

**Parasiten-induzierte
Phosphorylierungsereignisse in *Plasmodium
berghei* [Vincke&Lips, 1948]-infizierten
Hepatozyten**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
am Department Biologie der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften an der
Universität Hamburg**

**vorgelegt von:
Stefanie Bolte
aus Herford**

Hamburg 2006

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Priv.-Doz. Dr. V. HEUSSLER
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Frau Priv.-Doz. Dr. I. BRUCHHAUS
Tag der Disputation: 21. April 2006

Hamburg, den 01. April 2006



A handwritten signature in black ink, appearing to read "R. Lieberei".

Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

1. EINLEITUNG	1
1.1 Malaria	1
1.2 Der Lebenszyklus des Malaria-Erregers	2
1.3 Charakterisierung der Leberphase der Plasmodien-Infektion.....	4
1.4 Protein-Phosphorylierungen vermitteln Signaltransduktionsereignisse.....	7
1.4.1 Charakterisierung von Protein-Phosphorylierungen	7
1.4.2 Tyrosin-Phosphorylierungen vermitteln Interaktionen zwischen Parasit und Wirtszelle.....	10
1.5 MAPK-Kaskaden	14
1.5.1 Charakterisierung von MAPK-Kaskaden	14
1.5.2 Bedeutung der Aktivierung von Wirtszell- und Parasiten-MAPK während der Infektion.....	19
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	24
2. MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1 Materialien.....	25
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	26
2.1.2 Chemikalien	27
2.1.3 Enzyme.....	29
2.1.4 Inhibitoren.....	30
2.1.5 Antikörper	30
2.1.6 Plasmide	31
2.1.7 Oligonukleotide (ohne Restriktionsschnittstellen).....	31
2.1.8 Marker	32
2.1.9 Zellen, Parasiten, Mäuse	32
2.1.10 Programme, Datenbanken und Internetseiten.....	32
2.1.11 Puffer und Medien.....	33
2.2 Methoden	35
2.2.1 Kultivierung und Transfektion von eukaryotischen Zelllinien.....	35
2.2.1.1 Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien	35
2.2.1.2 Präparation von primären Maushepatozyten	35
2.2.1.3 Subkultivierung von eukaryotischen Zellen in 24-Well-Platten	36
2.2.1.4 Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen	36
2.2.1.5 siRNA-Design & -Synthese.....	37
2.2.1.6 Transfektion von siRNA in eukaryotische Zellen und Ernte der transfizierten Zellen	37
2.2.2 Kultivierung und Behandlung von <i>P.falciparum</i> -Blutstadien.....	38
2.2.2.1 Kultivierung von <i>P.falciparum</i> -Blutstadien	38
2.2.2.2 Synchronisierung mit anschließender Inhibitorbehandlung der <i>P.falciparum</i> -Blutstadien	38
2.2.3 <i>P.berghei</i> -Infektion und Behandlung von Hepatozyten (und Mäusen)	39
2.2.3.1 Infektion von Hepatozyten mit <i>P.berghei</i> -Sporozoiten	39
2.2.3.2 Bestimmung der Vitalität von HepG2-Zellen unter Inhibitoreinwirkung im radioaktiven Proliferationsassay	39
2.2.3.3 Behandlung von <i>P.berghei</i> -infizierten Hepatozyten mit verschiedenen Drogen.....	40
2.2.3.4 Infektion von Mäusen mit <i>P.berghei</i> -Sporozoiten mit anschließender Genistein-Behandlung.....	40
2.2.4 Fixierung und Färbung von Hepatozyten	41
2.2.4.1 Fixierung von infizierten/transfizierten Hepatozyten	41
2.2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung von fixierten Hepatozyten	41
2.2.5 Isolierung von RNA aus verschiedenen <i>P.berghei</i> -Entwicklungsstadien	41
2.2.6 Klonierungsstrategien	42
2.2.6.1 Reverse Transkription	42
2.2.6.2 Oligonukleotid-Design.....	42
2.2.6.3 PCR	42
2.2.6.4 Agarosegelelektrophorese.....	43
2.2.6.5 Restriktionsanalyse.....	43

2.2.6.6 Aufreinigung von DNA mittels M&N-Extract II-Kit	43
2.2.6.7 Ligation	43
2.2.6.8 Transformation chemisch-kompetenter <i>E.coli</i>	44
2.2.6.9 Plasmid-DNA-Präparation im „Mini-Format“	44
2.2.6.10 Nukleinsäurefällung	45
2.2.7 Proteinbiochemische Methoden	45
2.2.7.1 Präparation von <i>P.berghei</i> -Parasiten aus murinem Vollblut, <i>P.falciparum</i> -Parasiten aus humanen Blutkulturen und Leukozyten aus Mausblut	45
2.2.7.2 Immunpräzipitation	45
2.2.7.3 Protein-Fällung	46
2.2.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
2.2.7.5 Western Immunoblotanalyse	47
2.2.7.6 Zweidimensionale Gelelektrophorese	47
2.2.8 Rekombinante Expression und Affinitätsaufreinigung von eukaryotischen Proteinen in <i>E.coli</i>	48
2.2.8.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus Bakterien	48
2.2.8.2 Rekombinante Expression und Affinitätsaufreinigung von His-markierten Proteinen aus Bakterien	49
2.2.8.3 Rekombinante Expression und Affinitätsaufreinigung von MBP-Fusionsproteinen aus Bakterien	49
2.2.9 Experimente mit rekombinant exprimierten, eukaryotischen Proteinen	49
2.2.9.1 Affinitätsaufreinigung von Antiseren	49
2.2.9.2 PullDown-Experimente	50
2.2.9.3 Kinase-Assay	50
3. ERGEBNISSE	52
3.1 Parasiten-induzierte Phosphorylierungsereignisse in <i>P.berghei</i>-infizierten Hepatozyten	52
3.1.1 Tyrosin-Phosphorylierungen in <i>P.berghei</i> -infizierten HepG2-Hepatomazellen	52
3.1.2 Beeinflussung der Plasmodien-Infektion durch Tyrosinkinaseinhibitoren	55
3.1.2.1 PTK-Behandlungen von <i>P.berghei</i> -infizierten Hepatomazellen führten zu einer Reduzierung der α -P-Tyrosin-positiven Zellen	55
3.1.2.2 PTK-Inhibitor-Behandlungen von <i>Plasmodium</i> -infizierten Zellen führten zur Blockierung des Parasitenwachstums	56
3.2 Aktivierte MAPK wurden in <i>P.berghei</i>-infizierten Zellen in der PVM detektiert.	59
3.2.1 Antikörper gegen die aktivierte Form von MAPK färbten in infizierten Hepatomazellen Proteine in der PVM	59
3.2.2 Rekombinante Expression von humanem JNK1 in Hepatomazellen	60
3.2.3 Rekombinante Expression von humanem JNK1 in <i>P.berghei</i> -infizierten Hepatomazellen	61
3.3 Manipulation der Proteinexpression in eukaryotischen Zellen	63
3.3.1 Etablierung der Transfektionsbedingungen mit fluoreszierendem siRNA-Duplex	63
3.3.2 Versuche zur Verminderung der Proteinexpression von Lamin A/C und JNK1 in Hepatomazellen	64
3.3.3 Verminderung der Expression von Lamin A/C und JNK1 in HeLa-Zellen	66
3.4 Behandlung von <i>Plasmodium</i>-infizierten Zellen mit MAPK-Inhibitoren	68
3.5 Versuche zur Identifizierung des α-Phospho-p38-positiven Parasitenproteins	71
3.5.1 Nachweis eines α -Phospho-p38-positiven Parasitenproteins in der exo-erythrozytären Phase der <i>P.berghei</i> -Infektion	71
3.5.2 Spontan auftretende Dephosphorylierungen des α -Phospho-p38-positiven Parasitenproteins erschwerten seine Isolierung	72
3.5.3 Isolierung des α -P-p38-positiven Parasitenproteins mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese	75
3.6 Immunfluoreszenzanalysen mit α-PfMAPK1-Peptidantikörper	76
3.7 Charakterisierung von <i>P.berghei</i>-Mitogen-aktivierten Proteinkinasen	78
3.7.1 mRNA-Synthese von PbMAPK1 und PbMAPK2 im Entwicklungszyklus des Parasiten	78
3.7.2 Klonierung und rekombinante Expression der PbMAPK1 als GST-Fusionsprotein in <i>E.coli</i>	79
3.7.3 Immunfluoreszenzanalysen mit α - <i>P.berghei</i> -MAPK1-GST-Antiserum vor und nach Affinitätsaufreinigung	80

3.7.4 Western Immunoblot-Analysen mit α -PbMAPK1-GST-Antiserum	82
3.7.5 Rekombinante Expression und Aufreinigung der <i>P.berghei</i> -MAPK1 in Fusion mit 10 Histidinen bzw. MBP in <i>E.coli</i>	83
3.7.6 Immunfluoreszenzfärbungen von <i>P.berghei</i> -infizierten Hepatomazellen mit α -PbMAPK1-His-Antiserum	85
3.7.7 Western Immunoblot-Analysen mit α - <i>P.berghei</i> -MAPK1-10xHis-Antiserum.....	86
3.7.8 Rekombinante Expression der PbMAPK1 in eukaryotischen Zellen	87
3.7.9 PullDown-Versuche von MEK aus Hepatozytenextrakten mit rekombinanter PbMAPK1	88
3.7.10 Kinase-Assay zum Nachweis der Aktivierung von PbMAPK1 durch MEK	89
3.7.11 Nachweis einer C-terminalen Verlängerung der kodierenden Sequenz der putativen PbMAPK1	90
4. DISKUSSION	92
4.1 Tyrosin-Phosphorylierungen in der exo-erythrozytären Phase der <i>Plasmodium</i>-Infektion	92
4.1.1 Charakterisierung von Tyrosin-Phosphorylierungen in der PVM	92
4.1.2 Beeinflussung der Tyrosin-Phosphorylierungen in der PVM und der Parasitenproliferation durch PTK-Inhibitoren	95
4.2 MAPK des Parasiten und/oder der Wirtszelle wurden in <i>P.berghei</i>-infizierten Hepatozyten in der PVM aktiviert.....	99
4.2.1 Charakterisierung der aktivierten MAPK in der PVM.....	99
4.2.2 Wirkung von MAPK-Inhibitoren auf die Parasitenproliferation.....	101
4.3 Charakterisierung der <i>P.berghei</i>-MAPK.....	103
4.3.1 PbMAPK2 wird in der exo-erythrozytären Phase der <i>Plasmodium</i> -Infektion nicht expremiert.....	103
4.3.2 Die Kinase-Domäne der PbMAPK1 vereint Merkmale von Ser/Thr- und Tyr-Kinasen.....	104
4.3.3 Wirtszell-MEK als Initiator kinase für PbMAPK1	105
4.3.4 PbMAPK1 besitzt eine C-terminale Verlängerung.....	107
4.4.4 Welche Funktionen könnte die PbMAPK1 in infizierten Hepatozyten ausüben?	111
4.4.5 Regulierung von MAPK-Aktivitäten in parasitären Protozoen	113
5. ANHANG.....	120
6. LITERATURVERZEICHNIS	125
7. ZUSAMMENFASSUNG	139
DANKSAGUNG	143

1. Einleitung

1.1 Malaria

Jährlich infizieren sich 300-500 Millionen Menschen mit Malaria, einer in Abhängigkeit von der Erregerspezies zum Teil tödlichen verlaufenden Krankheit, die in ca. 100 Ländern der Welt endemisch ist. Der Erreger dieser Sumpf- oder auch Wechselfieber genannten Krankheit ist ein einzelliger Parasit der Gattung *Plasmodium*, der durch den Stich weiblicher *Anopheles*-Mücken (Familie *Culicidae*) übertragen wird.

