interaktionspartner für die Aufrechterhaltung der Funktionen des Immunsystems.

Shigella flexneri, der Erreger der Ruhr, ist in der Lage nach Invasion der Wirtszelle das intrazelluläre PtdIns5P-Level zu erhöhen, um so sein Überleben zu sichern [137]. Die

erhöhten PtdIns5P-Level an frühen Endosomen verhindern den Abbau von Rezeptoren wie dem EGFR (engl.: *epidermal growth factor receptor*), der an Prozessen des Zellüberlebens und der Proliferation beteiligt ist, die auch für das Überleben und die Proliferation der eingedrungenen Bakterien vorteilhaft sind [136, 137, 174, 175]. Die erhöhten PtdIns5P-Level sorgen dafür, dass TOM1 mit seiner VHS-Domäne statt an ubiquitinierten Cargo an PtdIns5P in Signalendosomen bindet, was dessen Cargo-Sortierungsfunktion einschränkt (Abbildung 8B) [136]. Erhöhte PtdIns5P-Level können auch in vielen anderen Pathogeninfektionen beobachtet werden, was auf einen gemeinsamen Mechanismus der Pathogene zum Überleben in den Wirtszellen hindeutet [176]. So ist auch von einigen TOM1-Interaktionspartnern bekannt, dass diese das Ziel von Pathogenen sind, wie z.B. TOLLIP, das von *Escherichia. coli* (*E. coli*) übernommen wird, um dessen CNF1 (engl.: *cytotoxic necrotizing factor 1*)-Toxin-vermittelte Wirtszellinvasion zu erleichtern [177]. Auf ähnliche Weise bemächtigt sich *Leishmania donovani* TOLLIP, um die IL-1R-vermittelte Immunantwort zu blockieren [178].
Dies betont die entscheidende Funktion, die TOM1 in den Prozessen der Autophagie, der Immunantwort und der Neuroinflammation in Kooperation mit seinen Interaktionspartnern ausübt.
Auch die Interaktion von mGBP7 und TOM1 war bereits untersucht worden. So hatte Dr. Wibke Schumann aus der AG Strodel *in silico* die Bindung von TOM1 an mGBP7 analysiert (Abbildung 9) [179]. Hierbei waren die Interaktionsenergien einzelner Aminosäuren bei 7.8 Å ermittelt worden (Abbildung 9B). Auffällig hohe Werte (>60 kJ/mol) wurden dabei für vier AS der G-Domäne (V184, E186, K188 und L202) und eine AS der E-Domäne (C568) berechnet. Zusätzlich konnte in simulierten Bindungsexperimenten keine Bindung von TOM1 an mGBP7 in Abwesenheit der G-Domäne beobachtet werden.

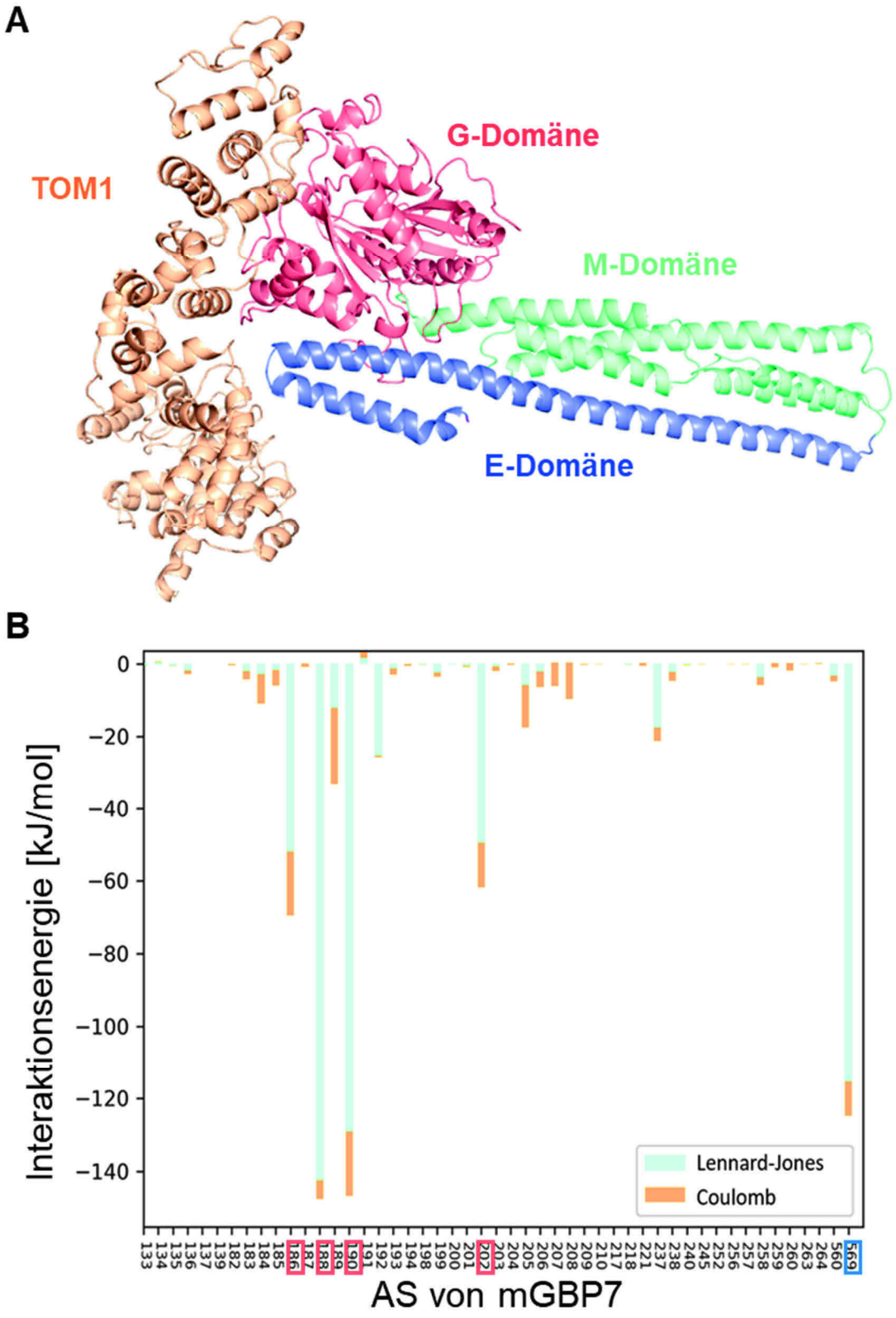


Abbildung 9: Interaktion zwischen mGBP7 und TOM1; A: Molekular-dynamische Simulation der Bindung von mGBP7 an TOM1, B: Interaktionsenergien zwischen einzelnen AS von mGBP7 mit TOM1; in rot markiert sind AS der G-Domäne mit hohen Interaktionsenergien, in blau die ist AS der E-Domäne mit hoher Interaktionsenergie umrandet; modifiziert nach Schumann et al., 2023 [179].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

T. gondii ist ein obligat intrazellulärer Parasit aus der Stamm der Apicomplexa, der die Infektionskrankheit Toxoplasmose auslöst [1]. Bei der Wirtszellinvasion bildet *T. gondii* aus der Wirtszellmembran eine PV, in der er vor den meisten Abwehrmechanismen der Zelle geschützt ist [37]. An dieser PV akkumulieren mGBPs in großen multimeren Komplexen, woraufhin die PVM zerstört und der Parasit schließlich eliminiert wird [82, 88, 122]. Hierbei scheint insbesondere mGBP7 einer *in vivo*-Studie nach eine bedeutende, nicht-redundante Funktion auszuüben [88]. In einer vorangegangenen Arbeit wurden Interaktionspartner von mGBP7 im Zuge einer *T. gondii*-Infektion ermittelt [123]. Unter diesen ist das Adapterprotein TOM1 aufgrund seiner Rolle im endosomalen Proteintransport von besonderem Interesse [124]. Die molekularen Mechanismen hinter der Rekrutierung von mGBPs zur *T. gondii* PV sowie hinter der folgenden Ruptur der PVM wurden bisher nicht vollständig entschlüsselt.

Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, die Interaktion zwischen mGBP7 und TOM1 genauer zu untersuchen sowie weitere Interaktionspartner von TOM1 im Kontext einer *T. gondii*-Infektion zu identifizieren, um so Hinweise auf die Maschinerie zu erhalten, durch die mGBP7 und ggf. weitere mGBPs zur PV rekrutiert werden. Für die Analyse der Interaktion der beiden Proteine sollte zunächst die Domäne von mGBP7 ermittelt werden, die für die Interaktion mit TOM1 verantwortlich ist. Dies sollte über Pull-Down-Experimente folgender Western-Blot-Analyse erfolgen. Ein weiteres Ziel war es, die Kolokalisationsrate von TOM1 und mGBP7 an der *T. gondii* PV und die Dynamik der Rekrutierung dieser beiden Proteine zur PVM zu bestimmen. Hierfür galt es, Fibroblasten, die Fluoreszenz-getaggtes mGBP7 und TOM1 exprimieren, mit *T. gondii* zu infizieren und konfokalmikroskopisch zu untersuchen. Darüber hinaus sollten mit TOM1 interagierende Proteine in *T. gondii*-infizierten Zellen über Ko-Immunpräzipitations-Experimente bestimmt werden, um weitere Einblicke in die molekularen Funktionen von mGBPs an *T. gondii* PVs zu gewinnen.

2 Materialien

2.1 Allgemeines

2.1.1 Chemikalien

Name	Produkt #	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol (50 mM)	31350-010	Gibco™, Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Agarose	840004	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
BSA	A3294	Sigma-Aldrich® Solutions, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
DAPI	D1306	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
DMEM high glucose, pyruvate	41966-029	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
DMSO	D2650	Sigma-Aldrich® Solutions, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
dNTPs	R0181	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
DPBS, kein Kalzium, kein Magnesium	14190-144	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
DTT	D9779	Sigma-Aldrich® Solutions, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
EDTA	ED-500G	Sigma-Aldrich® Solutions, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure (Eisessig, 100 %)	1000632500	Sigma-Aldrich® Solutions, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70 %	20821.330	VWR, Radnor, Pennsylvania
Ethidiumbromid (1 %)	1116080030	Sigma-Aldrich® Solutions, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FBS Supreme	P30-3031	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Fluorobrite DMEM	A18967-01	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Fluoromount G	00-4958-02	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Glycerin (85 %)	1040941000	EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
HCl (25 %)	6331.4	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Hefeextrakt	2363.1	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
HEPES	25245	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Germany
IFN-γ	485-MI	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota
Incidin™ Rapid	0297	Ecolab, Saint Paul, Minnesota
Isopropanol	I9516	Sigma-Aldrich® Solutions, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
KCl	P3911	Sigma-Aldrich® Solutions, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Magermilchpulver	232100	VWR, Radnor, Pennsylvania
Methanol	20864.320	VWR, Radnor, Pennsylvania
$MgCl_2$	8147330500	Sigma-Aldrich® Solutions, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
NaCl	3957.1	Carl Roth, Karlsruhe, Germany

NP-40/Igepal®	CA-630	Sigma-Aldrich® Solutions, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Oligo(dt)$_{12-18}$ Primer	18418012	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
PFA (4 %) in PBS	SC281692	ChemCruz® Chemicals, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas
Saponin	558255	Calbiochem®, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts
TRIS	5429.3	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypan Blue Lösung (0.4 %)	T8154	Sigma-Aldrich® Solutions, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypsin / EDTA (0.05 %)	25300-054	Gibco™, Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Tween® 20	8.22184	Sigma-Aldrich® Solutions, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
UltraPure™ DNase/RNase-freies Destilliertes Wasser	10977035	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Ziegenserum (Normal)	X0907	Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, California

2.1.2 Kits, Fertigpuffer und andere Reagenzien

Name	**Produkt #**	**Bezugsquelle**
20x NuPAGE™ MES SDS Running buffer	NP0002	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
20x NuPAGE™ Transfer Buffer	NP00061	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Anti-HA Immunoprecipitation Kit	IP0010-1KT	Sigma-Aldrich® Solutions, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	04693159001	Roche, Basel, Swiss
GFP-Agarose	gta-20/100	ChromoTek, München, Germany
High Pure PCR Produkt Aufreinigungs Kit	11732668001	Roche, Basel, Swiss
In-Fusion HD Cloning Plus Kit	638920	Takarabio, Kusatsu, Japan
jetPRIME Reagenz	101000001	Polyplus, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich
Luciferase Assay System	E1500	Promega, Mannheim, Deutschland
NucleoBond Xtra Maxi Kit	740414.50	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin RNA Plus	740984.50	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
Orange DNA Loading Dye (6X)	R0631	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	26616	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Passive Lysis Buffer 5x	E1941	Promega, Mannheim, Deutschland
PhosSTOP™	04906837001	Roche, Basel, Swiss
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	23225	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	1610374S	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California
Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder	N0550S	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts

ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution (10x)	2504	Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
SDS-PAGE Protein Ladepuffer 5X	AR1112	Boster Biological Technology, Pleasanton, California
SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	34579	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
TOPO TA Cloning Kit for Subcloning	450641	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Name	**Produkt #**	**Bezugsquelle**
CryoTube™ Gefäße	377224	Nunc™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Costar® Stripette® Serologische Pipetten 5 ml 10 ml 25 ml 50 mL	 CLS4487 CLS4488 CLS4489 CLS4490	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Costar® TC-Treated Multiple Well Platten 6-Well, 12-Well 24-Well 48-Well 96-Well	 CLS3516 CLS3513 CLS3524 CLS3548 CLS3596	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Deckgläser	631-1578	VWR, Radnor, Pennsylvania
Falcon® TC-treated Zellkulturschale 60 mm 100 mm 150 mm	 353004 353003 353025	Corning®, Corning, New York
Falcon® Tube 15 ml 50 ml	62554502 62547254	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Falcon® Zellsieb 100 µm	352360	Corning®, Corning, New York
Filter Spitzen (SafeSeal SurPhob) 10 µl	VT0210	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Filter Spitzen TipOne®) 20 µl 200 µl	S1120-1810 S1120-8810	Starlab, Hamburg, Deutschland
Cytiva Amersham™ Protran™ Nitrocellulose-Membran	15259794	Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel	NP0335BOX	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Micro-Touch® Nitra-Tex™ Handschuhe S, M, L	 700112 700113 700114	Ansell, Richmond, Australien
Mikroskopie-Schälchen	6160-168	MoBiTec Molecular Biotechnology, Göttingen, Deutschland
Objektträger	11102	Engelbrecht, Edermünde, Germany
Parafilm	12613586	Bemis™ PM996, Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts

PCR 8er-SoftStrips	711030	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipette Spitzen (TipOne®) 10/20 µl 200 µl 1000 µl	 S1110-3700 S1111-1700 S1111-6700	Starlab, Hamburg, Germany
Reaktionsgefäß (SafeSeal) 1.5 ml	72.706	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Tischmüllbeutel	86.1197	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Whatman® Zellulose Chromatographie Papier	WHA3003917	Sigma-Aldrich® Solutions, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Zellkulturflasche 25 cm², 75 cm² 175 cm²	430639 430641U 431080	Corning®, Corning, New York
Zellschaber	541070	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

2.2 Nukleinsäuren

2.2.1 Plasmide

Bezeichnung	**Eigenschaften**	**Bezugsquelle, Publikation**
pLP/VSV-G	Lentivirale Transduktion (VSV-G), CMV-Promoter, Amp^R	Invitrogen, Karlsruhe
psPAX2	Lentivirale Transduktion (Gag, Pol, Env), CMV-Promoter, Amp^R	Didier, Trono, Addgene Plasmid #12260
pWPI-IRES-eGFP	Expressionsvektor, IRES-eGFP, EF1α-Promoter, Amp^R	
pWPI-IRES-eGFP HA-TOM1.492	Expressionsvektor, IRES-eGFP, EF1α-Promoter, Insert: HA-TOM1.492, Amp^R	Kloniert, diese Arbeit
pWPI-IRES-eGFP TOM1.492-HA.	Expressionsvektor, IRES-eGFP, EF1α-Promoter, Insert: TOM1.492-HA, Amp^R	Kloniert, diese Arbeit
pWPI-IRES-eGFP TOM1-HA.ΔVHS	Expressionsvektor, IRES-eGFP, EF1α-Promoter, Insert: TOM1.ΔVHS-HA, Amp^R	Kloniert, diese Arbeit
pWPXL-GFP-mGBP7 E-domain	Expressionsvektor, Insert: mGBP7 Trunkationsmutante E-Domäne, Amp^R	Labor AG Pfeffer, Nora Steffens (2019)
pWPXL-TOM1.492-mCherry	Expressionsvektor, Insert: TOM1.492, Amp^R	Genscript, Piscataway Township, New Jersey, US
pWPXL-mCherry-TOM1.492	Expressionsvektor, Insert: TOM1.492, Amp^R	Genscript, Piscataway Township, New Jersey, US

pWPXL-mCherry-mit-STOP	Expressionsvektor, Insert: mCherry, Amp^R	Labor AG Pfeffer, Elisabeth Kravets (2016)
Tom1_OMu21552C_pcDNA3.1(+)-N-HA	Insert: HA-TOM1.492, Amp^R	Genscript, Piscataway Township, New Jersey, US
Tom1_OMu21552C_pcDNA3.1(+)-C-HA	Insert: TOM1.492-HA, Amp^R	Genscript, Piscataway Township, New Jersey, US
TOM1.ΔVHS pcDNA3.1 (+) C-HA	Insert: TOM1.ΔVHS-HA, Amp^R	genOway, Lyon Saint Exupéry Aéroport, Frankreich

2.2.2 Primer

Bezeichnung	**Sequenz 5'-3'**	**Verwendung**
DED1-42	GGTAGTCATAAAAGCAGAAGCAAAGTGCT	Genotypisierung des gefloxten TOM1 Allels
DED1-43	ATGTGCATCCTCTTGGGCTAGTGAACA	Genotypisierung des gefloxten TOM1 Allels
DED1-47 (com.)	GAGCAGTGCTTCATCTGCTTCTCAGTATTCA	Genotypisierung des TOM1 Knock-Out Allels
DED1-48	TGCATCCTCTTGGGCTAGTGAACAGG	Genotypisierung des TOM1 Knock-Out Allels
DED1-52	GGGGCCAAGATGGCAATTAATGAGG	Genotypisierung des TOM1 Knock-Out Allels
pWPI GFP seq for	ATTGTATGGGATCTGATCTGG	Sequenzierung von GFP in pWPI-IRES-eGFP
pWPI GFP seq rev	TCGAGGTCGACGGTACG	Sequenzierung von GFP in pWPI-IRES-eGFP
Tom1-HA for	CTAGCCTCGAGGTTTCCGCTCGGATGACT	Amplifikation des Gens *tom1.ΔVHS-HA* aus pcDNA3.1 Vektor
Tom1-HA rev	TGCAGCCCGTAGTTTGGTTTATCAAGCGTAATCTGG	Amplifikation des *tom1*-Gens mit C-terminalem HA aus pcDNA3.1 Vektoren
Tom1 fwd (pcDNA3.1)	CTAGCCTCGAGGTTTCCGCTCGAGATGGAC	Amplifikation des *tom1.492* Gens mit C-terminalem HA aus pcDNA3.1 Vektoren
HA fwd (pcDNA3.1)	CTAGCCTCGAGGTTTCTTGCCACCATGTACC	Amplifikation des *tom1.492* Gens mit N-terminalem HA aus pcDNA3.1 Vektoren
Tom1 rev (pcDNA3.1)	TGCAGCCCGTAGTTTTTCGGATCCTCATAAGG	Amplifikation des *tom1.492* Gens mit N-terminalem HA aus pcDNA3.1 Vektoren
TOM1-HA seq rev	AATTCCTGCAGCCCGTAG	Sequenzierung von TOM1-Inserts mit C-terminalen Tags in pWPI-Vektoren
WPI forward	CAAGCCTCAGACAGTGGTTC	Sequenzierung von Inserts in pWPI-Vektoren
TOM1 mRNA seq for	GAGCTGGTGGCAGC	PCR nach cDNA-Synthese und Sequenzierung des TOM1-Transkripts

TOM1 mRNA seq rev	CAGGATGCC AGACCC	PCR nach cDNA-Synthese und Sequenzierung des TOM1-Transkripts
TOM1 516 fwd	AATCGACTGCTCAGCC	PCR nach cDNA-Synthese
TOM1 516 rev	ACCCGGGGAGAAGTT	PCR nach cDNA-Synthese
TOM1 mRNA isoform seq for	CTGAGCTAGCTACTGACC	Sequenzierung des TOM1-Transkripts

Primer bestellt bei Metabion International AG, Planegg, Deutschland

2.3 Proteine

2.3.1 Enzyme

Name	Produkt #	Bezugsquelle
One*Taq*® Quick-Load® DNA Polymerase	M0509S	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts
Proteinase K (20 mg/ml)	124568	Sigma-Aldrich® Solutions, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
SuperScript™ III Reverse Transcriptase	18080085	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts

2.3.2 Restriktionsenzyme

Name	Produkt #	Bezugsquelle
BamHI	R3136	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
PmeI (MssI)	R0560	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
PacI	R0547	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
SwaI	R0604	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland

2.3.3 Primärantikörper

Antigen	Ursprung	Klon	Produk t#	Hersteller
β-actin	Maus	8H10D10, monoklonal	3700	Cell Signaling
GFP	Maus	7.1 and 13.1, monoklonal	11814460001	Roche
mCherry	Kaninchen	Polyklonal	ab167453	Abcam
HA	Maus	HA-7	H3663	Sigma-Aldrich
SAG1	Maus	D61S, monoklonal	MA5-18268	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific
TOLLIP	Kaninchen	Polyklonal	PA5-30747	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific

2.3.4 Sekundärantikörper

Antigen	Ursprung	Konjugation	Produk t#	Hersteller
Kaninchen IgG	Ziege	HRP	7074	Cell Signaling
Maus IgG	Pferd	HRP	7076	Cell Signaling
Maus IgG	Ziege	Alexa Fluor 633	A-21052	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific
Kaninchen IgG	Esel	Alexa Fluor 488	A-32790	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific

2.4 Zellen

2.4.1 Bakterien- und Parasitenstämme

Bezeichnung	Stamm/Genotyp	Bezugsquelle
Escherichia coli DH5α	DH5α, F- Φ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F) U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17 (rk-, mk+) *pho*A *sup*E44 λ-*thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1	Thermo Scientific, Braunschweig #18258012
Toxoplasma gondii ME49	ME49, Typ-II	ATCC, Wesel
Toxoplasma gondii + Luciferase	ME49, Typ-II, + Luciferase Kassette	University Medical Center Freiburg Department of Medical Microbiology, Virology and Hygiene PD Dr. Tobias Steinfeldt https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.01.010

2.4.2 Eukaryotische Zelllinien

Zellty p	Zellinie	Eigenschaften	Bezugsquelle
293 FT	WT	Humane, primäre, embryonale Nierenzelllinie transformiert mit humanen Adenovirus Typ 5 DNA, zusätzlich mit pCMVSPORT6Tag.neo transformiert	Invitrogen, Karlsruhe
HS27	WT	Humane Vorhautfibroblasten	ATCC (CRL-1634™), Wesel
MEF	mGBP2 WT	Embryonale Mausfibroblasten (MEFs) aus mGBP2 wt C57BL/6 Mäusen, immortalisiert	Labor AG Pfeffer, Julia Mock (2020)
MEF	WT + GFP	mGBP2 WT nach Transduktion mit pWPXL-GFP-mit-STOP	Labor AG Pfeffer, Veronica Raba
MEF	WT + mCherry	mGBP2 WT nach Transduktion mit pWPXL-mCherry-mit-STOP	Labor AG Pfeffer, Veronica Raba
MEF	WT + TOM1.492-HA	mGBP2 WT nach Transduktion mit pWPI-IRES-eGFP TOM1.492-HA	Diese Arbeit
MEF	WT + HA-TOM1.492	mGBP2 WT nach Transduktion mit pWPI-IRES-eGFP HA-TOM1.492	Diese Arbeit
MEF	WT + TOM1-GFP	mGBP2 WT nach Transduktion mit pWPI-IRES-eGFP TOM1-HA.ΔVHS	Diese Arbeit

MEF	WT + TOM1-HA.ΔVHS	mGBP2 WT nach Transduktion mit pWPI-IRES-eGFP TOM1-HA.ΔVHS	Diese Arbeit
MEF	WT + TOM1-mCherry	mGBP2 WT nach Transduktion mit pWPXL-TOM1.492-mCherry	Diese Arbeit
MEF	WT + mCherry-TOM1	mGBP2 WT nach Transduktion mit pWPXL-mCherry-TOM1.492	Diese Arbeit
MEF	mGBP7 ko	Embryonale Mausfibroblasten aus mGBP7 ko C57BL/6 Mäusen, immortalisiert	Labor AG Pfeffer, Julia Mock (2021)
MEF	mGBP7 ko + TOM1-mCherry	MEF mGBP7 ko nach Transduktion mit pWPXL-TOM1.492-mCherry	Diese Arbeit
MEF	mGBP7 ko + mCherry	MEF mGBP7 ko nach Transduktion mit pWPXL-mCherry-mit-STOP	Diese Arbeit
MEF	7 ko + GFP-mGBP7-E	MEF mGBP7 ko nach Transduktion mit pWPXL-GFP-mGBP7 E-domain	Diese Arbeit
MEF	7 ko + GFP-mGBP7	MEF mGBP7 ko nach Transduktion mit pWPXL-GFP	Labor AG Pfeffer, Karin Buchholz
MEF	7 ko + GFP-mGBP7-G	MEF mGBP7 ko nach Transduktion mit pWPXL-GFP-mGBP7 G-domain	Labor AG Pfeffer, Nora Steffens (2019)
MEF	7 ko + GFP-mGBP7-ME	MEF mGBP7 ko nach Transduktion mit pWPXL-GFP-mGBP7 ME-domain	Labor AG Pfeffer, Nora Steffens (2019)
MEF	mGBP7 ko + GFP-mGBP7 + TOM1-mCherry	MEF 7 ko + GFP-mGBP7 nach Transduktion mit pWPXL-TOM1.492-mCherry	Diese Arbeit
MEF	mGBP7 ko + GFP-mGBP7-G + TOM1-mCherry	MEF 7 ko + GFP-mGBP7-G nach Transduktion mit pWPXL-TOM1.492-mCherry	Diese Arbeit
MEF	mGBP7 ko + GFP-mGBP7-ME + TOM1-mCherry	MEF 7 ko + GFP-mGBP7-ME nach Transduktion mit pWPXL-TOM1.492-mCherry	Diese Arbeit
MEF	mGBP7 ko + GFP-mGBP7-E + TOM1-mCherry	MEF 7ko + GFP-mGBP7-E nach Transduktion mit pWPXL-TOM1.492-mCherry	Diese Arbeit
MEF	mGBP7 ko + GFP-mGBP7 + mCherry	MEF 7 ko + GFP-mGBP7 nach Transduktion mit pWPXL-mCherry-mit-STOP	Diese Arbeit
MEF	mGBP7 ko + GFP-mGBP7-G + mCherry	MEF 7 ko + GFP-mGBP7-G nach Transduktion mit pWPXL-mCherry-mit-STOP	Diese Arbeit
MEF	mGBP7 ko + GFP-mGBP7-ME + mCherry	MEF 7 ko + GFP-mGBP7-ME nach Transduktion mit pWPXL-mCherry-mit-STOP	Diese Arbeit
MEF	mGBP7 ko + GFP-mGBP7-E + TOM1	MEF 7ko + GFP-mGBP7-E nach Transduktion mit pWPXL-mCherry-mit-STOP	Diese Arbeit
MEF	TOM1 $^{\Delta/\Delta}$	Embryonale Mausfibroblasten aus (TOM1 $^{2lox/2lox}$ x Deleter-cre) Mäusen, immortalisiert	Labor AG Pfeffer, Nicole Küpper (2024)

MEF	TOM1 $^{2lox/2lox}$	Embryonale Mausfibroblasten aus TOM1 $^{2lox/2lox}$ Mäusen, immortalisiert	Labor AG Pfeffer, Nicole Küpper (2023)
MEF	TOM1 WT	Embryonale Mausfibroblasten aus TOM1 wt C57BL/6 Mäusen (Wurf der TOM1 $^{\Delta/\Delta}$ Mäuse)	Labor AG Pfeffer, Nicole Küpper (2024)

2.5 Puffer, Lösungen und Medien

2.5.1 Stammlösungen und Puffer

Bezeichnung	**Konzentration**	**Materialien**
Ampicillin-Stammlösung	100 µg/mL	in ddH_2O
DAPI-Lösung	1:2500	In PBS
Gewebe-Lyse-Puffer	100 mM 5 mM 0,2 % 200 mM	Tris-HCl pH 8.0 EDTA pH 8.0 SDS NaCl In dH_2O
IF-Antikörperlösung	0,2 % (v/v) 0,0002 % (v/v)	Ziegenserum Saponin in PBS
IF-Blockierungslösung	2 % (v/v) 0,002 % (v/v)	Ziegenserum Saponin in PBS
IF-Permeabilisierungslösung	0,02 % (v/v)	Saponin in PBS
IF-Waschlösung	0,0002 % (v/v)	Saponin in PBS
Ko-IP Puffer	10 mM 10 mM 50 mM 10 % (v/v) 200 ml 0,5 % (w/v) 1m M 1 Tablette/10 ml 1 Tablette/10 ml	$MgCl_2$ KCl HEPES Gylcerin NaCl NP-40/Igepal DTT (als letztes hinzufügen) cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail PhosSTOP™ In dH_2O, pH eingestelt auf 7,3
SDS Laufpuffer	5 % (v/v)	20x NuPAGE™ MES SDS Running buffer In ddH_2O
TAE Puffer	40 mM 20 mM 2 mM	Tris-HCl pH 8.0 Essigsäure EDTA In dH_2O
TBS-T Puffer	150 mM 10 mM 0,1 %	NaCl Tris-HCl pH 8.0 Tween® 20 In dH_2O
TE-Puffer	10 mM 1 mM	Tris-HCl pH 8.0 EDTA pH 8.0 In dH_2O
WB-Transfer-Puffer	5 % (v/v) 20 % (v/v)	20x NuPAGE™ Transfer Buffer Methanol In dH_2O

2.5.2 Medien

Bezeichnung	Konzentration	Materialien
Einfriermedium	10 % (v/v) 0,05 mM	FBS* 2-Mercaptoethanol in DMEM
LB-Medium**	10 g/L 5 g/L 5 g/L	Caseinhydrolysat Hefeextrakt NaCl in dH_2O
Zellkulturmedium	10 % (v/v) 0,05 mM	FBS* 2-Mercaptoethanol in DMEM
Zellkulturmedium nach Sortierung der Zellen	10 % (v/v) 0,05 mM 1 % (v/v)	FBS* 2-Mercaptoethanol Penicillin/Streptomycin in DMEM

* Das FBS wurde vor der Verwendung für 30 min bei 56 ℃ inkubiert

** LB-Medium wurde vor der Verwendung durch Autoklavieren (121°C, 2 bar, 20 min) sterilisiert. Das Festmedium entsteht durch Zugabe von 12 g Agar pro Liter vor dem Autoklavieren.

2.6 Technische Ausstattung

Name	Bezugsquelle
Abzug	WRT-Laborbau, Stadtlohn
Analysewaage Chyo JL-180	Welabo, Nettetal
Berthold Mithras LB 940 Multimode Plate Reader	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
ECL Imager Chemostar	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen
Ein- und Multikanalpipetten	Thermo Scientific, Braunschweig
Eismaschine	NordCap Simag, Milan (Italien)
Elektrophoresekammer für DNA	Hoefer, Amsterdam
Elektrophoresekammer XCell SureLock Mini-Cell	Thermo Scientific, Braunschweig
FACS Aria IIu	BD, Heidelberg
Fluoreszenzspektrometer Fluorolog-3	HORIBA, Bensheim
Gefrierschrank H86-570-1	EWALD Innovationstechnik, Rodenberg
Inkubator HERA cell 240	Kendro, Langenselbold
Inkubator BBD6220	Thermo Scientific, Braunschweig
Magnetrührer MR3001 K	Heidolph, Schwabach
Mikroskop Axio Observer 3	Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss, Jena
Mikroskop Konfokal LSM780	Zeiss, Jena
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart
Millipore Elix advantage 3	Millipore, Schwabach
Milli-Q Reference A+ Merck, Darmstadt	Merck, Darmstadt
Molecular Imager Gel DocTM XR+	Bio-Rad, Hercules (USA)
Multistep-Dispenser Handystep	Brand, Wertheim
Nanodrop 1000	Peqlab, Erlangen
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
pH-Meter MP225	Mettler-Toledo, Giessen

Photometer TECAN Sunrise	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Pipettierhelfer Pipetboy acu	VWR International, Darmstadt
Power Source E861	Consort, Turnhout (Belgien)
Power Source Peqpower 250	Peqlab, Erlangen
Power Source Power Ease 90W	Thermo Scientific, Braunschweig
Roller Mixer BTR10-12V	Ratek, Boronia (Australien)
Rotator SB3	Stuart, Staffordshire (UK)
Schüttler Multitron Inkubationsschüttler	Infors, Bottmingen (Schweiz)
Schüttler Kreisschüttler 3015	GFL, Burgwedel
Schüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Schüttler Reax top	Heidolph, Schwabach
Semi-Dry-Elektroblotter PerfectBlue™	Peqlab, Erlangen
Sicherheitswerkbank HerasafeTM	Kendro, Langenselbold
Thermocycler T1, T3 & T-gradient	Biometra, Göttingen
Thermoschüttler Mixer HC	Starlab International, Hamburg
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Thermo Scientific, Braunschweig
Waage Precisa 600C	Precisa, Dietikon (Schweiz)
Zentrifuge Evolution RC Centrifuge Sorvall Rotor F8S-6x1000y FIBERlite	Thermo Scientific, Braunschweig
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Thermo Scientific, Braunschweig
Zentrifuge Microcentrifuge MiniStar silverline	VWR International, Darmstadt
Zentrifuge Sorvall RC-4	Thermo Scientific, Braunschweig
Zentrifuge Ultracentrifuge OptimaTM L90K Rotor Type 45Ti	Beckman Coulter, Krefeld

2.7 Software

Name	**Hersteller**
Adobe Acrobat	Adobe
Adobe Illustrator 2024	Adobe
EndNote X20	Clarivate Analytics
Fiji	Fiji contributors Rueden et al.
Geneious Pro 5.5.8	Geneious
GraphPad Prism 10	GraphPad Software
Microsoft Office 2021	Microsoft
Zen 2012 (blue edition)	Zeiss

3 Methoden

3.1 Tierexperimentelle Methoden

3.1.1 Herstellung embryonaler Fibroblasten

Die Zucht der Mäuse für die Erstellung einer TOM1 KO Mauslinie und die folgende Herstellung embryonaler Fibroblasten wurde von Nicole Küpper (Labor AG Pfeffer) durchgeführt.

Für die Herstellung embryonaler Mausfibroblasten (MEFs) wurden männliche und weibliche Mäuse mit passenden Genotypen miteinander verpaart. Am nächsten Morgen wurden die Weibchen von den Männchen getrennt und auf Plugs überprüft, um sicherzustellen, dass eine Paarung stattgefunden hat. 13 Tage später wurden die Weibchen per Genickbruch getötet. Die Maus wurde auf dem Rücken liegend fixiert. Die folgende Arbeit fand unter sterilen Bedingungen statt. Die Peritonealhöhle wurde eröffnet und der Uterus wurde entfernt. In einer 100 mm Zellkulturschale wurde die Gebärmutterwand aufgeschnitten und die Embryos wurden in eine neue Zellkulturschale gesetzt. Leber und Kopf der Embryos wurden entfernt, der Kopf wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei –20 ℃ gelagert, bis die DNA für eine Genotypisierungs-PCR isoliert werden konnte. Die Embryos wurden nun in einer 60 mm Zellkulturschale mit 3 ml DMEM-Zellkulturmedium in ein Zellsieb transferiert und mit einem sterilen Spritzenkolben zerdrückt. Bei potenziell unterschiedlichen Genotypen wurde nur ein einzelner Embryo pro Zellkulturschale verwendet, anderenfalls konnten je nach Größe 2 - 3 Embryos zusammengelegt werden. Danach wurde das Zellsieb mit 2 ml Zellkulturmedium ausgespült und die gesammelte Suspension in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt. Die Zellkulturschale wurde nun ebenfalls mit 3 ml Medium gespült, dieses wurde dann zur restlichen Suspension hinzugefügt. Nach einer Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min wurde das Pellet in 5 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in einer 100 mm (1 Embryo) bzw. einer 150 mm (2 - 3 Embryos) Schale kultiviert.

3.1.2 Aufreinigung genomischer DNA aus Mausgeweben

Um die genomische DNA aus Mausproben für die folgende Genotypisierung zu gewinnen, wurde jeweils eine Ohrstanze mit 250 µl Gewebe-Lyse-Puffer und 2,5 µl Proteinkinase K ü. N. bei 55 ℃ und 500 rpm inkubie rt. Die Suspension wurde vortexiert und anschließend für 10 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein

neues 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 250 µl Isopropanol überführt und erneut für 5 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 250 µl Ethanol (70 %) gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min bei 13 000 rpm wurde der Überstand erneut verworfen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass kein Ethanol im Reaktionsgefäß verblieb. Das Pellet wurde in 30 - 150 µl Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (TE)-Puffer gelöst und für 1 - 2 h bei 37 ℃ und 40 0 rpm geschüttelt. Die DNA wurde bei 4℃ gelagert. Für die Aufreinigung genomischer DNA aus Schwanzspitzen wurden die doppelten Volumina verwendet, für die Aufreinigung aus Embryoköpfen wurden die dreifachen Volumina genutzt.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Adhärente Zellen wurden in oberflächenbeschichteten Zellkulturflaschen oder Multi-Well-Platten unter sterilen Bedingungen bei 37 ℃ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 10 % CO_2 kultiviert. Bei 80 - 100 % Konfluenz wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch die Zugabe von Trypsin / EDTA vom Boden der Kulturgefäße gelöst. Nach dreiminütiger Inkubation bei 37 ℃ wurde das Trypsin durch Hinzufügen von fötalem Rinderserumalbumin (FBS)-haltigem Zellkulturmedium inaktiviert. Die Zellsuspension wurde daraufhin für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der trypsinhaltige Überstand verworfen. Die Zellen wurden erneut in Zellkulturmedium resuspendiert und ½ - $^1/_{20}$ der Suspension wurde mit frischem Zellkulturmedium in neuen Kulturgefäßen ausgesät. HS27 Zellen wurden mit einem Zellschaber vereinzelt, da Trypsin deren Wachstum langfristig beeinträchtigt. Nur in Fällen, in denen genaue HS27 Zellzahlen für Experimente benötigt wurden, wurden diese trypsiniert.

