

Projekt: Funktion von mGBP-Proteinkomplexen bei der Zell-autonomen Immunität gegen *Toxoplasma gondii*

Projektleiter

Dr. rer. nat. Daniel Degrandi
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Universitätsstr. 1, Geb. 22.21
40225 Düsseldorf
Telefon: 0211-81-12487
Telefax: 0211-81-15906
E-Mail: daniel.degrandi@hhu.de

Fragestellung des Projektes

Die Forschungsthematik dieses Projekts konzentriert sich auf die immunologischen Funktionen der Interferon- γ induzierten murinen 65kDa Guanylat-bindenden Proteine (mGBPs). Wir haben in vorangehenden publizierten Arbeiten knock-out Mauslinien für mGBP2 und mGBP7 generiert und in verschiedenen Infektionsmodellen charakterisiert. mGBP2^{-/-} und insbesondere mGBP7^{-/-} Tiere zeigen erhöhte Suszeptibilitäten nach *Toxoplasma gondii* Infektion. mGBP7 defiziente Tiere zeigen eine ähnliche hohe Mortalität wie Interferon- γ Rezeptor defiziente Tiere, was auf eine grundlegende Immundefizienz schließen lässt. Kürzlich konnten wir mGBP9^{-/-} Mäuse generieren und in der *T. gondii* Infektion initial untersuchen. Die molekularen Mechanismen und Interaktionspartner von mGBPs sind bislang nur unzureichend beschrieben. Dieses Projekt soll die intrazelluläre zellautonome Antwort der mGBPs und ihrer interagierenden Moleküle auf *T. gondii* Infektion genauer charakterisieren und das Verständnis der Wirts-Pathogen-Interaktion bei parasitären Infektionen erweitern.

Stand der Forschung

Die Immunerkennung ist ein komplexer Prozess, der von Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) orchestriert wird, die eindringende Krankheitserreger erkennen. Diese Erkennung initiiert eine Kaskade von Ereignissen, die zur Produktion von Zytokinen führt, entscheidenden Signalstoffen, die Immunantworten steuern. Insbesondere spielen Zytokine wie Interferone (IFNs) eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung und Modulation von Immunantworten gegen Mikroben. Unter ihnen ragt IFN γ aufgrund seiner Fähigkeit heraus, entzündliche Reaktionen auszulösen, die darauf abzielen, Infektionen zu kontrollieren, indem sie sowohl Immun- als auch Nicht-Immunzellen aktivieren und antimikrobielle Effektorfunktionen induzieren.

Typ II IFN, oder IFN γ , spielt eine Schlüsselrolle in diesem Szenario. Nach seiner Induktion werden Hunderte von IFN-stimulierten Genen (ISGs) aktiviert, darunter IFN-induzierbaren GTPasen. Diese GTPasen, gruppiert nach ihren biochemischen Eigenschaften, spielen eine unverzichtbare Rolle bei der Aufrechterhaltung der zellautonomen Immunität bei Wirbeltieren. Insbesondere sind die 65-73 kDa Guanylat bindende Proteine (GBPs), die 21-47 kDa immunity-related GTPasen (IRGs), die 72-82 kDa Myxovirus-resistance (Mx) Proteine und die 200-285 kDa very-large-inducible GTPasen (VLIGs) wichtige Effektormoleküle in diesem Zusammenhang. Unter diesen haben die GBPs in den letzten Jahren erhebliche Aufmerksamkeit erregt aufgrund ihrer Rolle als wirksame antimikrobielle Effektoren, die bei verschiedenen Arten von Schwämmen bis zu Säugetieren konserviert sind. Bei Mäusen wurden elf Mitglieder (mGBP1-11) und bei Menschen sieben eng verwandte GBPs (hGBP1-7) identifiziert. Besonders nach IFN γ -Stimulation werden mehrere mGBPs hoch exprimiert, wobei mGBP2 die höchste Induktion unter ihnen aufweist.