Plasmodien gehören zum Stamm der Apikomplexa, dessen über 4000 Spezies zum Teil eine obligat intrazelluläre, parasitäre Lebensweise führen und von unterschiedlicher medizinischer und ökonomischer Bedeutung sind. So spielen beispielsweise *Plasmodium falciparum* als Erreger der *Malaria tropica* und *Toxoplasma gondii* als Verursacher opportunistischer Krankheiten bei immundefizienten Patienten als humanpathogene Organismen eine wichtige Rolle. Die geographische Verteilung der Malaria bedingt sich durch die Verbreitung der *Anopheles*-Mücke. So finden sich in den tropischen und subtropischen Gebieten Afrikas, Südamerikas und Asiens optimale geographische Verhältnisse für die Vermehrung dieser Insekten (Abb.1). In endemischen Ländern gibt es saisonale (Regen- und Trockenzeit) und regionale (Begrenzung des Mückenvorkommens auf das Flachland) Unterschiede hinsichtlich des Infektionsrisikos.

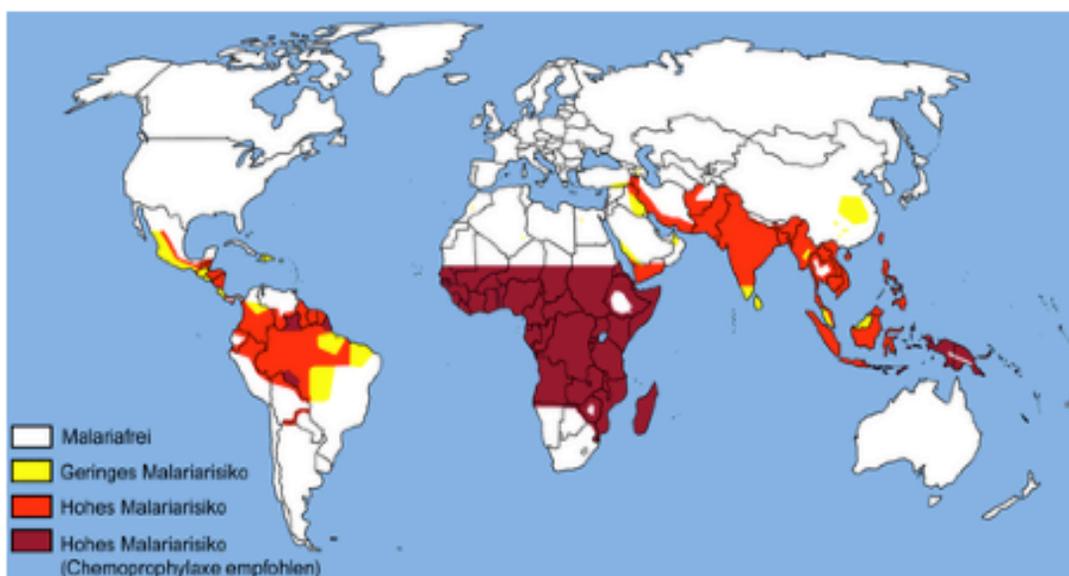


Abb. 1: Verbreitung der Malaria. Malariarisikogebiete mit Chemoprophylaxeempfehlung der DTG, Stand 2005, erstellt von S. Jähnichen, www.wikipedia.org

In einigen Ländern Afrikas ist die Malaria bereits die Haupttodesursache. Der afrikanische Kontinent ist jedoch aufgrund zu geringer Kaufkraft für die Pharmaindustrie kein attraktiver Markt, als dass sich Investitionen in die Entwicklung effektiver Medikamente lohnen würden. Die Bekämpfung der Malaria wird zudem durch Resistenzbildung des Parasiten gegen gängige Medikamente, wie etwa Chloroquin, Pyrimethamin und Atovaquon, erheblich erschwert. Drogen wie Artemisinin-Derivate und Mefloquin, gegen welche es bisher kaum oder gar keine Resistenzen gibt, sind teuer und werden daher in den meist armen Ländern nicht großflächig eingesetzt. Zusätzlich wird die Eindämmung der Malaria durch mangelnde Aufklärung über den Übertragungsweg der Krankheit und die richtige Anwendung von Hilfsmitteln, wie etwa Moskitonetzen, behindert.

1.2 Der Lebenszyklus des Malaria-Erregers

Der Lebenszyklus von *Plasmodium* ist mit einem obligaten Wirts- und Generationswechsel verbunden. Die geschlechtliche Vermehrung des Parasiten erfolgt im Hauptwirt, der *Anopheles*-Mücke, wohingegen die ungeschlechtliche Phase in Vertebraten wie z.B. Menschen, Nagetieren und Vögeln stattfindet (Abb.2).

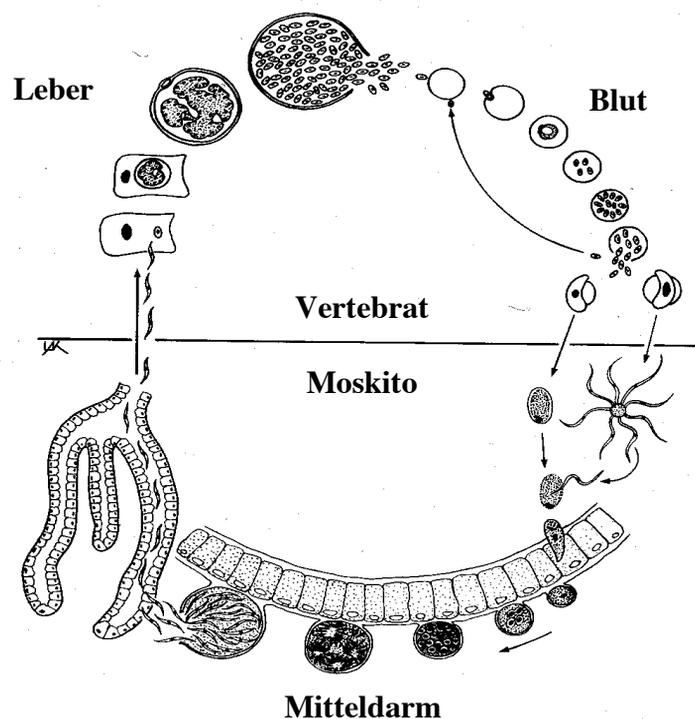


Abb.2: Lebenszyklus des *Plasmodium*-Parasiten. (Quelle: The Atlas of Tropical Parasites, www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/images/malcycle.gif)

Nach Injektion der Parasiten bei einer Blutmahlzeit der *Anopheles*-Mücke erreichen die Plasmodien über den Blutstrom die Leber des Zwischenwirtes, in der die exo-erythrozytäre Vermehrung stattfindet. In den Hepatozyten entwickeln sie sich zu vielkernigen Schizonten, aus denen durch zytoplasmatische Teilungen Merozoiten hervorgehen (Abb. 3 A). Im Anschluß an die Freisetzung aus der Leberzelle in den Blutstrom dringen die Parasiten in Erythrozyten ein (Abb. 3 B). Dort durchlaufen sie eine weitere Schizogoniestadium, in deren Anschluß Merozoiten freigesetzt werden, die erneut rote Blutzellen befallen können (Abb. 3 D). Während der erythrozytären Phase differenziert ein Teil der Parasiten zu Geschlechtsformen (Mikro- (Abb. 3 F) und Makrogametozyten (Abb. 3 E)), die von der *Anopheles*-Mücke beim Stechvorgang aufgenommen werden. Im Mitteldarm des Hauptwirtes entsteht durch Verschmelzung der männlichen und weiblichen Gameten die Zygote, welche zum Ookinet umgewandelt wird (Abb. 3 G). Dieser wandert in die Mitteldarmwand der Mücken ein und entwickelt sich dort zur Oozyste. In ihr entstehen nach Reduktionsteilungen Sporozoiten (Abb. 3 H), die freigesetzt werden und in die Speicheldrüsen wandern (Abb. 3 I). Beim Stich einer Mücke werden die Parasiten auf einen Vertebratenwirt übertragen.

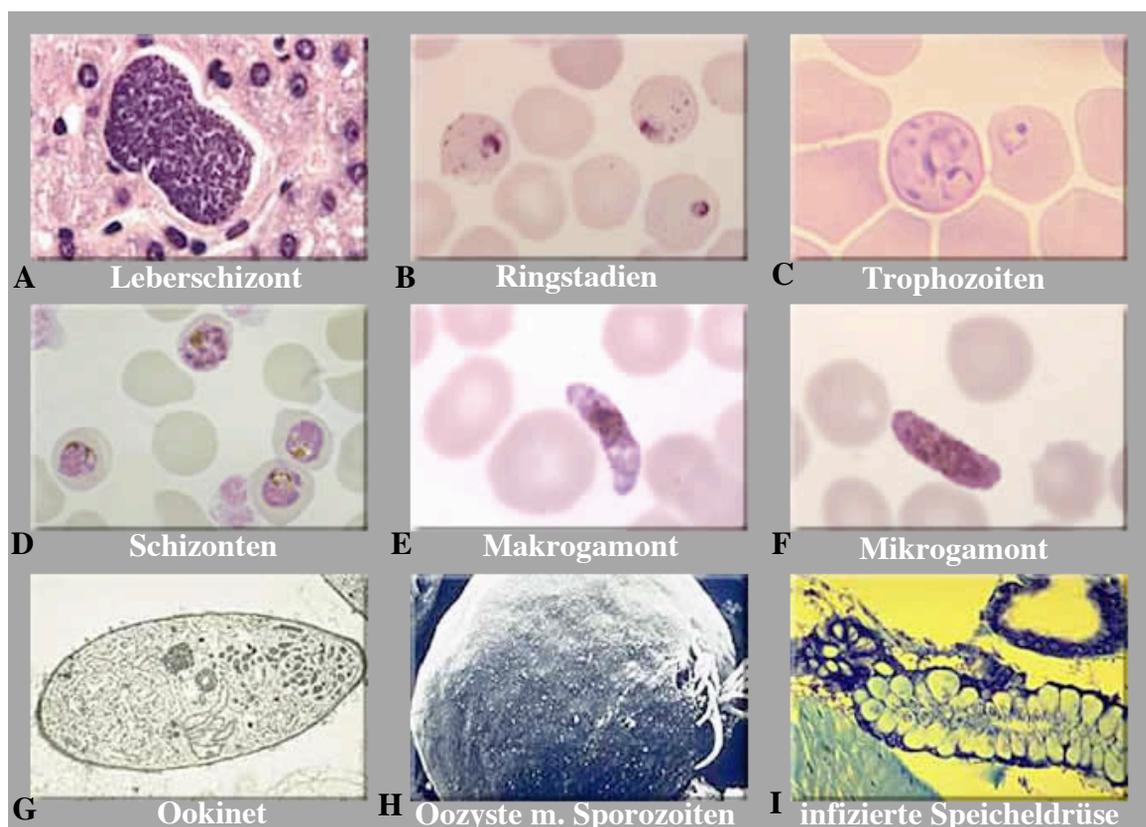


Abb.3: Aufnahmen verschiedener Entwicklungsstadien von *Plasmodium falciparum*.
www.infektionsbiologie.ch/parasitologie/seiten/modellparasiten/mp02plas.html (bearbeitet)