3.2.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Zellen wurden wie unter 3.2.1 beschrieben gelöst und pelletiert. Dann wurden sie in ausreichend vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert, um eine Konzentration von 1 Mio. Zellen/ml zu erreichen. Die Zellsuspension wurde in Cryoröhrchen überführt, für 30 min bei –20 ℃ inkubiert und anschließend ü. N. bei –80 ℃ aufbewahrt. Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Das Auftauen erfolgte möglichst schnell, um den toxischen Effekt von Dimethylsulfoxid (DMSO) auf die Zellen zu minimieren. Die aufgetauten Zellen wurden in frischem Zellkulturmedium

aufgenommen und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der DMSO-haltige Überstand verworfen. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium resuspendiert und in neuen Kulturgefäßen ausgesät. Nach zweimaligen Passagieren konnten die Zellen für folgende Experiment genutzt werden.

3.2.3 Lentivirale Transduktion zur Herstellung stabiler Zelllinien

Für die Lentivirus-Produktion wurden $2{,}5\times10^6$ 293FT Zellen in einer 10 cm^2 Kulturschale ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit folgendem Transfektionsansatz bestehend aus drei Plasmiden und jetPRIME Reagenzien versetzt.

Material	**Menge**
jetPRIME Puffer	500 µl
pWPXL-Expressionsvektor	5 µg
pLP/VSV-G	3,75 µg
psPAX2	1,25 µg

Der Transfektionsansatz wurde kurz vortexiert und zentrifugiert, bevor 20 µl jetPRIME Reagenz hinzugegeben wurden. Nach erneutem Vortexieren und Zentrifugieren wurde der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der 293 FT-Zellen gewechselt. Anschließend wurde der Transfektionsansatz vorsichtig unter Schwenken auf die Zellen gegeben und für 48 - 60 h bei 37 ℃ inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1×10^5 Zielzellen sowie 1×10^5 293FT Zellen als Transduktionskontrolle auf einer 24-Well Platte ausgesät. Nachdem die Wirtszellen lysiert wurden, wurden die Viren geerntet, indem das Medium entfernt und für 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert wurde, um Zellreste zu entfernen. Der virenhaltige Überstand wurde entweder in Cryotubes gefüllt und bei – 80 ℃ gelagert oder direkt verwendet. Für die Transduktion wurden 0,5 % (v/v) Polybrene zum Virusüberstand gegeben und diese Mischung für 10 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der Zielzellen entfernt. Anschließend wurden je 500 µl der Virus-Polybrene-Mischung auf die Zellen gegeben. Zur Akklimatisierung wurden die Zellen für 30 min bei 37 ℃ inkubiert, bevor die Platte mit Parafilm abgedichtet und für 99 min bei 1200 rpm und 30 ℃ zentrifugiert wurde. Anschließend wurden die Zellen für 4 - 6 h bei 37 ℃ inkubiert. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen für 24 - 72 h bei 37 ℃ inkubiert. Die Zellen wurden zweimal unter S2-Bedingungen passagiert, bevor erfolgreich transduzierte Zellen mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie

(FACS) angereichert wurden. Nach der Sortierung wurden die Zellen für zwei Passagen in mit Penicillin und Streptomycin (1 % v/v) versetzen Medium kultiviert, bevor auf normales Zellkulturmedium gewechselt wurde. Die weitere Kultivierung der Zellen sowie Folgeexperimente fanden unter S1-Bedingungen statt.

3.2.4 Kultivierung von ME49 *T. gondii*

$1x10^7$ frisch ausgestiegene Tachyzoiten wurden auf ein HS27-Zellmonolayer in T25-Zellkulturflaschen überführt. Nach Vermehrung der Tachyzoiten für 2 – 7 Tage und Lyse der HS27-Wirtszellen wurde der Überstand bei 700 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet aus Rückständen der Wirtszellen wurde verworfen und der Überstand bei 1400 rpm für 5 min erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Parasiten gezählt und auf ein neues HS27-Zellmonolayer überführt bzw. für Infektionen in weitere Experimente verwendet.

3.2.5 Herstellung von Zelllysaten

$1×10^6$ - $1×10^7$ Zellen wurden wie unter 3.2.1 beschrieben gelöst und pelletiert. Das Pellet wurde mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und die Suspension bei 1200 rpm für 5 min erneut zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in Ko-IP Puffer (100µl/$1×10^6$ Zellen) resuspendiert und für 20 min auf einem Drehrad bei 4 ℃ inkubiert. Anschließend wurde die Suspension b ei 13 000 rpm für 15 min und 4 ℃ zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Weiterverwendung in Folgeexperimenten bei –20 °C aufbewahrt.

3.2.6 IF-Färbung für konfokalmikroskopische Analysen

Für die Immunfluoreszenz (IF)-Färbung wurden $1×10^4$ Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte auf sterilen Deckgläsern ausgesät und mit Zellkullturmedium auf 1 ml aufgefüllt. Anschließend wurden diese mit 200 U/ml IFN-γ stimuliert oder blieben unbehandelt. 16 h später wurden die Zellen mit *T. gondii* im Verhältnis 1:50 (MEFs:Parasiten) infiziert wie unter 3.2.4 beschrieben oder blieben uninfiziert. Nach 2,5 h Infektion wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen zur Fixierung für 10 min mit 4 % para-Formaldehyd (PFA) inkubiert. Die Zellen wurden mit 500 µl PBS gewaschen und für 15 min mit 300 µl der Permeabilisierungslösung inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 300 µl der Blockierungslösung inkubiert, bevor 250 µl der Antikörperlösung auf die Zellen

gegeben wurden. Sowohl der Primär- als auch der Sekundärantikörper wurde für 45 min mit den Zellen inkubiert. Folgende Verdünnungen wurden verwendet:

Antikörper	Verdünnung
α-SAG1	1:50
α-Maus, Alexa Fluor 633 konjugiert	1:200

Nach der Inkubation mit den Antikörpern wurden die Zellen jeweils dreimal für 5 min mit 500 µl der Waschlösung gewaschen. Zur Färbung der Zellkerne folgte eine Inkubation mit 300 µl der 4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)-Lösung für 3 min. Es folgte ein letzter Waschschritt für 5 min mit 500 µl der Waschlösung. Abschließend wurden die Deckgläschen mit der Oberseite nach unten mit Hilfe von Fluormount G auf Objektträgern fixiert und bei 4 ℃ gelagert. Die fixierten Präparate wurden mit einem Zeiss LSM780 Konfokalmikroskop analysiert und die Aufnahmen durch Fiji ausgewertet.

3.2.7 Lebenzellmikroskopie an einem Konfokalmikroskop

Für die Lebendzellmikroskopie wurden 1×10^4 Zellen in 500 µl Fluorobrite Medium in einem Mikroskopie-Schälchen ausgesät. Nach 4 h wurden weitere 2 ml Fluorobrite Medium auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden diese mit 200 U/ml IFN-γ stimuliert. 16 h später wurden die Zellen mit *T. gondii* im Verhältnis 1:50 (MEFs:Parasiten) infiziert wie unter 3.2.4 beschrieben. Dann wurde eine einzelne Zelle an einem Zeiss LSM780 Konfokalmikroskop über mehrere Stunden aufgezeichnet. Die Einzelbilder wurden abschließend mittels ZEN 2012 Software und Fiji ausgewertet. Das in Fiji verwendete Macro befindet sich mit Beispielwerten in Abschnitt 10.1.1.

3.2.8 Ko-IP / GFP-Trap

Potenzielle Interaktionspartner von TOM1 wurden mittels Ko-IP ermittelt. Für die Identifikation der mGBP7-Domäne, die für die Interaktion mit TOM1 relevant ist, wurde das GFP-Trap Kit verwendet, das auf einer Nanobody-vermittelten Affinitätsreinigung basiert. Die hierfür jeweils relevanten Zellen wurden mit einer Zelldichte von 2×10^5 pro T75 Zellkulturflasche ausgesät. Nach 72 h wurden die MEFs mit 200 U/ml IFN-γ stimuliert. 16 h später wurden die Zellen mit *T. gondii* im Verhältnis 1:10 (MEFs:Parasiten) infiziert wie unter 3.2.4 beschrieben oder blieben uninfiziert. Nach 2,5 h Infektion wurden die Zellen wie unter 3.2.5 beschrieben lysiert. Auch nach der Lyse erfolgten alle Arbeitsschritte bei 4 ℃ oder a uf Eis. Die anti-HA- bzw. anti-GFP-

Agarose wurde im Ko-IP Puffer nach Herstellerangaben äquilibriert. Danach wurden jeweils 25 µl der Agarose zu den Zelllysatproben gegeben und diese für 2 h auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 2 min bei 3 000 rpm zentrifugiert und die Agarose dreimal mit je 500 µl Ko-IP-Puffer gewaschen. Die proteinbeladene Agarose wurde in 40 µl 5x Proteinladepuffer aufgenommen und für 5 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 2 min bei 3 000 rpm wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und für 5 min bei 95 ℃ inkubiert. Abschließend wurden die Proben für 1 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die so erhaltenen Proben wurden entweder mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (3.4.2) und folgendem Western-Blot (3.4.3) analysiert, oder in die Massenspektrometrie gegeben (3.4.4).

3.2.9 Bestimmung der *T. gondii* Proliferation mittels Luciferase-Assay

Für den Luciferase-Assay wurden 6×10^4 Zellen pro Well in 200 µl Zellkulturmedium auf einer 96-Well-Platte ausgesät. 16 h vor Infektion wurden diese Zellen mit 200 U/ml IFN-γ stimuliert oder blieben unbehandelt. Für die Infektion wurden in diesem Fall *T. gondii*-Luciferase verwendet. Die Infektion wurde wie unter 3.2.4 beschrieben durchgeführt, mit einem Verhältnis von 1:0,25 (MEFs:Parasiten). Nach einer 48-stündigen Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 40 µl 1x Passive Lysis Buffer (verdünnt in PBS) innerhalb einer Stunde lysiert. Die Zellysate konnten bei Bedarf bei –20 ℃ aufbewahrt werden. Für die Messung der Luciferase-Aktivität wurden 20 µl der Lysate auf eine weiße, flachbodige 96-Well-Platte transferiert und an einem Berthold Mithras LB 940 Plattenlesegerät mit Luciferase-Substrat versetzt. Die Luciferase-Emission wurde bei 578 nm gemessen [180]. Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel und GraphPad Prism 10.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurde die folgende Reaktionslösung unter Kühlung auf Eis angesetzt.

Material	**Konzentration (Stock)**	**Volumen [µl] für 25 µl**
One Taq Quick Load Buffer	5 x	5
dNTPs	10 mM	0,5
Primer 1	10 µM	0,5
Primer 2	10 µM	0,5
One Taq DNA Polymerase	5 U/µl	0,125
gen. DNA/Plasmid	10 ng - 1 µg/1 pg - 10 ng	1
dH_2O	-	17,5

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Schritt	Temp. [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	30	1 x
Denaturierung	94	30	30 x
Primerhybridisierung	45-68	30	
Elongation	68	60*kb	
Vervollständigung	68	300	1 x
Lagerung	4	Max 24 h	

3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Dafür wurden die zu untersuchenden DNA-Proben mit Auftragungspuffer (Orange DNA Loading Dye) versetzt. Die Agarosegele mit folgender Zusammensetzung wurden in Elektrophoresekammern angesetzt.

Material	Zusammensetzung (1 % Gel)
Agarose	1 % (w/v)
TAE Puffer	99 % (v/v)
Ethidiumbromid	2 µl/100 ml

Nach Aushärtung des Gels wurde die Kammer mit TAE-Puffer aufgefüllt. Die DNA-Proben wurden zusammen mit DNA-Auftragungspuffer (Orange DNA Loading Dye) in die Probentaschen aufgetragen. Die Agarose-Gelelektrophorese lief für 1 h bei 100 V. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte durch UV-Bestrahlung (λ = 280 nm) in einem Geldokumentationssystem. Falls die DNA für weitere Arbeiten, wie z.B. Klonierungen, benötigt wurde, wurde die DNA mit Hilfe des High Pure PCR Produkt Aufreinigungs Kits von Roche nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.3.3 Enzymatischer Verdau von DNA

Plasmid-DNA wurde mithilfe von Restriktionsendonukleasen verdaut, um für folgende Klonierungen linearisiert zu werden oder anhand spezifischer Fragmentgrößen identifiziert zu werden. Die Restriktionsansätze wurden nach Herstellerangaben angesetzt und anschließend per Agarose-Gelelektrophorese (3.3.2) analysiert oder aufgereinigt.

3.3.4 Klonierung und Transformation in *E. coli*

Klonierungen wurden mit Hilfe des In-Fusion HD Klonierungs Plus Kits von Takarabio nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Transformation von DNA wurden 10 µl

einer Zellsuspension aus kompetente *E. coli* DH5α auf Eis aufgetaut. 1 µl Plasmid-DNA oder 2 µl aus einem Klonierungsansatz wurden zu der aufgetauten Zellsuspension gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen einem Hitzeschock von 42 ℃ für 60 s ausgesetzt. Es folgte eine zweiminütige Inkubation auf Eis, bevor 500 µl LB-Medium hinzugegeben wurden und die Suspension bei 37 ℃ und 700 rpm für 1 h inkubiert wurde. Daraufhin wurde der Transformationsansatz auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und bei 37 ℃ ü. N. inkubiert. Anschließend wurden positive Klone über Plasmidisolierung (3.3.5) mit folgendem Restriktionsverdau (3.3.3) und Sequenzierung (3.3.7) bestätigt.

3.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Plasmidisolierung nach einer Klonierung wurden 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Einzelkolonie der ü. N. inkubierten Agarplatten (3.3.4) angeimpft. Nach Inkubation bei 37 ℃ unter Schütteln ü. N. wurden entweder 3 ml der Bakterienkultur für eine Plasmidisolierung im kleinen Maßstab genutzt oder 2 ml der Bakterienkultur wurden für das Animpfen einer 200 ml umfassenden Hauptkultur verwendet. Die Plasmidisolierung im kleinen Maßstab erfolgte mit Hilfe des High Pure Plasmid Isolation Kits nach Herstellerangaben. Für die Plasmidisolierung im großen Maßstab wurde die Hauptkultur bei 37 ℃ unter Schütteln ü. N. inkubiert. Danach erfolgte die Plasmidisolierung mittels des NucleoBond Xtra Maxi Kits von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die Sequenz der isolierten Plasmide durch Restriktionsverdau (3.3.3) und Sequenzierung (3.3.7) bestätigt.

3.3.6 Isolierung gesamtzellulärer RNA und cDNA-Synthese

MEFs wurden wie unter 3.2.1 beschrieben gelöst und pelletiert. Die RNA wurde mit Hilfe des NucleoSpin RNA Plus Kits von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben isoliert. Für die cDNA-Synthese wurde folgende Mischung auf Eis vorbereitet:

Material	**Volumen [µl]**
RNA (10 ng - 1 µg)	1
dNTPs	2
Oligo(dT)	2
dH_2O (*ad* 26 µl)	21

Die Lösung wurde kurz gemischt und zentrifugiert, bevor sie für 5 min bei 65 ℃ inkubiert wurde. Anschließend wurde sie für 1 min auf Eis inkubiert, dann wurde folgende Lösung hinzugegeben:

Material	Volumen [µl]
5x Puffer	10
DTT	2
Reverse Transcriptase	2

Die Lösung wurde kurz gemischt und zentrifugiert, bevor sie für 90 min bei 50 ℃ inkubiert wurde. Danach wurde sie für 15 min bei 70 ℃ inkubiert. Zur Analyse der so gewonnenen cDNA folgte eine PCR (3.3.1) mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese und PCR-Produktaufreinigung (3.3.2). Das so erhaltene PCR-Produkt wurde daraufhin mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kit for Subcloning von Thermo Scientific nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Transformation erfolgte wie in 3.3.4 beschrieben, bevor die Plasmide isoliert (3.3.5) und sequenziert (3.3.7) wurden.

3.3.7 Sanger-Sequenzierung

Die Plasmid-Sequenzierungen wurden im Genomics & Transcriptomics Labor (GTL) des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHU) durchgeführt.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten erfolgte mittels eines Bicinchoninsäure (BCA) Assays. Der Assay wurde mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach einer photometrischen Messung der Proben bei 562 nm wurde die Konzentration mittels einer Rinderserumalbumin (BSA) Standard- Verdünnungsreihe errechnet.

3.4.2 SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine aus Zelllysaten erfolgte mittels SDS-PAGE. Zur Vorbereitung der Proben wurden 10 - 40 µg Proteinlösung mit 5x Proteinladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 ℃ inkubiert. Das Bis-Tris-Gel wurde in der Elektrophoresekammer fixiert, bevor diese mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt wurde. Die

Proteinproben sowie der Proteingrößenmarker wurden auf das Gel aufgetragen. Anschließend lief die Gelelektrophorese bei 120 - 150 V für 1 h.

3.4.3 Western Blot

Die Identifikation spezifischer Proteinbanden nach der SDS-PAGE erfolgte mittels Western-Blot und anschließender Chemolumineszenz-Detektion. Zur Vorbereitung wurden sechs Whatman-Papiere und eine Nitrocellulose-Membran für 5 min in Transferpuffer inkubiert. Das Bis-Tris-Gel wurde aus der Kassette gelöst und zusammen mit den Whatman-Papieren und der aktivierten Membran in folgender (von unten nach oben) Reihenfolge in die Transferkammer (Semi-Dry-Elektroblotter PerfectBlue™) gelegt: drei Whatman-Papiere, Nitrocellulose-Membran, Bis-Tris-Gel, drei Whatman-Papiere. Luftblasen zwischen den Schichten wurden vorsichtig entfernt. Anschließend wurde die Kammer geschlossen und der Transfer bei 110 mA pro Blot für 1 h durchgeführt. Die Membran wurde danach in ein 50 ml Falcon überführt, mit der proteinbeladenen Seite innen. Vor der Zugabe von Antikörpern wurde die Membran mit 5 ml einer 5 %igen Milchlösung für mindestens 1 h geblockt. Dafür wurden folgende Antikörper-Verdünnungen genutzt:

Antikörper	**Verdünnung**
α-β-Aktin	1:5000
α-GFP	1:1000
α-HA	1:1000
α-mCherry	1:1000

Nachdem die Membran dreimal für 5 min mit TBS-T (engl.: *tris-buffered saline with Tween20*) gewaschen wurde, wurde sie für mindestens 1 h mit der Primärantikörperlösung inkubiert. Daraufhin wurde sie erneut dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen, bevor sie für 1 h mit der entsprechenden HRP-Sekundärantikörperlösung (Verdünnung 1:2500) inkubiert wurde. Die Membran wurde erneut dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen, bevor sie zur chemolumineszenten Detektion der Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierten Antikörper mit entsprechendem Substrat (SuperSignal™ West Pico PLUS) beträufelt wurde. Nach der Detektion wurde die Membran mit dH_2O gewaschen und anschließend für 30 min mit der Re-Blot Lösung inkubiert, um die Antikörperbindungen abzulösen. Daraufhin wurde die Membran erst für 5 min mit dH_2O und dann für weitere 5 min mit TBS-T

gewaschen. Die Membran konnte nun erneut geblockt und mit Antikörperlösungen inkubiert werden.

3.4.4 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Analysen der Ko-IP-Proben (3.2.8) wurden im Molecular Proteomics Laboratory (MPL, HHU, Prof. Dr. Kai Stühler) von Gereon Poschmann durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 In MEFs exprimiertes TOM1

Das in bisherigen Studien untersuchte murine TOM1 (Uniprot ID O88746, im Folgenden beschrieben als TOM1.492) ist ein 492 AS langes Protein, allerdings wurde computergestützt zusätzlich zu dieser Form eine weitere Isoform vorhergesagt (Uniprot ID Q3UDC3, im Folgenden beschrieben als TOM1.516) [126, 181, 182]. Diese potenzielle Isoform ist 516 AS lang und weist 24 zusätzliche AS zwischen N343 und L344, C-terminal der Clathrin-Box, auf.

Da diese Studien Thymusgewebe [181] bzw. Zellen des Dickdarms [182] verwendeten, wurde untersucht, welche dieser TOM1 Isoformen in den verwendeten MEFs exprimiert wird. Hierfür wurde zunächst mRNA aus Wildtyp (WT) MEFs isoliert. Aus dieser wurde cDNA synthetisiert, die nach darauffolgender PCR und Klonierung sequenziert wurde. Bereits die Größe der PCR-Fragmente wies auf das alleinige Vorhandensein von TOM1.492 hin (Abbildung 10A). Dieses wurde durch die Sequenzierung bestätigt, in der die 72 zusätzlichen Basenpaare (bp), die die Expression von TOM1.516 bestätigt hätten, fehlten.

Da während einer PCR kürzere Produkte bevorzugt vervielfältigt werden, könnte das Fehlen von TOM1.516-Banden auch dadurch erklärt werden, dass dieses größere Produkt (625 bp, im Vergleich zu den 553 bp von TOM1.492) kaum vervielfältigt wurde, obwohl ein Template vorhanden gewesen wäre. Um diesen Fall auszuschließen wurde eine weitere PCR durchgeführt, deren vorwärts gerichteter Primer komplementär zu den zusätzlichen Basenpaaren ist. Bei dieser PCR entstanden keine nachweisbaren Produkte (Abbildung 10B).

Als Bestätigung für die Funktionalität der Primer für diese zweite PCR wurden diese mit einem bestellten Plasmid, das das Gen für TOM1.516 enthielt, getestet. In diesem Fall waren Banden der erwarteten Größe sichtbar (Anhang 1). Das Fehlen der PCR-Produkte ist demnach nicht auf die Primer oder die PCR-Bedingungen zurückzuführen. Deshalb ist davon auszugehen, dass in den WT MEFs nur TOM1.492 exprimiert wird.

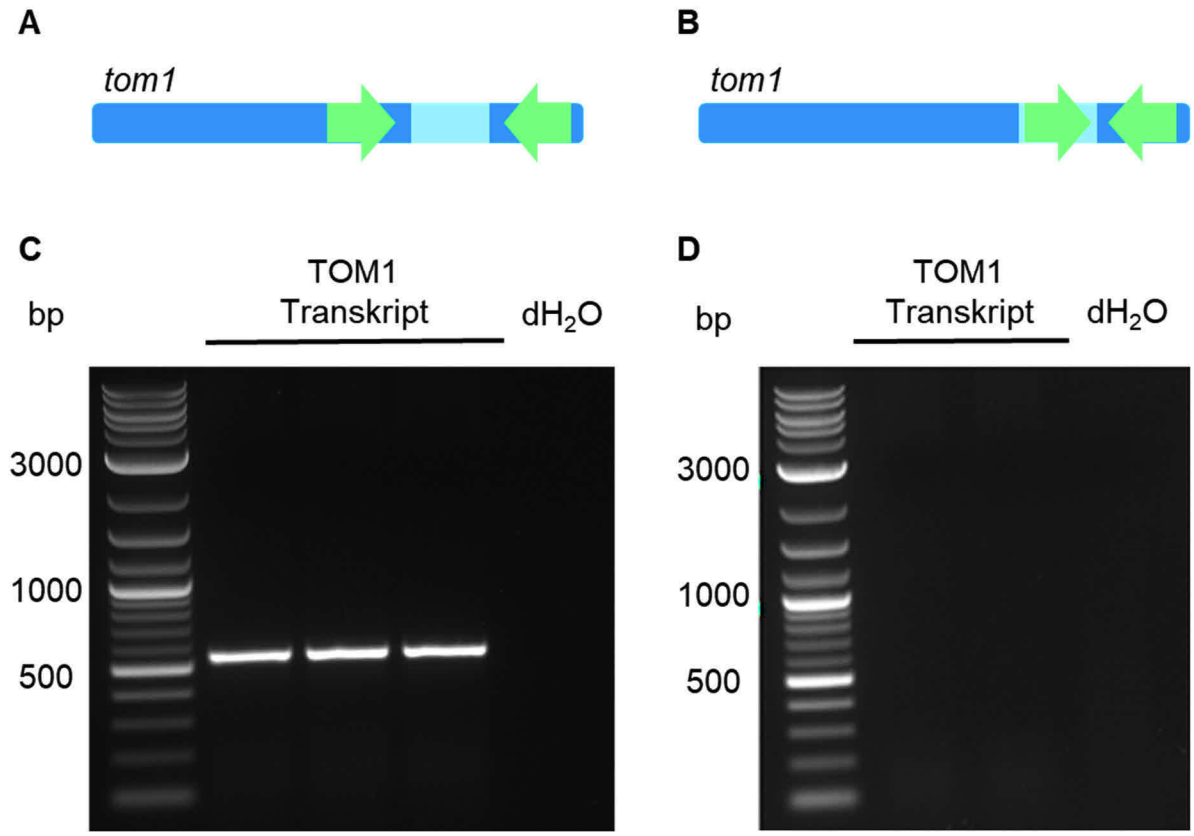


Abbildung 10: Mit UV-Licht bestrahlte Agarose-Gele nach einer Gelelektrophorese; A: schematische Darstellung der Primerbindestellen (grüne Pfeile) auf dem *tom1* Gen (dunkelblau) der PCR aus C; die 72 zusätzlichen bp von *tom1.516* sind in hellblau dargestellt; B: schematische Darstellung der Primerbindestellen auf dem *tom1* Gen der PCR aus D; Farbgebung entspricht A; C: Produkte einer PCR die den Bereich des TOM1 Transkripts rund um die nur bei TOM1.516 vorhandenen Basenpaare vervielfältigte, erwartete Größe des Produkts für TOM1.516 waren 625 bp, für TOM1.492 waren 553 bp erwartet. D: Produkte einer PCR, deren vorwärts gerichteter Primer komplementär zu den zusätzlichen Basenpaaren von TOM1.516 ist, erwartete Produktgröße beträgt 542 bp.

4.2 Interaktion zwischen mGBP7 und TOM1

In einer vorherigen Arbeit konnte durch Ko-Immunopräzipitations (Ko-IP)-Experimente mit anschließender Massenspektrometrie gezeigt werden, dass mGBP7 mit TOM1 im Kontext einer *T. gondii* Infektion interagiert [123]. Western-Blot-Analysen nach Ko-IP-Experimenten ergaben, dass TOM1 nur mit mGBP7 und nicht mit mGBP2 interagiert und dass diese Interaktion ausschließlich im Kontext einer *T. gondii*-Infektion stattfindet. Darüber hinaus konnte eine Kolokalisation von mGBP7 und TOM1 an der *T. gondii* PV nachgewiesen werden.

Diese Interaktion wurde im Folgenden genauer untersucht, um die Rolle von TOM1 im Zusammenspiel mit mGBP7 in der Pathogenabwehr zu entschlüsseln.

4.2.1 Identifikation der Interaktionsdomäne von mGBP7

Um die Interaktion zwischen TOM1 und mGBP7 und deren Funktion im Kontext einer *T. gondii* Infektion besser zu verstehen, wurde die für die Interaktion mit TOM1 notwendige Domäne von mGBP7 ermittelt.

Dr. Wibke Schumanns in 1.3.2 beschriebener *in silico*-Studie zufolge spielt hierbei vor allem die G-Domäne von mGBP7 eine entscheidende Rolle. Diese Ergebnisse galt es nun *in cellula* zu verifizieren oder falsifizieren.

Hierfür wurden Trunkationsmutanten von mGBP7 bestehend aus der einzelnen G-Domäne (mGBP7-G) bzw. der einzelnen E-Domäne (mGBP7-E) verwendet. Da die helikale M-Domäne die ebenfalls helikale E-Domäne strukturell stabilisiert [92], wurde zusätzlich ein Konstrukt aus M- und E-Domäne verwendet (mGBP7-ME).

Diese Trunkationsmutanten wurden als GFP-getaggte Konstrukte exprimiert und mittels anti-GFP-Agarose aus dem Zelllysat isoliert, gewaschen und anschließend eluiert. Da der Nachweis von endogen exprimiertem TOM1 aufgrund zu schwacher Antikörper-Detektion fehlschlug (nicht gezeigt), wurden die Zellen zusätzlich mit TOM1.492mCherry transduziert, sodass der Nachweis über anti-mCherry-Antikörper stattfinden konnte. Für mCherry-getaggtes TOM1.492 war hierbei eine Bandengröße von 81 kDa zu erwarten, während die theoretischen Größen der GFP-getaggten mGBP-7 Konstrukte 100 kDa für GFP-mGBP7, 61 kDa für GFP-mGBP7-G, 45 kDa für GFP-mGBP7-E und 65 kDa für GFP-mGBP7-ME betrugen.

Die Banden sind in den Durchfluss-Proben (Abbildung 11B), die genommen wurden, als die Agarose mit allen daran gebunden Proteinen von dem Lysat getrennt wurden, deutlich schwächer als in den Lysat-Proben (Abbildung 11A). Am stärksten sind die Banden wie zu erwarten im Eluat (Abbildung 11), in dem die GFP-getaggten Proteine aufkonzentriert wurden.

Western-Blot-Analysen unter Verwendung eine anti-mCherry Antikörpers der Lysat Proben (Abbildung 11A) zeigt, dass mCherry-getaggtes TOM1 in allen Zelllinien exprimiert wird, auch wenn die Expression in der Zelllinie mit dem Volllängenkonstrukt (GFP-mGBP7) verhältnismäßig gering ist.

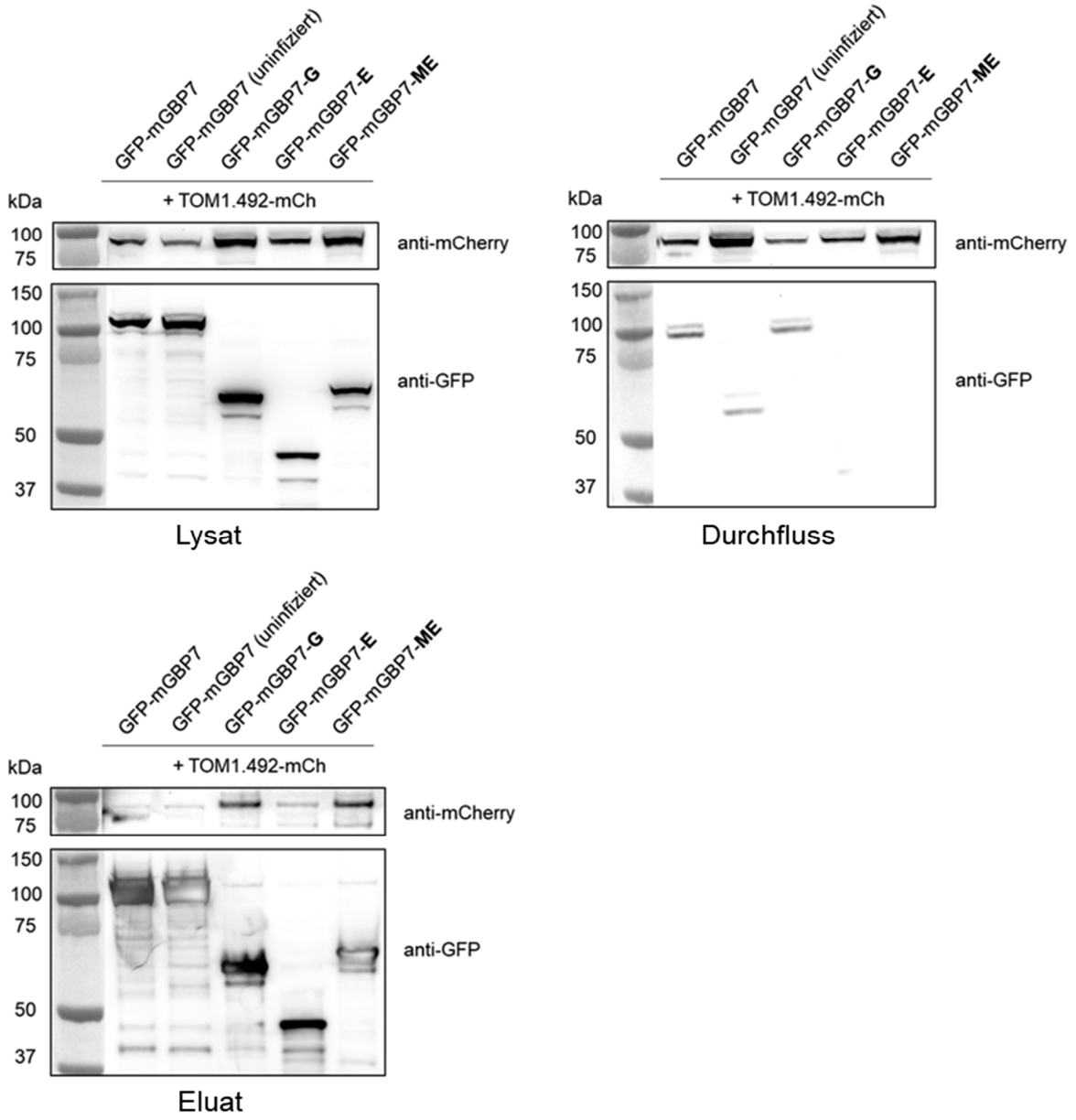


Abbildung 11: Western Blots nach GFP-Trap-Aufreinigung, mGBP7 KO MEFs, die sowohl GFP-getaggte mGBP7-Konstrukte als auch TOM1.492-mCherry exprimieren, wurden mit *T. gondii* infiziert und 2.5 h später lysiert, A: Lysat-Proben, B: Durchfluss-Proben, C: Eluat-Proben, erwartete Proteingrößen: TOM1.492-mCherry (81 kDa), GFP-mGBP7 (100 kDa), GFP-mGBP7-G (61 kDa), GFP-mGBP7-E (45 kDa), GFP-mGBP7-ME (65 kDa); ungeschnittener WB gezeigt in Anhang 2, Wiederholungsexperimente und Kontrollen mit Zelllinien, die sowohl GFP-getaggte mGBP7-Konstrukte als auch mCherry exprimieren, sind in Anhang 3 – 5 dargestellt.

In den Durchflussproben sind die TOM1-Banden ebenfalls stark (Abbildung 11B), da es nicht direkt an die anti-GFP-Agarose bindet und der Großteil des vorhandenen TOM1 nicht an das Agarose-gebundene mGBP7 zu binden scheint.

In den Eluat-Proben sind die TOM1-Banden aus den mGBP7-G und mGBP7-ME exprimierenden Zelllinien besonders deutlich zu sehen, stärker noch als in der Zelllinie, die das vollständige mGBP7 exprimiert. Diese stärkere Bindung von TOM1 an die Trunkationsmutanten ließ sich auch in Wiederholungsexperimenten beobachten (Anhang 3-5). In diesen Experimenten wurden zusätzlich Zelllinien verwendet, die neben den mGBP7-Konstrukten mCherry exprimieren, um eine Bindung von mCherry an die anti-GFP-Agarose auszuschließen. Es waren dort zwar schwache mCherry-Banden in den Eluat-Proben sichtbar, doch diese waren schwächer als die TOM1-Banden, obwohl mCherry als kleineres Konstrukt deutlich stärker exprimiert wurde, wie die Banden in den Lysat- und Durchflussproben zeigten.

Abschließend galt es zu überprüfen, ob die TOM1-Banden aus den mGBP7-G und mGBP7-ME exprimierenden Zelllinien besonders deutlich zu sehen waren, weil in diesen Zelllinien die Expression im Lysat stärker war oder ob diese Beobachtung wirklich auf eine stärkere Bindung der trunkierten Konstrukte an TOM1 hindeutet. Hierfür wurden die Signalintensitäten der WB-Banden der Eluatproben mit den Intensitäten der Lysatproben verglichen (Abbildung 12). Um zusätzlich zu überprüfen, ob die mCherry-Banden in den Eluat-Proben im Vergleich zu den starken Banden in den Lysat-Proben tatsächlich vernachlässigbar schwach sind, wurde ein WB genutzt, in dem Proben der TOM1.492-mCherry exprimierenden MEFs und der mCherry exprimierenden Zellen gemeinsam auf ein Gel aufgetragen worden waren.

Dieser Vergleich der Intensitäten zeigte deutlich, dass die Eluatbanden der Proben mit GFP-mGBP7-G im Vergleich zu den Lysatproben 5-Mal intensiver waren als die des vollständigen Proteins (Abbildung 12). Die Banden der Proben mit GFP-mGBP7-ME und die des uninfizierten mGBP7 waren doppelt so intensiv wie die des infizierten mGBP7. Die Eluatbanden Proben der mCherry-Kontrollzelllinien sind im Vergleich der Lysatbanden sehr schwach. Es scheint demzufolge keine Bindung von mCherry an die anti-GFP-Agarose stattzufinden.

Demnach deuten die Ergebnisse auf eine Bindung von TOM1 in *T. gondii* infizierten Zellen an die einzelne G-Domäne bzw. in geringerem Maße an die M- und E-Domäne von mGBP7, sowie an mGBP7 in uninfizierten Zellen hin.