GBPs zeigen eine charakteristische Multidomänen-Architektur mit einer katalytischen GTPase-Domäne und einer C-terminalen helikalen Domäne. Verschiedene Mitglieder wie mGBP1, mGBP2 und

mGBP7 haben eine signifikante Wirksamkeit im Kampf gegen intrazelluläre Krankheitserreger wie *T. gondii*, einen weltweit bedeutenden einzelligen Parasiten, gezeigt. Nach der Invasion bildet *T. gondii* parasitäre Vakuolen (PVs) innerhalb von Wirtszellen, in welchen die Parasiten effizient replizieren können. GBPs, insbesondere mGBPs, sind eng in die IFN- γ -induzierte Kontrolle und Zerstörung von *T. gondii* in verschiedenen murinen Zelltypen involviert. Durch spezifische Assoziationen mit pathogenhaltigen Kompartimenten erleichtern GBPs die angeborene Immunerkennung und die nachfolgende Beseitigung intrazellulärer Krankheitserreger. Nach IFN- γ -Induktion aggregieren die meisten mGBPs zu vesikelartigen Strukturen (VLS) im Zytoplasma. Nach dem Eintritt von *T. gondii* orchestrieren mGBPs koordinierte Angriffe auf die parasitäre Vakuolenmembran (PVM), was zu deren Zerstörung führt. Dieser Prozess beinhaltet die Rekrutierung von mGBP2 und mGBP7 auf die PVM, was letztendlich zur Inaktivierung des Parasiten führen kann.

Darüber hinaus belegen Einzelgen-Knockout-Studien bei Mäusen sowie die Deletion des GBP-Clusters auf Chromosom 3 die entscheidende Rolle von GBPs bei der Immunität gegen intrazelluläre Parasiten. Insbesondere zeigt die mGBP7-Knockout-Mauslinie eine ausgeprägte Anfälligkeit für *T. gondii*-Infektionen, was die essentielle Funktion von GBPs in den Abwehrmechanismen des Wirts hervorhebt.

Eigene Vorarbeiten

Um die molekularen Interaktionen und regulatorischen Mechanismen von mGBP7 genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Bindungspartner identifiziert. Wir konnten hierbei TOM1 als Interaktionsmolekül von mGBP7 identifizieren. Das TOM1 Protein ist ein zytoplasmatisches Protein, von dem mehrere Interaktionspartner bereits beschrieben wurden, z.B. Chlathrin oder Tollip. Zudem wurde für TOM1 beschrieben, dass es ubiquitinylierte Proteine binden kann. Wir konnten zeigen, dass TOM1 an der *T. gondii* PV lokalisiert, ähnlich zu mGBP7. Kürzlich konnten wir konditionale TOM1 knockout Mäuse generieren. Diese sollen in diesem Projekt näher charakterisiert werden um die molekularen Wirkmechanismen der mGBP7 vermittelten anti-parasitäre Wirkung aufzuklären.

Weiterhin haben wir eine mGBP9^{-/-} Mauslinie generieren können. mGBP9 ist ein Vertreter der sog. Chromosom 5 mGBPs, die bislang funktionell kaum untersucht wurden. Ein erstes Experiment mit mGBP9^{-/-} Mäusen zeigt ebenfalls eine erhöhte Suszeptibilität nach *T. gondii* Infektion. Präliminäre Daten aus unserer Arbeitsgruppe deuten auf eine Beteiligung von mGBP9 an der Inflammation hin. Diese Befunde sollen in diesem Projekt näher beleuchtet werden.

Arbeitsprogramm und Methoden

Im Rahmen dieses Projekts sind folgende Arbeiten geplant:

- Die Rolle von TOM1 in der *T. gondii* Infektion soll genau charakterisiert werden. Hierzu werden TOM1^{-/-} Mäuse mit *T. gondii* infiziert und sowohl auf Überleben als auch auf Parasitenlast und Entzündungsparameter untersucht
- In *in vitro* Studien soll zum einen die Proliferation von *T. gondii* mittels eines Luciferase-exprimierenden Stamms (Boyle, J.P. et al., Exp Parasitol, 2007. 116:302), in WT und TOM1^{-/-} Zellen gemessen werden. Weiterhin werden wir die Rekrutierungseffizienz von mGBPs in Abwesenheit von TOM1 untersuchen.
- Als bekannte Interaktionspartner von TOM1, werden wir die Funktion von Tollip und Chlathrin in der *T. gondii* Infektion näher charakterisieren. Hierzu sind mikroskopische und funktionelle Studien geplant.
- Kürzlich wurde gezeigt, dass Tollip für die Rekrutierung von Galectin 7 zu intrazellulären Pathogenvakuolen verantwortlich ist. Wir konnten in der Vergangenheit bereits Rekrutierung von weiteren Galectinen zur *T. gondii* PV beobachten, daher werden wir diesen neuartigen Befund weiter charakterisieren. Mittels eines Crispr/Cas9 basierten screen werden wir in murinen Fibroblasten die Rolle von Galectinen in der *T. gondii* Infektion genauer beschreiben.