1.3 Charakterisierung der Leberphase der Plasmodien-Infektion

Als obligat intrazellulärer Parasit kann *Plasmodium* im Gegensatz zu Parasiten der Familie der Trypanosomatidae nicht axenisch kultiviert werden. Trager und Jensen gelang es 1976 erstmals, die Blutstadien von *P.falciparum* bei niedrigen O₂-Konzentrationen in Kultur zu nehmen (Trager and Jensen, 1976). Diese Methode erlaubte in den folgenden Jahren die intensive Studie der erythrozytären Phase der *Plasmodium*-Infektion, wohingegen Untersuchungen der Leberphase humanpathogener Plasmodien sich denkbar schwierig gestalteten. Studien der exo-erythrozytären Phase werden mit dem nah verwandten, nagetierpathogenen Erreger *Plasmodium berghei* (Vincke & Lips, 1948) im Tiermodell durchgeführt. Mücken der Gattung *Anopheles* können bei 27 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit unter Simulation eines Tag/Nacht-Rhythmus in eine Insektarium gezüchtet werden. Die Mücken werden bei einer Blutmahlzeit an einem *P.berghei*-positiven Tier infiziert. Nach 14-20 Tagen wandern die Sporozoiten in die Speicheldrüsen ein. Aus diesen können die Parasiten isoliert und für eine *in vitro*-Infektion von primären Hepatozyten (Meis et al., 1984) oder humanen/murinen Hepatomazellen (Hollingdale et al., 1983) eingesetzt werden. Auf diese Weise ist ebenfalls die exo-erythrozytäre Infektionsphase wissenschaftlichen Untersuchungen erschlossen worden, die sich jedoch aufgrund einer Infektionsrate von 1-5% generell auf die Einzelzellebene beschränken.

Nachdem die Plasmodien mit dem Stich der Mücke in die Haut injiziert worden sind, gelangen rund 50% der Parasiten durch aktive Bewegung entweder in Blut- (70%) oder in Lymphgefäße (30%), während der Rest in der Haut verbleibt. Die Parasiten erreichen über die Gefäße die Leber oder Lymphknoten. In den lymphatischen Organen wird nach neuesten Erkenntnissen ein Teil der Sporozoiten durch dendritische Zellen attackiert und degradiert, wohingegen sich einige Parasiten zu dem exo-erythrozytären Stadium ähnlichen Formen entwickeln, die bis zu 24h post Infektion in Epithelzellen der Lymphknoten nachweisbar sind (Amino et al., 2006).

Nach Erreichen der Leber treten die Sporozoiten über Oberflächenproteine wie CSP (circum sporozoite protein) oder TRAP (thrombospondin-related adhesive protein) in Kontakt mit hepatischen Proteoglykanen, die aus der extrazellulären Matrix in den Lebersinus ragen und gleiten an Endothelzellen entlang, bis sie auf eine Kupfferzelle treffen (Pradel et al., 2002). Der aktive Durchtritt durch die Kupfferzelle ermöglicht den Zugang zum Disse'schen Raum, worauf die Sporozoiten Hepatozyten invadieren (Pradel and Frevert, 2001). Sie durchwandern mehrere Leberzellen, bevor sie schließlich in einem Hepatozyten unter Ausbildung einer parasitophoren Vakuole (PV) die Infektion etablieren (Mota et al., 2001). Als Konsequenz

des Durchwanderns sekretieren verwundete Hepatozyten den Wachstumsfaktor HGF (hepatocyte growth factor). Dieser bindet an den HGF-Rezeptor MET auf umliegenden Zellen und macht diese empfänglicher für eine Sporozoeninfektion. Durch die HGF-Bindung wird die Rezeptortyrosinkinase MET stimuliert, welche folgend Signaltransduktionswege zur Aktivierung von PI-3-K (phosphatidylinositol-3-kinase) und ERK1/2 (extracellular-signal related kinase) initiiert. Beide Kinasen können einen protektiven Effekt ausüben, der die Wirtszelle vor der Induktion der programmierten Zelltods, der Apoptose, und damit auch den Parasiten schützt (Leiriao et al., 2005; Mota et al., 2004). Eine Inhibierung der PI3K-Signalkaskade hat jedoch 24h p.I. keinen Einfluß auf die weitere Parasitenproliferation (van de Sand et al., 2005). Folglich scheint die Aktivierung von Signaltransduktionswegen der Wirtszellen durch HGF nur in der Anfangsphase der Leberinfektion eine Rolle zu spielen. Da jedoch *Plasmodium*-infizierte Leberzellen auch 24h und 48h post Infektion vor apoptotischen Stimuli wie Peroxid-Behandlung *in vitro* oder TNF- α -Injektion *in vivo* geschützt sind (van de Sand et al., 2005), stellt sich die Frage nach Parasiten-vermittelten Manipulationen der Signaltransduktionsmaschinerie im Fortlauf des Leberstadiums. Ein aktives Eingreifen von Pathogenen in Signaltransduktionswege der Wirtszelle ist bereits für apikomplexe und trypanosomatide Parasiten beschrieben worden. So werden in *Theileria*- und *Toxoplasma*-infizierten Zellen anti-apoptotische Stimuli u.a. durch die gezielte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFkappaB vermittelt (Dobbelaere and Kuenzi, 2004; Payne et al., 2003). *Leishmania major* hingegen bewirkt eine zeitliche Verzögerung der Apoptose seiner primären Wirtszellen, den neutrophilen Granulozyten (NG), von denen der Parasit direkt nach Inokulation in die Haut phagozytiert wird. Die NG haben generell nur eine kurze Lebensdauer und würden sterben, bevor Makrophagen in das betroffene Gewebe einwanderten. Letztere phagozytieren die verzögert-apoptotischen, infizierten Granulozyten und bilden die eigentlichen Zielzellen der Leishmanien (van Zandbergen et al., 2004). *T.gondii* verfolgt ebenfalls die Strategie der gezielten Blockierung zellulärer Signaltransduktionswege, indem in infizierten Makrophagen unter anderem die Aktivierung der JAK/STAT-Kaskade inhibiert wird. Als Konsequenz wird die NO-Synthese reduziert und der Parasit ist vor einem Angriff geschützt (Lüder et al., 2003).

Im Gegensatz zu den Trypanosomatiden invadieren apikomplexe Parasiten ihre Wirtszellen sowohl in der exo- als auch in der erythrozytären Phase der Infektion in einem aktiven Prozess. An diesem Vorgang sind Organellen des namensgebenden, apikalen Komplexes beteiligt, der sich je nach Spezies aus einem Konoid, mehreren Rhoptrien, Mikronemen und Dichter Granula zusammensetzt. Während des Invasionsprozesses wird die Ausbildung der parasitophoren Vakuole initiiert, deren Membran in ihrer Zusammensetzung nicht mit der von

Phagolysosomen oder Endosomen vergleichbar ist (Sinai and Joiner, 1997). Durch die parasitophore Vakuolenmembran (PVM) hat sich der Parasit vom umgebenden Zellmilieu separiert, was ihn zum einen vor einem Angriff der Wirtszelle durch z.B. Ansäuerung schützt, zum anderen von ihm aber auch eine besondere Art der Interaktion erfordert. Da der Parasit u. a. im Bezug auf Purine auxotroph ist, muß er essentielle Substanzen aus seiner Umgebung beziehen. Des Weiteren erfordert die Proliferation des Parasiten eine Expansion der PVM. Sowohl die Generierung und die Erweiterung der PVM als auch der Austausch zwischen Parasit und Wirtszelle sind in der exo-erythrozytären Phase der *Plasmodium*-Infektion bisher kaum erforscht. Unklar ist ebenfalls die Koordinierung des Zellzyklus des Parasiten im Leberstadium. Während der Schizogoniephase durchläuft der Parasit in der PV multiple DNA-Replikationsrunden und asynchrone Kernteilungen ohne Zytokinese. Die Schizontenplasmamembran bildet gegen Ende der Hepatozyteninfektion tiefe Einschnürungen in das Schizontenzytoplasma und umschließt so mehrere Parasitennuklei und Organellen. Auf diese Weise bildet der Parasit sogenannte Zytomere, aus denen sich gegen Ende der exo-erythrozytären Phase Merozoiten abschnüren. Der genaue Vorgang der Freisetzung der Parasiten aus PVM und Wirtszelle wird in der Arbeitsgruppe Malaria I am BNI erforscht. Gegen Ende der Leberphase konnten an infizierten Leberzellen sowohl *in vitro* (61h p.I.) als auch *in vivo* (51h p.I.) Merkmale von Zelltod, wie z.B. das Ablösen aus dem Zellverband und die Abschnürung parasitengefüllter Körperchen, festgestellt werden. Trotz dieser Anzeichen werden die parasitierten Hepatozyten von Zellen des Immunsystems nicht attackiert, solange sie einen vitalen Parasiten beinhalten. In *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen konnte bereits bestätigt werden, dass in infizierten Hepatozyten eine Blockierung der Apoptose durch den Parasiten vermittelt wird (van de Sand et al., 2005). Folglich werden die morphologischen Veränderungen der infizierten Wirtszelle als Parasiten-induzierten Vorgänge interpretiert, welche vermutlich die Freisetzung der Merozoiten in den Blutstrom vermitteln.

In der exo-erythrozytären Phase ist *Plasmodium* im Gegensatz zum Blutstadium mit einem stoffwechselaktiven Hepatozyten als Wirtszelle konfrontiert, der eine aktive Intervention in die Wirtszell-Maschinerie zur Etablierung der Infektion erfordert. Da intra- und interzelluläre Kommunikationen sowie Interaktionen zwischen Pathogenen und ihren Wirtszellen u. a. über Phosphorylierungen vermittelt werden können, konzentrierten sich die folgenden Untersuchungen zunächst auf die Ermittlung des Phosphorylierungsstatus in Plasmodien-infizierten Zellen.

1.4 Protein-Phosphorylierungen vermitteln Signaltransduktionsereignisse

1.4.1 Charakterisierung von Protein-Phosphorylierungen

Durch Phosphorylierungen von Proteinen werden sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten wichtige Prozesse wie Wachstum, Zellzyklus und Differenzierung reguliert. Die Phosphorylierung eines Proteins erfolgt durch die Übertragung eines Phosphats von einem Nukleotid (meist ATP) auf ein Substrat, vermittelt durch eine Proteinkinase (PK). Diese Phosphorylierungen können durch Proteinphosphatasen (PP) wieder entfernt werden.