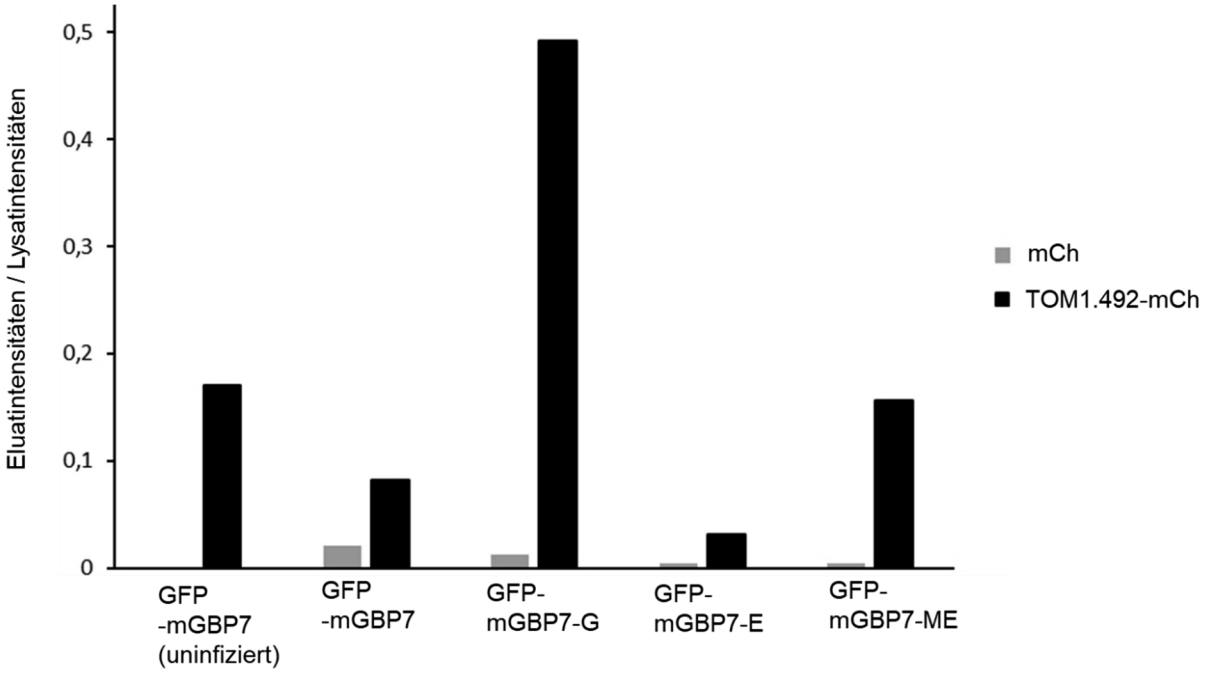


Abbildung 12: Verhältnisse der WB-Signalintensitäten der Eluatproben zu den Intensitäten der Lysatproben; WB gezeigt in Anhang 3; die Signalintensitäten der jeweiligen Banden wurden mittels Fiji ermittelt.

4.2.2 Kolokalisationsrate von mGBP7 und TOM1 an der *T. gondii* PV

Bereits zuvor war gezeigt worden, dass mGBP7 und TOM1 an der *T. go*ndii PV kolokalisieren [123], doch die Rate der Kolokalisation im Vergleich zur Einzelrekrutierung zu der PV war bisher nicht untersucht worden. Um zu ermitteln, ob mGBP7 und TOM1 bevorzugt einzeln oder gemeinsam an die PV rekrutiert werden, wurden MEFs verwendet die sowohl GFP-getaggtes mGBP7 als auch mCherry-getaggtes TOM1 exprimieren. Die Zellen wurden mit *T. gondii* infiziert und fixiert. Anschließend wurden die Immunfluoreszenz-gefärbten PVs ausgezählt und auf die Anwesenheit der beiden Proteine hin untersucht. Hierbei konnten an den PVs alle möglichen Konstellationen beobachtet werden (Abbildung 13): PVs ohne Rekrutierung von mGBP7 oder TOM1 (Abbildung 13A), PVs, an denen jeweils nur eines der beiden Proteine zu beobachten war (Abbildung 13B+C), sowie einige PVs an denen TOM1 und mGBP7 kolokalisierten (Abbildung 13D).

Die genauere Auszählung aus drei Experimenten ergab, dass mGBP7 und TOM1 an 25 % der untersuchten PVs kolokalisieren, während sie nur in jeweils 10 % der Fälle einzeln an einer PV zu beobachten sind (Abbildung 14). Die Rekrutierung von TOM1 und mGBP7 scheint demnach in den meisten Fällen gemeinsam stattzufinden.

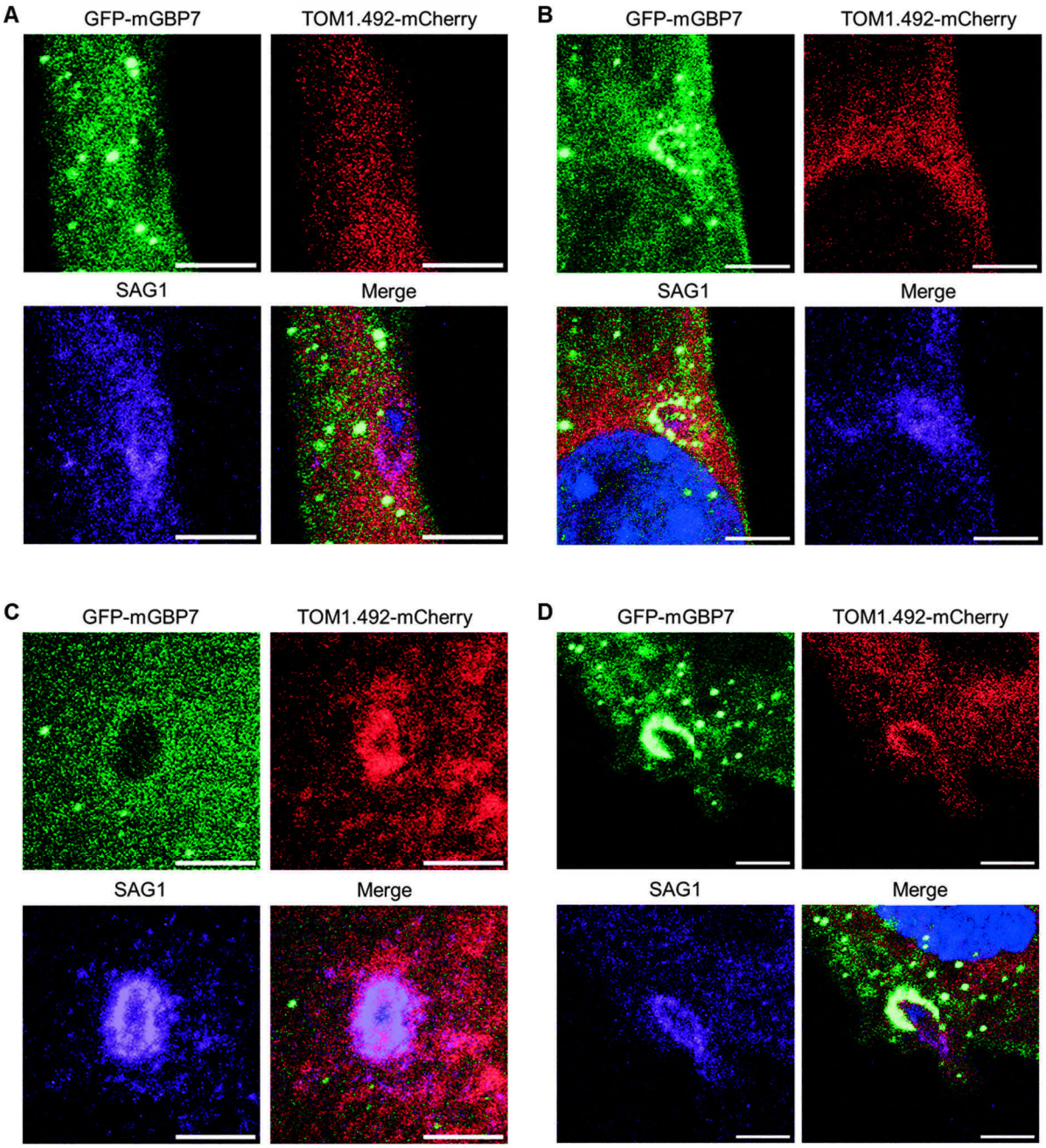


Abbildung 13: Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von mit *T. gondii* infizierten MEFs (mGBP7$^{-/-}$ + GFP-mGBP7 + TOM1.492-mCherry) 2,5 h nach der Infektion, immunfluoreszenzgefärbt mit anti-SAG1-Antikörpern und Alexa Fluor 663-konjugierten anti-Maus IgG-Antikörpern, Zellkerne gefärbt mit DAPI, A: keine Rekrutierung (weder mGBP7 noch TOM1), B: Rekrutierung von mGBP7 (keine Rekrutierung von TOM1), C: Rekrutierung von TOM1 (keine Rekrutierung von mGBP7), D: Rekrutierung von sowohl GFP-mGBP7 als auch TOM1.492-mCherry, Maßstabsbalken: 5 µm.

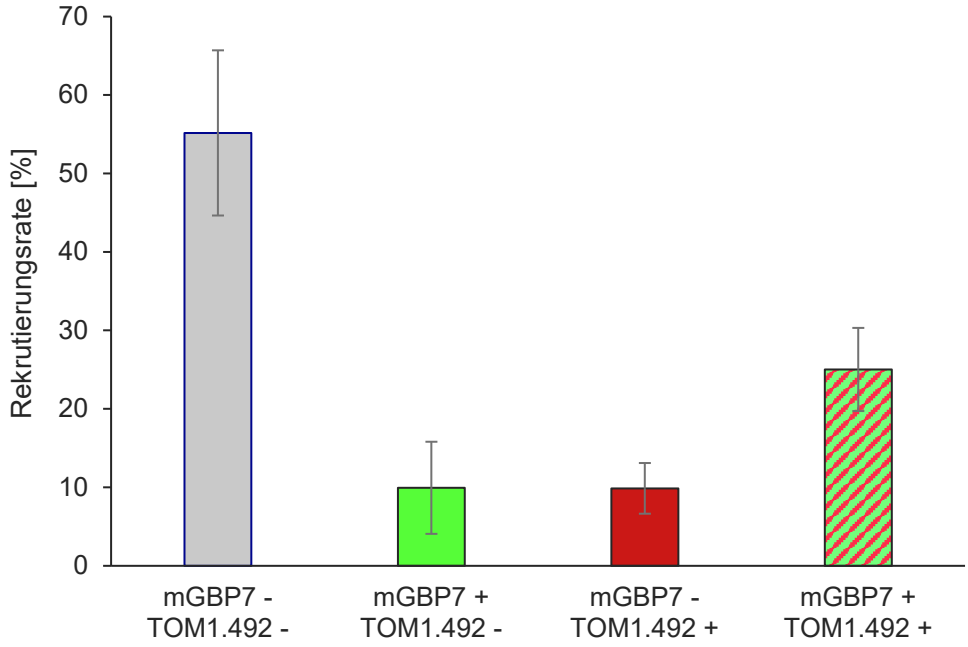


Abbildung 14: Rekrutierungsrate von mGBP7 und TOM1 zu einer *T. gondii* PV, „+“: es fand eine Rekrutierung des Proteins zur PV statt, „-“: es fand keine Rekrutierung des Proteins zur PV statt, insgesamt wurden 217 PVs in drei Experimenten auf Rekrutierung durch mGBP7 und TOM1 untersucht, die Balken stellen die Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung dar.

4.2.3 Dynamik der Rekrutierung von mGBP7 und TOM1 zur *T. gondii* PV

Für verschiedene mGBPs, die an der *T. gondii* PV kolokalisieren, waren bereits z. T. unterschiedliche Dynamiken der Rekrutierung ermittelt worden. So erfolgt beispielsweise die Rekrutierung von mGBP7 in einer deutlich langsameren Kinetik als die mGBP2-Rekrutierung, auch wenn sie zu derselben PV rekrutiert werden [88]. Da zeitliche Unterschiede in der Rekrutierung ein Hinweis auf unterschiedliche Arten der Rekrutierung sein könnten, wurde auch die Dynamik der Rekrutierung von TOM1 im Vergleich zu mGBP7 untersucht. Hierfür wurden lebende mGBP7$^{-/-}$ MEFs verwendet, die sowohl GFP-getaggtes mGBP7 als auch mCherry-getaggtes TOM1.492 exprimieren. Diese Zellen wurden nach Stimulation mit IFN-γ mit *T. gondii* infiziert.
Der Verlauf der Infektion wurde über mehrere Stunden hinweg dokumentiert, von der Infektion, über die Rekrutierung der Proteine zur PV bis hin zur Ruptur der PV.
In fünf Fällen konnte eine Rekrutierung sowohl von TOM1 als auch von mGBP7 beobachtet werden (Abbildung 15 + Anhang 6). In einigen Fällen startete die Rekrutierung von TOM1 und mGBP7 zur *T. gondii* PV direkt nach der Infektion der Zelle (Abbildung 15 und Anhang 6C), in anderen Fällen begann die Rekrutierung einige Zeit später, zwischen 10 min (Anhang 6B) und 50 min (Anhang 6A) nach der Infektion der Zelle.

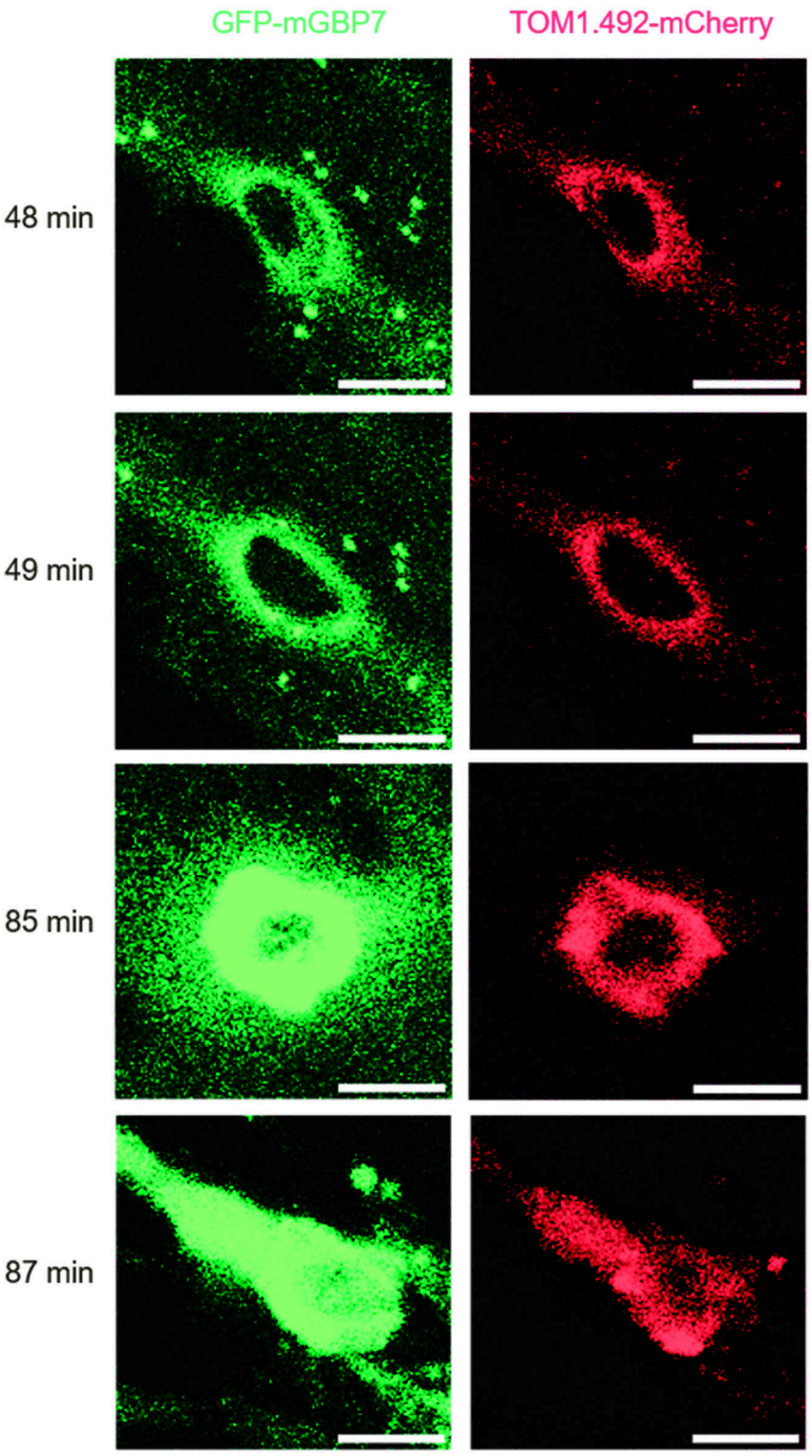


Abbildung 15: Lebendzellmikroskopie-Aufnahmen von mit *T. gondii* infizierten MEFs (mGBP7$^{-/-}$ + GFP-mGBP7 + TOM1.492-mCherry) zu verschiedenen Zeitpunkten; T=0 min: Zugabe der Parasiten zu dem Zellmedium, das erste Bild zeigt den Zeitpunkt der Infektion und den Beginn der Rekrutierung der Proteine zur PV, das zweite Bild zeigt die maximale Intensität der beiden Proteine an der PV, das dritte Bild zeigt die Deformation der PV, das vierte Bild zeigt die Zerstörung der *T. gondii* PV; Maßstabsbalken: 5 µm; Wiederholungsexperimente in Anhang 6.

Auch die auf die Rekrutierung folgende Ruptur der *T. gondii* PV fand zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt. Diese geschah z. B. in einem Experiment bereits 40 min nach der Infektion (Abbildung 15), in einem anderen Fall lagen mehr als anderthalb Stunden zwischen der Infektion der Wirtszelle durch den Parasiten und der Ruptur der PV (Anhang 6A).
In jedem der fünf Fälle, in denen eine Rekrutierung von sowohl von TOM1 als auch von mGBP7 beobachtet werden konnte, fand diese Rekrutierung jedoch zeitgleich statt, was ein Hinweis auf einen gemeinsamen Rekrutierungsmechanismus sein könnte.

4.3 Interaktionspartner von TOM1 im Kontext einer *T. gondii* Infektion

Um die Rolle von TOM1 in der Immunantwort auf eine *T. gondii* Infektion genauer zu ermitteln, wurde nach Proteinen gesucht, die im Kontext einer solchen Infektion mit TOM1 interagieren. Hierfür wurden MEFs verwendet, die HA-getaggtes TOM1 exprimieren, welches über eine mittels anti-HA Antikörpern durchgeführte Ko-IP aufgereinigt wurde. Das HA-Tag wurde anstelle eines Fluoreszenztags verwendet, da es deutlich kleiner ist und somit Protein-Protein-Interaktionen weniger beeinträchtigt. Um auszuschließen, dass die identifizierten Proteine mit den Linker-AS, (oder einer Kombination der Linker-AS mit den angrenzenden AS von TOM1 bzw. dem HA-Tag,) interagieren anstatt mit TOM1 selbst, wurde sowohl C-terminal- als auch N-terminal-getaggtes TOM1 verwendet. Zusätzlich musste beachtet werden, dass Proteine nicht nur aufgrund ihrer Interaktion mit TOM1, sondern auch wegen ihrer hohen intrazellulären Abundanz (z. B. ribosomale oder cytoskeletale Proteine, vgl. Abbildung 17 und Anhang 9) in den Eluat-Proben detektiert werden können. Um die potenziellen Interaktionspartner von TOM1 zu identifizieren mussten die Eluat-Proben der HA-getaggtes TOM1 exprimierenden MEFs mit Eluat-Proben einer anderen Zelllinie verglichen werden. Da es sich bei den HA-getaggtes TOM1 exprimierenden Zellen um ein Überexpressionssystem handelt sollte als Kontrolle ebenfalls ein Überexpressionssystem genutzt werden. Hierfür wurden TOM1.516-GFP exprimierende Zellen verwendet, die Larissa Legewie zuvor für konfokalmikroskopische Studien verwendet hatte [123].
Neben HA-getaggtem TOM1.492 sollte für die Ko-IP auch ein TOM1-Konstrukt verwendet werden, bei dem die ersten 162 AS des Proteins deletiert wurden, die die VHS-Domäne von TOM1 beinhalten [139]. Dieses Konstrukt wird im Folgenden als

TOM1.ΔVHS bezeichnet. Da TOM1 über seine VHS-Domäne ubiquitinierten Cargo erkennt und transportiert [141], könnte der Vergleich von potentiellen Interaktionspartnern von TOM1.492 und TOM1.ΔVHS während einer *T. gondii* Infektion Aufschluss über Rolle der Fähigkeit zur Cargo-Erkennung dieses Proteins in der Pathogenabwehr geben.

Tabelle 1: MS-Intensitäten für Myosin VI und TOLLIP, aus der MS-Analyse von Eluat-Proben einer mittels anti-HA Antikörpern durchgeführten Ko-IP

Protein	TOM1.ΔVHS-HA infiziert	TOM1.ΔVHS-HA uninfiziert	TOM1.516-GFP uninfiziert
Myosin VI	169 000 000	1 200 000 000	0
TOLLIP	3 370 200	934 190	0

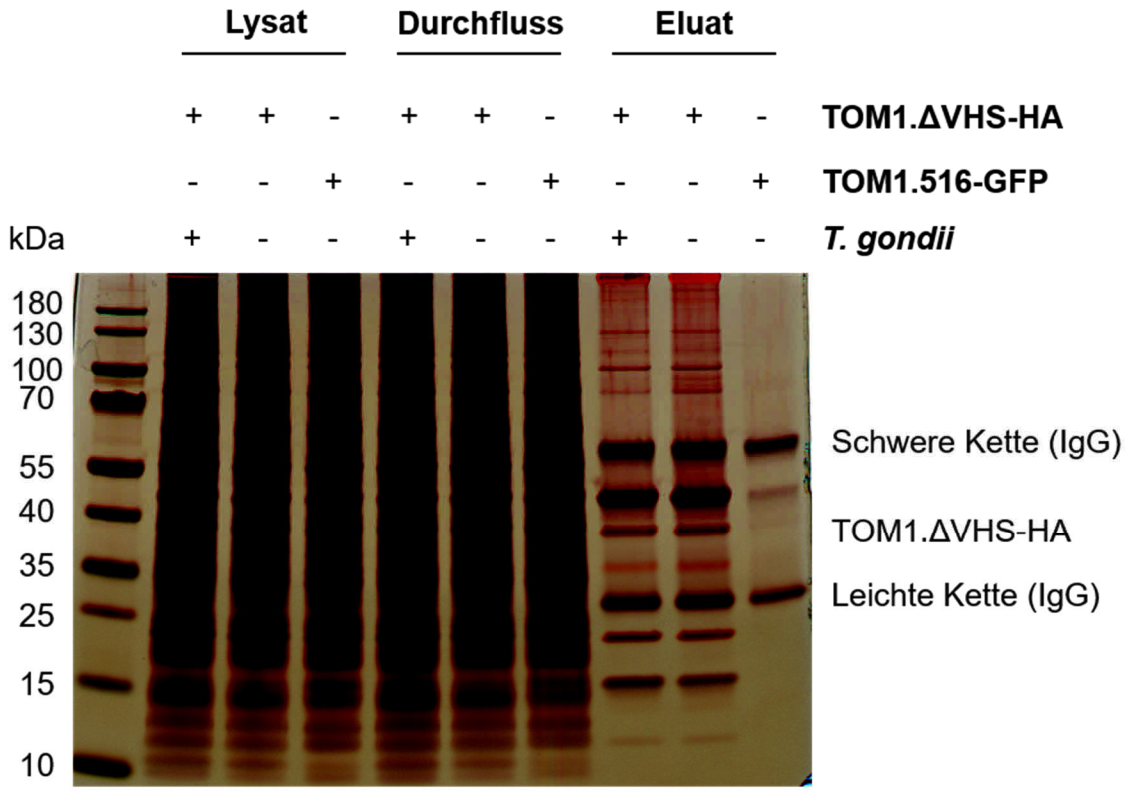


Abbildung 16: Silber-Gel von Proben einer mittels anti-HA Antikörpern durchgeführten Ko-IP; MEFs (WT + TOM1.ΔVHS-HA, bzw. WT + TOM1.516-GFP als Negativkontrolle) wurden mit *T. gondii* infiziert und 2,5 h später lysiert, bzw. uninfiziert lysiert; erwartete Proteingrößen: TOM1.ΔVHS-HA (37 kDa), IgG schwere Kette (50 kDa), IgG leichte Kette (25 kDa); Gel angefertigt von Gereon Poschmann (AG Stühler, BMFZ, HHU).

Da es früher verfügbar war als HA-getaggtes TOM1.492 wurde TOM1.ΔVHS-HA für die Etablierung der Ko-IP verwendet. Hierbei zeigte bereits ein erster Versuch, dass die Ko-IP unter den gewählten Bedingungen (3.2.8) prinzipiell funktioniert. So ist auf einem Silbergel von Proben der Aufreinigung (Abbildung 16) gut zu erkennen, dass in

den Eluatproben bedeutend geringere Proteinmengen vorhanden sind als in den Lysat- und Durchflussproben. Zusätzlich sind in der Eluatprobe der Negativkontrolle wie erwartet kaum Proteine zu erkennen, nur die Banden der anti-HA Antikörper (schwere und leichte Kette des Immunglobulin G (IgG)) sind gut sichtbar. Im Vergleich dazu sind in den Eluatproben mit HA-getaggtem TOM1 deutlich mehr Proteine zu erkennen. Zusätzlich dazu wurden in einer ersten MS-Analyse (durchgeführt von Gereon Poschmann (AG Stühler, BMFZ, HHU)) bereits bekannte Interaktionspartner von TOM1 wie TOLLIP und Myosin VI identifiziert (Tabelle 1). Diese waren ausschließlich in den Eluatproben mit TOM1.ΔVHS-HA vorhanden und konnten in der Negativkontrolle nicht detektiert werden.

Auch wenn die Ko-IP prinzipiell bereits funktionierte, stellten die starken Antikörper-Signale ein Problem bei der MS-Analyse der Eluat-Proben dar, da sie die Detektion anderer Proteine erschwerten. Diese Signale resultierten daraus, dass während der Elution die an die Agarose gebundenen anti-HA-Antikörper gemeinsam mit den gebundenen Proteinen von der Matrix gelöst wurden. Um dieses Problem zu umgehen wurden mildere Elutionsbedingungen gewählt: statt wie bisher bei 95 ℃ wurden die Proteine bei RT eluiert. Eine Untersuchung der Eluat-Proben mittels eines Silbergels wies darauf hin, dass diese Änderung durchaus Wirkung zeigte: In den Proben, die bei 95 ℃ eluiert wurden (Abbildung 17A), waren starke Antikörper-Banden (sowohl die schwere als auch die leichte Kette des IgGs) sichtbar. In den Proben, die bei RT eluiert wurden (Abbildung 17C), waren die Antikörper-Banden deutlich schwächer ausgeprägt. Zudem waren auch unter diesen milderen Elutionsbedingungen genug Proteine von der anti-HA-Agarose gelöst worden, um sie auf dem Silbergel zu detektieren. Der Vorteil der milderen Elution bei RT zeigte sich auch in der folgenden MS-Analyse. Während in den Proben, die bei 95 ℃ el uiert worden waren, IgG ca. 75 % der summierten Intensitäten ausmachte (Abbildung 17B), war dessen Anteil an den gemessenen Intensitäten der bei RT eluierten Probe deutlich geringer. Hier nahm IgG einen geringeren Anteil ein als ribosomale oder cytoskeletale Proteine der Probe (Abbildung 17D). Dadurch nahmen die Signale der mit TOM1 interagierenden Proteine, die durch die Ko-IP aufgereinigt wurden, im Verhältnis zu den IgG-Signalen zu, was deren Identifikation erleichterte. Für die folgenden Experimente wurde aus diesen Gründen die Elution bei RT angewendet.

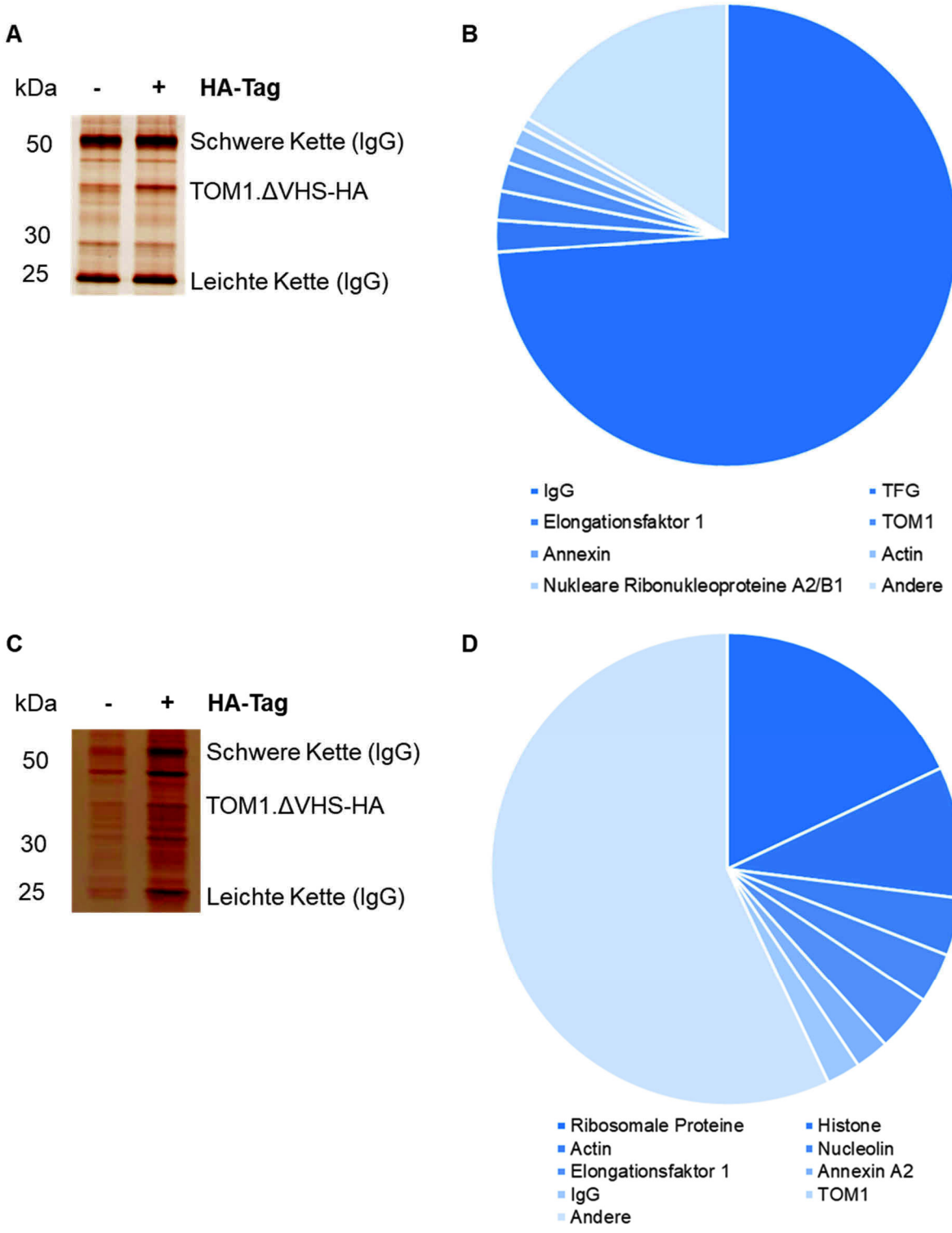


Abbildung 17: Vergleich der Elutionsmethoden einer mittels anti-HA Antikörpern durchgeführten Ko-IP; MEFs (WT + TOM1.ΔVHS-HA, bzw. WT + TOM1.516-GFP als Negativkontrolle) wurden mit *T. gondii* infiziert und 2,5 h später lysiert, bzw. uninfiziert lysiert; die Elution der Proteine erfolgte bei 95 ℃ (A+B) bzw. bei RT (C+D); A+C: Silber-Gel der Eluatproben; erwartete Proteingrößen: TOM1.ΔVHS-HA (37 kDa), IgG schwere Kette (50 kDa), IgG leichte Kette (25 kDa); Gele angefertigt von Gereon Poschmann (AG Stühler, BMFZ, HHU); B+D: Verteilung der gemessenen MS-Intensitäten der Proben aus A (B) bzw. C (D)

Bei jedem Ansatz zur Identifikation der Interaktionspartner von TOM1 wurde zuerst der Erfolg der anti-HA-Ko-IP mittels eines anti-HA Western-Blots überprüft (Abbildung 18, Anhang 7, Anhang 8) bevor die Eluat-Proben zur MS-Analyse übergeben wurden. Hierbei konnte sowohl für TOM1.ΔVHS als auch für TOM1.492 die Banden der HA-getaggten TOM1-Konstrukte beobachtet werden. Die theoretischen Größen dieser Proteine betrugen 37 kDa für TOM1.ΔVHS-HA (Abbildung 18A) bzw. 55 kDa für HA-getaggtes TOM1.492 (Abbildung 18B+C).

Für eine statistische Relevanz der Ergebnisse wurde die Ko-IP in fünf biologischen Replikaten durchgeführt. Die in der MS-Analyse identifizierten Proteine wurden von Gereon Poschmann mittels SAM (engl.: *significance analysis of microarrays*) [183] auf Unterschiede zwischen den verschiedenen Bedingungen hin untersucht. Hierbei wurden Proben aus infizierten MEFs, die HA-getaggtes TOM1 exprimieren mit Proben aus uninfizierten MEFs, die HA-getaggtes TOM1 exprimieren bzw. mit Proben aus infizierten MEFs, die TOM1.516-GFP exprimieren (Negativkontrolle) verglichen.

Die graphische Darstellung dieser Analysen als *Volcano-Plots* zeigt, dass für alle drei getesteten Konstrukte (TOM1.492-HA, HA-TOM1.492 und TOM1.ΔVHS-HA) viele der identifizierten Proteine aus dem Vergleich zwischen Proben aus infizierten MEFs und uninfizierten MEFs erwartungsgemäß aus *T. gondii* stammen (Abbildung 19, Anhang 10 Anhang 12). Diese Proteine wurden im Folgenden nur berücksichtigt, wenn sie auch im Vergleich zu der infizierten Negativkontrolle signifikant erhöht waren (Tabelle 3). Die vollständigen Listen der auf diese Weise identifizierten Proteine durch Ko-IP mit allen drei getesteten Konstrukten sind in Tabelle 2 und Tabelle 4 zu finden. Zusätzlich sind ausführlichere Listen der jeweils ersten 50 identifizierten Proteine (sortiert nach der berechneten Signifikanz) für die unterschiedlichen Konstrukte im Anhang in Tabelle 5 - Tabelle 7 zu finden.

Für alle drei Konstrukte wurden bei dem Vergleich der Proben aus infizierten, HA-getaggtes TOM1 exprimierenden MEFs mit Proben aus infizierten TOM1.516-GFP exprimierenden Zellen weniger signifikant erhöhte Proteine ermittelt (Abbildung 20, Anhang 11 + Anhang 13, Tabelle 2 - Tabelle 4), im Falle der Ko-IP mit TOM1.492-HA war neben TOM1 selbst nur TOLLIP signifikant erhöht.

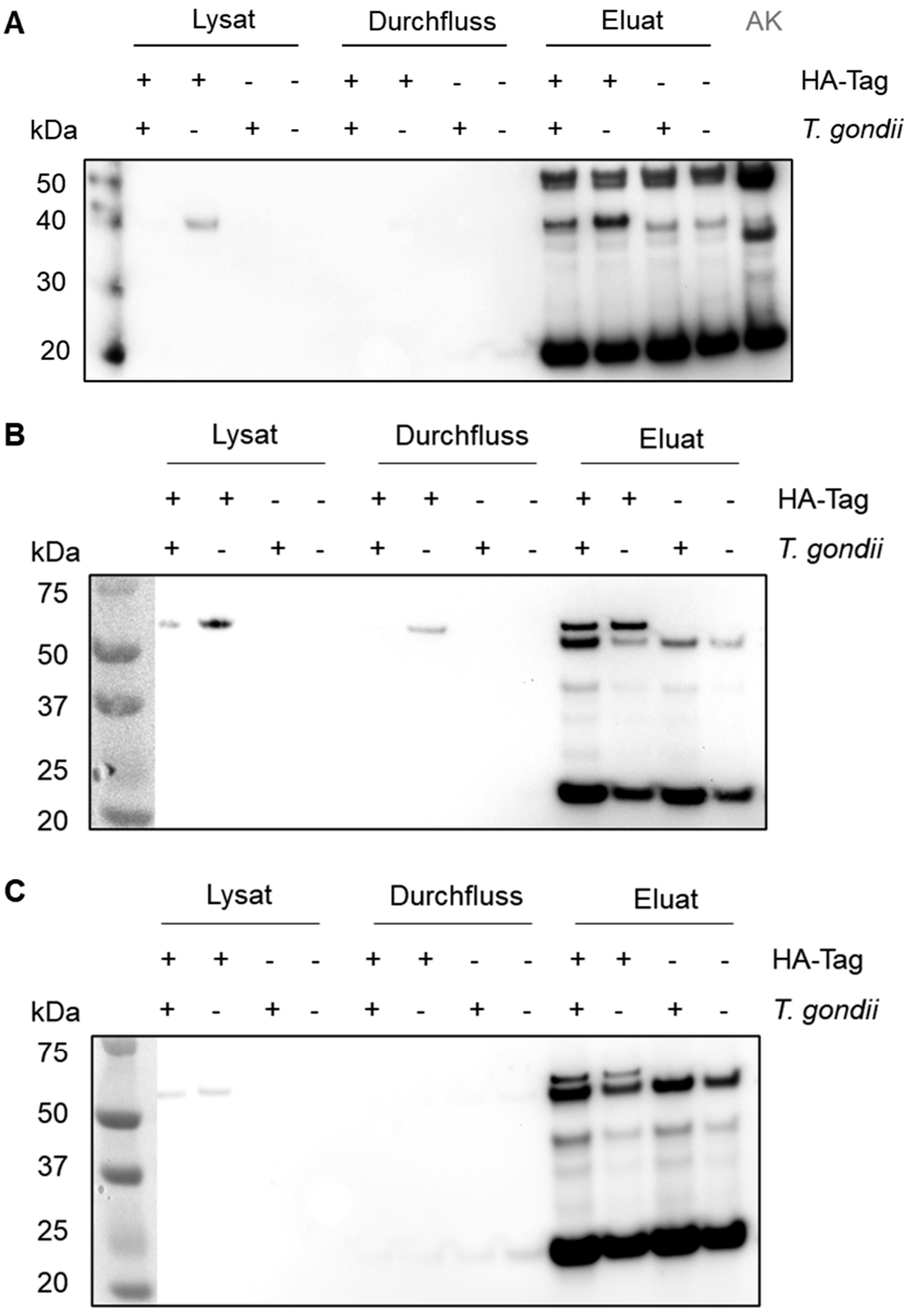


Abbildung 18: WBs von Proben einer mittels anti-HA Antikörpern durchgeführten Ko-IP; MEFs (WT + HA-getaggtes TOM1, bzw. WT + TOM1.516-GFP) wurden mit *T. gondii* infiziert und 2,5 h später lysiert, bzw. uninfiziert lysiert; Detektion der Proteine erfolgte mittels eines anti-HA-Antikörpers; AK: als Antikörperkontrolle wurden die für die Ko-IP verwendete Agarose auf das Gel aufgetragen A: MEF WT + TOM1.ΔVHS-HA; B: MEF WT + TOM1.492-HA (C-terminales Tag); C: MEF WT + HA-TOM1.492 (N-terminales Tag); erwartete Proteingrößen: TOM1.ΔVHS-HA (37 kDa), HA-getaggtes TOM1.492 (55 kDa), IgG schwere Kette (50 kDa), IgG leichte Kette (25 kDa); ungeschnittene WBs und Wiederholungsexperimente in Anhang 7 + 8.