- Präliminäre Studien konnten zeigen, dass mGBP9 defiziente Mäuse suszeptibel auf eine *T. gondii* Infektion reagieren. Diese Studien werden in diesem Projekt intensiviert und vergleichbar zu der TOM1^{-/-} Mauslinie untersucht.
- Weiterhin soll mittels der in unserem Labor etablierten Proximity Labeling Methode, Interaktionskandidaten von mGBP9 im Zytoplasma und an der PV identifiziert werden.

In die Graduiertenschule eingebrachte Expertise / Methoden / Modelle

- Infektionen von Mäusen und Zellen mit *T. gondii*
- Hochauflösende Konfokale Airyscan Mikroskopie und Live-cell imaging
- Gen-Transfer mit lentiviralen Vektoren
- Durchflusszytometrie
- GUV- Technologie
- Proximity Labelling Methodik

Verknüpfungen mit anderen Projekten der Graduiertenschule

Das Projekt ist eng mit anderen Teilprojekten der Graduiertenschule vernetzt. Mit Prof. Schmitt untersuchen wir biochemische Eigenschaften und Lipidbindungseigenschaften mGBPs. Gemeinsam mit Dr. Miriam Kutsch untersuchen wir die Rolle von humanen GBPs in der Infektion mit intrazellulären Erregern. Mit Prof. Dilthey führen wir bioinformatische genomische Studien von *T. gondii* Stämmen durch.

Kooperationen zu außeruniversitären Forschungseinrichtungen

Prof. Dr. David Sibley, Washington School of Medicine, St. Louis, USA
 Prof. Dr. Jörn Coers, Duke University School of Medicine, Durham, USA
 Prof. Dr. Petr Broz, Biozentrum, Universität Basel, Schweiz

Literatur zum Projekt

1. Loschwitz J, Steffens N, Wang X, Schäffler M, Pfeffer K, **Degrandi D***, Strodel B*. *Sci Rep.* 2023;Jan 13;13(1):679. doi: 10.1038/s41598-023-27520-8
2. Feng S, Enosi Tuipulotu D, Pandey A, Jing W, Shen C, Ngo C, Tessema MB, Li FJ, Fox D, Mathur A, Zhao A, Wang R, Pfeffer K, **Degrandi D**, Yamamoto M, Reading PC, Burgio G, Man SM. *Nat Commun.* 2022;13:4395. doi:10.1038/s41467-022-32127-0
3. Steffens N, Beuter-Gunia C, Kravets E, Reich A, Legewie L, Pfeffer K, **Degrandi D**. *mBio.* 2020;11:doi:10.1128/mBio.02993-19
4. Legewie L, Loschwitz J, Steffens N, Prescher M, Wang X, Smits SHJ, Schmitt L, Strodel B, **Degrandi D**, Pfeffer K. *Biochem J.* 2019;476:3161-3182. doi:10.1042/BCJ20190364
5. Santos JC, Dick MS, Lagrange B, **Degrandi D**, Pfeffer K, Yamamoto M, Meunier E, Pelczar P, Henry T, Broz P. *EMBO J.* 2018;37:e98089. doi:10.15252/embj.201798089
6. Kravets E, **Degrandi D**, Ma Q, Peulen TO, Klumpers V, Felekyan S, Kuhnemuth R, Weidtkamp-Peters S, Seidel CA, Pfeffer K. *Elife.* 2016;5:e11479. doi:10.7554/eLife.11479
7. Meunier E, Wallet P, Dreier RF, Costanzo S, Anton L, Ruhl S, Dussurgey S, Dick MS, Kistner A, Rigard M, **Degrandi D**, Pfeffer K, Yamamoto M, Henry T, Broz P. *Nat Immunol.* 2015;16:476-484. doi:10.1038/ni.3119
8. Pilla DM, Hagar JA, Haldar AK, Mason AK, **Degrandi D**, Pfeffer K, Ernst RK, Yamamoto M, Miao EA, Coers J. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:6046-6051. doi:10.1073/pnas.1321700111
9. **Degrandi D**, Kravets E, Konermann C, Beuter-Gunia C, Klumpers V, Lahme S, Rasch E, Mausberg AK, Beer-Hammer S, Pfeffer K. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110:294-299. doi:10.1073/pnas.1205635110
10. **Degrandi D**, Konermann C, Beuter-Gunia C, Kresse A, Wurthner J, Kurig S, Beer S, Pfeffer K. *J Immunol.* 2007;179:7729-7740. doi:10.4049/jimmunol.179.11.7729