Die enzymatische Aktivität einer Proteinkinase vermittelt die Übertragung von Phosphat auf die Hydroxylgruppe von Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten. Im Gegensatz zu Threonin wird Serin sehr häufig phosphoryliert. Tyrosin-Phosphorylierungen treten mit einem Anteil von ungefähr 1% an der Summe der Proteinphosphorylierungen in den meisten Zellen eher selten auf (Cooper and Hunter, 1983). Dennoch nimmt diese Art der Modifizierung eine kritische Rolle in der Regulierung der Zellproliferation ein, da die Produkte von vielen Onkogenen Tyrosinkinase sind (Rodrigues and Park, 1994). Des Weiteren üben verschiedene Wachstumsfaktoren oder Wachstumssignale ihre Effekte auf die Zelle durch direkte oder indirekte Aktivierung von Tyrosin-Kinasen aus (Fantl et al., 1993).

Zur Detektion von phosphorylierten Proteinen sind verschiedene Methoden entwickelt worden. Zum Beispiel können Zellen oder Proteine direkt mit ^{32}P markiert ($^{32}\text{PO}_4$ *in vivo* oder $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ *in vitro*), die phosphorylierten Moleküle über Immunoaffinitätsaufreinigung isoliert und folgend im Autoradiogramm visualisiert werden. Tyrosin-phosphorylierte Proteine können zudem effektiv mit Hilfe von α -Phospho-Tyrosin-Antikörpern aufgereinigt werden. Derartige Phosphorylierungs-spezifische Antikörper kamen 1981erstmal zum Einsatz (Ross et al., 1981).

Die Phosphorylierung eines Proteins kann entweder zur Steigerung oder zur Repremierung seiner biologischen Aktivität führen. Beispielsweise resultiert die Tyrosin-Phosphorylierung der CDC2-Proteinkinase in ihrer Inhibierung wohingegen Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) durch diese Art der Modifizierung stimuliert werden. Zudem können durch Phosphorylierungen Proteininteraktionen vermittelt werden, indem z.B. Proteine über Phospho-Tyrosin-bindende Domänen mit autophosphorylierten Wachstumsfaktor-Rezeptoren interagieren.

Beim Rous-Sarkom-Virus wurde erstmals ein transformierendes Gen beschrieben, das für eine Kinase mit einer spezifischen Aktivität gegenüber Tyrosinresten kodierte (Hunter and Sefton, 1980), was folgend die Identifizierung von homologen Proteinen und ihren Substraten in anderen Organismen herausforderte (Hunter and Cooper, 1985). Es wurden verschiedene

Tyrosinkinasen isoliert, die in zwei Gruppen unterteilt werden: Es gibt Rezeptor-gekoppelte (RTK) und zytoplasmatische Proteintyrosinkinasen (zPTK).

RTK werden wiederum in zwei verschiedene Rezeptorsysteme gegliedert: Wachstumsfaktor-Rezeptoren sind aufgrund einer Transmembrandomäne in der Zellmembran so inseriert, dass die Domänen zur Bindung von Liganden in den extrazellulären und die Kinase-Domäne in den intrazellulären Raum exponiert werden (Hunter, 2001). Sie weisen selber eine intrinsische Kinase-Aktivität auf, wohingegen bei zweigeteilten Rezeptoren wie dem Interferon- oder T- und B-Zell-Antigen-Rezeptor die in die Zelloberfläche inserierte Einheit mit einer zytoplasmatischen Tyrosin-Kinase interagiert. Aufgrund der Ligandenbindung erfolgen in beiden Systemen Transphosphorylierungen in der Aktivierungstasche und an weiteren Stellen außerhalb der katalytischen Domäne (Hunter, 2001). Diese Tyrosin-Phosphorylierungen bilden Bindungsstellen für Proteine, die entweder SH2- (Src-Homology 2) oder PTB- (Phospho-Tyrosin-Binding) Domänen enthalten. Charakteristische Vertreter der RTK-Kategorie sind die Rezeptorkinasen für EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), Insulin und CSF-1 (colony-stimulating factor-1) (Fantl et al., 1993). Zu zPTK, die typischer Weise im Zytoplasma der Zelle agieren, zählen die Produkte diverser Onkogene und ihre zellulären Homologe wie Scr- (Bolen, 1991), Abl- (Wang, 1993) sowie JAK-Kinasen (Ihle, 1994). Tyrosin-Kinasen beider Kategorien scheinen unter anderem bei menschlichen Krebserkrankungen eine Rolle zu spielen. So hat die der akuten, lymphatischen Leukämie zugrunde liegende Philadelphia-Chromosomentranslokation u.a. die Aktivierung der Abl-Tyrosinkinase zur Folge (Sawyers, 1992).

RTK und zPTK können nach ihrer Aktivierung Signale auf andere Proteinklassen wie Serin/Threonin-Proteinkinasen übertragen, die sich von ihnen aufgrund der Sequenz ihrer katalytischen Domäne unterscheiden (Hanks and Quinn, 1991). Auf diese Weise werden Prozesse wie die Zellteilung kontrolliert, in dem die Serin/Threoninkinase CDC2 durch eine Tyrosinkinase (Wee1) an Position Tyr15 in der ATP-Bindungstasche phosphoryliert und damit inhibiert wird (McGowan and Russell, 1995). Die Dephosphorylierung zu Beginn der Mitose und damit die Aktivierung der Kinase katalysiert die cdc25-Proteinphosphatase (Gautier et al., 1991).

Typischerweise initiieren Phosphorylierungen ganze Proteinkaskaden, in denen ein Stimulus von der Zelloberfläche durch die Übertragung des Signals auf andere Kinasen in das Innere der Zelle weitergeleitet wird. Beispielhaft wurde kurz nach der Entdeckung der Tyrosinkinasen 1985 in Fibroblasten ein zytoplasmatisches Protein identifiziert, das nach Stimulierung durch Wachstumsfaktoren an Tyrosinresten Phosphorylierungen aufwies (Kohno, 1985). Die Bezeichnung dieses Proteins als MAP-Kinase beruhte zum einen auf der

Fähigkeit *in vitro* sowohl das Mikrotubuli-assozierte Protein (MAP2) als auch MBP (myelin basic protein) zu phosphorylieren (Rossomando et al., 1989), zum anderen auf der Eigenschaft der Kinase, durch Wachstumsfaktoren aktiviert zu werden. Bouton et al. erkannten, dass es sich bei dieser Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) um zwei zu 90% identische Kinasen (40 und 42 kDa) handelte, die folgend als extrazellulär regulierte Kinasen (ERK) bezeichnet wurden, da ihre Aktivierung durch Wachstumsfaktoren wie z.B. EGF und PDGF initiiert werden konnte (Boulton and Cobb, 1991). Die Stimulierung dieser MAPK resultiert aus der Übertragung eines Phosphats entlang einer Proteinkinasekaskade, die in den letzten Jahren genau entschlüsselt wurde und an anderer Stelle ausführlich beschrieben wird (Abb.4).

Bei den meisten eukaryotischen Organismen repräsentieren Proteinkinasen ungefähr 2% der gesamten kodierenden Sequenzen (Shiu and Li, 2004). Das humane Proteom beinhaltet 90 Tyrosinkinasen, die sich aus 58 RTK und 32 PTK zusammensetzen. In parasitär-lebenden Protozoen und Pilzen hingegen konnten nur wenige für Tyrosinkinasen kodierende Sequenzen identifiziert werden. Der einzige Vertreter der Protozoa, in dessen Genom bisher Sequenzen für putative PTK beschrieben wurden, ist *Entamoeba histolytica* (Shiu and Li, 2004).

Das Fehlen von putativen Tyrosinkinase-Sequenzen könnte auf den Verlust der entsprechenden Gene im Verlauf der Evolution zurückgeführt werden. Des Weiteren könnten putative Tyrosinkinasen in ihrer Sequenz derart von den Konsensussequenzen bisher beschriebener Kinasen abweichen, dass diese Kinasen keiner Proteinklasse aufgrund von Homologien zugeordnet werden. Möglicherweise vereinen multifunktionelle Enzyme entweder Aktivitäten von Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasen in sich oder sie vermitteln als kryptische Proteine verschiedene Funktionen mit unterschiedlichen Domänen.

Die Aktivität von Tyrosinkinasen kann durch zwei verschiedene Klassen von Wirkstoffen gehemmt werden: Zum einen durch Inhibitoren, die mit der ATP-Bindungsstelle der Kinase interagieren, wie etwa Genistein; zum anderen durch Tyrphostine, die zu einer Molekülgruppe gehören, die die Substratbindungsstelle einer PTK blockieren.

Genistein wurde 1987 erstmals als effektiver, mit ATP kompetitiver Inhibitor von Tyrosin-Kinasen wie z.B. EGFR oder pp60^{v-src} beschrieben (Akiyama et al., 1987). Es handelt sich hierbei um ein Isoflavonoid aus der Soja-Bohne, dem verschiedene therapeutische Wirkungsweisen zugeschrieben werden. Die Inhibierung von PTK macht einen Teil seines antikarzinogenen Effekts aus; des Weiteren verhindert Genistein als Antioxidans die Aufnahme von LDL-Cholesterin. Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit Östrogenen wird Genistein auch als Phytoöstrogen bezeichnet. Markovits et al. beschrieben zudem einen

inhibitorischen Effekt von Genistein auf die Topoisomerase II, indem die Droge vermutlich an eine der ATP-Bindungsstelle ähnelnde Sequenz im Enzym bindet (Markovits et al., 1989). Zu der Gruppe der Tyrphostine gehören mehrere, synthetische Derivate des Erbstatins, das ursprünglich aus *Streptomyces* isoliert wurde (Levitzki et al., 1991). Diese Drogen inhibieren ebenfalls spezifisch Tyrosinkinase. Sie üben ihre Wirkung jedoch nicht in Konkurrenz mit ATP aus, sondern verhindern die Umsetzung des Substrats durch die PTK.

1.4.2 Tyrosin-Phosphorylierungen vermitteln Interaktionen zwischen Parasit und Wirtszelle

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Tyrosin-Phosphorylierungen eine wesentliche Rolle bei der Interaktion zwischen pathogenen Organismen und ihren Wirtszellen spielen, wobei die Effekte in Abhängigkeit vom Zelltyp sowohl von phosphorylierten Parasiten- als auch Wirtszellproteinen reguliert werden.

Beispielsweise konnte sowohl die Invasion von *Eimeria tenella* als auch *T.gondii* durch PTK-Inhibitoren wesentlich reprimiert werden (Brown, 2003; Ferreira et al., 2003). Eine Vorinkubation der Toxoplasmen oder der Wirtszellen mit dem allgemeinen Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin oder den spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitoren Genistein/Tyrphostin resultierte in einer bis zu 50%igen Inhibierung sowohl der Adhäsion als auch der Invasion der Parasiten in die Wirtszellen (Ferreira et al., 2003; Robert-Gangneux et al., 2000). In Immunfluoreszenzanalysen wurden an den Kontaktstellen zwischen dem Pathogen und den Makrophagen Phosphorylierungsmuster detektiert. Diese Art der Proteinmodifikation scheint auch bei der Etablierung der Infektion eine Rolle zu spielen, da nach der Invasion in PV-Nähe Phosphorylierungen nachgewiesen werden konnten. Die beobachteten Effekte scheinen bei *T.gondii*-Infektionen vom Wirtszelltyp abzuhängen, da in infizierten, nicht-phagozytierenden L929-Zellen keine vergleichbaren Phosphorylierungen beobachtet werden konnten (Ferreira et al., 2003).