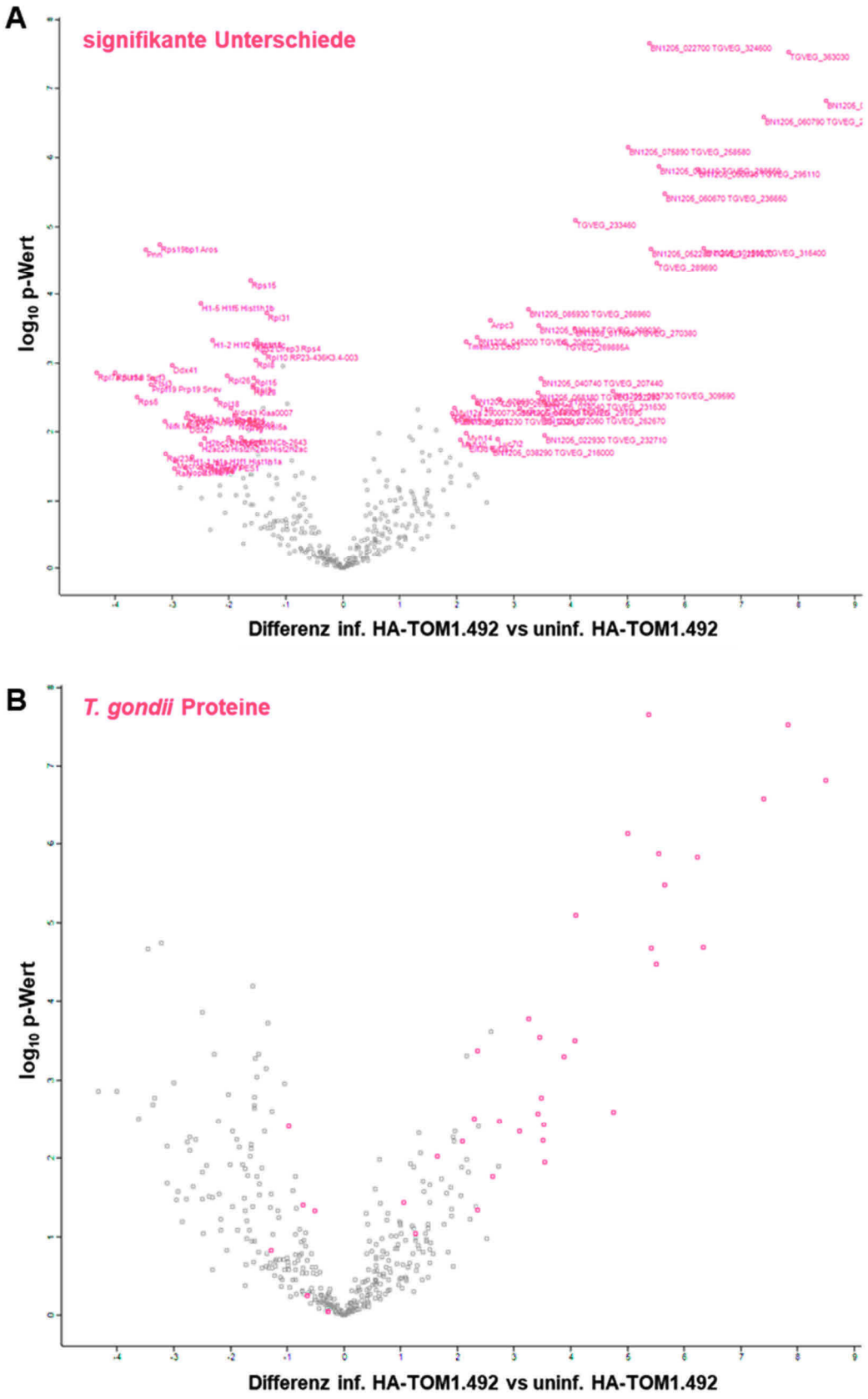


Abbildung 19: *Volcano-Plots* der in der MS-Analyse identifizierten Proteine; MEFs (WT + HA-TOM1.492, bzw. WT) wurden mit *T. gondii* infiziert und 2,5 h später lysiert, bzw. uninfiziert lysiert; Ko-IP erfolgte mittels anti-HA-Antikörpern; die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mittels SAM (engl.: *significance analysis of microarrays*) [183] durchgeführt; A: Proteine mit Accession Numbers mit signifikant unterschiedlichen Signalintensitäten sind in rot markiert; B: *T. gondii* Proteine sind in rot markiert.

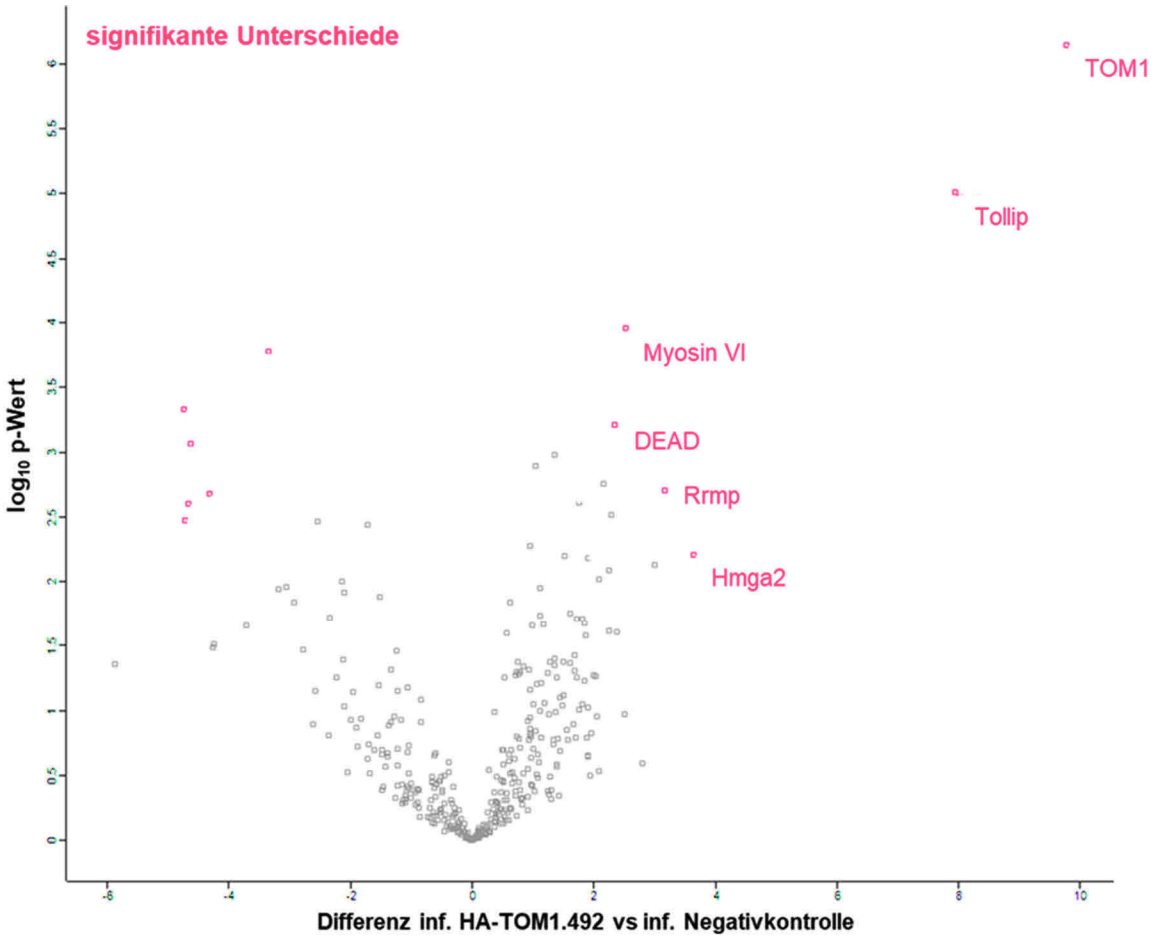


Abbildung 20: *Volcano-Plots* der in der MS-Analyse identifizierten Proteine; MEFs (WT + HA-TOM1.492, bzw. WT + TOM1.516-GFP als Negativkontrolle) wurden mit *T. gondii* infiziert und 2,5 h später lysiert; Ko-IP erfolgte mittels anti-HA-Antikörpern; die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mittels SAM (engl.: *significance analysis of microarrays*) [183] durchgeführt; Proteine mit signifikant unterschiedlichen Signalintensitäten sind in rot markiert.

Tabelle 2: Identifizierte Proteine mit signifikant erhöhten Signalintensitäten (engl. Namen) nach einer Ko-IP mit TOM1.492-HA (C-terminal getaggt)

Inf. TOM1.492-HA vs uninf. TOM1.492-HA	Inf. TOM1.492-HA vs inf. TOM1-GFP Kontrolle
Nucleolin	TOLLIP
Putative phospholipase B-like 2 (EC 3.1.1.-)	TOM1
Ribosomal proteins (L32, L36A, S2, S4, S7, S18, S26, S27, S30)	
Son DNA binding protein	
Tripeptidyl-peptidase 2 (EC 3.4.14.10)	
Vesicle-associated membrane protein, associated protein B and C	
Vesicle-associated membrane protein-associated protein A (VAMP-A)	

Tabelle 3: Identifizierte Proteine mit signifikant erhöhten Signalintensitäten (engl. Namen) nach einer Ko-IP mit HA-TOM1.492 (N-terminal getaggt)

Inf. HA-TOM1.492 vs uninf. HA-TOM1.492	Inf. HA-TOM1.492 vs inf. TOM1-GFP Kontrolle
Actin-related protein 2/3 complex subunit	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17) (TG)
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17 (TG)	High mobility group AT-hook 2
Myosin-10,12,14	Myosin VI
Poly(U)-binding-splicing factor PUF60	RNA recognition motif-containing protein (TG)
RNA recognition motif-containing protein (TG)	TOLLIP
Translin	TOM1
Zinc finger CCCH-type containing 18	

Tabelle 4: Identifizierte Proteine mit signifikant erhöhten Signalintensitäten (engl. Namen) nach einer Ko-IP mit TOM1.ΔVHS-HA

Inf. TOM1.ΔVHS -HA vs uninf. TOM1.ΔVHS-HA	Inf. TOM1.ΔVHS-HA vs inf. TOM1-GFP Kontrolle
Annexin A2 (Annexin II)	Hepatoma-derived growth factor-related protein 3 (HRP-3)
Cellular communication network factor 2	TOLLIP
DnaJ homolog subfamily C member 10 (EC 1.8.4.-)	TOM1
Erythrocyte membrane protein band 4.1 like 1	WD repeat-containing protein 6 (mWDR6)
Gremlin-1	
Histone H1.0	
Junction plakoglobin (Desmoplakin III)	
Magnesium transporter 1 (MagT1)	
Peflin	
Pinin	
Programmed cell death protein 6 (ALG-257)	
Son DNA binding protein	
Thioredoxin (Trx) (ATL-derived factor)	
Transcription factor JunB (MyD21)	
Unconventional myosin-Ie	
WD repeat-containing protein 6 (mWDR6)	

Das einzige Protein, dass auf diese Weise konsistent in den Proben mit HA-getaggten TOM1 im Vergleich zu den Proben der Negativkontrolle erhöht war, war TOLLIP, ein bereits bekannter Interaktionspartner von TOM1 [128]. Im Vergleich zwischen infizierten und nicht infizierten Proben ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen.

Da TOLLIP auch während einer *T. gondii* Infektion weiterhin mit TOM1 interagiert, wurde untersucht, ob TOLLIP ebenfalls zur *T. gondii* PV rekrutiert wird und sogar mit TOM1 kolokalisiert. Hierfür wurden TOM1.492-mCherry exprimierende MEFs verwendet. Diese wurden mit *T. gondii* infiziert und fixiert. Nach einer Färbung mit anti-TOLLIP-Antikörpern war zu erkennen, dass TOLLIP in der Tat an der PV mit TOM1 kolokalisiert (Abbildung 21). Ein Test des Fluorophor-konjugierten Sekundärantikörpers (Anhang 14) ergab, dass dieser nicht unspezifisch bindet und die Färbung tatsächlich auf die Anwesenheit von TOLLIP gemeinsam mit TOM1 an der *T. gondii* PV hindeutet.

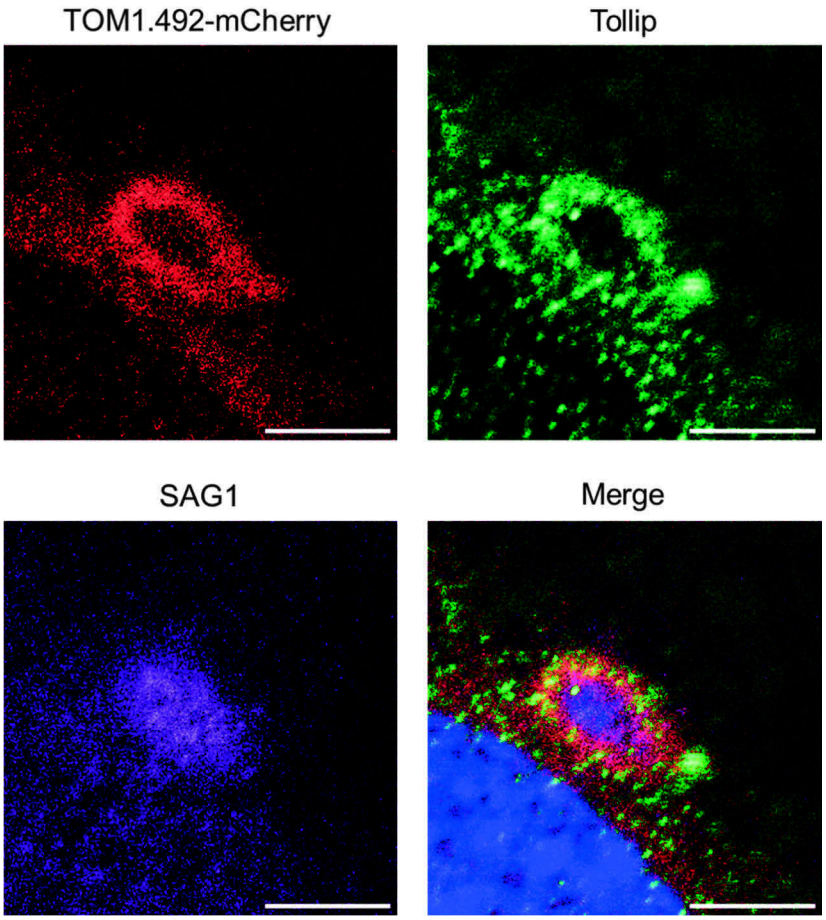


Abbildung 21: Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von mit *T. gondii* infizierten MEFs (WT + TOM1.492-mCherry) 2,5 h nach der Infektion, immunfluoreszenzgefärbt mit anti-SAG1- und anti-TOLLIP-Antikörpern, Maßstabsbalken: 5 µm

4.4 Einfluss von TOM1 auf die *T. gondii* Proliferation

Um den Einfluss von TOM1 auf die Proliferation von *T. gondii* zu untersuchen wurden Luciferase exprimierende *T. gondii* verwendet [184]. Über die gemessene Enzym-Aktivität der Luciferase in den Zelllysaten konnten so Rückschlüsse auf die Menge der vorhandenen Parasiten gezogen werden.

Ein erster Test in WT MEFs (Abbildung 22A) zeigte, dass dieser Proliferations-Assay prinzipiell funktioniert. Luciferase-Aktivität wurde nur in den Proben gemessen, in den die Luciferase-exprimierenden *T. gondii* auch vorhanden waren. Zusätzlich war die Luciferase-Aktivität wie erwartet in den MEFs, die 16 h vor der Infektion mit IFN-γ stimuliert worden waren, deutlich geringer als in den unstimulierten MEFs.

Als nächstes wurde die Lagerstabilität der Luciferase getestet. Dafür wurde Luciferase-Aktivität am Tag der Zelllyse der infizierten Zellen mit der Aktivität derselben Lysate nach Lagerung bei –20 ℃ verglichen. Nach einer Lag erungsdauer von einem Tag (Abbildung 22B) lag die gemessene Luciferase-Aktivität noch bei ca. 90 % des Ausgangswertes, während nach einer Lagerung von drei Wochen bei –20 ℃ noch 70 % der ursprünglichen Aktivität vorhanden waren. Die Aktivität bleibt demnach auch nach mehrwöchiger Lagerung größtenteils erhalten.

Die deutlichen Unterschiede in der gemessenen relativen Aktivität in den stimulierten und infizierten Proben in Abbildung 22 B+C unterstreicht die Notwendigkeit biologischer Replikate für die Auswertung dieses Assays. Für die Lagerungsstabilität waren 8 technische Replikate, jedoch keine biologischen Replikate verwendet worden. Da die Assays an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden sind so deutliche Unterschiede in der relativen Aktivität für die infizierten und stimulierten Proben sichtbar. Für folgende Assays sind biologische Replikate essenziell, um natürliche Schwankungen in der *T. gondii*-Proliferation abzudecken.

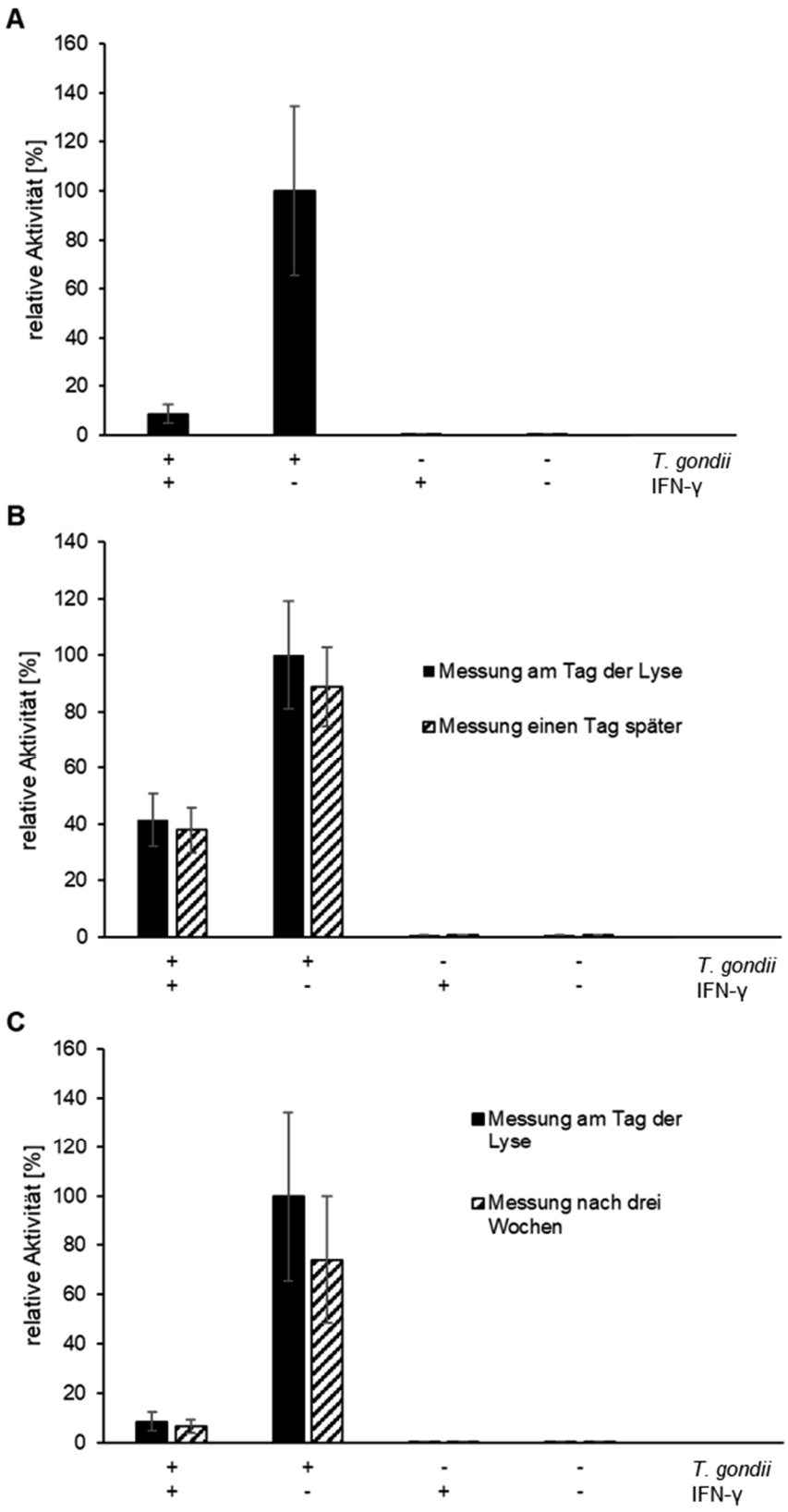


Abbildung 22: *T. gondii* Proliferations-Assay, WT MEFs wurden mit Luciferase-exprimierenden *T. gondii* infiziert und für 48 h inkubiert, anschließend wurde die Luciferase-Aktivität gemessen; A: Test des Luciferase-Assays, B: Vergleich der Luciferase Aktivität nach einem Tag Lagerung des Lysats bei –20 ℃ mit der Aktivität ohne Zwischenla gerung, C: Vergleich der Luciferase Aktivität nach drei Wochen Lagerung des Lysats bei –20 ℃ mit der Aktivität ohne Zwischenlagerung; die Balken stellen die Mittelwerte aus jeweils 8 technischen Replikaten mit ihrer Standardabweichung dar.

Auf Basis dieser Erkenntnisse konnte der Assay verwendet werden, um die Proliferation von *T. gondii* in verschiedenen Zelllinien zu vergleichen. Um den Einfluss von TOM1 auf die *T. gondii* Proliferation zu untersuchen wurden MEFs infiziert, die aus einer TOM1$^{\Delta/\Delta}$ Maus (homozygot) isoliert worden waren. Diese Mauslinie war durch Kreuzung von Cre-Rekombinase-exprimierenden Mäusen mit Mäusen generiert worden, die zwei loxP-Sequenzen im *tom1*-Gen tragen. Diese loxP-Stellen flankieren den Bereich von Exon 7 bis Exon 9 des Gens, der für die GAT-Domäne von TOM1 kodiert. Da diese Domäne für die funktionsrelevanten Interaktionen von TOM1 verantwortlich ist, führt diese Deletion zum Funktionsverlust von TOM1 in den entsprechenden Mäusen. Als Kontrolle wurden MEFs verwendet, die aus WT Mäusen desselben Wurfs isoliert wurden. Um sicherzustellen, dass mögliche Unterschiede nicht auf der Inserierung der loxP-Stellen beruhen, wurden als Kontrolle MEFs verwendet, die aus den parentalen 2loxP-Mäusen (homozygot) isoliert wurden.

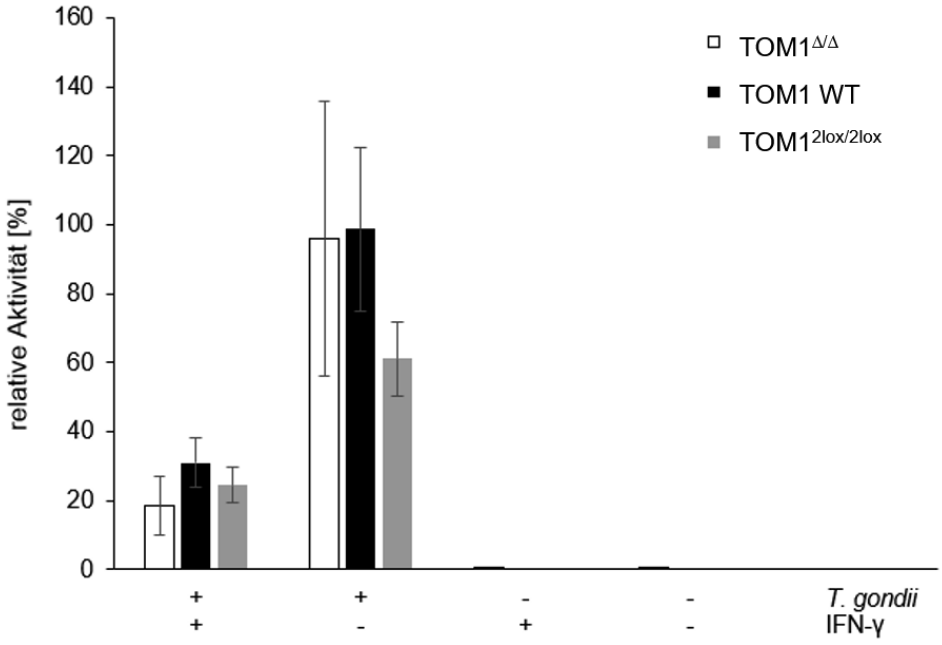


Abbildung 23: *T. gondii* Proliferations-Assay, MEFs (TOM1 WT, TOM1$^{2lox/2lox}$ und TOM1$^{\Delta/\Delta}$) wurden mit Luciferase-exprimierenden *T. gondii* infiziert und für 48 h inkubiert, anschließend wurde die Luciferase-Aktivität gemessen; die Balken stellen die Mittelwerte aus jeweils 8 technischen Replikaten aus zwei Experimenten mit ihrer Standardabweichung dar. Die Unterschiede der gemessenen Luciferase-Aktivitäten der einzelnen Zelllinien waren nicht signifikant.

Die Unterschiede der gemessenen Luciferase-Aktivitäten der einzelnen Zelllinien waren nicht signifikant, wobei durch die verhältnismäßig großen Standardabweichungen weitere Experimente sinnvoll wären, um dieses Ergebnis zu verifizieren.

5 Diskussion

mGBPs spielen in der Immunantwort auf Infektionen durch diverse Erreger (Bakterien, Viren und Parasiten) eine zentrale Rolle [82, 112, 120]. Im Falle eine Infektion mit dem Parasiten *T. gondii* wurde einer *in vivo* Studie belegt, dass mGBP7 eine essentielle Funktion bei der Abwehr dieser Erreger ausübt [88]. Da mGBP7 diese wichtige Funktion aller Wahrscheinlichkeit nach im Zusammenspiel mit anderen Proteinen ausübt, wurden in einer vorangegangenen Arbeit Interaktionspartner von mGBP7 im Zuge einer *T. gondii*-Infektion ermittelt [123]. Unter den identifizierten potentiellen Interaktionspartnern ist TOM1, ein Adapterprotein, aufgrund seiner Rolle im endosomalen Proteintransport von besonderem Interesse [124]. Die genauere Untersuchung der Interaktion von TOM1 und mGBP7 lieferte erste Hinweise auf die Mechanismen dieser beiden Proteine in der Immunantwort auf eine *T. gondii*-Infektion.

5.1 In MEFs exprimiertes TOM1

Durch mRNA-Isolation und cDNA-Synthese konnte bestätigt werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten WT MEFs das 492 AS lange TOM1 (TOM1.492) exprimieren, während die 516 AS lange potentielle Isoform nicht nachgewiesen werden konnte. Dies passt zu den Ergebnissen vorheriger Studien, in denen Thymusgewebe [181] bzw. Zellen des Dickdarms [182] verwendet wurden. Auch in diesen konnte ausschließlich das 492 AS lange TOM1 nachgewiesen werden.

5.2 Die Interaktionsdomäne von mGBP7

In dieser Arbeit wurden die Domänen von mGBP7 identifiziert, die für die Interaktion mit TOM1 verantwortlich sind, um so genauere Einblicke in das Zusammenspiel dieser beiden Proteine in der *T. gondii* Abwehr zu erhalten. Hierbei zeigten Experimente mit Trunkationsmutanten, dass die Bindung von TOM1 an die einzelne G-Domäne bzw. in geringerem Maße an die M- und E-Domäne von mGBP7 stärker war als an das vollständige Protein. Zudem schien die Bindung im Zuge der Infektion schwächer zu sein als in den uninfizierten Proben.

Dies könnte möglicherweise darauf hindeuten, dass die Bindung dieser beiden Proteine aneinander primär im Zytosol und nicht an der *T. gondii* PV stattfindet. Da die

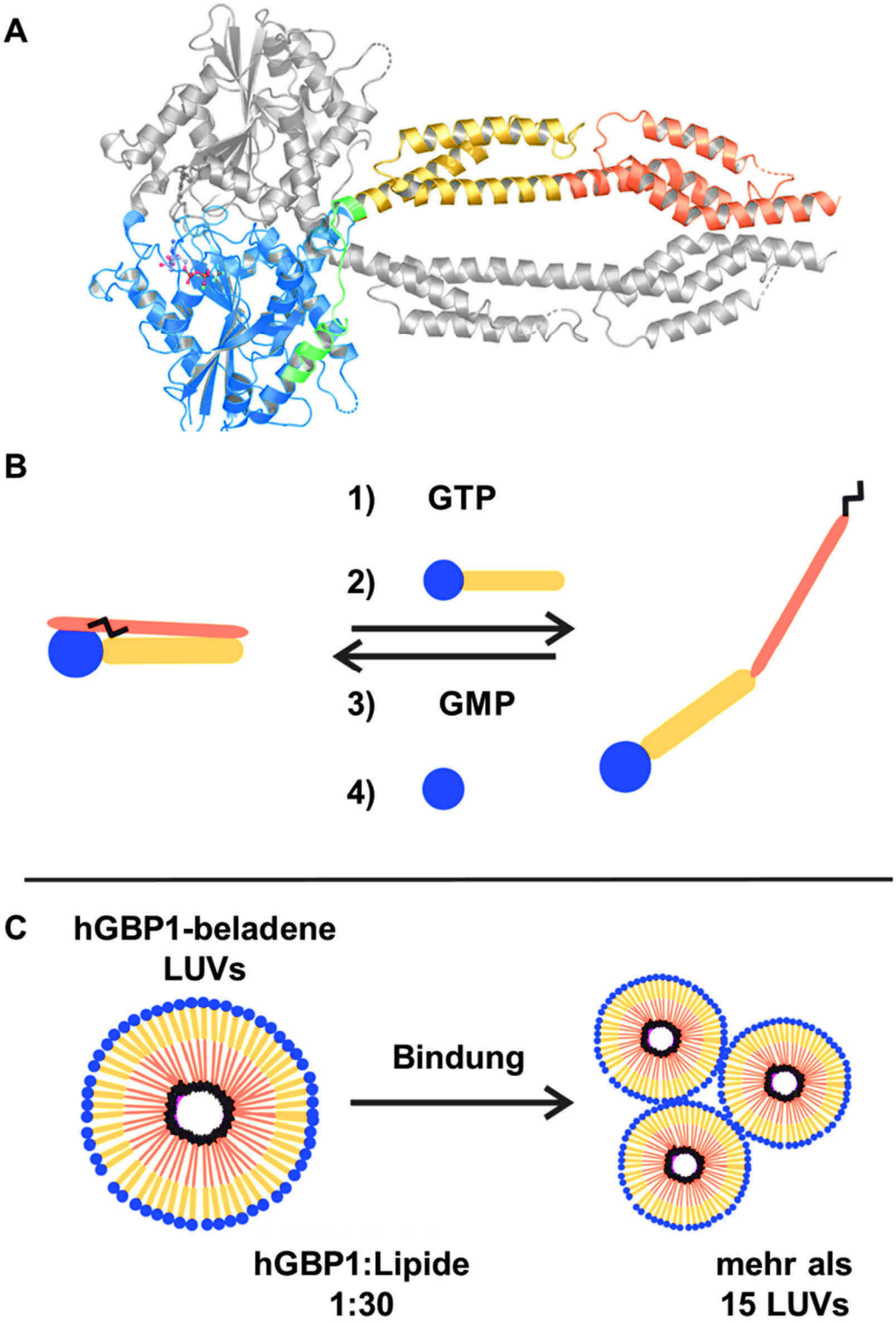


Abbildung 24: Öffnung von hGBPs zur Dimerbildung und Bindung an Membranen; A: Kristallstruktur von hGBP5 im Komplex mit GDP · AlF_3,blau: G-Domäne, grün: Übergang zwischen den Domänen, gelb/orange: ME- Domäne, grau: Dimerpartner; B: die Öffnung des Proteins wird begünstigt durch die Anwesenheit von 1) GTP, 2) die Unterstützung eines hGBP1 Dimer-Partners, der mindestens die G- und M-Domäne enthält, die Schließung des Proteins wird begünstigt durch 3) die Abwesenheit eines Nukleotids oder die Anwesenheit von GMP, 4) die Formation eines Dimers mit einem Partner, dem die M-Domäne fehlt, blau: G-Domäne, gelb: M-Domäne, orange: E-Domäne; C: hGBP1-beladenes Vesikel (nicht maßstabsgetreu: hGBP1 hat eine Länge von 30 nm und das Vesikel hat einen Durchmesser von 200 nm), die beladenen Vesikel binden durch Kontakt der G-Domänen aneinander und können so Aggregate von mehr als 15 Vesikeln erreichen, Farbgebung wie in B; modifiziert nach [185, 186]

Bindungsexperimente im Kontext einer *T. gondii*-Infektion durchgeführt wurden, assemblierte dass vollständige mGBP7 (u.a. mit anderen mGBPs) zu großen Oligomeren Komplexen an der PV [82].
In diesen Komplexen könnte die Bindung an TOM1 gestört sein. Die einzelne G-Domäne von mGBP7 kann jedoch nicht an Membranen assoziieren, da die 49 C-terminalen AS des Proteins, die für diese Funktion essentiell sind, fehlen [89]. Das Konstrukt aus M- und E-Domäne kann zwar an die PV binden, aber ohne die G-Domäne ist die Fähigkeit des Proteins zur Dimer- bzw. Oligomerbildung stark beeinträchtigt [82]. Dadurch könnten diese Trunkationsmutanten zugänglicher für die Bindung an TOM1 bleiben.
Weitere Hinweise auf eine verringerte Zugänglichkeit von mGBP7 an der PV wurden durch Studien zur Dimer- bzw. Multimerbildung von hGBPs geliefert. Hierbei wurde für hGBP5 über eine Kristallstruktur ermittelt, dass die Dimerbildung im geöffneten Zustand des Proteins stattfindet (Abbildung 24A) [185]. Die G-Domänen der beiden Proteine binden in Gegenwart eines Nukleotids aneinander und verschränken ihre M- und E-Domänen miteinander. Eine weitere Studie zu hGBP1 zeigte darüber hinaus, dass auch dieses Protein sich in Anwesenheit eines Nukleotids bzw. eines Dimerpartners öffnet, und dass es in diesem geöffneten Zustand an Membranen bindet (Abbildung 24B+C) [186]. Aufgrund der großen Homologie der GBPs untereinander ist es durchaus möglich, dass auch mGBP7 im geöffneten Zustand Dimere bzw. Multimere bildet und an Membranen bindet [86]. Da auch Bereiche der M- und/oder E-Domäne an der Bindung an TOM1 beteiligt zu sein scheinen, könnte diese Art der Membranbindung die verringerte Bindung von TOM1 an das vollständige mGBP7 im Zuge einer *T. gondii*-Infektion erklären. Dieses Indiz, dass die Interaktion der beiden Proteine vor allem im Zytosol stattfindet, könnte Hinweise auf eine gemeinsame Rekrutierung zur PV liefern.

5.3 Rekrutierung von mGBP7 und TOM1 zu der *T. gondii* PV

Um die Interaktion zwischen TOM1 und mGBP7 genauer zu verstehen, wurden in dieser Arbeit die Kolokalisationsrate dieser beiden Proteine sowie die Dynamik ihrer Rekrutierung zur *T. gondii* PV ermittelt.
In vorherigen Studien war bereits die Kolokalisation von mGBP7 mit anderen mGBPs untersucht worden [88]. Hierbei wurde mittels Konfokalmikroskopie festgestellt, dass mGBP7 und mGBP3 in denselben VLS in uninfizierten Zellen lokalisiert sind. Zu einem

deutlich geringeren Anteil konnte mGBP7 in mGBP1-, mGBP2- oder mGBP6-positiven Kompartimenten nach IFN-γ-Stimulation gefunden werden. Im Zuge einer *T. gondii*-Infektion konnte eine Kolokalisation der vier getesteten mGBPs mit mGBP7 nachgewiesen werden. [88].
Auch für TOM1 war bereits festgestellt worden, dass es mit mGBP7 an der PV kolokalisiert, aber die Rate war nicht bestimmt worden [123]. In dieser Arbeit konnte ermittelt werden, dass sowohl mGBP7 als auch TOM1 häufiger gemeinsam an einer PV gefunden werden können als dass sie alleine zu einer *T. gondii* PV rekrutieren. Die Rekrutierungsrate von mGBP7 zur PV stimmt mit 40 - 50 % mit der Rate vorheriger Studien überein [88]. Die häufige gemeinsame Rekrutierung von TOM1 und mGBP7 zur *T. gondii* PV könnte auf einen gemeinsamen Mechanismus der Rekrutierung hindeuten.
Neben der Rate der Rekrutierung dieser beiden Proteine wurde in dieser Arbeit auch die Dynamik der Assemblierung von mGBP7 und TOM1 an der *T. gondii* PV ermittelt. Hierbei konnte in fünf Lebendzellmikroskopie-Aufnahmen beobachtet werden, dass TOM1 und mGBP7 nahezu zeitgleich an die PV rekrutieren.
In einer früheren Studie war bereits die Dynamik der Rekrutierung von mGBP7 mit der von mGBP2 und mGBP3 verglichen worden [88]. Hierbei war für mGBP2 eine deutlich schnellere Rekrutierung zur *T. gondii* PV ermittelt worden, während die Rekrutierung von mGBP7 zeitlich verzögert erfolgte. Für mGBP3, mit dem mGBP7 bereits in den VLS eine nahezu vollständige Kolokalisation ermittelt wurde, konnte eine Korekrutierung zur *T. gondii* PV beobachtet werden. Da die Abwesenheit von mGBP7 die Rekrutierung von mGBP3 zur PV nicht beeinträchtigte, scheinen diese Proteine einen gemeinsamen, aber nicht von mGBP7 abhängigen Mechanismus der Rekrutierung zu besitzen [88]. Die hier beobachtete Korekrutierung von mGBP7 und TOM1 könnte darauf hindeuten, dass TOM1 an der Rekrutierung von mGBP7 und evtl. auch mGBP3 zur *T. gondii* PV beteiligt ist, auch wenn noch weitere Untersuchungen nötig sind, um diese Theorie zu festigen.