Die Beteiligung von Parasitenproteinen am Invasionsvorgang ist bei *Trypanosoma cruzi* – Infektionen genauer untersucht worden. Dieser amerikanische Trypanosomatid induziert in Säugetierzellen seine eigene Endocytose, die die Aktivierung sowohl von Parasiten- als auch von Wirtszell-Signaltransduktionswegen voraussetzt. Als Resultat kommt es u. a. zu einem Anstieg des zytosolisch frei vorliegenden Calciums, das in der Wirtszelle die Umordnung von Mikrofildamenten initiiert (Rodriguez et al., 1995), Lysosomen zur Kontaktstelle mit dem Parasiten rekrutiert (Tardieux et al., 1992) und die letztendliche Aufnahme des Pathogens

bewirkt (Andrews, 1995). Da die Zugabe von Genistein in einer Reduzierung der Zellinvasion von Trypanosomen resultiert (Vieira et al., 1994) und die Calciumfreisetzung ebenfalls verhindert (Yoshida et al., 2000), wird vermutet, dass Proteintyrosinkinasen als Initiatoren der Signaltransduktionswege eine Rolle spielen. Phosphorylierungsereignisse wurden hier anhand der Tyrosin-Phosphorylierungen eines 175kDa-Parasitenproteins gemessen, das im aktiven Zustand an der Invasion beteiligt ist (Favoreto et al., 1998). Genistein bewirkte eine Inhibierung der Phosphorylierung dieses Proteins (Yoshida et al., 2000) und reduzierte die Invasionsfähigkeit von metazyklischen Trypomastigoten in HeLa-Zellen um 75% (Favoreto et al., 1998). Auch hier gab es Zelltypen-abhängige Unterschiede, da durch eine Vorinkubation von nicht-phagozytierenden Fibroblasten mit Genistein die Invasion des Parasiten nicht verhindert wurde (Rodriguez et al., 1995).

In Untersuchungen der ausschließlich extrazellulär vorliegenden, afrikanischen Trypanosomatiden wurde deutlich, dass im Parasit diverse Tyrosin-Phosphorylierungen initiiert werden können, die in *Trypanosoma congolense* in allen Entwicklungsstadien in vergleichbarer Intensität detektiert wurden (Parsons et al., 1995). Im Gegensatz dazu traten in *Trypanosoma brucei* offensichtlich Stadien-spezifische Unterschiede in den Protein-Tyrosinphosphorylierungen auf, da sie vornehmlich bei der Differenzierung der Blutstromformen und nicht in den Teilungsphasen des Parasiten detektiert werden konnten (Parsons et al., 1991). In *T. brucei* traten in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium Proteine auf, die sowohl an Tyrosin- als auch an Serin-Resten phosphoryliert waren (Parsons et al., 1994). Eine genaue Charakterisierung dieser Parasitenproteine zeigte, dass sie im Nukleolus der Trypanosomen lokalisiert sind und dort, wahrscheinlich vermittelt über C-terminale RGG-Boxen, mit RNA interagieren (Das et al., 1996).

Von Wheeler-Alm und Shapiro konnte 1992 erstmals *in vitro* die enzymatische Aktivität von Parasiten-Tyrosin-Kinase(n) detektiert werden. Die Kinaseaktivitäten in den Parasitenextrakten, durch die exogene Substrate an Tyrosinresten phosphoryliert wurden, konnten durch Tyrosinkinaseinhibitoren reprimiert werden (Wheeler-Alm and Shapiro, 1992). Die Proliferation des Parasiten wurde *in vivo* zudem durch Genistein erheblich beeinträchtigt. Da in den Parasitenextrakten diverse Tyrosin-phosphorylierte Parasitenproteine zwischen 10 und 220 kDa detektiert wurden, konnte die enzymatische Aktivität keinem Protein eindeutig zugeordnet werden. Ein Jahr später wurden von denselben Autoren Daten veröffentlicht, wonach die Tyrosin-phosphorylierten Parasitenproteine in Kinetoplastida-spezifischen Organellen, den Glyosomen, lokalisiert sind (Wheeler-Alm and Shapiro, 1993).

Das Auftreten von Tyrosin-Phosphorylierungen legt das Vorhandensein von Protein-Tyrosin-Kinasen in parasitären Protozoen nahe. Generell wird einzelligen Organismen die

Notwendigkeit von PTK/RTK abgesprochen, weil sie in keinem zellulären Verband leben, der interzelluläre Kommunikation erfordert. Da im Lebenszyklus von Trypanosomen jedoch auch extrazelluläre Stadien wie Blutformen vorkommen, könnten diese über die Fähigkeit, den Status des Wirts zu registrieren, ihre Proliferation und Differenzierung regulieren. Einen Hinweis auf die Einflussnahme von Wachstumsfaktoren auf Trypanosomen gab die Identifizierung eines Parasitenhomologs zum EGFR (epidermal growth factor receptor) in *T.brucei* (Hide et al., 1989). Aktuelle Studien haben gezeigt, dass die Proliferation von *T.cruzi*-Amastigoten wesentlich durch Bindung von TGF (transforming growth factor) an Parasiten-Rezeptoren stimuliert wird, welcher über PTK Tyrosin-Phosphorylierungen von Parasitenproteinen induziert (Alexander et al., 2003).

Die Übertragung aus dem Insektenvektor in den Wirbeltierwirt bedeutet für Parasiten generell einen Hitzeschock durch den Anstieg der Temperatur von 24°C auf 37°C. Hieraus resultierende Veränderungen in der Proteinsynthese könnten u.a. über Phosphorylierungen reguliert werden. In Extrakten aus virulenten, bei 24°C kultivierten promastigoten Leishmanien konnten diverse phosphorylierte Proteine mit einer Größe von 20 bis 110kDa detektiert werden. Die Erhöhung der Temperatur resultierte in einer massiven Dephosphorylierung der Parasitenproteine (Salotra et al., 2000). Kinase-Deaktivierungen spielen schon bei der Infektion eine Rolle, da die Zugabe von Proteinphosphatase-Inhibitoren die Invasionsfähigkeit von *T.cruzi* in Rattenmyoblasten wesentlich verringert (Zhong et al., 1998). *Leishmania donovani* und *Mycobakterium tuberculosis* manipulieren Makrophagen, indem sie die Wirtszell-Phosphatase SHP-1 aktivieren, die folgend MAPK-vermittelte Signaltransduktionsprozesse inhibiert (Blanchette et al., 1999; Nandan et al., 1999). Die Bedeutung von PTK bei der Invasion von Leishmanien wird kontrovers diskutiert: Love und Kollegen konnten zeigen, dass eine Vorbehandlung von Makrophagen mit Genistein die Aufnahme von Amastigoten *Leishmania amazonensis* verhindert (Love et al., 1998). Es scheint sich hier um einen konzentrationsabhängigen Effekt zu handeln, da Martiny et al. in ihren Versuchen keine Beeinflussung der Invasion des Parasiten durch PTK-Inhibitoren feststellen konnten (Martiny et al., 1996). Die Arbeitsgruppen stimmten jedoch in der Beobachtung überein, dass es im Zuge der Etablierung der Leishmanien-Infektion zu einer deutlichen Abnahme von Tyrosin-Phosphorylierungen von Wirtszellproteinen kommt.

Offensichtlich spielen Tyrosin-(De-)Phosphorylierungen sowohl von Parasiten- als auch von Wirtszellproteinen bei der Interaktion zwischen Pathogen und Wirtszelle sowie bei der Parasitenproliferation eine wesentliche Rolle. Durch die Identifizierung der involvierten Proteinkinasen und Signaltransduktionswege würden für die Etablierung der Infektion

elementare Vorgänge aufgedeckt, die als Ziele in der Generierung von spezifischen Inhibitoren dienen könnten. Es wurde bereits gezeigt, dass auch in der erythrozytären Phase der *Plasmodium*-Infektion Protein-Phosphorylierungen von wichtiger Bedeutung sind (Dluzewski and Garcia, 1996; Gazarini and Garcia, 2003). PTK-Inhibitoren reprimierten sowohl die Invasion als auch die Entwicklung des Parasiten in den roten Blutzellen. Unklar ist jedoch, welche Parasiten- oder Wirtszellkinasen von den Inhibitoren in ihrer Aktivität beeinflusst wurden. Effekte einer PTK-Inhibierung und damit die Signifikanz von Protein-Tyrosinphosphorylierungen sind in der exo-erythrozytären Phase der *Plasmodium*-Infektion bisher unerforscht. Untersuchungen hinsichtlich des Phosphorylierungsstatus und der Aktivität von Parasiten- und Wirtszellkinasen im Leberstadium sind Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit.

1.5 MAPK-Kaskaden

1.5.1 Charakterisierung von MAPK-Kaskaden

Aufgrund der Art ihrer Initiierung können MAPK in verschiedene Gruppen eingeteilt werden: Es gibt Kinasen, deren Aktivierung durch einen Wachstumsstimulus ausgelöst wird (ERK) und deren Aktivierung generell zur Proliferation und zur Vitalität der Zelle beiträgt (Rubinfeld and Seger, 2005). Zudem gibt es MAPK, die durch Stimuli wie osmotischen Stress und UV-Licht (SAPK; stress-activated protein kinase) aktiviert werden und in Abhängigkeit vom Zelltyp pro- und anti-apoptische Stimuli vermitteln können (Pearson et al., 2001).

Die Aktivierung der MAPK ERK wird durch eine Signaltransduktionskaskade stimuliert, die durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren initiiert wird. Die Übertragung des primären Stimulus wird durch RTK, heterotrimere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Zytokinrezeptoren vermittelt (Lewis et al., 1998). Folgend ist der Ablauf der Signalkaskade nach Initiierung durch einen Wachstumsfaktor erläutert (Abb.4):

Der Wachstumsfaktors EGF bindet an den N-terminalen, extrazellulären Teil einer in der Zellmembran inserierten Tyrosinkinase und stimuliert so deren Autophosphorylierung. Die phosphorylierten Tyrosinreste im C-Terminus bilden Interaktionsstellen für Moleküle mit SH2-Domänen wie z.B. GRB-2 (growth factor receptor bound protein-2). Dieser interagiert wiederum über SH3-Domänen mit prolinreichen Aminosäureabfolgen in einem GEF (guanine nucleotide exchange factor), der so aus dem Zytoplasma zur Zellmembran rekrutiert wird. SOS ist das Genprodukt des humanen Homologs zum Drosophila-Gen Son Of Sevenless, das als GEF den Austausch von GDP gegen GTP in Ras katalysiert. Ras ist aufgrund einer C-terminalen Modifikation (Farnesylierung) membranassoziiert und kann im GTP-gebundenen Zustand diverse Proteine wie z.B. die Ser/Thr-Kinase Raf aktivieren. Die Raf-Kinase vermittelt die Phosphorylierungen der MAP Kinase Kinase (MKK) MEK, die ihrerseits durch die Übertragung von 2 Phosphatresten auf ein Threonin und ein Tyrosin im Phosphorylierungsmotiv der MAPK ERK deren Aktivierung katalysiert. Diese Ser/Thr-Kinase kann folgend verschiedene Substrate wie z.B. Transkriptionsfaktoren ebenfalls durch Phosphorylierung aktivieren (Schlessinger, 1993).

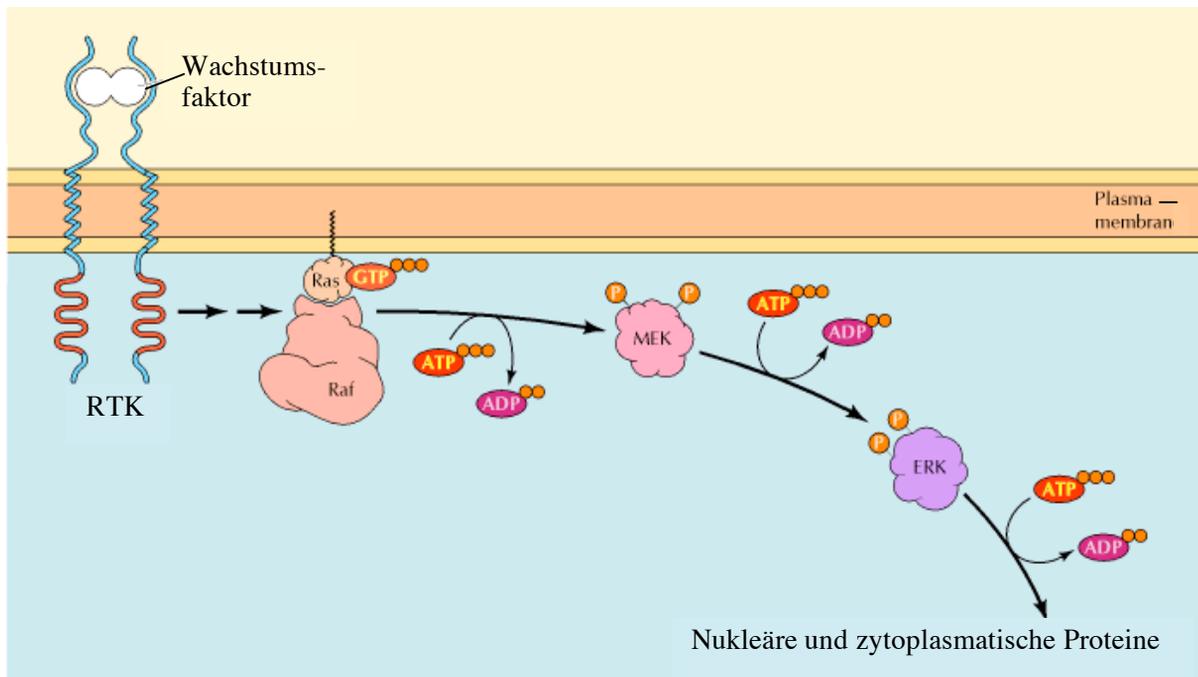


Abb.4: ERK-Aktivierungskaskade. (Quelle: The Cell von G.M.Cooper, 2000, verändert)

Die **MEKK** Raf wird durch verschiedene Parameter wie Lokalisation, Protein-Protein-Interaktionen und Phosphorylierungen an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten kontrolliert (Morrison and Cutler, 1997). So wird der Phosphorylierungsstatus von Raf-1 zusätzlich von diversen Kinasen beeinflusst; hierzu zählen u.a. Src, PKC-Familienmitglieder, PAK und Akt. Die von PAK und Src phosphorylierten Aminosäuren befinden sich im N-terminalen Teil der Kinase (Serin 338, Tyrosin 340 und 341) und ihre Phosphorylierung resultiert in einer deutlichen Steigerung der Kinaseaktivität (Diaz et al., 1997; Fabian et al., 1993).

MKKs gehören zur seltenen Klasse der zweifach-spezifischen Kinasen, die sowohl Ser/Thr- als auch Tyr-Reste phosphorylieren können. MKKs werden selber durch zweifache Phosphorylierung an Serinresten im Aktivierungsmotiv Ser₂₁₈(P)-Met-Ala-Asn-Ser₂₂₂(P) (nummeriert nach der Abfolge in humanem MKK1) (Resing et al., 1995) aktiviert. Im Gegensatz zu den MAPK, die immer spezifisch von MKKs erkannt und aktiviert werden, können MKKs durch verschiedene MAP Kinase Kinase Kinasen phosphoryliert werden, zu denen die Mitglieder der Raf-Familie, c-Mos, MEK Kinasen (MEKKs) und "multilineage protein kinases" (MLKs) gehören (Lewis et al., 1998). Im Unterschied zu ERK kann MKK1 durch einfache Phosphorylierung an einem Serin teilweise aktiviert werden (Resing et al., 1995). Die Interaktion zwischen MEK und ERK wird über spezielle Protein-Motive vermittelt: Die MAPKK besitzt in ihrem N-Terminus die konservierte D-Domäne, welche mit zwei Aspartatresten in der MAPK interagiert, die die CD-Domäne bilden (Tanoue and Nishida, 2002).

ERK1 und ERK2 sind 44- und 42-kDa große Enzyme, deren Sequenz in Säugetieren zu 90% identisch ist (Boulton et al., 1991). In ihrer Aminosäureabfolge finden sich alle für Proteinkinasen charakteristischen Domänen I-XI (Hanks et al., 1988). Die Aktivierung der Enzyme erfolgt durch Phosphorylierungen von zwei konservierten Aminosäureresten, wobei Tyrosin zeitlich vor Threonin phosphoryliert wird (Haystead et al., 1992). Durch aktivierte MAPK kann die Genexpression entweder direkt durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren oder indirekt durch die Aktivierung von Proteinkinasen, die ihrerseits nukleäre Faktoren phosphorylieren, moduliert werden. Eine spezifische Inhibierung der Aktivierung dieser Kinase kann durch die Chemikalien U0126 und PD98059 erreicht werden; (Alessi et al., 1995; Favata et al., 1998). Diese unterscheiden sich jedoch von anderen MAPK-Inhibitoren, da sie nicht kompetitiv mit der ATP- oder Substratbindungsstelle interagieren, sondern die Initiator kinase MEK blockieren und somit eine Phosphorylierung der ERK-MAPK verhindern.

Aus den Lebern von Ratten wurde 1990 erstmals eine MAPK mit MAP-2-Aktivität isoliert, die infolge einer Behandlung mit Cycloheximid induziert wurde und damit das erste charakteristische Mitglied einer weiteren MAPK-Gruppe, der Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK), darstellte (Kyriakis and Avruch, 1990). In einer Affinitätsaufreinigung mit c-Jun als Adsorptionsmatrix wurden zwei weitere Proteine mit ähnlicher Sequenz isoliert, die ebenfalls MAPK-Merkmale aufwiesen (Hibi et al., 1993). Diese Kinasen wurden folgend als **JNK1/SAPK γ** , **JNK2/SAPK α** und **JNK3/SAPK β** bezeichnet und in der Gruppe SAPK/JNK (c-Jun N-terminal Kinase) zusammengefasst, deren Transkripte auf mehr als zehn alternative Arten gespleißt werden können (Kyriakis et al., 1994). Eine Inhibierung der JNK MAPK kann durch den Einsatz des Anthrapyrazolon-Derivat SP600125 (=JNK-Inhibitor II) erreicht werden. Dieser Wirkstoff bindet in Konkurrenz mit ATP an die katalytische Domäne der Kinase und hemmt deren Aktivität, was sich im Zellkulturmodell in einer dosisabhängigen Hemmung der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Jun widerspiegelt (Bennett et al., 2001). Die Aktivierung von JNK wird durch die Kinasen MKK4 und MKK7 katalysiert, die *in vitro* jedoch auch die p38-MAPK als Substrat erkennen können (Meier et al., 1996).

Diese weitere MAPK-Gruppe wurde 1994 in verschiedenen Zusammenhängen erstmals beschrieben: Aus mit Zytokinen behandelten Zellen wurde eine Tyrosin-phosphorylierte Kinase isoliert (Han et al., 1994). Zeitgleich wurde dasselbe Protein als Ziel von Pyridinyl-Imidazol-Inhibitoren ermittelt, dessen Inhibierung u.a. eine Blockierung der Interleukin1- (IL-1) und der Tumornekrosefaktor α - (TNF- α) Produktion trotz LPS-Stimulus zur Folge hatte (Lee et al., 1994). Die p38-MAPK wurde ebenfalls als aktivierende Kinase von MAPKAP-

Kinase-2 (MAP kinase-activated protein) identifiziert (Rouse et al., 1994). Die p38-MAPK-Subfamilie setzt sich aus 4 Genen zusammen, die für verschiedene Formen der Kinase kodieren: **p38 α** , **p38 β** , **p38 γ** und **p38 δ** . Die Phosphorylierung der p38-MAPK wird ebenfalls von den Kinasen MKK3 und MKK6 katalysiert, wobei MKK3 präferentiell p38 α und β aktiviert (Enslin et al., 2000).

Da die Inhibierung von p38-MAPKinasen in einer reprimierten Zytokinbildung resultiert, können durch p38-Inhibitoren inflammatorische Reaktionen verhindert werden. Einige p38-Inhibitoren wurden bereits in ersten klinischen Studien im Menschen getestet (Dominguez et al., 2005). Eine Hemmung der p38-MAPK kann durch Pyridinylimidazol und seine Derivate (SB-(SmithKline Beecham)compounds) erreicht werden, indem durch kompetitive Interaktion mit der ATP-Bindungsstelle die katalytische Aktivität der Kinase gehemmt wird (Lee et al., 1999). Die Verbindungen SB203580 und SB202190 gelten als spezifische Inhibitoren der p38-Isoformen α und β , wohingegen p38 δ und p38 γ erst im hochmikromolaren Bereich in ihrer Aktivität beeinflusst werden.

Außer den bereits beschriebenen MAPK-Subfamilien wurden in den letzten Jahren diverse Kinasen mit Homologien zu den bisher charakterisierten MAPK isoliert (Tab. 1) (Bogoyevitch and Court, 2004). Die Charakterisierungen dieser atypischen Kinasen (ERK 3, 4, 5, 6, 7 und 8) im Hinblick auf Aktivierung, Substrate und Funktionen sind bisher noch unvollständig. Interessanterweise besitzen ERK 3, 5, 7 und 8 C-terminale Verlängerungen im Anschluß an die Kinase-Domäne, über die vermutlich Aktivierungen, zelluläre Lokalisationen und Interaktionen mit anderen Proteinen vermittelt werden (Abe et al., 2001; Abe et al., 2002; Kasler et al., 2000).