5.4 Die Rolle von TOM1 in der *T. gondii* Abwehr

Um die Funktion von TOM1 in der Immunantwort auf eine *T. gondii*-Infektion besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit weitere Interaktionspartner von TOM1 im Kontext dieser Infektion gesucht. Hierbei war TOLLIP das einzige Protein, das in den infizierten Proben im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant erhöht war. Zudem konnte

in dieser Arbeit gezeigt werden, dass TOLLIP mit TOM1 an der *T. gondii* PV kolokalisiert. TOLLIP ist ein gut untersuchtes und vielseitiges Protein, das verschiedene Funktionen im Zuge einer *T. gondii*-Infektion erfüllen könnte.

So erfüllt TOLLIP einigen Studien zufolge regulierende Funktionen in der Immunantwort auf Pathogene. Hierbei kontrolliert TOLLIP die MyD88-abhängigen NF-κB-aktivierenden Signalwege auf zwei unterschiedlichen Ebenen. Einerseits bindet TOLLIP an IL-1R, TLR2 und TLR4 nach einer Aktivierung durch LPS, wodurch die TLR-vermittelten Immunantworten inhibiert werden [187, 188]. Diese Bindung beruht auf einer Interaktion der CUE (engl.: *coupling of ubiquitin to endoplasmic reticulum degradation*)-Domäne von TOLLIP mit der intrazellulären Toll-Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne der TLRs, über die nachfolgenden Signalwege vermittelt werden [189, 190]. Zweitens bindet TOLLIP direkt an die Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte-Kinase (IRAK-1), die zusammen mit IRAK-2 und IRAK-4 an der MyD88-abhängigen Aktivierung proinflammatorischer Signale über NF-κB beteiligt sind (Abbildung 25) [191, 192]. Hierbei scheinen IRAK-1 und IRAK-2 redundante Rollen zu erfüllen [193]. Diese Bindung inhibiert die Autophosphorylierung von IRAK-1, fördert aber nicht dessen Abbau [188, 190, 194]. Eine Bindung von TOLLIP an IRAK-2 konnte ebenfalls beobachtet werden [190]. Die modulierende Rolle von TOLLIP in der Immunantwort konnte auch durch die Tatsache bestätigt werden, dass dessen Überproduktion zu der Inhibierung von TLR2, TLR4 und IL-1R Signalwegen führt [188, 195, 196]. TLR2 und TLR4 spielen vermutlich beide eine Rolle in der Erkennung einer *T. gondii*-Infektion. Sie werden u.a. durch GPI-Anker aktiviert, die auf der Zelloberfläche mehrerer Protozoenparasiten, einschließlich *T. gondii*, zu finden sind [49, 197]. Darüber hinaus können TLR2 und TLR4 durch das Hitze-Schock Protein 70 (HSP70) dieses Parasiten aktiviert werden [198]. Allerdings wiesen TLR2 defiziente Mäuse nur eine Anfälligkeit für eine Infektion mit hohen Dosen von *T. gondii* auf, während die Abwesenheit von TLR4 scheinbar keinen Effekt auf die Wirtsresistenz oder die Zytokinproduktion in Antwort auf eine *T. gondii*-Infektion hat [199, 200]. Aus diesen Gründen ist die Relevanz von TLR2 und TLR4 in der Immunantwort auf *T. gondii* unsicher.

Neben seiner Funktion in MyD88-abhängigen Signalwegen spielt TOLLIP auch eine große Rolle im Proteintransport. In Kooperation mit seinem Interaktionspartner TOM1 transportiert es Cargo als Teil der ESCRT-Maschinerie [162, 163]. Diese Fähigkeit kann von intrazellulären Pathogenen zur Immunsuppression genutzt werden.

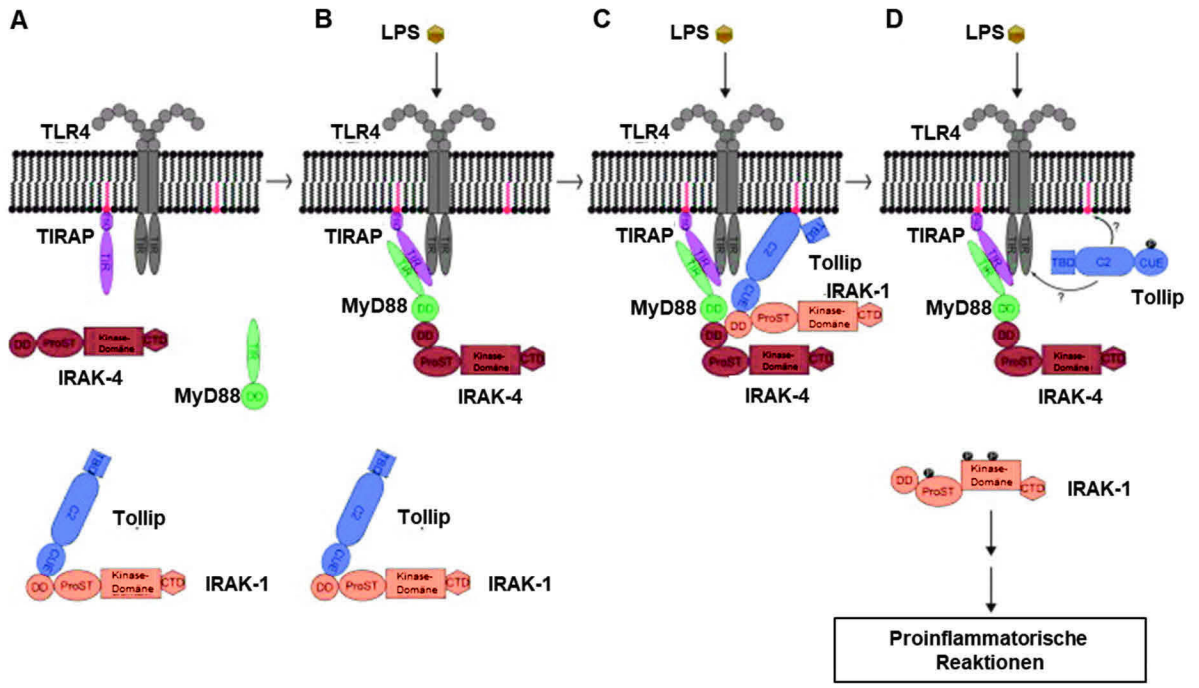


Abbildung 25: Vermutete Rolle von TOLLIP in der MyD88-abhängigen Aktivierung proinflammatorischer Reaktionen; in ruhenden Zellen (z. B. bei inaktivem TLR4) bindet TOLLIP IRAK-1 (für IRAK-2 gilt dieses Modell ebenfalls) im Zytosol und hält die Kinase in einer inaktiven Konformation, diese Bindung wird durch die TOLLIP-CUE-Domäne und die IRAK-1-DD (engl.: *death domain*) vermittelt. Sowohl inaktives MyD88 als auch IRAK-4 scheinen ebenfalls zytosolisch vorzuliegen, während TIRAP durch Phosphoinositidbindung (z. B. PtdIns(4,5)P2; rot markiert) an die Plasmamembran gebunden bleibt; B: Sobald TLR4 auf der Zelloberfläche aktiviert wird (z. B. durch bakterielles LPS), interagiert MyD88 über TIR–TIR-Wechselwirkungen mit TIRAP. TIRAP dient hierbei als Brückenadapterprotein, über das MyD88 mit dem aktivierten TLR4 in Kontakt treten kann. MyD88 rekrutiert daraufhin IRAK-4; C: Die Bindung von IRAK-4 an MyD88 führt zur Rekrutierung von TOLLIP-IRAK-1-Komplexen in die räumliche Nähe der TLR4-TIR-Domäne. IRAK-4 und IRAK-1 interagieren über ihre DDs miteinander. Diese Interaktion wird durch die Fähigkeit der TOLLIP-C2-Domäne stabilisiert, an die Phosphoinositide der Plasmamembran binden; D: Die gleichzeitige Assoziation von IRAK-1 an MyD88, IRAK-4 und TOLLIP fördert sowohl die IRAK-4-vermittelte Phosphorylierung von IRAK-1 als auch die Autophosphorylierung der Kinase- und ProST-Domänen von IRAK-1. Nach einer IRAK-1-vermittelten Phosphorylierung der TOLLIP-CUE-Domäne wird IRAK-1 aus dem Komplex freigesetzt und signalisiert nachgeschalteten Effektoren proinflammatorische Reaktionen. Phosphoryliertes TOLLIP kann frei oder membrangebunden vorliegen. Da TOLLIP LPS-aktivierte TLRs hemmt, ist es plausibel, dass die Phosphorylierung von TOLLIP für die Bindung an den aktivierten Rezeptor und die Modulation des Ausmaßes proinflammatorischer Reaktionen erforderlich ist; modifiziert nach Capelluto et al., 2012 [163]

So internalisiert TOLLIP im Zuge einer *L. donovani*-Infektion von Makrophagen vermehrt IL-1R1 in lysosomale Kompartimente und erleichtert so das Überleben des Pathogens [178].

TOLLIP vermittelter Membran-Transport scheint auch bei dem Rac1 abhängigen Eindringen uropathogener *E. coli* in die Epithelzellen der Harnblase eine Rolle zu spielen. Hierbei bindet TOLLIP sowohl Rac1 als auch dessen ubiquitinierte Form in einem Komplex mit TOM1 und Clathrin. In Abwesenheit von TOLLIP wurde eine verringerte Rac1 abhängige bakterielle Internalisierung beobachtet, was darauf hindeutet, dass

TOLLIP für die Invasion der Wirtszellen durch uropathogener *E. coli* erforderlich ist. [177]

Andererseits könnte die Fähigkeit von TOM1 und TOLLIP zum Transport von ubiquitinierten Proteinen auch der Immunantwort auf eine *T. gondii*-Infektion dienen. So ist für mehrere mGBPs, einschließlich mGBP7, bekannt, dass sie bereits unabhängig von dieser Infektion ubiquitiniert werden [123, 201]. Solche Modifikationen können die Aktivität der Proteine sowie ihre Lokalisation in der Zelle verändern oder zum Abbau der ubiquitinierten Proteine führen [202, 203]. Für mGBP1 konnten 10, für mGBP2 sogar 25 ubiquitinierte Lysine identifiziert werden [201]. Im Zuge einer *Shigella flexneri*-Infektion konnte beobachtet werden, dass dessen Ubiquitin E3-Ligase humanes GBP1 ubiquitiniert und so dessen Abbau beschleunigt. Dadurch wird die Fähigkeit von hGBP1, die Aktin-basierte Mobilität des Bakteriums zu inhibieren, stark eingeschränkt [204, 205]. Ob eine derartige Ubiquitinierung auch durch *T. gondii*-Ligasen erfolgt ist bisher unbekannt, allerdings ist es wahrscheinlicher, dass die Ubiquitinierung der mGBPs als vorbereitender Schritt zu deren Relokalisation zur PV dient, da sie bereits vor der Infektion stattfindet [201]. Diese Vermutung wird durch eine Studie unterstützt, die auf eine p62/SQSTM1-abhängige Rekrutierung von mGBP1 und mGBP2 zur *T. gondii* PV hindeutet [206]. Da TOM1, und vermutlich auch TOLLIP, in Kooperation mit Myosin VI sowohl an Autophagosomen lokalisieren, als auch am Cargotransport entlang der Aktinfilamente beteiligt ist, könnten sie die Verbindungsstelle zwischen diesen bereits untersuchten Autophagieproteinen und den mGBPs darstellen [132, 156, 168]. Auf diese Weise könnten TOM1 und TOLLIP Teil des Rekrutierungsmechanismus der mGBPs zur *T. gondii* PV sein, auch wenn noch weitere Studien nötig sind, um die Funktion dieser beiden Proteine im Kontext einer *T. gondii*-Infektion eindeutig zu bestimmen.

Interessanterweise wurde kaum mGBP7 in den Eluat-Proben gefunden, obwohl durch ähnliche Experimente, in denen HA-getaggtes mGBP7 verwendet wurde, TOM1 als Interaktionspartner von mGBP7 im Zuge einer *T. gondii*-Infektion identifiziert wurde [123]. Dies könnte zum einen dadurch erklärt werden, dass in den vorherigen Experimenten mit einer mGBP7$^{-/-}$-Zelllinie gearbeitet wurde, während in dieser Arbeit WT MEFs mit HA-getaggtem TOM1 transduziert wurden. Das in diesen Zellen vorkommende ungetaggte TOM1 konkurriert mit dem HA-getaggten TOM1 um dessen Interaktionspartner und verringerte vermutlich die detektierten Proteinmengen der Interaktionspartner in den Eluat-Proben der Ko-IP. Zusätzlich scheint der Pull-Down von

mGBP7 durch TOM1 weniger effizient zu sein als der Pull-Down von TOM1 durch mGBP7. So wurde in dieser Arbeit für die Identifikation der Interaktionsdomäne auch versucht mittels RFP-Traps, das mit anti-mCherry Agarose arbeitet, GFP-mGBP7 über TOM1.492-mCherry aufzureinigen. Allerdings konnte hier in den WBs der Eluat-Proben kein GFP-getaggtes mGBP7 nachgewiesen werden, während dieses im umgekehrten Fall mit der Aufreinigung über das GFP-Trap funktionierte (Anhang 15). Diese Beobachtung scheint kein Einzelfall zu sein. So wurde in einer Studie, die Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe von Pull-Down-Experimenten untersuchte, ermittelt, dass der reziproke Pull-Down für die beiden Interaktionspartner unterschiedlich gut funktionierte. So konnte mit einem Protein 6 - 9 % des anderen Proteins im Gel nachgewiesen werden, während anders herum nur 2 - 3 % der ursprünglichen Proteinmenge im Gel detektiert werden konnten [207]. Diese beiden Faktoren könnten erklären, weshalb in dieser Arbeit kaum mGBP7 in den Eluat-Proben der Ko-IP detektiert werden konnte.

5.5 Funktionsanalyse von TOM1 bei der Proliferation von *T. gondii*

Um genauere Hinweise auf die Funktion von TOM1 in der Immunantwort auf eine *T. gondii*-Infektion zu erhalten, wurde zusätzlich ein Luciferase-basierter Proliferations-Assay etabliert. Hierbei wurde für WT MEFs die Funktionalität des Assays und die Lagerungsstabilität, der in den Parasiten exprimierten Luciferase bestätigt. Der Vergleich der relativen Luciferase-Aktivitäten aus den WT MEFs mit denen aus $TOM1^{\Delta/\Delta}$ MEFs und $TOM1^{2lox/2lox}$ MEFs ergab keine eindeutigen Unterschiede. Deshalb sind weitere Experimente mit einer größeren Anzahl an Replikaten, notwendig um den Einfluss von TOM1 auf die Proliferation von *T. gondii* in MEFs zu ermitteln. Dies könnte Hinweise darauf liefern, ob TOM1, evtl. im Zusammenspiel mit TOLLIP, von *T. gondii* genutzt wird, um der Immunantwort des Wirtes zu entgehen, oder ob diese Proteine Teil des Rekrutierungsmechanismus von mGBP7 und möglicherweise weiterer mGBPs zur PV sein könnten.

5.6 Ausblick

Um die Interaktion zwischen mGBP7 und TOM1 genauer zu charakterisieren, könnte in zukünftigen Arbeiten der Effekt einzelner Aminosäurereste auf die Bindung der beiden Proteine untersucht werden. Hierzu könnten Punktmutationen an den Aminosäuren eingeführt werden, für die Dr. Wibke Schumann in ihrer Arbeit bereits hohe Interaktionsenergien berechnet hatte (V184, E186, K188, L202 und C568). Sollte eine oder mehrere dieser AS tatsächlich für die Interaktion von mGBP7 mit TOM1 essentiell sein, dann könnte als nächster Schritt diese Interaktion gezielt gestört werden, um den Einfluss des Zusammenspiels der beiden Proteine auf die *T. gondii*-Abwehr zu ermitteln. In Bezug auf die Rekrutierung von mGBP7 und TOM1 zur *T. gondii* PV wäre es zudem sehr interessant zu bestimmen, ob die Abwesenheit eines der Proteine die Rekrutierungsrate des jeweils anderen Proteins beeinflusst. Dies könnte Hinweise auf eine mögliche Rekrutierungshierarchie liefern.

Darüber hinaus könnte eine genauere Untersuchung der bereits bekannten Interaktionspartner von TOM1 (TOLLIP, Clathrin und Myosin VI) bezüglich ihrer möglichen Rolle in der *T. gondii*-Abwehr von großem Interesse sein. Hier wären konfokalmikroskopische Studien zur Lokalisation dieser Proteine ein möglicher erster Schritt. Sollten sie zur *T. gondii* PV rekrutieren wäre zudem die Kolokalisationsrate mit TOM1 und die Dynamik der Rekrutierung zu bestimmen.

Besonders bedeutend wäre jedoch die Untersuchung des Effekts von TOM1 auf die *T. gondii*-Proliferation durch weitere Luciferase-Assays in TOM1 defizienten Zellen. Diese könnten Hinweise darauf liefern, ob TOM1 als Teil der Rekrutierungsmaschinerie mit mGBP7 interagiert oder ob es von dem Parasiten genutzt wird, um der Immunantwort der Wirtszelle zu entgehen. Die Durchführung von *T. gondii* Infektionsexperimenten in einer TOM1- defizienten Mauslinie könnte wichtige Informationen zur Rolle von TOM1 bei der immunologischen Kontrolle von *T. gondii* liefern.

Langfristig gesehen wird die Aufklärung der Funktion von mGBP7, TOM1 und deren weiterer Interaktionspartner in der Immunabwehr gegen *T. gondii* ein besseres Verständnis für die generelle biologische Funktion von GBPs im Rahmen von Infektionen und anderen Entzündungsreaktionen ermöglichen. In Zukunft könnte dieses Wissen genutzt werden, um neue klinische Therapieansätze für die Behandlung der Toxoplasmose zu finden.

6 Zusammenfassung

GBPs sind eine Familie von IFN-induzierbaren GTPasen, die eine bedeutende Rolle in der zellautonomen Immunität gegen intrazelluläre Pathogene wie z. B. *T. gondii* spielen. Für mehrere mGBPs konnte beobachtet werden, dass sie direkt an der *T. gondii* PVM akkumulieren, deren Ruptur vermitteln und somit letztendlich zur Eliminierung des Parasiten beitragen. Unter diesen Proteinen scheint vor allem mGBP7 eine essentielle Funktion in der Immunabwehr gegen *T. gondii* auszuüben. In einer vorherigen Studie verstarben mGBP7$^{-/-}$-Mäuse 10 Tage nach einer Infektion mit Typ-II Toxoplasmen und wiesen somit eine ähnliche Mortalitätsrate wie IFN-γ-R$^{-/-}$-Mäuse auf. Um zu verstehen, wie mGBP7 eine derart Auswirkung auf die Immunantwort gegen *T. gondii* ausüben kann, wurden dessen Interaktionspartner im Zuge einer *T. gondii*-Infektion identifiziert. Unter diesen wurde TOM1 aufgrund seiner Funktion als Adaptorprotein im endosomalen Proteintransport in dieser Arbeit genauer auf seine Interaktion mit mGBP7 und seine Funktion in der Immunabwehr gegen *T. gondii* hin untersucht.

Für TOM1 konnte bestätigt werden, dass in den in dieser Arbeit verwendeten WT MEFs das 492 AS-lange TOM1 exprimiert wird. Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte enthalten deshalb TOM1.492.

Bezüglich der Interaktion zwischen mGBP7 und TOM1 konnte gezeigt werden, dass sowohl die G-Domäne als auch Teile der M- und E-Domäne von mGBP7 an der Interaktion mit TOM1 beteiligt sind. In den WB-Analysen der Pull-Down-Experimente war die Interaktion der trunkierten mGBP7-Mutanten mit TOM1 sogar stärker als die des vollständigen Proteins. Das könnte ein Hinweis sein, dass die Interaktion dieser beiden Proteine hauptsächlich im Zytosol und nicht an der *T. gondii* PV stattfindet oder dass mGBP7 in einer offenen Konformation mit TOM1 interagiert.

Zusätzlich wurde beobachtet, dass mGBP7 und TOM1 häufiger gemeinsam an einer PV lokalisieren als dass sie alleine zu einer *T. gondii* PV rekrutieren. Lebendzellmikroskopie-Aufnahmen zeigten, dass die Rekrutierung dieser beiden Proteine zur PV zeitgleich stattfindet, was auf einen gemeinsamen Rekrutierungsmechanismus hindeutet.

Auf der Suche nach Interaktionspartnern von TOM1 im Kontext einer *T. gondii*-Infektion konnte TOLLIP nachgewiesen werden. TOLLIP fungiert in Kooperation mit TOM1 als Adaptorprotein im endosomalen Proteintransport und könnte somit Teil der Rekru-

tierungsmaschinerie sein, die es mGBP7 ermöglicht, an der *T. gondii* PV zu lokalisieren. Jedoch werden weitere Experimente notwendig sein, um die Funktion der Interaktion zwischen mGBP7 und TOM1 eindeutig zu ermitteln.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit die Interaktion zwischen mGBP7 und TOM1 genauer untersucht, wodurch neue Erkenntnisse zu den molekularen Funktionen dieser Proteine in der Immunantwort auf eine *T. gondii*-Infektion gewonnen werden konnten.

7 Summary

GBPs are a family of IFN-inducible GTPases that play an important role in cell-autonomous immunity against intracellular pathogens such as *T. gondii*. Several mGBPs have been observed to accumulate directly at the *T. gondii* PVM, mediating its rupture and ultimately contributing to the elimination of the parasite. Among these proteins, mGBP7 in particular appears to play an essential role in the immune defense against *T. gondii*. In a previous study, mGBP7$^{-/-}$-mice died 10 days after infection with type II toxoplasma, exhibiting a mortality rate similar to that of IFN-γ-R$^{-/-}$-mice. To understand how mGBP7 can have such an effect on the immune response against *T. gondii*, its interaction partners were identified in the course of a *T. gondii* infection. Among these, TOM1 was examined in more detail in this study regarding its interaction with mGBP7 and its function in the immune defense against *T. gondii* due to its function as an adaptor protein in endosomal protein transport.

It was confirmed that the 492 AA-long TOM1 isoform is expressed in the WT MEFs used in this study. The constructs used in this study therefore contain TOM1.492.

With regard to the interaction between mGBP7 and TOM1, it was shown that both the G domain and parts of the M and E domains of mGBP7 are involved in the interaction with TOM1.

In the WB analyses of the pull-down experiments, the interaction of the truncated mGBP7 mutants with TOM1 appeared to be even stronger than that of the complete protein. This could indicate that the interaction of these two proteins mainly takes place in the cytosol and not at the *T. gondii* PV or that mGBP7 interacts with TOM1 in an open conformation.

In addition, it was observed that mGBP7 and TOM1 localize together at a PV more often than they recruit to a *T. gondii* PV alone. Live cell microscopy images showed that the recruitment of these two proteins to the PV occurs simultaneously, suggesting a common recruitment mechanism. In the search for interaction partners of TOM1 in the context of a *T. gondii* infection, TOLLIP was identified. TOLLIP acts in cooperation with TOM1 as an adaptor protein in endosomal protein transport and could thus be part of the recruitment machinery that enables mGBP7 to localize to the *T. gondii* PV. However, further experiments will be necessary to clearly determine the function of the interaction between mGBP7 and TOM1.

In summary, this study examined the interaction between mGBP7 and TOM1 in greater detail, thereby gaining new insights into the molecular functions of these proteins in the immune response to *T. gondii* infection.

8 Eidesststtliche Erklärung

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

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

Düsseldorf, den 09.07.2026 _____

Sophia Helena Kasbrink

9 Literaturverzeichnis

1. Black, M.W. and J.C. Boothroyd, *Lytic Cycle of Toxoplasma gondii.* Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000. **64**(3): p. 607–623.
2. Dubey, J.P., D.S. Lindsay, and C.A. Speer, *Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts.* Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(2): p. 267–99.
3. Blader, I.J., et al., *Lytic Cycle of Toxoplasma gondii: 15 Years Later.* Annu Rev Microbiol, 2015. **69**: p. 463–85.
4. Nicolle, C., *Sur une infection a corps de Leishman (on organismes voisons) du gondi.* CR Acad Sci, 1908. **147**: p. 736.
5. Splendore, A., *Un nuovo protozoa parassita deconigli d'une malattia che ricorda in molti punti il kala-azar dell'uoma. Nota preliminare.* Rev. Soc. Sci. Sao Paulo, 1908. **3**: p. 109–112.
6. Kim, K. and L.M. Weiss, *Toxoplasma: the next 100years.* Microbes Infect, 2008. **10**(9): p. 978–84.
7. Frenkel, J., J. Dubey, and N.L. Miller, *Toxoplasma gondii in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts.* Science, 1970. **167**(3919): p. 893–896.
8. Howe, D.K. and L.D. Sibley, *Toxoplasma gondii Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease.* The Journal of Infectious Diseases, 1995. **172**(6): p. 1561–1566.
9. Su, C., et al., *Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in Toxoplasma gondii.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(16): p. 10753–8.
10. Saeij, J.P., et al., *Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis.* Science, 2006. **314**(5806): p. 1780–3.
11. Behnke, M.S., et al., *Virulence differences in Toxoplasma mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(23): p. 9631–6.
12. Pleyer, U., et al., *Toxoplasmosis in Germany.* Dtsch Arztebl Int, 2019. **116**(25): p. 435–444.
13. Weiss, L.M. and J.P. Dubey, *Toxoplasmosis: A history of clinical observations.* Int J Parasitol, 2009. **39**(8): p. 895–901.
14. Kieffer, F. and M. Wallon, *Chapter 112 - Congenital toxoplasmosis*, in *Handbook of Clinical Neurology*, O. Dulac, M. Lassonde, and H.B. Sarnat, Editors. 2013, Elsevier. p. 1099–1101.
15. Mamidi, A., J.A. DeSimone, and R.J. Pomerantz, *Central nervous system infections in individuals with HIV-1 infection.* J Neurovirol, 2002. **8**(3): p. 158–67.
16. Kim, K. and L.M. Weiss, *Toxoplasma gondii: the model apicomplexan.* Int J Parasitol, 2004. **34**(3): p. 423–32.
17. Melo, E.J.L., M. Attias, and W. De Souza, *The Single Mitochondrion of Tachyzoites of Toxoplasma gondii.* Journal of Structural Biology, 2000. **130**(1): p. 27–33.
18. Hu, K., et al., *Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of Toxoplasma gondii.* PLoS Pathog, 2006. **2**(2): p. e13.
19. Nair, S.C., et al., *Apicoplast isoprenoid precursor synthesis and the molecular basis of fosmidomycin resistance in Toxoplasma gondii.* J Exp Med, 2011. **208**(7): p. 1547–59.
20. Janouskovec, J., et al., *A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(24): p. 10949–54.
21. Morisaki, J.H., J.E. Heuser, and L.D. Sibley, *Invasion of Toxoplasma gondii occurs by active penetration of the host cell.* J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 6)**: p. 2457–64.
22. Dubey, J.P., *Advances in the life cycle of Toxoplasma gondii.* International Journal for Parasitology, 1998. **28**(7): p. 1019–1024.
23. Robert-Gangneux, F. and M.L. Dardé, *Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis.* Clin Microbiol Rev, 2012. **25**(2): p. 264–96.
24. Attias, M., et al., *The life-cycle of Toxoplasma gondii reviewed using animations.* Parasites & Vectors, 2020. **13**(1): p. 588.

25. Ferguson, D., *Toxoplasma gondii and sex: essential or optional extra?* Trends Parasitol, 2002. **18**(8): p. 351.
26. Jones, J.L. and J.P. Dubey, *Foodborne Toxoplasmosis.* Clinical Infectious Diseases, 2012. **55**(6): p. 845–851.
27. Su, C., et al., *Recent Expansion of Toxoplasma Through Enhanced Oral Transmission.* Science, 2003. **299**(5605): p. 414–416.
28. Lourido, S., *Toxoplasma gondii.* Trends in Parasitology, 2019. **35**(11): p. 944–945.
29. Dubey, J.P., N.L. Miller, and J.K. Frenkel, *Toxoplasma gondii life cycle in cats.* J Am Vet Med Assoc, 1970. **157**(11): p. 1767–70.
30. Carruthers, V.B., *Host cell invasion by the opportunistic pathogen Toxoplasma gondii.* Acta Tropica, 2002. **81**(2): p. 111–122.
31. Sibley, L.D., *Intracellular parasite invasion strategies.* Science, 2004. **304**(5668): p. 248–53.
32. Mital, J., et al., *Conditional Expression of Toxoplasma gondii Apical Membrane Antigen-1 (TgAMA1) Demonstrates That TgAMA1 Plays a Critical Role in Host Cell Invasion.* Molecular Biology of the Cell, 2005. **16**(9): p. 4341–4349.
33. Lamarque, M., et al., *The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites.* PLoS Pathog, 2011. **7**(2): p. e1001276.
34. Guérin, A., et al., *Efficient invasion by Toxoplasma depends on the subversion of host protein networks.* Nature Microbiology, 2017. **2**(10): p. 1358–1366.
35. Meissner, M., et al., *A family of transmembrane microneme proteins of Toxoplasma gondii contain EGF-like domains and function as escorters.* Journal of Cell Science, 2002. **115**(3): p. 563–574.
36. Reiss, M., et al., *Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in Toxoplasma gondii.* J Cell Biol, 2001. **152**(3): p. 563–78.
37. Sibley, L.D., *Invasion and intracellular survival by protozoan parasites.* Immunol Rev, 2011. **240**(1): p. 72–91.
38. Mordue, D.G., et al., *Invasion by Toxoplasma gondii establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring.* J Exp Med, 1999. **190**(12): p. 1783–92.
39. Charron, A.J. and L.D. Sibley, *Molecular partitioning during host cell penetration by Toxoplasma gondii.* Traffic, 2004. **5**(11): p. 855–67.
40. Coppens, I. and K.A. Joiner, *Host but not parasite cholesterol controls Toxoplasma cell entry by modulating organelle discharge.* Mol Biol Cell, 2003. **14**(9): p. 3804–20.
41. Schwab, J.C., C.J. Beckers, and K.A. Joiner, *The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular Toxoplasma gondii functions as a molecular sieve.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(2): p. 509–13.
42. Gold, D.A., et al., *The Toxoplasma Dense Granule Proteins GRA17 and GRA23 Mediate the Movement of Small Molecules between the Host and the Parasitophorous Vacuole.* Cell Host Microbe, 2015. **17**(5): p. 642–52.
43. Jones, T.C. and J.G. Hirsch, *The interaction between Toxoplasma gondii and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites.* J Exp Med, 1972. **136**(5): p. 1173–94.
44. Sinai, A.P., P. Webster, and K.A. Joiner, *Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the Toxoplasma gondii parasitophorous vacuole membrane: A high affinity interaction.* Journal of Cell Science, 1997. **110**(17): p. 2117–2128.
45. Sasai, M., A. Pradipta, and M. Yamamoto, *Host immune responses to Toxoplasma gondii.* International Immunology, 2018. **30**(3): p. 113–119.
46. Sasai, M. and M. Yamamoto, *Pathogen Recognition Receptors: Ligands and Signaling Pathways by Toll-Like Receptors.* International Reviews of Immunology, 2013. **32**(2): p. 116–133.
47. Yarovinsky, F., et al., *TLR11 Activation of Dendritic Cells by a Protozoan Profilin-Like Protein.* Science, 2005. **308**(5728): p. 1626–1629.

48. Raetz, M., et al., *Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-dependent IL-12 response to Toxoplasma gondii profilin.* J Immunol, 2013. **191**(9): p. 4818–27.
49. Debierre-Grockiego, F.o., et al., *Activation of TLR2 and TLR4 by Glycosylphosphatidylinositols Derived from Toxoplasma gondii1.* The Journal of Immunology, 2007. **179**(2): p. 1129–1137.
50. Arancibia, S.A., et al., *Toll-like receptors are key participants in innate immune responses.* Biol Res, 2007. **40**(2): p. 97–112.
51. Mashayekhi, M., et al., *CD8α(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by Toxoplasma gondii tachyzoites.* Immunity, 2011. **35**(2): p. 249–59.
52. Goldszmid, R.S., et al., *NK cell-derived interferon-γ orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection.* Immunity, 2012. **36**(6): p. 1047–59.
53. Robben, P.M., et al., *Production of IL-12 by Macrophages Infected with Toxoplasma gondii Depends on the Parasite Genotype1.* The Journal of Immunology, 2004. **172**(6): p. 3686–3694.
54. Bliss, S.K., B.A. Butcher, and E.Y. Denkers, *Rapid Recruitment of Neutrophils Containing Prestored IL-12 During Microbial Infection1.* The Journal of Immunology, 2000. **165**(8): p. 4515–4521.
55. Khan, I.A., T. Matsuura, and L.H. Kasper, *Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis.* Infect Immun, 1994. **62**(5): p. 1639–42.
56. Gazzinelli, R.T., et al., *Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(13): p. 6115–9.
57. Yarovinsky, F., *Innate immunity to Toxoplasma gondii infection.* Nature Reviews Immunology, 2014. **14**(2): p. 109–121.
58. Dupont, C.D., D.A. Christian, and C.A. Hunter. *Immune response and immunopathology during toxoplasmosis*. in *Seminars in immunopathology*. 2012. Springer.
59. Scharton-Kersten, T.M., et al., *In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to Toxoplasma gondii while failing to control acute infection.* Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), 1996. **157**(9): p. 4045–4054.
60. Yap, G., M. Pesin, and A. Sher, *Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-γ production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, Toxoplasma gondii.* The Journal of Immunology, 2000. **165**(2): p. 628–631.
61. Fang, F.C., *Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies.* Nature Reviews Microbiology, 2004. **2**(10): p. 820–832.
62. Chang, H.R. and J.-C. Pechère, *Macrophage oxidative metabolism and intracellular Toxoplasma gondii.* Microbial pathogenesis, 1989. **7**(1): p. 37–44.
63. YAMAMOTO, M., *A Cluster of Interferon-γ-Inducible.* GTPases Plays a Critical Role in Host Defense against Toxoplasma gondii. Immunity, 2012. **65**.
64. Steinfeldt, T., et al., *Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent Toxoplasma gondii.* PLoS biology, 2010. **8**(12): p. e1000576.
65. Etheridge, R.D., et al., *The Toxoplasma pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice.* Cell host & microbe, 2014. **15**(5): p. 537–550.
66. Clough, B. and E.-M. Frickel, *The Toxoplasma parasitophorous vacuole: an evolving host–parasite frontier.* Trends in parasitology, 2017. **33**(6): p. 473–488.
67. Mizushima, N., Y. Ohsumi, and T. Yoshimori, *Autophagosome formation in mammalian cells.* Cell structure and function, 2002. **27**(6): p. 421–429.
68. Randow, F., *How cells deploy ubiquitin and autophagy to defend their cytosol from bacterial invasion.* Autophagy, 2011. **7**(3): p. 304–309.
69. Gomes, L.C. and I. Dikic, *Autophagy in antimicrobial immunity.* Molecular cell, 2014. **54**(2): p. 224–233.

70. Khaminets, A., et al., *Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the Toxoplasma gondii parasitophorous vacuole.* Cellular microbiology, 2010. **12**(7): p. 939–961.
71. Zhao, Z., et al., *Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens.* Cell host & microbe, 2008. **4**(5): p. 458–469.
72. Choi, J., et al., *The parasitophorous vacuole membrane of Toxoplasma gondii is targeted for disruption by ubiquitin-like conjugation systems of autophagy.* Immunity, 2014. **40**(6): p. 924–935.
73. Haldar, A.K., et al., *The E2-like conjugation enzyme Atg3 promotes binding of IRG and Gbp proteins to Chlamydia-and Toxoplasma-containing vacuoles and host resistance.* PloS one, 2014. **9**(1): p. e86684.
74. Santos, J.C. and P. Broz, *Sensing of invading pathogens by GBPs: At the crossroads between cell-autonomous and innate immunity.* Journal of Leukocyte Biology, 2018. **104**(4): p. 729–735.
75. Cheng, Y., R.J. Colonno, and F.H. Yin, *Interferon induction of fibroblast proteins with guanylate binding activity.* Journal of Biological Chemistry, 1983. **258**(12): p. 7746–7750.
76. Boehm, U., et al., *Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-γ.* The Journal of Immunology, 1998. **161**(12): p. 6715–6723.
77. Pilla-Moffett, D., et al., *Interferon-inducible GTPases in host resistance, inflammation and disease.* Journal of molecular biology, 2016. **428**(17): p. 3495–3513.
78. Vestal, D.J. and J.A. Jeyaratnam, *The guanylate-binding proteins: emerging insights into the biochemical properties and functions of this family of large interferon-induced guanosine triphosphatase.* Journal of Interferon & Cytokine Research, 2011. **31**(1): p. 89–97.
79. Praefcke, G.J. and H.T. McMahon, *The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules?* Nature reviews Molecular cell biology, 2004. **5**(2): p. 133–147.
80. Faelber, K., et al., *Oligomerization of dynamin superfamily proteins in health and disease.* Progress in molecular biology and translational science, 2013. **117**: p. 411–443.
81. Ramachandran, R. and S.L. Schmid, *The dynamin superfamily.* Current Biology, 2018. **28**(8): p. R411–R416.
82. Kravets, E., et al., *Guanylate binding proteins directly attack Toxoplasma gondii via supramolecular complexes.* Elife, 2016. **5**: p. e11479.
83. Vestal, D.J., V.Y. Gorbacheva, and G.C. Sen, *Different subcellular localizations for the related interferon-induced GTPases, MuGBP-1 and MuGBP-2: implications for different functions?* Journal of Interferon & Cytokine Research, 2000. **20**(11): p. 991–1000.
84. Tretina, K., et al., *Interferon-induced guanylate-binding proteins: Guardians of host defense in health and disease.* Journal of Experimental Medicine, 2019. **216**(3): p. 482–500.
85. Shenoy, A.R., et al., *GBP5 promotes NLRP3 inflammasome assembly and immunity in mammals.* Science, 2012. **336**(6080): p. 481–485.
86. Shenoy, A.R., et al., *Emerging themes in IFN-γ-induced macrophage immunity by the p47 and p65 GTPase families.* Immunobiology, 2008. **212**(9-10): p. 771–784.
87. Kresse, A., et al., *Analyses of murine GBP homology clusters based on in silico, in vitro and in vivo studies.* BMC genomics, 2008. **9**(1): p. 158.
88. Steffens, N., et al., *Essential Role of mGBP7 for Survival of Toxoplasma gondii Infection.* mBio, 2020. **11**(1): p. 10.1128/mbio.02993–19.
89. Legewie, L., et al., *Biochemical and structural characterization of murine GBP7, a guanylate binding protein with an elongated C-terminal tail.* Biochemical Journal, 2019. **476**(21): p. 3161–3182.
90. Cheng, Y.-S.E., C.E. Patterson, and P. Staeheli, *Interferon-induced guanylate-binding proteins lack an N (T) KXD consensus motif and bind GMP in addition to GDP and GTP.* Molecular and cellular biology, 1991. **11**(9): p. 4717–4725.

91. Praefcke, G.J., et al., *Nucleotide-binding characteristics of human guanylate-binding protein 1 (hGBP1) and identification of the third GTP-binding motif.* Journal of molecular biology, 1999. **292**(2): p. 321–332.
92. Prakash, B., et al., *Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins.* Nature, 2000. **403**(6769): p. 567–571.
93. Ghosh, A., et al., *How guanylate-binding proteins achieve assembly-stimulated processive cleavage of GTP to GMP.* Nature, 2006. **440**(7080): p. 101–104.
94. Kim, B.-H., et al., *IFN-inducible GTPases in host cell defense.* Cell host & microbe, 2012. **12**(4): p. 432–444.
95. Kravets, E., et al., *The GTPase activity of murine guanylate-binding protein 2 (mGBP2) controls the intracellular localization and recruitment to the parasitophorous vacuole of Toxoplasma gondii.* Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(33): p. 27452–27466.
96. Praefcke, G.J., et al., *Identification of residues in the human guanylate-binding protein 1 critical for nucleotide binding and cooperative GTP hydrolysis.* Journal of molecular biology, 2004. **344**(1): p. 257–269.
97. Kunzelmann, S., G.J. Praefcke, and C. Herrmann, *Nucleotide binding and self-stimulated GTPase activity of human guanylate-binding protein 1 (hGBP1).* Methods in enzymology, 2005. **404**: p. 512–527.
98. Yang, J., et al., *The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction.* Nature methods, 2015. **12**(1): p. 7–8.
99. Wehner, M., S. Kunzelmann, and C. Herrmann, *The guanine cap of human guanylate-binding protein 1 is responsible for dimerization and self-activation of GTP hydrolysis.* The FEBS journal, 2012. **279**(2): p. 203–210.
100. Vöpel, T., et al., *Triphosphate induced dimerization of human guanylate binding protein 1 involves association of the C-terminal helices: a joint double electron–electron resonance and FRET study.* Biochemistry, 2014. **53**(28): p. 4590–4600.
101. Bradshaw, R.A. and E.A. Dennis, *Handbook of cell signaling*. 2009: Academic press.
102. Tripathi, R., R. Glaves, and D. Marx, *The GTPase hGBP1 converts GTP to GMP in two steps via proton shuttle mechanisms.* Chemical Science, 2017. **8**(1): p. 371–380.
103. Fres, J.M., S. Müller, and G.J. Praefcke, *Purification of the CaaX-modified, dynamin-related large GTPase hGBP1 by coexpression with farnesyltransferase [S].* Journal of lipid research, 2010. **51**(8): p. 2454–2459.
104. Wehner, M. and C. Herrmann, *Biochemical properties of the human guanylate binding protein 5 and a tumor-specific truncated splice variant.* The FEBS journal, 2010. **277**(7): p. 1597–1605.
105. Xavier, A., et al., *hGBP1 Coordinates Chlamydia Restriction and Inflammasome Activation through Sequential GTP Hydrolysis.* Cell Reports, 2020. **31**(7).
106. Olszewski, M.A., J. Gray, and D.J. Vestal, *In silico genomic analysis of the human and murine guanylate-binding protein (GBP) gene clusters.* Journal of Interferon & Cytokine Research, 2006. **26**(5): p. 328–352.
107. Nantais, D.E., et al., *Prenylation of an interferon-γ-induced GTP-binding protein: the human guanylate binding protein, huGBP1.* Journal of leukocyte biology, 1996. **60**(3): p. 423–431.
108. Kim, B.-H., et al., *A family of IFN-γ–inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection.* Science, 2011. **332**(6030): p. 717–721.
109. Finethy, R., et al., *Inflammasome activation by bacterial outer membrane vesicles requires guanylate binding proteins.* MBio, 2017. **8**(5): p. 10.1128/mbio. 01188–17.
110. Santos, J.C., et al., *LPS targets host guanylate-binding proteins to the bacterial outer membrane for non-canonical inflammasome activation.* The EMBO journal, 2018. **37**(6): p. e98089.
111. Man, S.M., et al., *The transcription factor IRF1 and guanylate-binding proteins target activation of the AIM2 inflammasome by Francisella infection.* Nature immunology, 2015. **16**(5): p. 467–475.

112. Meunier, E., et al., *Guanylate-binding proteins promote activation of the AIM2 inflammasome during infection with Francisella novicida.* Nature immunology, 2015. **16**(5): p. 476–484.
113. Cheng, Y., et al., *Affinity purification of an interferon-induced human guanylate-binding protein and its characterization.* Journal of Biological Chemistry, 1985. **260**(29): p. 15834–15839.
114. Mostafavi, S., et al., *Parsing the interferon transcriptional network and its disease associations.* Cell, 2016. **164**(3): p. 564–578.
115. Degrandi, D., et al., *Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense.* The Journal of Immunology, 2007. **179**(11): p. 7729–7740.
116. Darnell Jr, J.E., I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins.* Science, 1994. **264**(5164): p. 1415–1421.
117. Beuter-Gunia, C., *Identifizierung und Charakterisierung von IFN-gamma regulierten Effektormolekülen (mGBP7, SSPII) in der antimikrobiellen Immunantwort*. 2008.
118. Lindenberg, V., et al., *Broad recruitment of mGBP family members to Chlamydia trachomatis inclusions.* PloS one, 2017. **12**(9): p. e0185273.
119. Anderson, S.L., et al., *Interferon-induced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus.* Virology, 1999. **256**(1): p. 8–14.
120. Carter, C., V. Gorbacheva, and D. Vestal, *Inhibition of VSV and EMCV replication by the interferon-induced GTPase, mGBP-2: differential requirement for wild-type GTP binding domain.* Archives of virology, 2005. **150**(6): p. 1213–1220.
121. Biering, S.B., et al., *Viral replication complexes are targeted by LC3-guided interferon-inducible GTPases.* Cell host & microbe, 2017. **22**(1): p. 74–85. e7.
122. Degrandi, D., et al., *Murine guanylate binding protein 2 (mGBP2) controls Toxoplasma gondii replication.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(1): p. 294–299.
123. Legewie, L., *Murines GBP7 und interagierende Proteine in der Wirtsabwehr*.
124. Wang, T., et al., *The Emerging Role of VHS Domain-Containing Tom1, Tom1L1 and Tom1L2 in Membrane Trafficking.* Traffic, 2010. **11**(9): p. 1119–1128.
125. Burk, O., et al., *tom-1, a novel v-Myb target gene expressed in AMV- and E26-transformed myelomonocytic cells.* Embo j, 1997. **16**(6): p. 1371–80.
126. Seroussi, E., et al., *TOM1 genes map to human chromosome 22q13.1 and mouse chromosome 8C1 and encode proteins similar to the endosomal proteins HGS and STAM.* Genomics, 1999. **57**(3): p. 380–8.
127. Seet, L.F., et al., *Endofin recruits TOM1 to endosomes.* J Biol Chem, 2004. **279**(6): p. 4670–9.
128. Yamakami, M., T. Yoshimori, and H. Yokosawa, *Tom1, a VHS domain-containing protein, interacts with tollip, ubiquitin, and clathrin.* J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52865–72.
129. Katoh, Y., et al., *Tollip and Tom1 form a complex and recruit ubiquitin-conjugated proteins onto early endosomes.* J Biol Chem, 2004. **279**(23): p. 24435–43.
130. Roach, T.G., et al., *Protein trafficking or cell signaling: A dilemma for the adaptor protein TOM1.* Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021. **9**: p. 643769.
131. Vietri, M., M. Radulovic, and H. Stenmark, *The many functions of ESCRTs.* Nature reviews Molecular cell biology, 2020. **21**(1): p. 25–42.
132. Hu, S., et al., *Structure of Myosin VI/Tom1 complex reveals a cargo recognition mode of Myosin VI for tethering.* Nature Communications, 2019. **10**(1): p. 3459.
133. Brissoni, B., et al., *Intracellular trafficking of interleukin-1 receptor I requires Tollip.* Curr Biol, 2006. **16**(22): p. 2265–70.
134. Gwon, Y., et al., *TOM1 Regulates Neuronal Accumulation of Amyloid-β Oligomers by FcγRIIb2 Variant in Alzheimer's Disease.* J Neurosci, 2018. **38**(42): p. 9001–9018.

135. Keskitalo, S., et al., *Dominant TOM1 mutation associated with combined immunodeficiency and autoimmune disease.* NPJ Genomic Medicine, 2019. **4**(1): p. 14.
136. Boal, F., et al., *TOM1 is a PI5P effector involved in the regulation of endosomal maturation.* Journal of Cell Science, 2015. **128**(4): p. 815–827.
137. Ramel, D., et al., *Shigella flexneri infection generates the lipid PI5P to alter endocytosis and prevent termination of EGFR signaling.* Sci Signal, 2011. **4**(191): p. ra61.
138. Bonifacino, J.S., *The GGA proteins: adaptors on the move.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(1): p. 23–32.
139. Misra, S., B.M. Beach, and J.H. Hurley, *Structure of the VHS Domain of Human Tom1 (Target of Myb 1): Insights into Interactions with Proteins and Membranes.* Biochemistry, 2000. **39**(37): p. 11282–11290.
140. Kirchhausen, T., *Single-handed recognition of a sorting traffic motif by the GGA proteins.* Nat Struct Biol, 2002. **9**(4): p. 241–4.
141. Ren, X. and J.H. Hurley, *VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo.* Embo j, 2010. **29**(6): p. 1045–54.
142. Wang, H., W.-T. Lo, and V. Haucke, *Phosphoinositide switches in endocytosis and in the endolysosomal system.* Current opinion in cell biology, 2019. **59**: p. 50–57.
143. Ebner, M., P.A. Koch, and V. Haucke, *Phosphoinositides in the control of lysosome function and homeostasis.* Biochem Soc Trans, 2019. **47**(4): p. 1173–1185.
144. Xiao, S., et al., *Tom1 Modulates Binding of Tollip to Phosphatidylinositol 3-Phosphate via a Coupled Folding and Binding Mechanism.* Structure, 2015. **23**(10): p. 1910–1920.
145. Ankem, G., et al., *The C2 domain of Tollip, a Toll-like receptor signalling regulator, exhibits broad preference for phosphoinositides.* Biochem J, 2011. **435**(3): p. 597–608.
146. Mitra, S., et al., *Ubiquitin interacts with the Tollip C2 and CUE domains and inhibits binding of Tollip to phosphoinositides.* J Biol Chem, 2013. **288**(36): p. 25780–25791.
147. Azurmendi, H.F., et al., *Backbone (1)H, (15)N, and (13)C resonance assignments and secondary structure of the Tollip CUE domain.* Mol Cells, 2010. **30**(6): p. 581–5.
148. Xiong, W., et al., *Preferential phosphatidylinositol 5-phosphate binding contributes to a destabilization of the VHS domain structure of Tom1.* Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 10868.
149. Xiao, S., et al., *Structure of the GAT domain of the endosomal adapter protein Tom1.* Data in brief, 2016. **7**: p. 344–348.
150. Akutsu, M., et al., *Structural basis for recognition of ubiquitinated cargo by Tom1-GAT domain.* FEBS Letters, 2005. **579**(24): p. 5385–5391.
151. Seet, L.-F. and W. Hong, *Endofin recruits clathrin to early endosomes via TOM1.* Journal of Cell Science, 2005. **118**(3): p. 575–587.
152. Seet, L.F. and W. Hong, *Endofin, an endosomal FYVE domain protein.* J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 42445–54.
153. Lafer, E.M., *Clathrin-protein interactions.* Traffic, 2002. **3**(8): p. 513–20.
154. Tumbarello, D.A., et al., *Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome.* Nature Cell Biology, 2012. **14**(10): p. 1024–1035.
155. Hartman, M.A. and J.A. Spudich, *The myosin superfamily at a glance.* J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 7): p. 1627–32.
156. Masters, T.A., et al., *MYO6 Regulates Spatial Organization of Signaling Endosomes Driving AKT Activation and Actin Dynamics.* Cell Rep, 2017. **19**(10): p. 2088–2101.
157. Weeratunga, S., B. Paul, and B.M. Collins, *Recognising the signals for endosomal trafficking.* Current opinion in cell biology, 2020. **65**: p. 17–27.
158. Henne, W.M., N.J. Buchkovich, and S.D. Emr, *The ESCRT pathway.* Dev Cell, 2011. **21**(1): p. 77–91.
159. Mizuno, E., et al., *STAM proteins bind ubiquitinated proteins on the early endosome via the VHS domain and ubiquitin-interacting motif.* Mol Biol Cell, 2003. **14**(9): p. 3675–89.
160. Hirano, S., et al., *Structural basis of ubiquitin recognition by mammalian Eap45 GLUE domain.* Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(11): p. 1031–2.

161. Raiborg, C., et al., *FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes.* Journal of cell science, 2001. **114**(12): p. 2255–2263.
162. Shields, S.B. and R.C. Piper, *How ubiquitin functions with ESCRTs.* Traffic, 2011. **12**(10): p. 1306–17.
163. Capelluto, D.G., *Tollip: a multitasking protein in innate immunity and protein trafficking.* Microbes Infect, 2012. **14**(2): p. 140–7.
164. Haglund, K. and I. Dikic, *The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting.* J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 2): p. 265–75.
165. Lobingier, B.T., et al., *An approach to spatiotemporally resolve protein interaction networks in living cells.* Cell, 2017. **169**(2): p. 350–360. e12.
166. Ryan, T.A., et al., *Tollip coordinates Parkin-dependent trafficking of mitochondrial-derived vesicles.* The EMBO journal, 2020. **39**(11): p. e102539.
167. Lefebvre, C., R. Legouis, and E. Culetto, *ESCRT and autophagies: Endosomal functions and beyond.* Semin Cell Dev Biol, 2018. **74**: p. 21–28.
168. Lu, K., I. Psakhye, and S. Jentsch, *Autophagic clearance of polyQ proteins mediated by ubiquitin-Atg8 adaptors of the conserved CUET protein family.* Cell, 2014. **158**(3): p. 549–63.
169. Baker, B., et al., *Alteration of lysosome fusion and low-grade inflammation mediated by super-low-dose endotoxin.* J Biol Chem, 2015. **290**(10): p. 6670–8.
170. Yamakami, M. and H. Yokosawa, *Tom1 (Target of Myb 1) Is a Novel Negative Regulator of Interleukin-1- and Tumor Necrosis Factor-Induced Signaling Pathways.* Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2004. **27**(4): p. 564–566.
171. Oglesby, I.K., et al., *miR-126 is downregulated in cystic fibrosis airway epithelial cells and regulates TOM1 expression.* J Immunol, 2010. **184**(4): p. 1702–9.
172. Chávez-Gutiérrez, L. and M. Szaruga, *Mechanisms of neurodegeneration — Insights from familial Alzheimer's disease.* Seminars in Cell & Developmental Biology, 2020. **105**: p. 75–85.
173. Lång, H.K.M., et al., *A TOM1 variant impairs interaction with TOLLIP, autophagosome-lysosome fusion and regulation of innate immunity.* Dis Model Mech, 2025. **18**(9).
174. Pendaries, C., et al., *PtdIns5P activates the host cell PI3-kinase/Akt pathway during Shigella flexneri infection.* Embo j, 2006. **25**(5): p. 1024–34.
175. Qiu, S. and M. Côté, *From hitchhiker to hijacker: pathogen exploitation of endosomal phosphoinositides (1).* Biochem Cell Biol, 2019. **97**(1): p. 1–9.
176. Hasegawa, J., B.S. Strunk, and L.S. Weisman, *PI5P and PI(3,5)P(2): Minor, but Essential Phosphoinositides.* Cell Struct Funct, 2017. **42**(1): p. 49–60.
177. Visvikis, O., et al., *Escherichia coli producing CNF1 toxin hijacks Tollip to trigger Rac1-dependent cell invasion.* Traffic, 2011. **12**(5): p. 579–590.
178. Parmar, N., et al., *Leishmania donovani Exploits Tollip, a Multitasking Protein, To Impair TLR/IL-1R Signaling for Its Survival in the Host.* J Immunol, 2018. **201**(3): p. 957–970.
179. Schumann, W., *Molecular Dynamics and Interactions of Murine Guanylate Binding Proteins and the Bacterial Dynamin Like Protein*. 2023.
180. Zhao, H., et al., *Emission spectra of bioluminescent reporters and interaction with mammalian tissue determine the sensitivity of detection in vivo.* J Biomed Opt, 2005. **10**(4): p. 41210.
181. Carninci, P., et al., *The transcriptional landscape of the mammalian genome.* Science, 2005. **309**(5740): p. 1559–63.
182. Gerhard, D.S., et al., *The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC).* Genome Res, 2004. **14**(10b): p. 2121–7.
183. Tusher, V.G., R. Tibshirani, and G. Chu, *Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(9): p. 5116–5121.
184. Boyle, J.P., J.P. Saeij, and J.C. Boothroyd, *Toxoplasma gondii: inconsistent dissemination patterns following oral infection in mice.* Experimental parasitology, 2007. **116**(3): p. 302–305.

185. Cui, W., et al., *Structural basis for GTP-induced dimerization and antiviral function of guanylate-binding proteins.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2021. **118**(15): p. e2022269118.
186. Sistemich, L., et al., *Structural requirements for membrane binding of human guanylate-binding protein 1.* The FEBS Journal, 2021. **288**(13): p. 4098–4114.
187. Bulut, Y., et al., *Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and Borrelia burgdorferi outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling.* The Journal of immunology, 2001. **167**(2): p. 987–994.
188. Zhang, G. and S. Ghosh, *Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip.* Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(9): p. 7059–7065.
189. Casanova, J.-L., L. Abel, and L. Quintana-Murci, *Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics.* Annual review of immunology, 2011. **29**(1): p. 447–491.
190. Burns, K., et al., *Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor.* Nature cell biology, 2000. **2**(6): p. 346–351.
191. Li, S., et al., *IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(8): p. 5567–5572.
192. Lin, S.-C., Y.-C. Lo, and H. Wu, *Helical assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling.* Nature, 2010. **465**(7300): p. 885–890.
193. Kawagoe, T., et al., *Sequential control of Toll-like receptor–dependent responses by IRAK1 and IRAK2.* Nature immunology, 2008. **9**(6): p. 684–691.
194. Li, T., J. Hu, and L. Li, *Characterization of Tollip protein upon Lipopolysaccharide challenge.* Molecular immunology, 2004. **41**(1): p. 85–92.
195. Brissoni, B., et al., *Intracellular trafficking of interleukin-1 receptor I requires Tollip.* Current Biology, 2006. **16**(22): p. 2265–2270.
196. Piao, W., et al., *Endotoxin tolerance dysregulates MyD88-and Toll/IL-1R domain-containing adapter inducing IFN-β-dependent pathways and increases expression of negative regulators of TLR signaling.* Journal of leukocyte biology, 2009. **86**(4): p. 863–875.
197. Krishnegowda, G., et al., *Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity.* Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(9): p. 8606–8616.
198. Mun, H.-S., et al., *Toll-like receptor 4 mediates tolerance in macrophages stimulated with Toxoplasma gondii-derived heat shock protein 70.* Infection and immunity, 2005. **73**(8): p. 4634–4642.
199. Mun, H.S., et al., *TLR2 as an essential molecule for protective immunity against Toxoplasma gondii infection.* International immunology, 2003. **15**(9): p. 1081–1087.
200. Scanga, C.A., et al., *Cutting edge: MyD88 is required for resistance to Toxoplasma gondii infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells.* The Journal of Immunology, 2002. **168**(12): p. 5997–6001.
201. Encheva, V., et al., *Murine Gbp1 and Gbp2 are ubiquitinated independent of Toxoplasma gondii infection.* BMC research notes, 2018. **11**(1): p. 166.
202. Komander, D. and M. Rape, *The ubiquitin code.* Annual review of biochemistry, 2012. **81**(1): p. 203–229.
203. Swatek, K.N. and D. Komander, *Ubiquitin modifications.* Cell research, 2016. **26**(4): p. 399–422.
204. Li, P., et al., *Ubiquitination and degradation of GBPs by a Shigella effector to suppress host defence.* Nature, 2017. **551**(7680): p. 378–383.
205. Wandel, M.P., et al., *GBPs inhibit motility of Shigella flexneri but are targeted for degradation by the bacterial ubiquitin ligase IpaH9. 8.* Cell host & microbe, 2017. **22**(4): p. 507–518. e5.
206. Haldar, A.K., et al., *Ubiquitin systems mark pathogen-containing vacuoles as targets for host defense by guanylate binding proteins.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. **112**(41): p. E5628–E5637.

207. Midgett, C.R., et al., *Bile salts and alkaline pH reciprocally modulate the interaction between the periplasmic domains of Vibrio cholerae ToxR and ToxS.* Molecular Microbiology, 2017. **105**(2): p. 258–272.

10 Anhang

10.1.1 Macro zur Bearbeitung der Einzelaufnahmen aus der Lebendzellmikroskopie mittels Fiji

```
//Preparation
//update image name and folder (and number of channels, if needed)
// if you don#'t know the directory,use Plugins>Macros>Record and open file in target folder
//count taken images
//calculate interval using Zen (how many seconds per frame)

seconds_per_frame = 19
images = "1-548"
input = "N:/Arbeitsgruppen/AG Pfeffer/Sophia/01 Interaction between mGBP7 and TOM1/Live Cell Imaging/Sokas0118/2.czi"
output1 = "N:/Arbeitsgruppen/AG Pfeffer/Sophia/01 Interaction between mGBP7 and TOM1/Live Cell Imaging/Sokas0118/2_Light.avi"
output2 = "N:/Arbeitsgruppen/AG Pfeffer/Sophia/01 Interaction between mGBP7 and TOM1/Live Cell Imaging/Sokas0118/2_TOM1-mCherry.avi"
output3 = "N:/Arbeitsgruppen/AG Pfeffer/Sophia/01 Interaction between mGBP7 and TOM1/Live Cell Imaging/Sokas0118/2_GFP-mGBP7.avi"

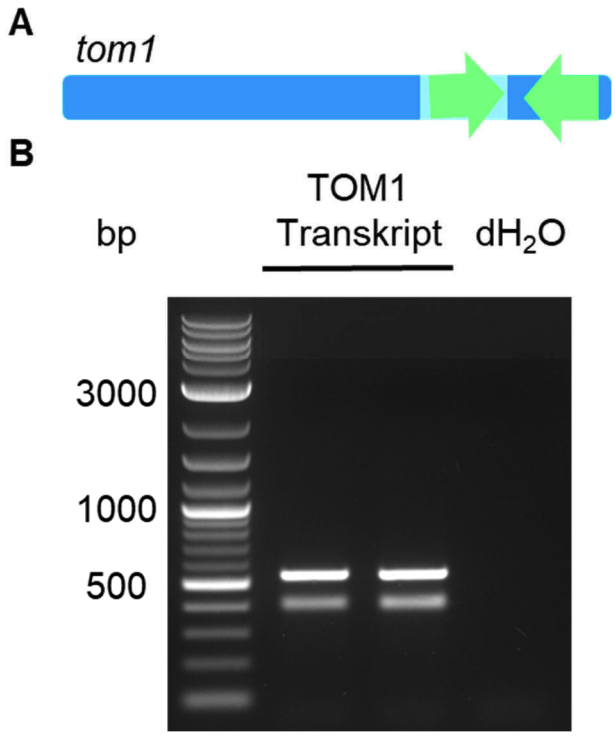
run("Bio-Formats Importer", "open=input color_mode=Colorized rois_import=[ROI manager] split_channels view=Hyperstack stack_order=XYCZT use_virtual_stack");

run("Z Project...", "projection=[Max Intensity] all");
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.01 normalize process_all use");
run("Scale Bar...", "width=20 height=20 thickness=10 font=50 bold overlay");
run("Label...", "format=00:00:00 starting=0 interval=seconds_per_frame x=5 y=20 font=100 text=[] range=images use");
run("AVI... ", "compression=JPEG frame=10 save=[output1]");
close();
close();

run("Z Project...", "projection=[Max Intensity] all");
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.01 normalize process_all use");
run("Scale Bar...", "width=20 height=20 thickness=10 font=50 bold overlay");
run("Label...", "format=00:00:00 starting=0 interval=seconds_per_frame x=5 y=20 font=100 text=[] range=images use");
run("AVI... ", "compression=JPEG frame=10 save=[output2]");
close();
close();

run("Z Project...", "projection=[Max Intensity] all");
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.01 normalize process_all use");
run("Scale Bar...", "width=20 height=20 thickness=10 font=50 bold overlay");
run("Label...", "format=00:00:00 starting=0 interval=seconds_per_frame x=5 y=20 font=100 text=[] range=images use");
run("AVI... ", "compression=JPEG frame=10 save=[output3]");
close();
close();
```

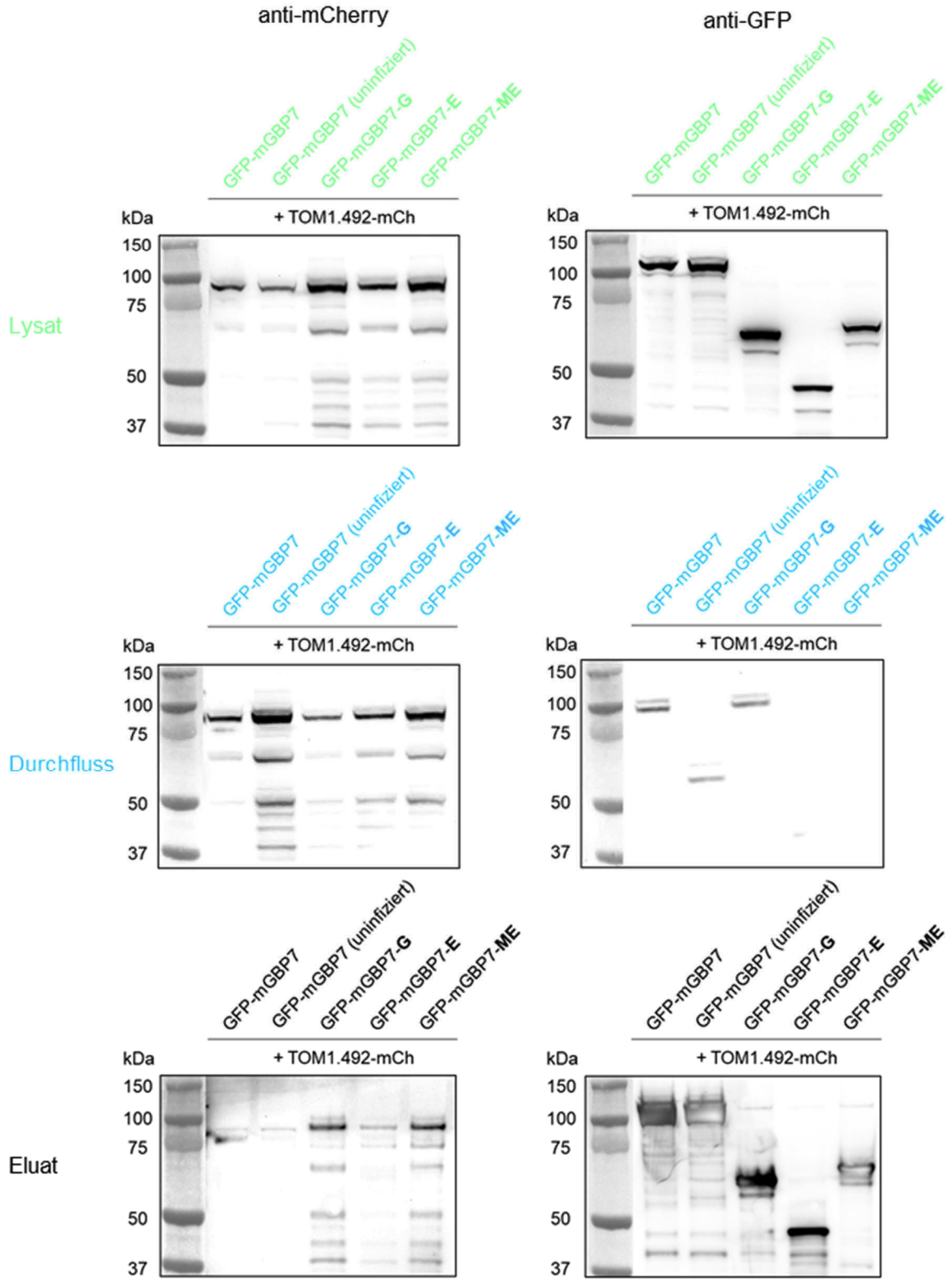
10.2 In MEFs exprimiertes TOM1



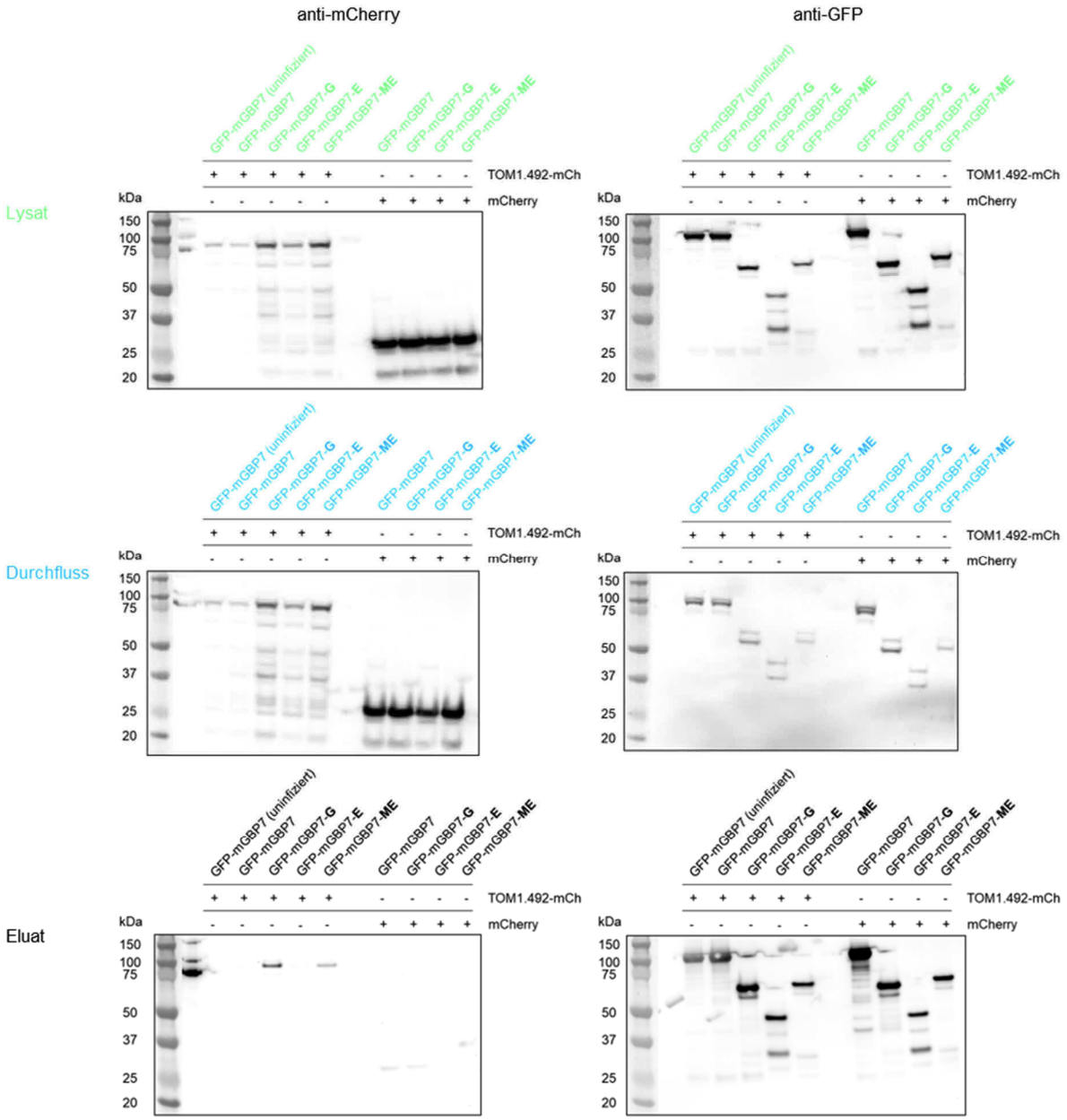
Anhang 1: Mit UV-Licht bestrahlte Agarose-Gele nach einer Gelelektrophorese; A: schematische Darstellung der Primerbindestellen (grüne Pfeile) auf dem *tom1* Gen (dunkelblau) der PCR aus B; die 72 zusätzlichen bp von *tom1.516* sind in hellblau dargestellt; B: Produkte einer PCR, deren vorwärts gerichteter Primer komplementär zu den zusätzlichen Basenpaaren von TOM1.516 ist, Template: pcDNA3.1(+) HA-Tom1.516, erwartete Produktgröße beträgt 542 bp.