<u>Kinase</u>	<u>Größe</u> (kDa)	<u>Stimulierung durch:</u>	<u>MAPKK</u>	<u>Phospho-</u> <u>Motiv</u>	<u>Besonderheiten</u>
ERK1/2	42/40	Wachstumsfaktoren	MEK1/2	T-E-Y	
ERK3	63/97	?	?	S-E-G	C-term. Verlängerung, dauerhaft nukleär
ERK4	45	Wachstumsfaktoren	MEK1/2	T-E-Y	Spleißvariante von ERK1
ERK5	98	Wachstumsfaktoren & Stress	MEK5	T-G-Y	C-terminale Verlängerung
ERK6	40	Stress?	MKK6	T-G-Y	p38 γ
ERK7	61	Konstitutiv aktiv?	Auto- phospho- rylierung?	T-E-Y	autoregulatorische, C-terminale Verlängerung
ERK8	60	?	Src?	T-E-Y	C-terminale Verlängerung
JNK1	49	Stress	MKK4/7	T-P-Y	
p38α	38	Stress	MKK3/6	T-G-Y	

Tab.1: Charakterisierung verschiedener MAPK. Unterschiedliche MAPK wurden im Hinblick auf Größe, Aktivierungsstimulus und –kinase, Phosphorylierungsmotiv und besondere Eigenschaften verglichen.

Die Entfernung eines oder beider Phosphatreste im Aktivierungsmotiv durch Phosphatasen führt bei allen MAPK zu einer dramatischen Reduzierung der Aktivität. Es gibt doppelt-spezifische Phosphatasen, die sowohl die Threonin- als auch die Tyrosinreste in den Kinasen dephosphorylieren können. Diese MAPKinase Phosphatasen (MKP) werden entweder durch Gene kodiert, die durch Wachstumsfaktoren oder Stress induziert werden können und deren Produkte hauptsächlich im Nucleus lokalisiert sind (Sun et al., 1993). Andere werden nicht auf Transkriptionsebene kontrolliert und liegen primär im Zytoplasma der Zelle vor (Mourey et al., 1996). MAPK können die sie deaktivierenden Enzyme z.T. selber positiv regulieren, indem sie entweder die Phosphatasen phosphorylieren, wodurch ihre Degradation durch das Proteosom verhindert wird (Brondello et al., 1999), oder sie verstärken die Aktivität der Phosphatasen, indem sie an regulatorische Motive innerhalb der Enzyme binden (Nichols et al., 2000). Interaktionen zwischen Phosphatasen und MAPK werden wie in MEKs und MAPK-Substraten u.a. über D-Domänen vermittelt (Tanoue and Nishida, 2002).

Während der zur Aktivierung von p38 und JNK führende Signalweg vorwiegend durch inflammatorische Zytokine und verschiedene Stressfaktoren stimuliert wird, sind an der Aktivierung der MAP-Kinase ERK vor allem Wachstumsfaktoren beteiligt. Trotz der offensichtlichen Unterschiede hinsichtlich der Proteinsequenz und dem Aktivierungsstimulus haben die MAPK überlappende Substratspezifitäten:

Generell aktivieren MAPK verschiedene Substrate durch Phosphorylierung an Serin- oder Threoninresten, denen mindestens ein Prolin folgt (Lewis et al., 1998). Der Prolinrest ermöglicht aufgrund seiner Konformation in den Proteinen eine optimale Interaktion zwischen Kinase und Substrat, da die Bindungstasche der MAPK durch den eigenen, phosphorylierten Tyrosinrest im Aktivierungsmotiv verengt wird. Des Weiteren gibt es Substrat-spezifische Motive wie die δ -Domäne im Transkriptionsfaktor c-Jun, über die die Interaktion mit JNK vermittelt wird (Kallunki et al., 1996). Die in der Sequenz von MEK identifizierte, Proteininteraktionen-vermittelnde D-Domäne ist ebenfalls in verschiedenen MAPK-Substraten wie z.B. dem Transkriptionsfaktor Elk-1 vorhanden. Substrate von MAPK sind andere Proteinkinasen oder nukleäre Proteine wie Transkriptionsfaktoren. Als Konsequenz der Phosphorylierung von Rsk, MAPKAP-Kinasen oder MAPKinase-interagierenden Kinasen (Mnks) durch MAPK können diese Kinasen wiederum Proteine stimulieren, die in der Transkriptionsaktivierung involviert sind (Pearson et al., 2001). Für die direkte Einflussnahme müssen die MAPK in den Zellkern transloziert werden, wo sie z.B. Mitglieder der AP-1-Familie aktivieren können. Die AP-1-(activating protein-1) Transkriptionsfaktoren entstehen durch Homo- oder Heterodimerisierung von aktiviertem c-Jun, c-Fos und/oder ATF-2 (activating transcription factor-2), die folgend an DNA binden können (Hai and Curran, 1991). So kann c-Jun positiv und negativ durch die Phosphorylierung von MAPK reguliert werden: JNK katalysiert die Übertragung von Phosphatresten auf den N-terminalen Teil des Transkriptionsfaktors, woraufhin dessen Stabilität und DNA-Bindungsaffinität gestärkt wird (Hibi et al., 1993). ERK hingegen phosphoryliert Aminosäurereste im C-Terminus, die mit der DNA-Bindung interferieren (Chou et al., 1992).

1.5.2 Bedeutung der Aktivierung von Wirtszell- und Parasiten-MAPK während der Infektion

Bei der Charakterisierung von Proteinen, die im Rahmen von Parasiten-Infektionen phosphoryliert werden, wurde deutlich, dass die Aktivierung von MAPK einen entscheidenden Beitrag zu den nachgewiesenen Phosphorylierungsereignissen leistet. Hier

spielen sowohl aktivierte Kinasen vom Parasiten als auch von der Wirtszelle eine entscheidende Rolle.

So konnte bereits gezeigt werden, dass Wirtszell-MAPK bei der Invasion von *T. cruzi* aktiviert werden. Die Bindung eines Parasitenoberflächenproteins induzierte in Makrophagen Tyrosin-Phosphorylierungen an diversen Proteinen, zu denen auch ERK gehörte. Behandlungen mit Genistein oder dem MEK-Inhibitor PD98059 resultierten sowohl in einer Reduzierung der Phosphorylierungsmuster als auch in der Verringerung der Invasionsfähigkeit des Parasiten (Villalta et al., 1998). Bei der Invasion von Toxoplasmen in Monozyten werden ebenfalls MAPK der Wirtszelle, ERK1/2, JNK und p38, aktiviert (Valere et al., 2003). Im Gegensatz zu Theilerien-Infektionen, bei denen es zu einer konstitutiven Aktivierung von Wirtszell-JNK kommt (Galley et al., 1997), werden in Toxoplasmen- und Leishmanien-infizierten Zellen Phosphorylierungen nur kurzfristig im Rahmen der Invasion induziert. Die Parasiten stimulieren folgend (Wirtszell-) Phosphatasen, die die Aktivierung von Signaltransduktionswegen in der Wirtszelle verhindern. Auf diese Weise wird u. a. die Synthese von NO und pro-inflammatorischen Zytokinen unterdrückt, so dass der Parasit die Infektion etablieren kann (Kim et al., 2004; Nandan et al., 1999).

In der frühen Phase der exo-erythrozytären Entwicklung von *Plasmodium* konnten in infizierten Hepatozyten ebenfalls Aktivierungen von Wirtszellkinasen wie ERK und PI3K beobachtet werden (Leiriao et al., 2005). Die Inhibierung der PI3K-Signalkaskade 24h p.I. hatte jedoch keinen Effekt auf die Proliferation des Parasiten, so dass eine Aktivierung dieses Signaltransduktionswegs vermutlich nur in der Anfangsphase der Infektion von Bedeutung ist (van de Sand et al., 2005). Der Status anderer Wirtszell-Kinasen ist in der exo-erythrozytären Entwicklung bisher kaum erforscht. Zudem stellt sich die Frage, welche Plasmodien-Kinasen im Leberstadium in der Kommunikation mit den Hepatozyten und in der Parasitenproliferation eine Rolle spielen könnten.

In den letzten Jahren wurden die Genome verschiedener Parasiten sequenziert und teilweise annotiert. 2002 wurde die gesamte genomische Sequenz von *P. falciparum* (Gardner et al., 2002) und *Plasmodium yoelii yoelii* (Carlton et al., 2002) veröffentlicht. Das Erbgut von *P. berghei* wird z.Zt. noch sequenziert und ist daher nur teilweise zugänglich.

Die Veröffentlichung der genomischen Sequenzen legte den Grundstein für die genaue Charakterisierung der Parasiten u.a. im Hinblick auf ihr Kinom. Ziel ist die Identifizierung von Kinasen mit Homologien zu bereits beschriebenen Proteinen und von parasiten-spezifischen Proteingruppen wie z.B. der *Plasmodium*-FIKK-Familie, die nach einem konservierten Motif in der Subdomäne II benannt wurde (Schneider and Mercereau-Pujalon, 2005). In Abhängigkeit von der gewählten Stringenz in der Ermittlung der Zugehörigkeit zu

einer Gruppe wurden von Ward et al. 65 putative *P.falciparum*-Proteine mit einer typischen eukaryotischen Kinasedomäne sowie 20 Mitglieder der FIKK-Gruppe ermittelt (Ward et al., 2004). Anamika et al. hingegen charakterisierten 99 Parasitensequenzen als putative eukaryotische Proteinkinasen (ePK) sowie 19 FIKK-Mitglieder (Anamika et al., 2005). Im Proteom von *P.berghei* wurden 60 putative Proteinkinasen und 16 Proteinphosphatasen identifiziert, von denen ein Großteil in Gametozyten exprimiert wird: Zehn Kinasen und zehn Phosphatasen scheinen nur in der sexuellen Phase des Parasitenzyklus eine Rolle zu spielen (Khan et al., 2005).

In Eukaryoten repräsentiert die Gruppe der ePK ungefähr 2% der gesamten kodierenden Sequenzen (Shiu and Li, 2004). Im Vergleich zum Genom von Vertretern der *Trypanosomatida* (*Leishmania major*: 199 ePK, *T.brucei*: 176 ePK und *T. cruzi*: 190 ePK (Parsons et al., 2005)) scheint es im *Plasmodium*-Genom nur Sequenzen für halb so viele putative ePK zu geben. Bei der Suche nach Übereinstimmungen mit bereits beschriebenen Proteinen konnten jedoch rund 60% aller vermeintlichen *Plasmodium*-Proteine keine Funktion zugeschrieben werden (Doerig et al., 2005). Folglich werden diverse, kryptische Parasitenproteine exprimiert, die nicht eindeutig einer Proteinklasse zugeordnet werden können. Desweiteren wurden einige chimäre Parasitenproteine beschrieben, die Merkmale verschiedener ePK in sich vereinen. In vorangehenden Studien konnte bereits festgestellt werden, dass sich außerdem viele Parasitenkinasen in ihrer Struktur oder in ihrer Funktion von vergleichbaren Proteinen ihrer Wirbeltierwirte unterscheiden (Kappes et al., 1999). Gerade diese Diversität könnte bei der Generierung von Parasiten-spezifischen Inhibitoren ausgenutzt werden.