Interaktion zwischen mGBP7 und TOM1

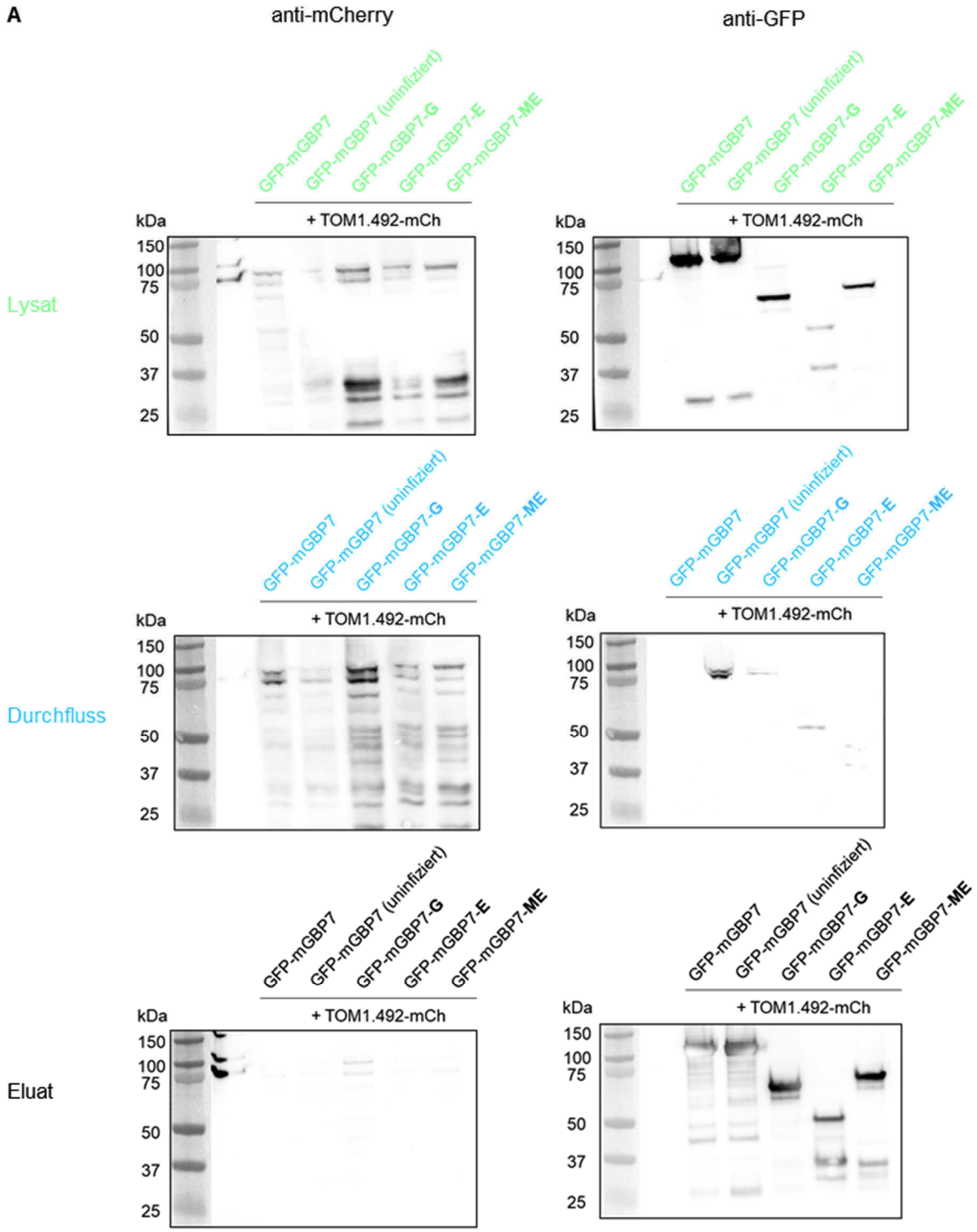
10.2.1 Identifikation der Interaktionsdomäne von mGBP7

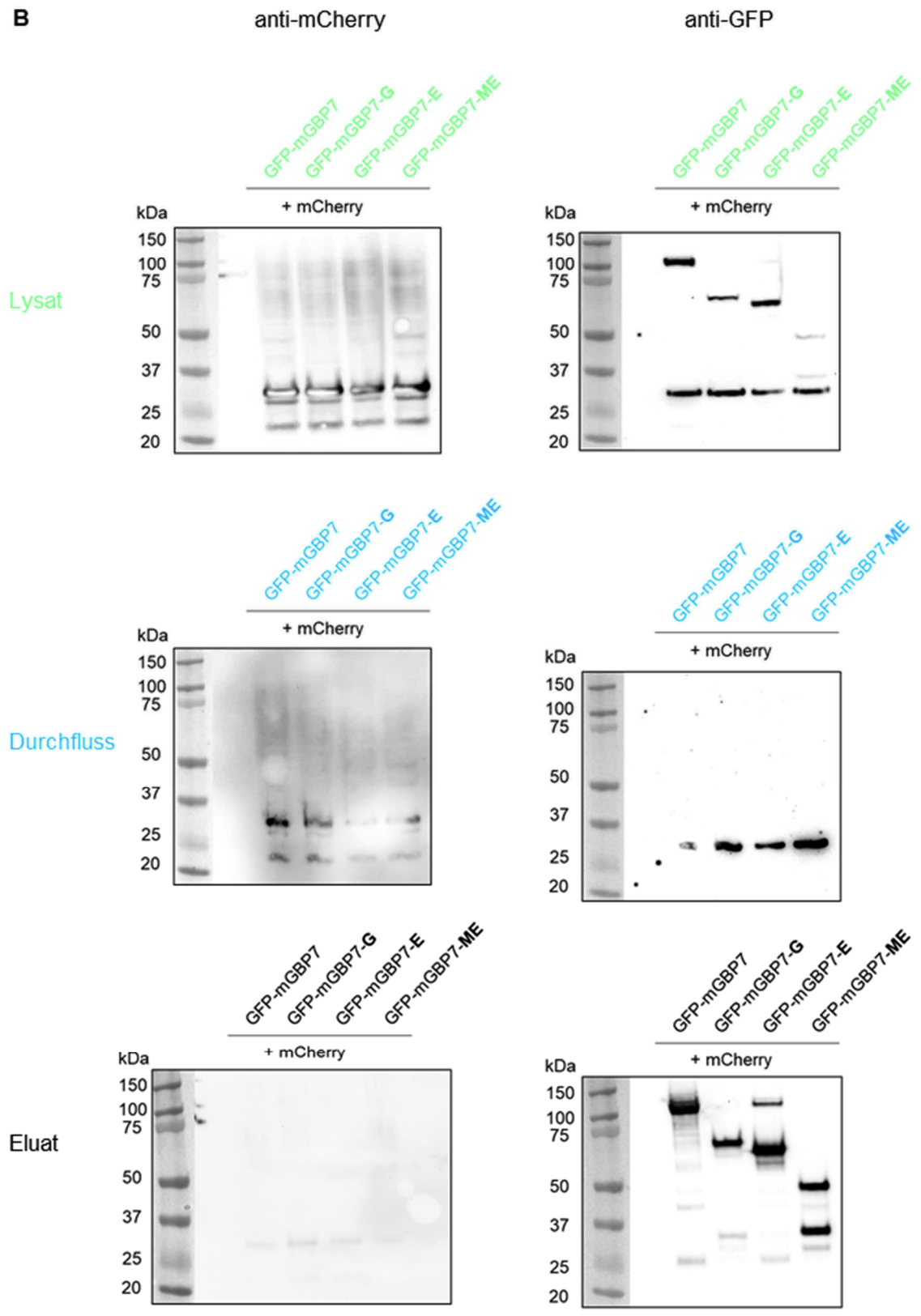


Anhang 2: Western Blots nach GFP-Trap-Aufreinigung, mGBP7$^{-/-}$ MEFs, die sowohl GFP-getaggte mGBP7-Konstrukte als auch TOM1.492-mCherry exprimieren, wurden mit *T. gondii* infiziert und 2.5 h später lysiert; grün: Lysat-Proben, blau: Durchfluss-Proben, schwarz: Eluat-Proben; erwartete Proteingrößen: TOM1.492-mCherry (81 kDa), GFP-mGBP7 (100 kDa), GFP-mGBP7-G (61 kDa), GFP-mGBP7-E (45 kDa), GFP-mGBP7-ME (65 kDa).

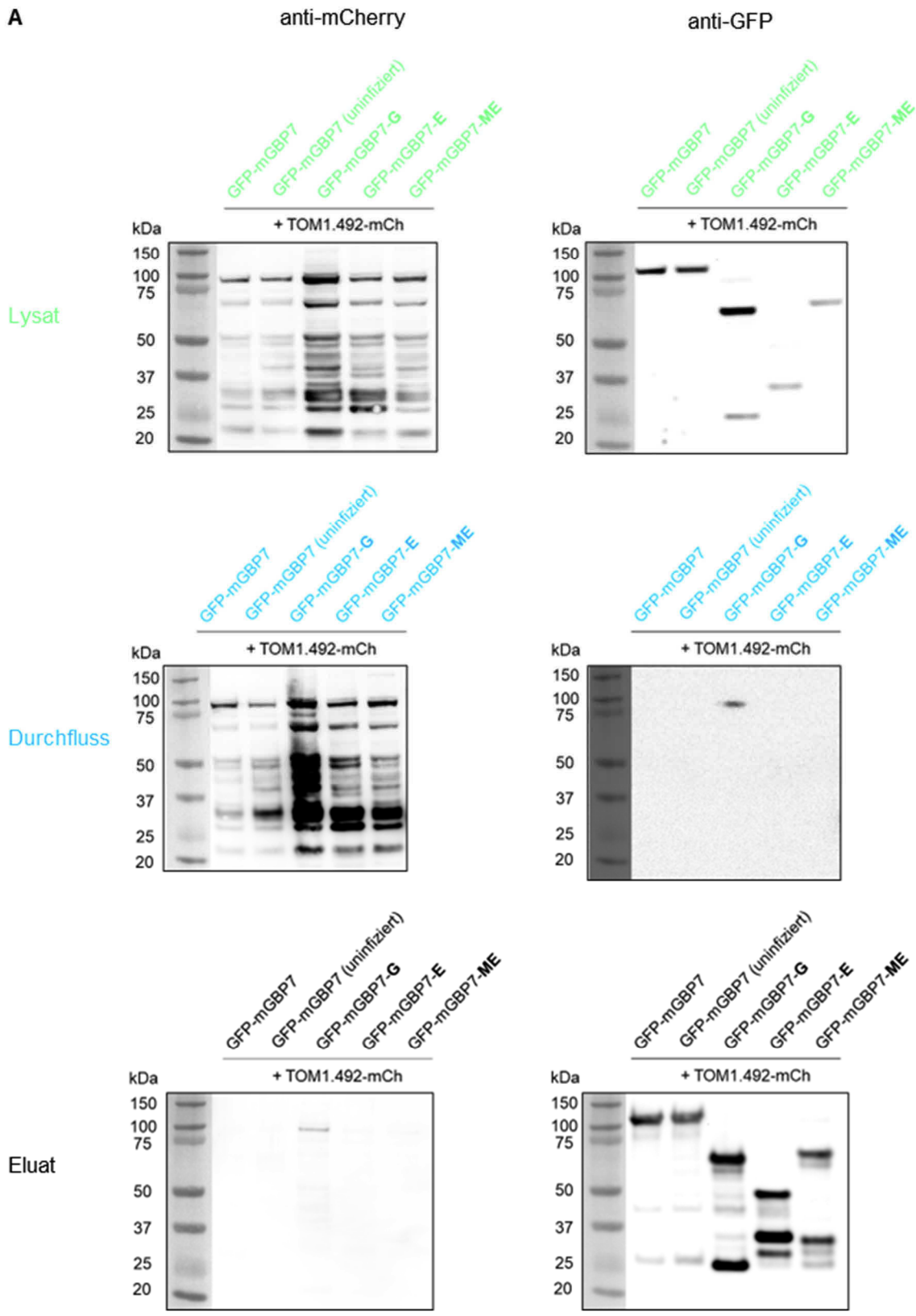


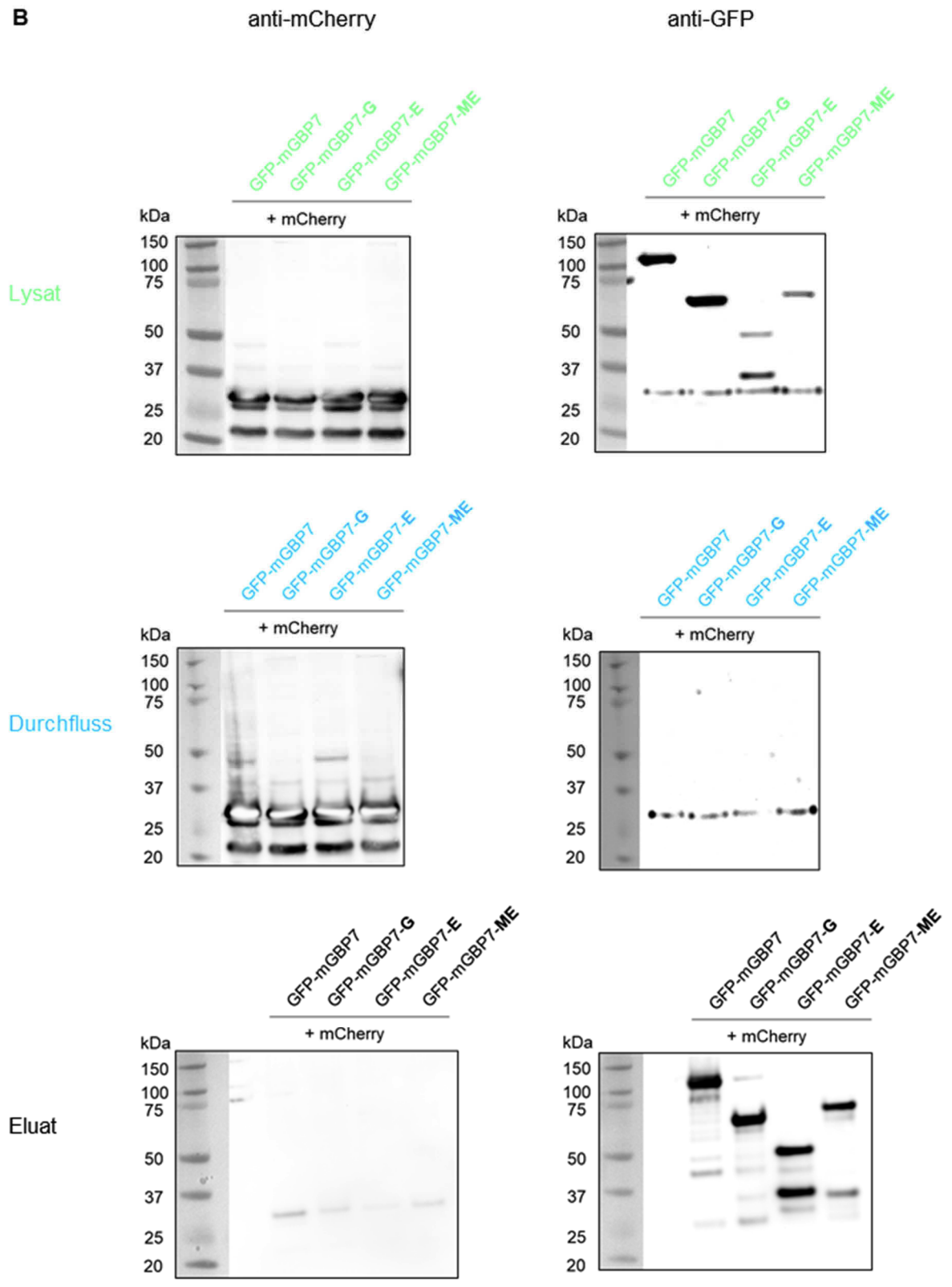
Anhang 3: Western Blots nach GFP-Trap-Aufreinigung; mGBP7$^{-/-}$ MEFs, die sowohl GFP-getaggte mGBP7-Konstrukte als auch TOM1.492-mCherry exprimieren, wurden mit *T: gondii* infiziert und 2.5 h später lysiert, mCherry-exprimierende Zellen wurden als Neagtivkontrolle verwendet; grün: Lysat-Proben, blau: Durchfluss-Proben, schwarz: Eluat-Proben; erwartete Proteingrößen: TOM1.492-mCherry (81 kDa), GFP-mGBP7 (100 kDa), GFP-mGBP7-G (61 kDa), GFP-mGBP7-E (45 kDa), GFP-mGBP7-ME (65 kDa).


A
anti-mCherry
anti-GFP
Lysat
Durchfluss
Eluat
GFP-mGBP7
GFP-mGBP7 (uninfiziert)
GFP-mGBP7-G
GFP-mGBP7-E
GFP-mGBP7-ME
+ TOM1.492-mCh
kDa
150
100
75
50
37
25



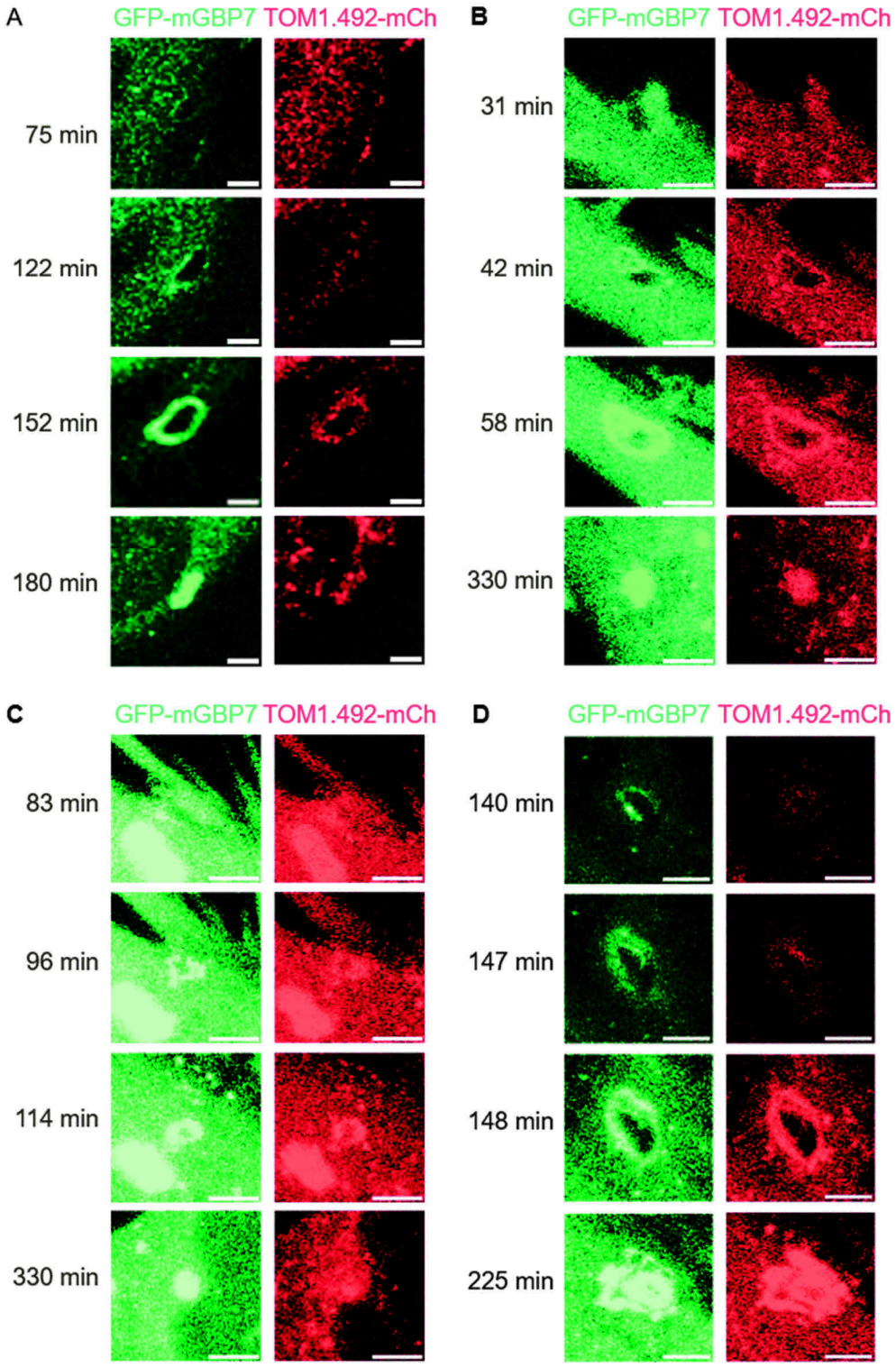
Anhang 4: Western Blots nach GFP-Trap-Aufreinigung; A: mGBP7$^{-/-}$ MEFs, die sowohl GFP-getaggte mGBP7-Konstrukte als auch TOM1.492-mCherry exprimieren, wurden mit *T. gondii* infiziert und 2.5 h später lysiert, B: mCherry-exprimierende Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet; grün: Lysat-Proben, blau: Durchfluss-Proben, schwarz: Eluat-Proben; erwartete Proteingrößen: TOM1.492-mCherry (81 kDa), GFP-mGBP7 (100 kDa), GFP-mGBP7-G (61 kDa), GFP-mGBP7-E (45 kDa), GFP-mGBP7-ME (65 kDa).


A
anti-mCherry
anti-GFP
Lysat
Durchfluss
Eluat
GFP-mGBP7
GFP-mGBP7 (uninfiziert)
GFP-mGBP7-G
GFP-mGBP7-E
GFP-mGBP7-ME
+ TOM1.492-mCh
kDa
150
100
75
50
37
25
20



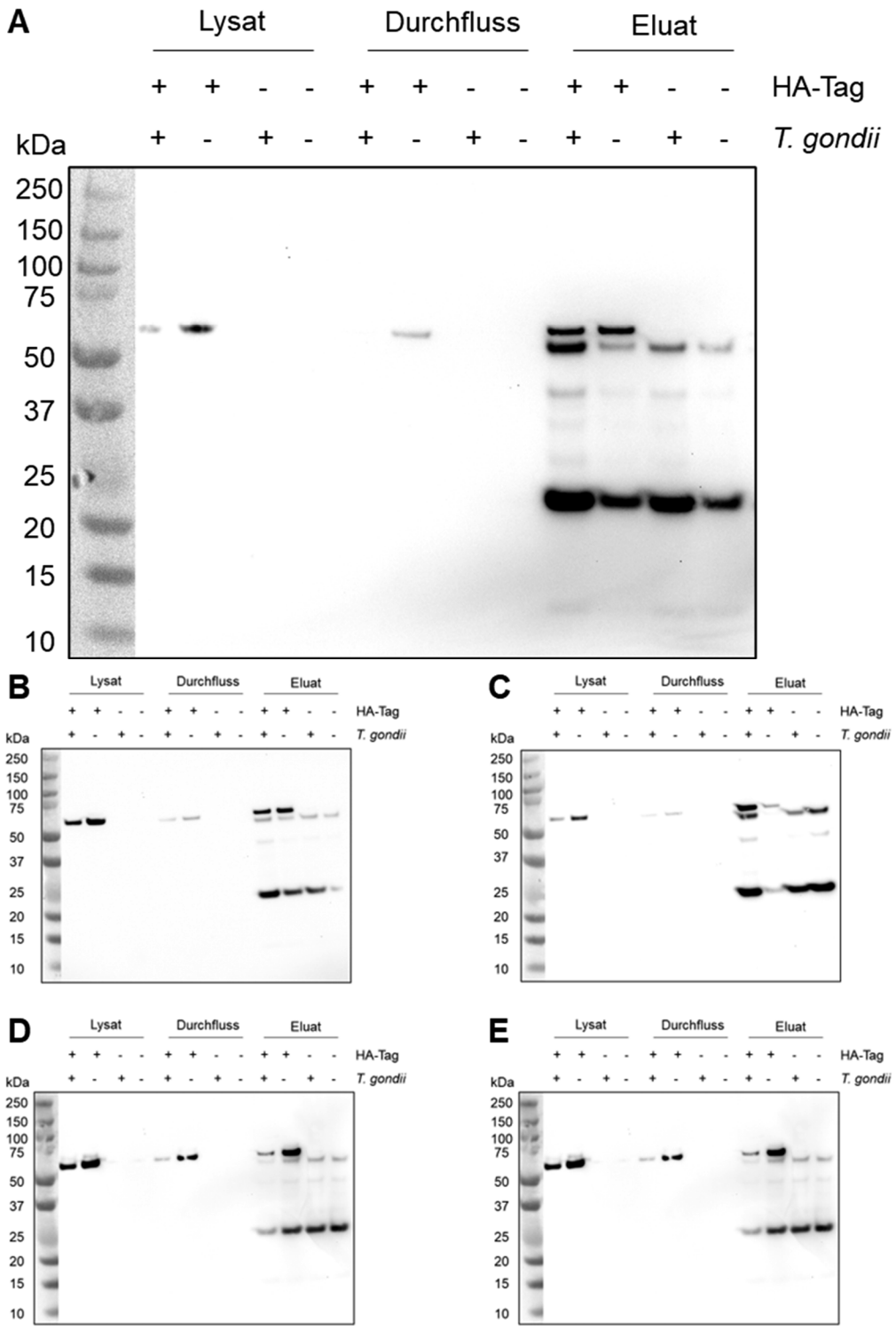
Anhang 5: Western Blots nach GFP-Trap-Aufreinigung; A: mGBP7$^{-/-}$ MEFs, die sowohl GFP-getaggte mGBP7-Konstrukte als auch TOM1.492-mCherry exprimieren, wurden mit *T. gondii* infiziert und 2.5 h später lysiert; B: mCherry-exprimierende Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet, grün: Lysat-Proben, blau: Durchfluss-Proben, schwarz: Eluat-Proben; erwartete Proteingrößen: TOM1.492-mCherry (81 kDa), GFP-mGBP7 (100 kDa), GFP-mGBP7-G (61 kDa), GFP-mGBP7-E (45 kDa), GFP-mGBP7-ME (65 kDa).

10.2.2 Dynamik der Rekrutierung von mGBP7 und TOM1 zur T. gondii PV

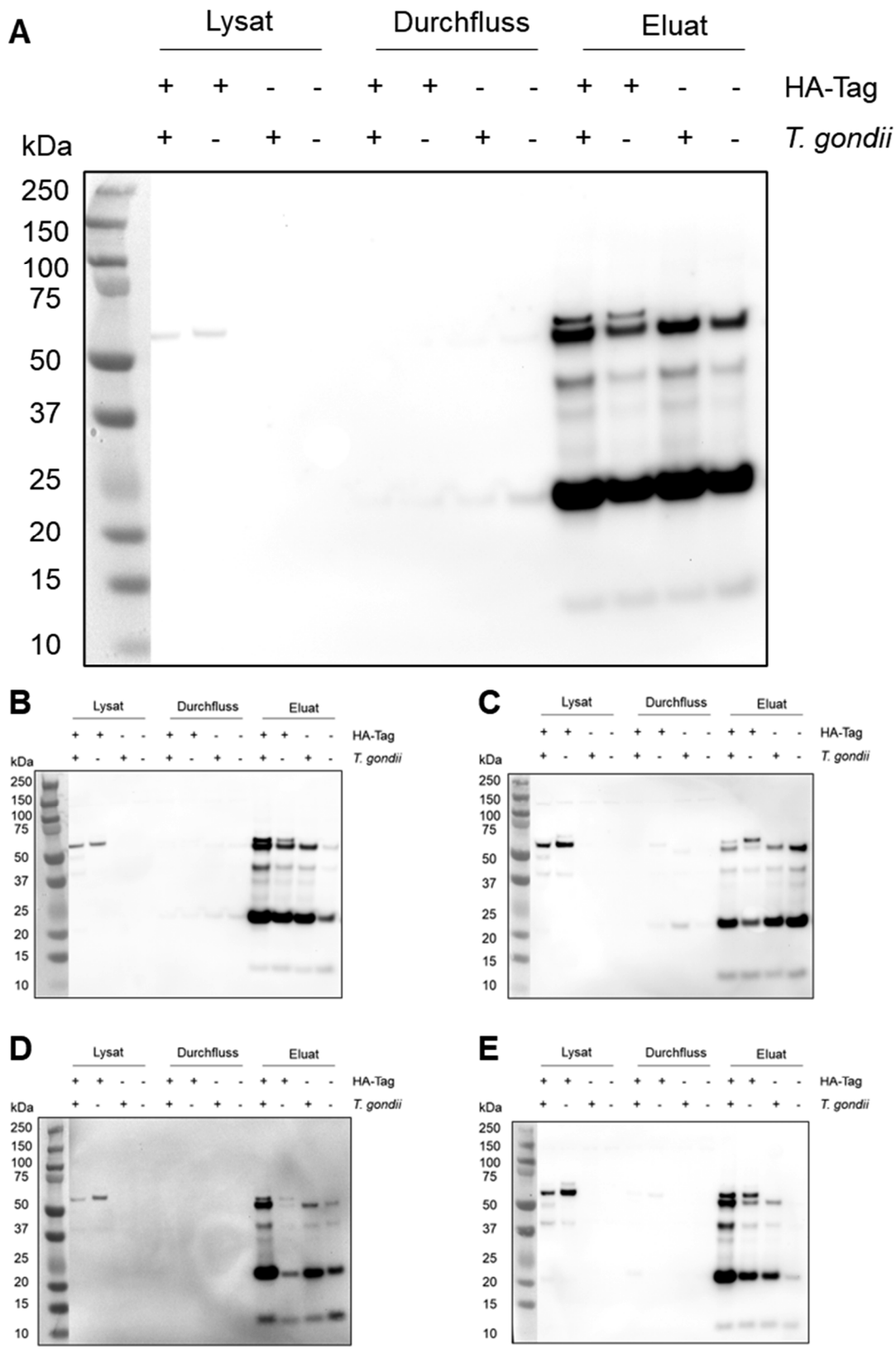


Anhang 6: Lebendzellmikroskopie-Aufnahmen von mit *T. gondii* infizierten MEFs (mGBP7$^{-/-}$ + GFP-mGBP7 + TOM1.492-mCherry) zu verschiedenen Zeitpunkten. T=0 min: Zugabe der Parasiten zum Zellmedium, A-D: Biologische Replikate; das jeweils erste Bild zeigt die Infektion, das zweite den Beginn der Rekrutierung der Proteine zur PV, das dritte Bild zeigt die maximale Intensität der beiden Proteine an der PV, das vierte Bild zeigt die Deformation und damit einhergehende Zerstörung der *T. gondii* PV; Maßstabsbalken: 5 µm.

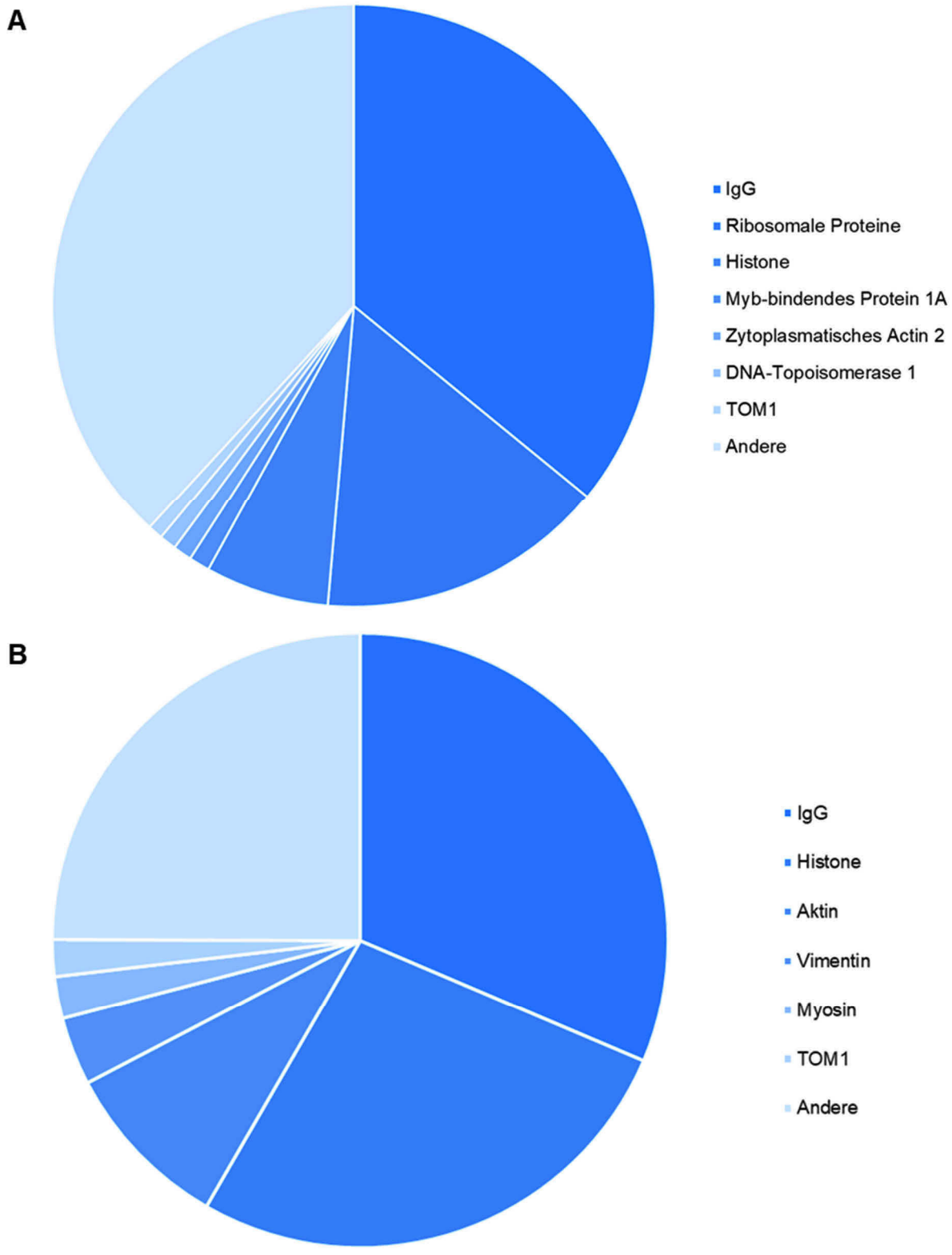
10.3 Interaktionspartner von TOM1 im Kontext einer *T. gondii* Infektion



Anhang 7: anti-HA-WBs von Proben einer anti-HA Ko-IP; MEFs (WT + TOM1.492-HA, bzw. WT + TOM1.516-GFP als Negativkontrolle) wurden mit *T. gondii* infiziert und 2,5 h später lysiert, bzw. uninfiziert lysiert; A-E: Biologische Replikate; erwartete Proteingrößen: HA-getaggtes TOM1.492 (55 kDa), IgG schwere Kette (50 kDa), IgG leicht Kette (25 kDa).



Anhang 8: anti-HA-WBs von Proben einer anti-HA Ko-IP; MEFs (WT + HA-TOM1.492, bzw. WT + TOM1.516-GFP als Negativkontrolle) wurden mit *T. gondii* infiziert und 2,5 h später lysiert, bzw. uninfiziert lysiert; A-E: Biologische Replikate; erwartete Proteingrößen: HA-getaggtes TOM1.492 (55 kDa), IgG schwere Kette (50 kDa), IgG leichte Kette (25 kDa).



Anhang 9: Verteilung der gemessenen MS-Intensitäten von Proben einer mittels anti-HA Antikörpern durchgeführten Ko-IP; MEFs (WT + HA-getaggtes TOM1.492, bzw. WT + TOM1.516-GFP als Negativkontrolle) wurden mit *T. gondii* infiziert und 2,5 h später lysiert, bzw. uninfiziert lysiert; A: Verteilung für TOM1.492-HA (C-terminales Tag); B: Verteilung für HA-TOM1.492 (N-terminales Tag).

Tabelle 5: Liste der ersten 50 identifizierten Proteine der MS-Analyse nach Ko-IP mit TOM1.ΔVHS-HA, sortiert nach der berechneten Signifikanz (statistische Auswertung der Ergebnisse durchgeführt von Gereon Poschmann mittels SAM (engl.: *significance analysis of microarrays*)

Inf. TOM1.ΔVHS-HA vs uninf. TOM1.ΔVHS-HA			**Inf. TOM1.ΔVHS-HA vs inf. TOM1-GFP Kontrolle**		
Proteinnamen (engl.)	**Intensität**	**Signifikanz**	**Proteinnamen (engl.)**	**Intensität**	**Signifikanz**
Gremlin-1	122580000	4,65296	TOM1	1248600000	3,63447
Unconventional myosin-Ie	75565000	2,77182	TOLLIP	1183000000	2,56551
Peflin	6773200	2,56162	Hepatoma-derived growth factor-related protein 3	13134000	2,10975
DnaJ homolog subfamily C member 10	17874000	2,54421	WD repeat-containing protein 6	21373000	2,06681
Thioredoxin	16105000	2,09176	DnaJ domain-containing protein (Putative DnaJ family chaperone)	4061400	1,84806
WD repeat-containing protein 6 (	21373000	2,02078	Junction plakoglobin	50799000	1,58421
Junction plakoglobin	50799000	1,96833	Thioredoxin	16105000	1,568
CCN family member 2	380620000	1,86856	Actin-related protein 2/3 complex subunit	28791000	1,56287
Histone H1.0	398340000	1,84172	Tight junction protein 1	62970000	1,56004
Transcription factor JunB	18871000	1,79563	Profilin-1	76468000	1,51861
Pinin	11071000	1,74794	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	404860000	1,47679
Son DNA binding protein	109250000	1,63339	Cofilin 1	170630000	1,42814
Erythrocyte membrane protein band 4.1 like 1	14779000	1,6297	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	10293000	1,42145
Programmed cell death protein 6	71606000	1,56356	Asparagine synthetase	36848000	1,38645
Magnesium transporter 1	33130000	1,5502	Galactocerebrosidase	20551000	1,36552
Keratin-76	1373400000	1,38449	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	789090000	1,36485
Annexin A2	1,0479E+10	1,34711	Spectrin alpha	40836000	1,36422
14-3-3 protein theta	21663000	1,31236	L-lactate dehydrogenase	70918000	1,36182
Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase	12695000	1,27838	Bifunctional phosphoribosylaminoimidazole carboxylase/phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase	13354000	1,35961
Translocating chain-associated membrane protein 1	34716000	1,25544	Proteasome subunit alpha type-5	34013000	1,34739
Voltage-dependent anion channel 3	14440000	1,19619	Alpha-enolase	641180000	1,31298

Calcyclin-binding protein	20794000	1,19416	GTP-binding nuclear protein	14310000	1,31047
Enhancer of mRNA-decapping protein 4	62956000	1,17184	Spermatogenesis associated	28569000	1,30739
Desmoplakin;Desmoplakin (DP)	10898000	1,1669	Casein kinase 1	41833000	1,29552
Phosphate carrier protein	89213000	1,16244	Fructose-bisphosphate aldolase 3	103810000	1,27743
Protein S100-A10	160580000	1,14982	Annexin A5	140010000	1,25777
Basic leucine zipper and W2 domains 1	25716000	1,14597	F-actin-capping protein subunit alpha-2	35141000	1,25207
Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region	32726000	1,11216	26S proteasome regulatory subunit 6B	20783000	1,24991
Serine hydroxymethyltransferase	28500000	1,08124	L-lactate dehydrogenase A chain C	244140000	1,24773
NADH-cytochrome b5 reductase	8646300	1,05211	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	29109000	1,24259
Transmembrane p24 trafficking protein 10	3569600	1,05014	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	603760000	1,23977
ADP-ribosylation factor 1	20921000	1,04825	14-3-3 protein eta	24871000	1,22935
Protein MAK16 homolog	9720400	1,04405	Calcyclin-binding protein	20794000	1,22067
Structural maintenance of chromosomes protein 1A	16505000	1,03309	AP-2 complex subunit alpha-2	102540000	1,1988
mRNA turnover protein 4 homolog	25477000	1,03222	Filamin-C	22298000	1,19422
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3	73515000	1,01873	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	936620000	1,19198
Tubulin alpha chain-like 3	8202500	1,01788	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	62440000	1,19157
Four and a half LIM domains 3	11973000	1,01042	ATP-dependent RNA helicase DDX3Y	70150000	1,18852
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A	8436000	0,996988	Myosin VIIA;Myosin VIIA	41868000	1,17463
Cyclin-dependent kinase 10	18458000	0,994385	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	8459400	1,1698
Calnexin	19812000	0,99281	Dense granule protein 3	92646000	1,15742
Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	87701000	0,981647	ADP-ribosylation factor 4	94217000	1,15596
Coatomer subunit delta	9429800	0,973432	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	17243000	1,13339
Hepatoma-derived growth factor-related protein 3	13134000	0,957391	Aspartate aminotransferase	43147000	1,13167
Nuclear factor 1	151670000	0,957185	Spectrin beta chain	102750000	1,13119

Galactocerebrosidase	20551000	0,929698	Electrogenic aspartate/glutamate antiporter SLC25A12	24578000	1,13033
S-adenosylhomocysteine hydrolase-like protein 1	19321000	0,927828	Nucleoside diphosphate kinase	128480000	1,12102
Cysteine--tRNA ligase	82101000	0,919741	ATP synthase subunit f, mitochondrial	49602000	1,10062
BUB3-interacting and GLEBS motif-containing protein ZNF207	88057000	0,900507	60 kDa heat shock protein	387080000	1,10043
Aars1	10293000	0,895482	High mobility group nucleosomal binding domain 2	95121000	1,0992

Tabelle 6: Liste der ersten 50 identifizierten Proteine der MS-Analyse nach Ko-IP mit TOM1.492-HA, sortiert nach der berechneten Signifikanz (statistische Auswertung der Ergebnisse durchgeführt von Gereon Poschmann mittels SAM (engl.: *significance analysis of microarrays*)

Inf. TOM1.492-HA vs uninf. TOM1.492-HA			**Inf. TOM1.492-HA vs inf. TOM1-GFP Kontrolle**		
Proteinnamen (engl.)	**Intensität**	**Signifikanz**	**Proteinnamen (engl.)**	**Intensität**	**Signifikanz**
Vesicle-associated membrane protein	26801000	3,9004	TOM1	1885800000	6,90192
Large ribosomal subunit protein eL32	145250000	3,04194	TOLLIP	120130000	2,3313
Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	17009000	3,01849	High mobility group AT-hook 2	21535000	1,8903
Histone H2A type 2-B	15862000	2,50335	High mobility group AT-hook 1	35708000	1,79959
40S ribosomal protein S18	1006500000	2,1617	Vesicle-associated membrane protein	26801000	1,70799
Small ribosomal subunit protein eS26	557110000	2,12512	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	38479000	1,60435
40S ribosomal protein S30	585030000	1,84629	Galactocerebrosidase	6271400	1,59618
Small ribosomal subunit protein eS7	82063000	1,72703	Aldo-keto reductase family 1 member B1	3483200	1,56416
Son DNA binding protein	69952000	1,70301	Cofilin 1, non-muscle	93617000	1,5287
Putative phospholipase B-like 2	4366400	1,64	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	914240000	1,49969
Small ribosomal subunit protein uS5	486420000	1,44893	Keratin, type II cytoskeletal 2 oral)	691200000	1,46877
Ribosomal protein L36A, pseudogene 1	292700000	1,4429	Heat shock protein HSP 90-alpha	67964000	1,45744
40S ribosomal protein S27	104930000	1,42062	Adenine phosphoribosyl transferase	5227600	1,4299
Nucleolin	717810000	1,39403	Ubiquitin-ribosomal protein eS31 fusion protein	427110000	1,42178
Immunoglobulin heavy constant gamma 1	1,1223E+10	1,39064	Nucleoside diphosphate kinase	35591000	1,40693

Immunoglobulin kappa constant	2,323E+10	1,37963	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	310890000	1,3812
Small ribosomal subunit protein eS4	7040400000	1,37618	Galectin-1	82745000	1,37337
Tripeptidyl-peptidase 2	7454600	1,36071	Protein disulfide-isomerase A6	10858000	1,36711
Large ribosomal subunit protein eL43	155150000	1,29669	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	88504000	1,33901
40S ribosomal protein S15a	85174000	1,28588	T-complex protein 1 subunit theta	47308000	1,33813
Small ribosomal subunit protein uS9	863600000	1,27609	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	80217000	1,31001
Immunoglobulin kappa chain variable 4-72	2,1597E+10	1,2665	S-formylglutathione hydrolase	3521600	1,26619
Large ribosomal subunit protein uL15 (60S ribosomal protein L27a) (L29)	43764000	1,24368	Cytotoxic granule-associated RNA binding protein 1	10162000	1,23731
Small ribosomal subunit protein uS12	682620000	1,20274	L-lactate dehydrogenase A chain	74676000	1,23221
Small ribosomal subunit protein eS24	471930000	1,16214	14-3-3 protein zeta/delta	98926000	1,22503
Ribosomal protein 10	46360000	1,1613	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	105890000	1,21325
Large ribosomal subunit protein eL13	83896000	1,15722	Tuftelin-interacting protein 11	16303000	1,19271
Immunoglobulin heavy variable 5-6	9264700000	1,1483	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	21369000	1,18415
Small ribosomal subunit protein uS3	135060000	1,14513	Annexin A1	43614000	1,18122
Large ribosomal subunit protein eL24	277970000	1,14015	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	6573800	1,17769
Large ribosomal subunit protein uL6	60089000	1,13846	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	40287000	1,16478
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	62512000	1,13237	RING-type E3 ubiquitin transferase	391800000	1,13431
Large ribosomal subunit protein uL29	171980000	1,13171	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	94597000	1,12785
Large ribosomal subunit protein uL13	100350000	1,1253	Prelamin-A/C	9980900	1,12134
40S ribosomal protein S25	3372700000	1,1195	Moesin	30030000	1,05318
Large ribosomal subunit protein eL36	27206000	1,10319	Transketolase	22997000	1,04217
Large ribosomal subunit protein eL38	633110000	1,0842	ADP-ribosylation factor 4	5356100	1,04122
Galectin-3-binding protein	79308000	1,0837	T-complex protein 1 subunit eta	18094000	1,03206
Small ribosomal subunit protein RACK1	33812000	1,05124	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	3376900	1,02719
Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	691200000	1,02843	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	17009000	1,02547

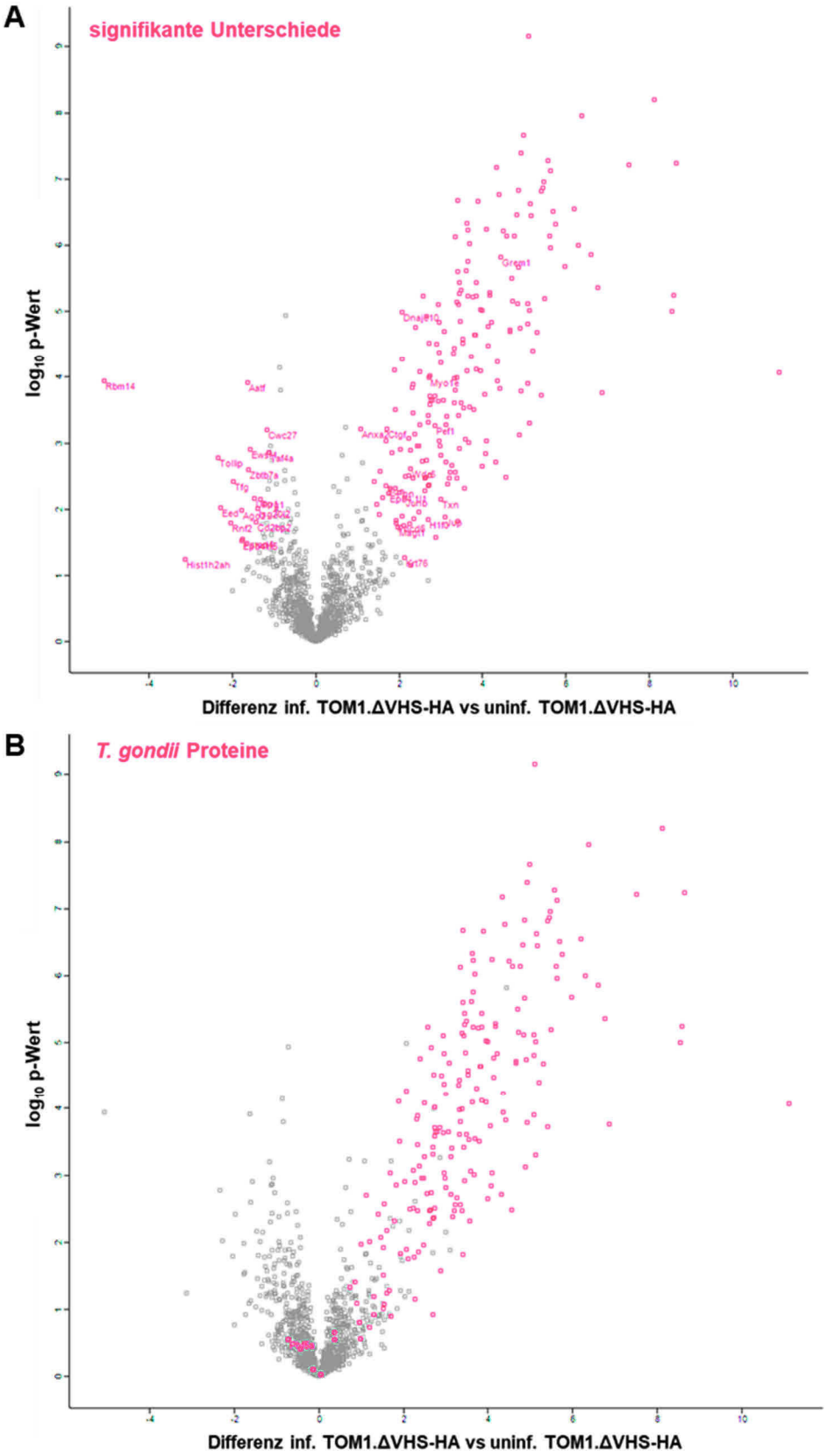
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	32827000	1,02295	RNA recognition motif-containing protein	180500000	1,01944
Small ribosomal subunit protein eS8	146150000	1,01453	Calreticulin	8938300	1,01354
Small ribosomal subunit protein uS17	140770000	0,97447	RNA helicase	336520000	0,97542
Small ribosomal subunit protein eS17	456120000	0,95982	Fatty acid synthase	25357000	0,95047
Small ribosomal subunit protein uS14	47230000	0,95563	Myosin-9	17138000	0,92756
Small ribosomal subunit protein uS19	293280000	0,94788	Phosphoglycerate kinase 1	41614000	0,91341
Protein-lysine 6-oxidase	184470000	0,93393	protein disulfide-isomerase	3965500	0,90187
RNA helicase	336520000	0,92378	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	19189000	0,89238
Large ribosomal subunit protein uL14	838990000	0,90788	Annexin A2	136830000	0,88922
Spermidine synthase	15931000	0,90707	RAB1A	10083000	0,88191

Tabelle 7: Liste der ersten 50 identifizierten Proteine der MS-Analyse nach Ko-IP mit HA-TOM1.492, sortiert nach der berechneten Signifikanz (statistische Auswertung der Ergebnisse durchgeführt von Gereon Poschmann mittels SAM (engl.: *significance analysis of microarrays*)

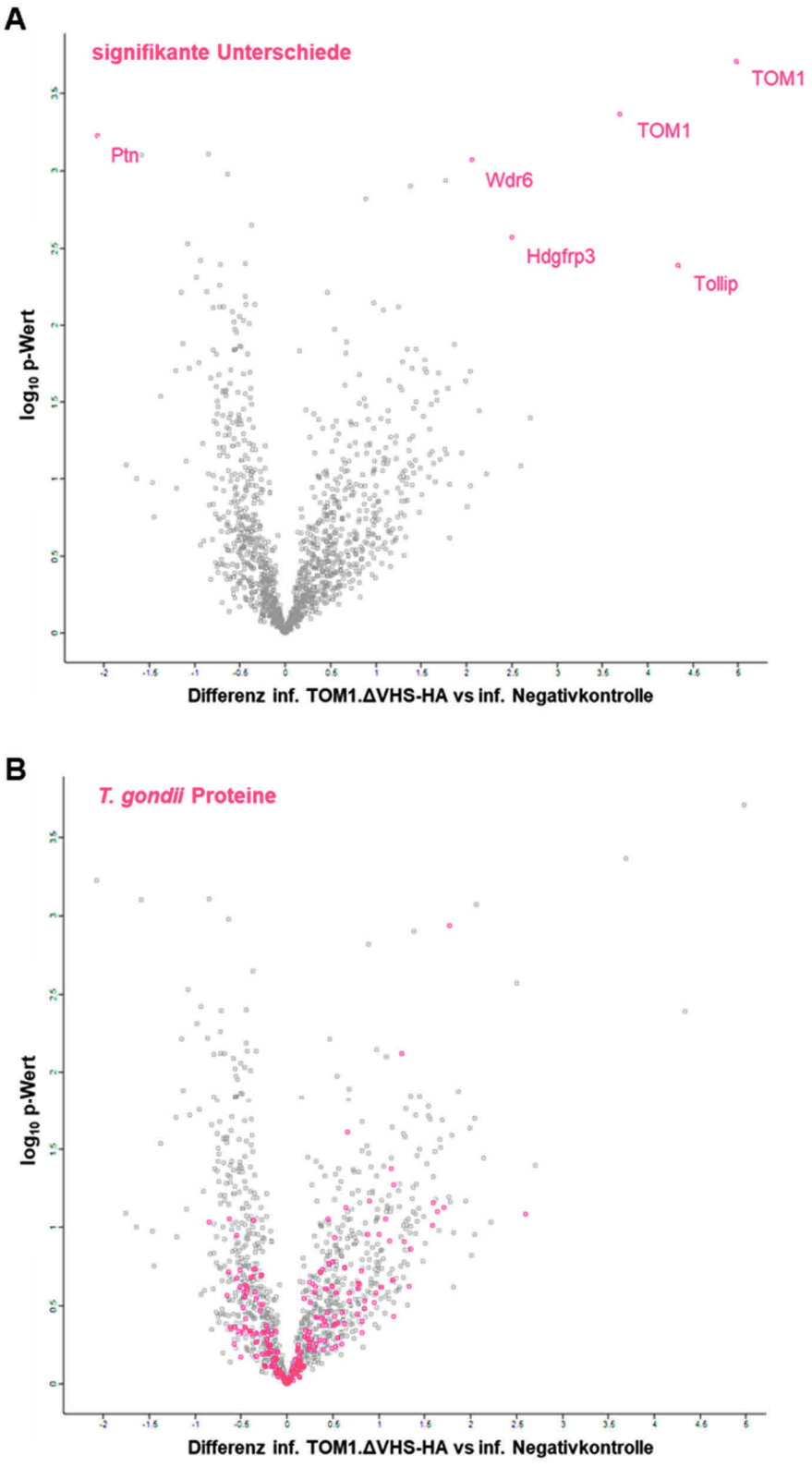
Inf. HA-TOM1.492 vs uninf. HA-TOM1.492			**Inf. HA-TOM1.492 vs inf. TOM1-GFP Kontrolle**		
Proteinnamen (engl.)	**Intensität**	**Signifikanz**	**Proteinnamen (engl.)**	**Intensität**	**Signifikanz**
Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	22269000	2,55653	TOM1	531200000	7,48681
Transmembrane protein 33	7860700	2,19784	TOLLIP	241450000	5,63222
Translin	3892700	1,99261	Unconventional myosin-VI	6439100	2,63003
Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	6492000	1,87588	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	24929000	2,42924
Myosin, light chain 12A	405580000	1,78016	High mobility group AT-hook 2	15031000	2,2892
Zinc finger CCCH-type containing 18	6136900	1,7351	RNA recognition motif-containing protein	146290000	2,27729
Myosin-14	91483000	1,73052	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	8005500	2,08067
Poly(U)-binding-splicing factor PUF60	78026000	1,7281	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	19335000	2,01657
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	6809300	1,67352	AHNAK nucleoprotein	13777000	1,99904
Myosin, heavy polypeptide 10	607580000	1,65488	Uridine 5'-monophosphate synthase	3129400	1,80728
RuvB-like 1	22999000	1,49092	Rhoptry kinase family protein ROP17	25427000	1,75437
Serine/arginine-rich splicing factor 3	141180000	1,49064	RING-type E3 ubiquitin transferase	786850000	1,71625

Galectin-1	77907000	1,47655	Prohibitin	6548700	1,69258
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	25021000	1,45353	Rhoptry protein ROP2A	309330000	1,62713
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	20084000	1,42042	Coatomer subunit beta	18279000	1,59267
Myosin-9	3713000000	1,39885	Splicing factor 45	12519000	1,55463
Heat shock cognate 71 kDa protein	313150000	1,36253	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	3955100	1,49967
Immunoglobulin heavy constant gamma 1	1,6771E+10	1,35981	DNA replication licensing factor MCM5	4858300	1,48443
Immunoglobulin heavy variable 5-6	1,3462E+10	1,3389	Endoplasmic reticulum resident protein 44	20267000	1,48039
Uridine 5'-monophosphate synthase	3129400	1,315	Lysyl oxidase homolog	14381000	1,45216
Stress-70 protein, mitochondrial	24972000	1,29375	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60	78026000	1,44917
Immunoglobulin kappa constant	1,5196E+10	1,27537	DNA replication licensing factor MCM7	12031000	1,40833
Caveolae-associated protein 1	51469000	1,2563	Exportin-1	9461200	1,35274
Phosphoglycerate mutase 1	48549000	1,25386	Cytotoxic granule-associated RNA binding protein 1	9103500	1,34756
Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	13609000	1,24546	Succinate dehydrogenase	12269000	1,31893
Polypyrimidine tract-binding protein 1	92905000	1,22537	Galactocerebrosidase	42199000	1,28208
Actin, alpha cardiac muscle 1	1024200000	1,22188	Rhoptry protein ROP8	139780000	1,28089
Importin-5	33385000	1,13486	Immunoglobulin kappa chain variable 4-72	28005000	1,26928
chaperonin containing Tcp1	7513400	1,10769	Lysine--tRNA ligase	7660000	1,26563
Protein transport protein sec16	26875000	1,06817	ADP/ATP translocase 2	193630000	1,2638
Pre-mRNA processing factor 40A	17113000	1,03863	Translin (	3892700	1,25561
Lysine--tRNA ligase	7660000	1,03447	RNA-binding protein 14	143750000	1,22748
Serine/arginine-rich splicing factor 6	125110000	1,03335	Phosphoglycerate kinase 1	15884000	1,18931
Endoplasmic reticulum resident protein 44	20267000	1,0271	Heat shock protein HSP 90-alpha	36097000	1,18717
RING-type E3 ubiquitin transferase	786850000	1,01726	Galectin-3-binding protein	247590000	1,18012
Prohibitin	6548700	1,01418	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	17194000	1,17774
DNA replication licensing factor MCM7	12031000	0,981364	Immunoglobulin kappa constant	1,5196E+10	1,17332
Coatomer subunit beta	18279000	0,979736	Ribonuclease inhibitor	3160900	1,16272
asparagine--tRNA ligase	19409000	0,967236	Moesin	6994000	1,16105
RNA-binding protein 25	60245000	0,966705	Pre-mRNA processing factor 40A	17113000	1,14222

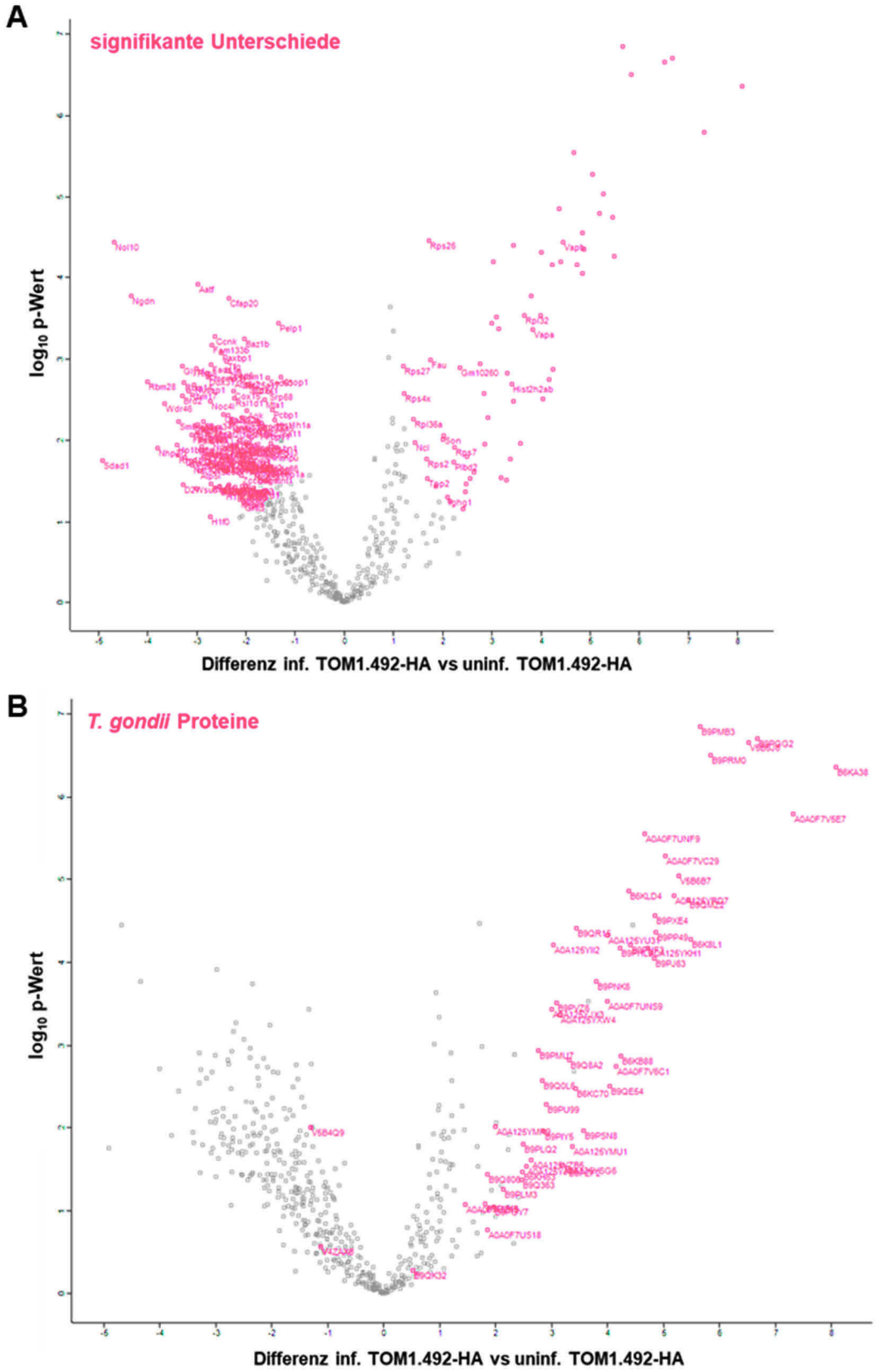
Alpha-enolase	37672000	0,954646	40S ribosomal protein S13	20902000	1,14078
Small ribosomal subunit protein RACK1	140500000	0,938139	Predicted pseudogene 8797	833560000	1,13846
AHNAK nucleoprotein	13777000	0,932517	Clathrin heavy chain 1	171190000	1,13139
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	3955100	0,927727	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	352610000	1,12197
DNA replication licensing factor MCM5 (	4858300	0,923791	Immunoglobulin heavy variable 5-6	1,3462E+10	1,12033
Coatomer subunit alpha	56977000	0,922811	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	1,6771E+10	1,0941
60 kDa heat shock protein	45785000	0,917901	T-complex protein 1 subunit alpha	87065000	1,08951
RNA binding motif protein 39	50662000	0,899781	Tuftelin-interacting protein 11	39532000	1,08077
TOLLIP	241450000	0,896974	T-complex protein 1 subunit epsilon	42520000	1,07362
Cytotoxic granule-associated RNA binding protein 1	9103500	0,877522	Zinc finger CCCH-type containing 18	6136900	1,05818



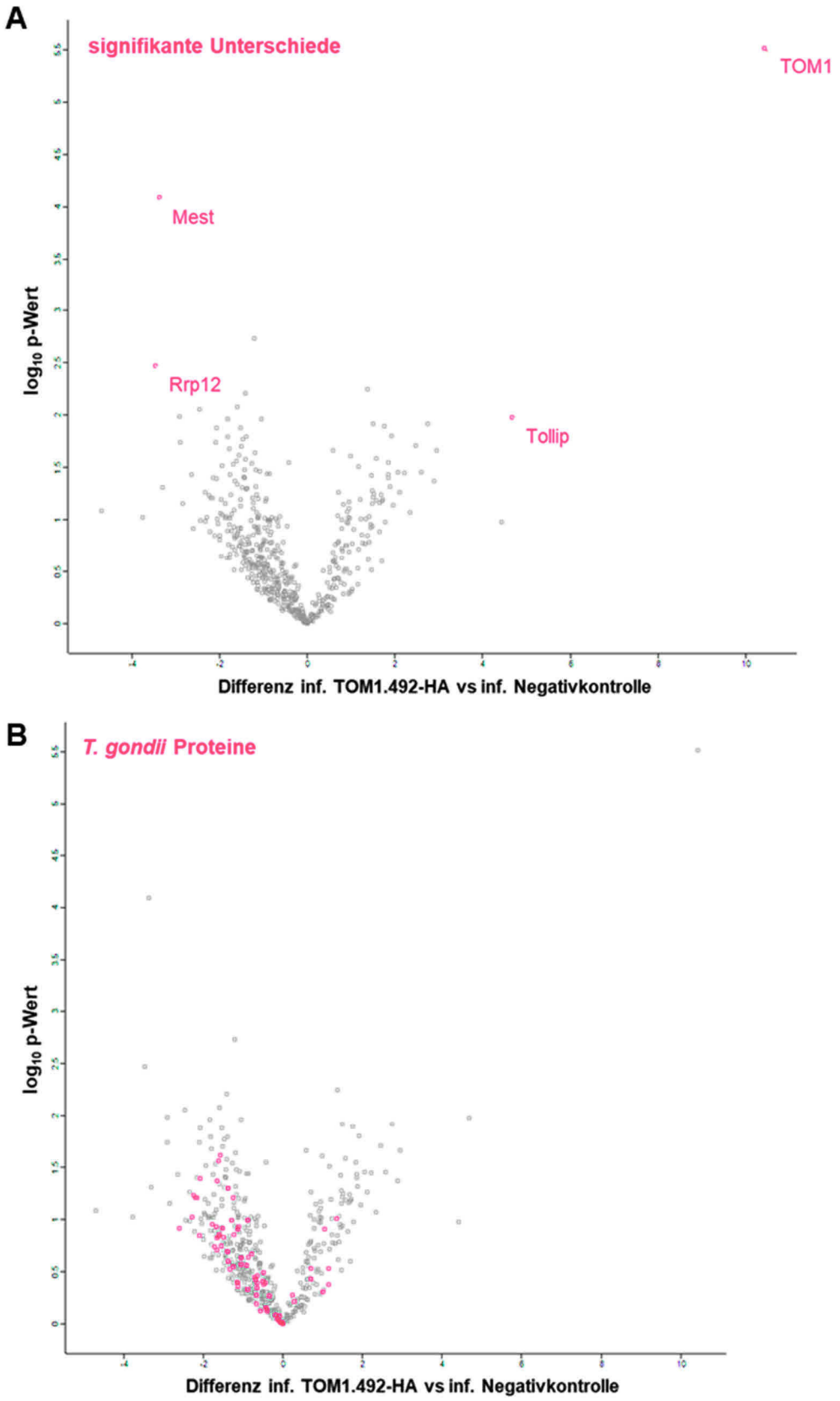
Anhang 10: *Volcano-Plots* der in der MS-Analyse identifizierten Proteine, MEFs (WT + TOM1.ΔVHS-HA) wurden mit *T. gondii* infiziert und 2,5 h später lysiert, bzw. uninfiziert lysiert; Ko-IP erfolgte mittels anti-HA-Antikörpern; die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mittels SAM (engl.: *significance analysis of microarrays*) [183] durchgeführt; A: Proteine mit signifikant unterschiedlichen Signalintensitäten sind in rot markiert; B: *T. gondii* Proteine sind in rot markiert.



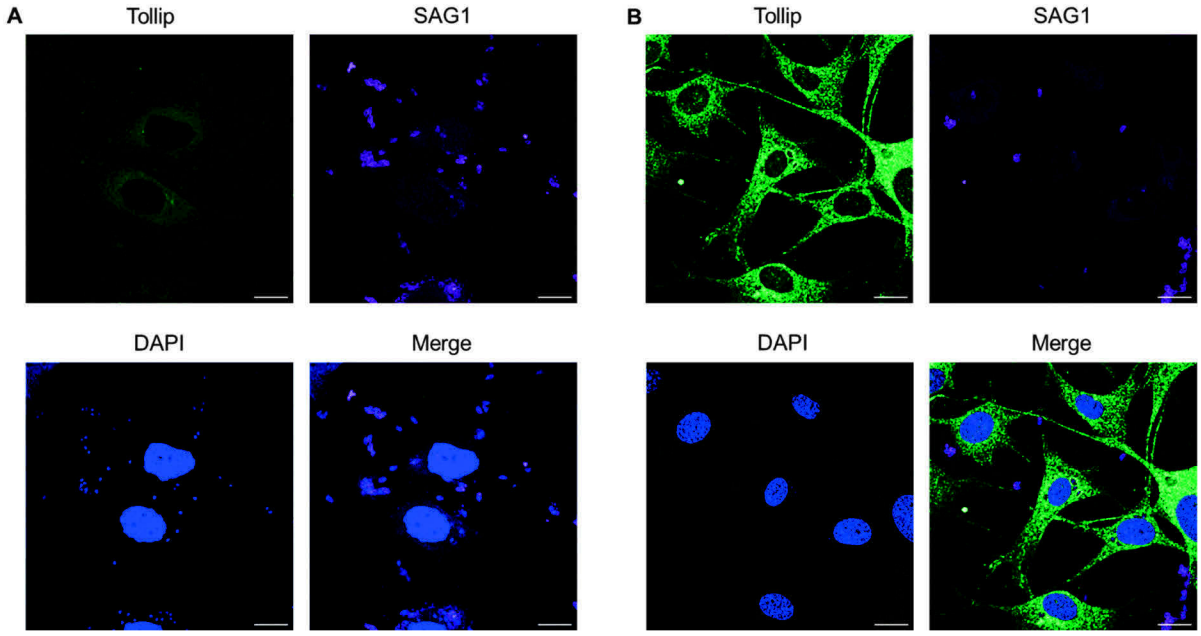
Anhang 11: *Volcano-Plots* der in der MS-Analyse identifizierten Proteine, MEFs (WT + TOM1.ΔVHS-HA, bzw. WT + TOM1.516-GFP als Negativkontrolle) wurden mit *T. gondii* infiziert und 2,5 h später lysiert; Ko-IP erfolgte mittels anti-HA-Antikörpern; die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mittels SAM (engl.: *significance analysis of microarrays*) [183] durchgeführt; A: Proteine mit signifikant unterschiedlichen Signalintensitäten sind in rot markiert; B: *T. gondii* Proteine sind in rot markiert.



Anhang 12: *Volcano-Plots* der in der MS-Analyse identifizierten Proteine, MEFs (WT + TOM1.492-HA) wurden mit *T. gondii* infiziert und 2,5 h später lysiert, bzw. uninfiziert lysiert; Ko-IP erfolgte mittels anti-HA-Antikörpern; die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mittels SAM (engl.: *significance analysis of microarrays*) [183] durchgeführt; A: Proteine mit signifikant unterschiedlichen Signalintensitäten sind in rot markiert; B: *T. gondii* Proteine sind in rot markiert.

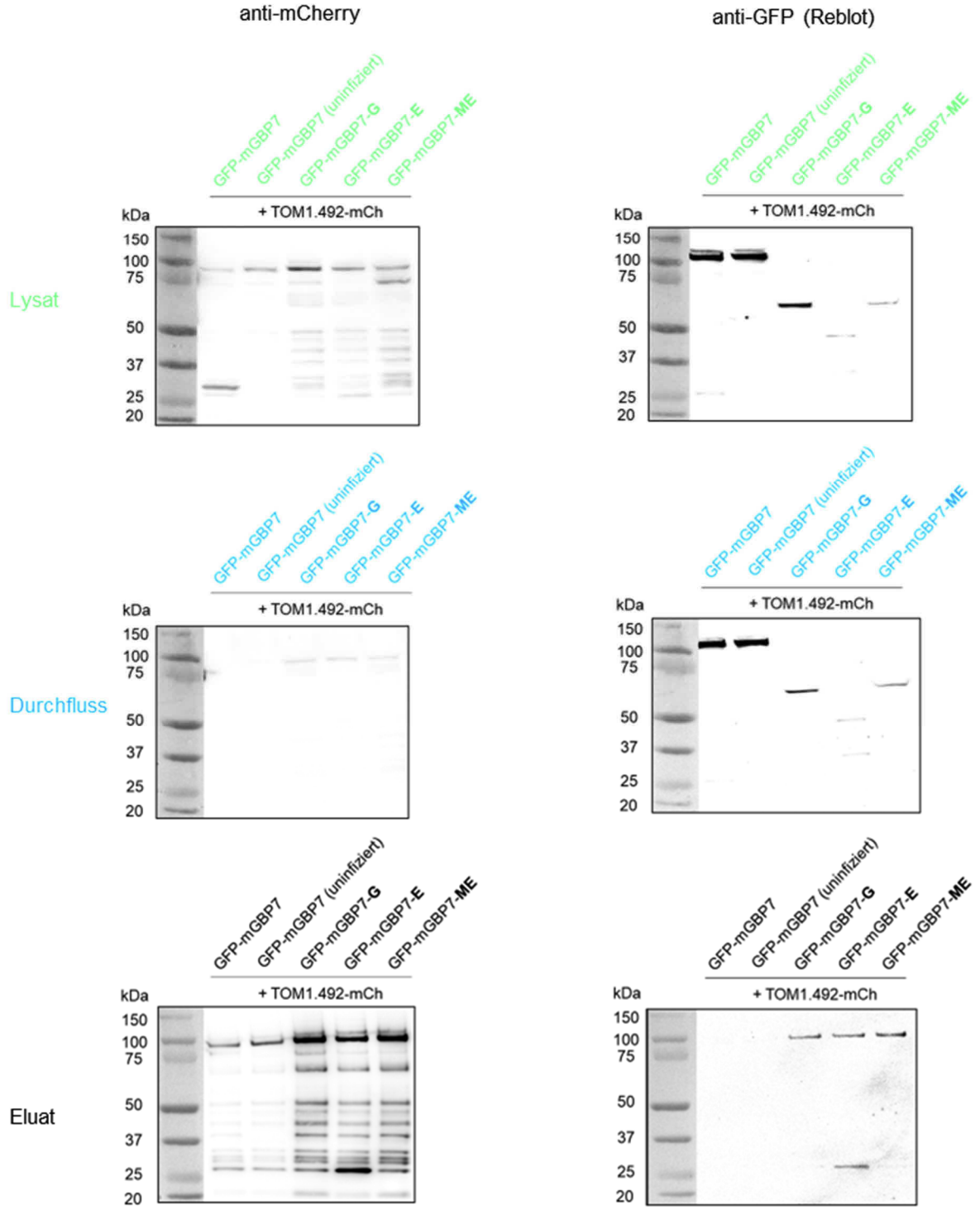


Anhang 13: *Volcano-Plots* der in der MS-Analyse identifizierten Proteine, MEFs (WT + TOM1.492-HA, bzw. WT + TOM1.516-GFP als Negativkontrolle) wurden mit *T. gondii* infiziert und 2,5 h später lysiert; Ko-IP erfolgte mittels anti-HA-Antikörpern; die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mittels SAM (engl.: *significance analysis of microarrays*) [183] durchgeführt; A: Proteine mit signifikant unterschiedlichen Signalintensitäten sind in rot markiert; B: *T. gondii* Proteine sind in rot markiert.



Anhang 14: Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von mit *T. gondii* infizierten MEFs (WT) 2,5 h nach der Infektion; immunfluoreszenzgefärbt mit anti-SAG1-Antikörpern; A: zusätzliche Immunfluoreszenzfärbung mit anti-Kaninchen-Antikörper (Sekundärantikörper, Alexa Fluor 488 konjugiert), B: zusätzliche Immunfluoreszenzfärbung mit anti-TOLLIP Antikörper (Primärantikörper, aus Kaninchen) und anti-Kaninchen-Antikörper (Sekundärantikörper, Alexa Fluor 488 konjugiert); Maßstabsbalken: 20 µm.

10.4 Die Rolle von TOM1 in der *T. gondii* Abwehr



Anhang 15: Western Blots nach RFP-Trap-Aufreinigung; mGBP7$^{-/-}$ MEFs, die sowohl GFP-getaggte mGBP7-Konstrukte als auch TOM1.492-mCherry exprimieren, wurden mit *T: gondii* infiziert und 2.5 h später lysiert, grün: Lysat-Proben, blau: Durchfluss-Proben, schwarz: Eluat-Proben; erwartete Proteingrößen: TOM1.492-mCherry (81 kDa), GFP-mGBP7 (100 kDa), GFP-mGBP7-G (61 kDa), GFP-mGBP7-E (45 kDa), GFP-mGBP7-ME (65 kDa).

11 Danksagung

An erster Stelle gilt mein herzlicher Dank Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Bereitstellung eines interessanten Forschungsthemas und für die exzellente Betreuung während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit.
Ein besonderer Dank geht an Prof. Lutz Schmitt für die freundliche Betreuung im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 1208, und die Übernahme des Korreferats.
Zudem möchte ich mich auch bei Dr. Daniel Degrandi für die freundschaftliche Betreuung und die stete Unterstützung während meiner Promotionszeit herzlich bedanken.
Vielen Dank an alle Mitglieder des Sonderforschungsbereichs 1208, allen voran unseren Repräsentanten Jennifer Loschwitz, Madhumitha Narasimhan, Florestan Bilsing und Rocco Gentile, für die vielen anregenden Diskussionen, Retreats und Konferenzen. Ein lieber Dank geht in diesem Sinne auch an Dr. Cordula Kruse für ihre Hilfe mit den alltäglichen organisatorischen Fragen.
Ein großes Dankeschön geht weiterhin an Prof. Dr. Kai Stühler und besonders an Dr. Gereon Poschmann für die MS-Analyse der Ko-IP Daten und Hilfe bei der Etablierung der Methodik. Darüber hinaus möchte ich Prof. Dr. Birgit Strodel und Dr. Wibke Schumann für die anregenden Diskussionen und die Bereitstellung ihrer Computersimulationsergebnisse zu der Interaktion von mGBP7 und TOM1.
Ich bedanke mich weiterhin bei der gesamten AG Pfeffer für die Unterstützung im Laboralltag und die zahlreichen gemeinsamen Unternehmungen (AG-Ausflüge, Kirmes- und Weihnachtsmarktbesuche) außerhalb des Laborbetriebs. Ich danke Julia Mock für die Einarbeitung in der Zellkultur, Karin Buchholz für ihre Unterstützung bei den Proliferations-Assays und Nicole Küpper für ihre unermüdliche Arbeit an der Generierung einer TOM1 KO Zelllinie. Darüber hinaus danke ich Ursula Sorg für die Organisation der AG-Ausflüge. Insbesondere möchte ich mich herzlich bei meinem Schreibraum für die stets lustige Atmosphäre danken, die meine vier Jahre im Institut wie im Flug vergehen ließen.
Ein großes Dankeschön geht darüber hinaus an alle Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene sowie die Virologen für die stete Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Atmosphäre bei unseren Seminaren, den Institutsfeiern und dem Mittagessen.
Vom ganzen Herzen danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich stets unterstützt und motiviert haben. Meinem Mann Tutu danke ich für seine unendliche

Geduld mit mir und dafür, dass er es auch nach langen Tagen geschafft hat mich wieder zum Lächeln zu bringen.