Obwohl Tyrosin-Phosphorylierungen bei der Invasion und der Proliferation von Plasmodien in Erythrozyten eine wichtige Rolle spielen (Gazarini and Garcia, 2003), konnten in Sequenzanalysen weder im *P.falciparum*-, noch im *P.berghei*-Genom kodierende Sequenzen für putative Tyrosinkinasen gefunden werden (Ward et al., 2004). Des Weiteren wurden im Kinom der Parasiten bisher auch keine typischen zweifach-spezifischen Kinasen, d.h. Kinasen, die sowohl Ser/Thr- als auch Tyr-Reste phosphorylieren können, identifiziert. So scheint es bei Plasmodien zwar zwei Parasiten-MAPK (s.u.), jedoch keine weiteren Mitglieder typischer MAPK-Kaskaden (MAPKK, MAPKKK) zu geben (Anamika et al., 2005; Ward et al., 2004). In Konsequenz wird die Aktivierung der Parasitenkinasen vermutlich nicht wie in anderen Eukaryoten über eine klassische Kinasekaskade erfolgen. Bisher wurden bei *P.falciparum* nur zwei Proteine mit Homologien zu MAPKK beschrieben, die jedoch vermutlich nicht als klassische Initiatorkinasen fungieren:

Die Sequenz der PfPK7 auf Chromosom 2 wurde in Datenbankanalysen als eine putative Kinase mit einer hohen Homologie zu den Proteinen der MAPKK3/6-Familie identifiziert (Dorin et al., 2005). Diese Übereinstimmungen beschränkten sich jedoch auf den C-terminalen Teil des Proteins, der alle konservierten Aminosäurereste einer katalytischen Kinasedomäne enthält. Der N-Terminus hingegen weist Homologien zu Protein-Kinasen A von Pilzen auf. Trotz den Homologien zu MEK im C-terminalen Abschnitt der Parasitenkinase befindet sich an der entsprechenden Stelle im *Plasmodium*-Protein zwischen den Subdomänen VII und VIII kein Phosphorylierungsmotiv. Es gibt in der putativen Aktivierungsschleife der Parasitenkinase Serin- und Threoninreste, die *in vivo* unabhängig von dem Aktivierungsmotiv phosphoryliert werden könnten. In *in vitro*-Versuchen wurde sowohl eine Autophosphorylierung der rekombinanten Kinase als auch eine Phosphorylierung von MBP nachgewiesen. Die rekombinante Kinase besitzt jedoch keine Aktivität gegenüber PfMAPK1 und PfMAPK2 (Dorin et al., 2005).

Diese Art der chimären Proteinkinasen, die Merkmale verschiedener Kinase-Gruppen in sich vereinen, ist charakteristisch für Parasitenkinasen. Ein weiteres Beispiel ist PfNek-1, deren Aktivierungsdomäne denen von MAPKK sehr ähnlich ist (Dorin et al., 2001). Die gesamte Sequenz von PfNek-1 weist jedoch eindeutige Homologien zur NIMA-Kinasefamilie auf (42% identisch mit Nek2). Namensgebend für die im Pilz *Aspergillus nidulans* entdeckten Kinasen sind temperatursensitive Mutanten, die in der G2-Phase des Zellzyklus arretiert sind = Never-In-Mitosis/Aspergillus (Osmani et al., 1988). PfNek-1 wurde bei dem Versuch der Identifizierung von Parasiten-MEK anhand eines konservierten Motivs (SMANS) aus der Aktivierungsdomäne in Datenbankanalysen ermittelt (30% identisch mit MEK). In *in vitro*-Versuchen konnte PfNek-1 PfMAPK2, nicht jedoch PfMAPK1 oder murine ERK2 als Substrat phosphorylieren (Dorin et al., 2001).

Die Plasmodien-MAPK1 und 2 wurden bereits teilweise charakterisiert und nehmen phylogenetisch betrachtet interessante Positionen in der Gruppe der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ein: Die PfMAPK1 wurde 1996/97 von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben und konnte keiner der Subfamilien ERK, JNK oder p38 eindeutig zugeordnet werden (Doerig et al., 1996; Graeser et al., 1997; Lin et al., 1996). Aufgrund ihrer C-terminalen Verlängerung ähnelt sie eher den atypischen MAPK ERK7/8, deren Aktivität nicht über eine typische MAPK-Kaskade vermittelt zu werden scheint (Doerig et al., 2005). Die Proteinsequenz beinhaltet ein typisches Motiv aus der ATP-Bindungsstelle (VGKGAYGVV, AS 29-37) und aus der katalytischen Domäne (LLHRDIKPSNILV, AS 142-154) (Bairoch and Claverie, 1988) sowie das für die Aktivierung von MAPK erforderliche Phosphorylierungsmotiv (Payne et al., 1991). Des Weiteren sind in der Aminosäureabfolge

die 15 konservierten, für Serin/Threoninkinasen charakteristischen Aminosäurereste zu finden (Hanks and Quinn, 1991; Hanks et al., 1988). Der C-terminalen Verlängerung von 503 zumeist basischen und sauren Aminosäuren konnte bisher keine Funktion zugeordnet werden. In *in vitro*-Versuchen phosphorylierte die rekombinante Parasitenkinase sowohl sich selbst als auch MBP (Graeser et al., 1997). Ein zur PfMAPK1 homologes Protein ist in *P. berghei* noch nicht beschrieben worden. Die Expression der PfMAPK1 wurde *in vivo* bisher nur in der erythrozytären Phase der Infektion untersucht, in der ihr weder eine Aufgabe noch spezifische Substrate zugeordnet werden konnten. Folglich ist bislang unklar, welche Rolle die Parasiten-MAPK1 in der exo-erythrozytären Entwicklung spielen könnte.

Im Gegensatz dazu konnte der Plasmodien-MAPK2 bereits eine eindeutige Funktion zugeschrieben werden (Tewari et al., 2005). Knock-Out-Studien zeigten, dass die PbMAPK2 offenbar für die Exflagellation der Mikrogametozyten essentiell ist. Die weibliche Gametogenese ist dagegen bei den mutierten Parasiten nicht beeinflusst (Tewari et al., 2005). Bisher konnte eine Expression der Plasmodien-MAPK2 nur in Mikrogametozyten nachgewiesen werden (Khan et al., 2005). Diese Parasitenkinase zeigt kaum Übereinstimmungen mit bisher charakterisierten MAPK. Die katalytische Domäne der PfMAPK2 ist größer als die anderer MAPK (Dorin et al., 1999). Im Gegensatz zur PfMAPK1 besitzt sie keine C-terminale Verlängerung und trägt anstelle der MAPK-typischen Thr-X-Tyr-Abfolge die Aminosäuren Thr-Ser-His in ihrem Phosphorylierungsmotiv. Die Sequenz der PbMAPK2 stimmt zu 74% mit der der PfMAPK2 überein; in Bezug auf die katalytische Domäne sind sie sogar zu 89% identisch. Der Weg der Aktivierung der MAPK2 konnte *in vivo* bisher nicht geklärt werden, *in vitro* wird sie von der Parasitenkinase PfNek-1 phosphoryliert (Dorin et al., 2001).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Kampf gegen Malaria erschweren die Resistenzenbildung gegen Medikamente sowie das Fehlen von Impfstoffen die Eindämmung dieser Tropenkrankheit. In den letzten Jahren konzentrieren sich die Untersuchungen zunehmend auch auf die exo-erythrozytäre Phase der Infektion, da durch eine Bekämpfung des Parasiten in der Leber der Ausbruch der Krankheit sowie die Übertragung der Parasiten verhindert werden könnten.

Um in dieses Stadium der Plasmodien-Infektion eingreifen zu können, müssen zunächst die molekularen Vorgänge in der exo-erythrozytären Phase verstanden werden, die besonders für die Interaktion zwischen Parasit und Wirtszelle von Bedeutung sind. Für verschiedene Parasiten wie Toxoplasmen, Leishmanien und Trypanosomen konnte bereits gezeigt werden, dass Phosphorylierungsereignisse eine entscheidende Rolle bei der Kommunikation zwischen Parasit und Wirtszelle sowie bei der Entwicklung der Pathogene spielen. Die exo-erythrozytäre Phase der Plasmodien-Infektion ist im Hinblick auf parasiten-induzierte Signaltransduktionsereignisse bisher kaum erforscht. In Konsequenz sollte zunächst in Immunfluoreszenzanalysen der Phosphorylierungsstatus in *P. berghei*-infizierten Hepatozyten untersucht werden. Zudem sollte der Einfluss von PTK-Inhibitoren auf Protein-Phosphorylierungen in infizierten Zellen sowie die Proliferation des Parasiten analysiert werden.

Da Mitogen-aktivierte Proteinkinasen zentrale Elemente in Signaltransduktionskaskaden bilden, sollte in der Arbeit zudem die Rolle von Wirtszell- und Parasiten-MAPK in der exo-erythrozytären Phase charakterisiert werden. Zu diesem Zweck sollten in Immunfluoreszenzanalysen Kinaseaktivitäten aufgedeckt und mit Inhibitoren gezielt reprimiert werden. Zudem sollten mögliche Interaktionen zwischen Parasiten- und Wirtszellkinasen untersucht werden.

Auf diese Weise könnten Abhängigkeiten des Parasiten von seiner Wirtszelle aufgedeckt oder für die Leberphase relevante Parasitenkinasen identifiziert werden, die Ziele in der Generierung von Impfstoffen oder Inhibitoren bilden könnten.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Acrylamidgelkammer	Hoefer Mighty Small II	Amersham, Buckinghamshire
Agarosegelkammer	Horizon ® 58	Gibco, Karlsruhe
β-Counter	1205 Betaplate	Wallac, Freiburg
Binokular	KL1500LCD	Zeiss, Hamburg
Blotting Tank	Modell EB10	Labtec Int., Burkhardsdorf
Brutschrank	B5060EK-C02	Heraeus, Hannover
Brutschrank	B6200	Heraeus, Hannover
Digitalkamera	C4742-95	Hamamatsu, Herrsching
Durchflußpumpe	Pharmacia LKB-Pump P1	Pharmacia, Karlsruhe
Entwickler	Curix 60	AGFA, Leverkusen
Fluoreszenz-Mikroskop	Axioskop 2 plus	Zeiss, Hamburg
pH-Meter	pH Level 1	InoLab, Weilheim
Photometer	Bio-Photometer	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetus®-akku	Hirschmann, Eberstadt
Power-Supply	EPS 3500	Amersham, Buckinghamshire
Power-Supply	Power PAC 300	Bio-Rad, München
Schüttler	Inkubator Shaker 4400	Innova™
Sonifikator	Sonifer 250	Branson, Dietzenbach
Sterilbank	BSB 6A	Gelaire Flow Laboratories, Opera, Italien
Thermoblock	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, Rodgau-Jüdesheim
UV-Transilluminator	UV-Flächenstrahler	Konrad Bender, Wiesloch

Vortexer	VF2	IKA Labortechnik, Hamburg
Wasserbad	Julabo SW20 M3	JulaboLabortechnik, Seelbach Lauda
Waage	GM-300P	Lutron, Berlin
Zentrifugen:Beckmann	J2-21	Beckmann, Fullerton, USA
Beckmann	J2-HS	Beckmann, Fullerton, USA
Centrifuge	5415C	Eppendorf, Hamburg
Sigma	4K10	Sigma, Steinheim
Sigma	1-15K	Sigma, Steinheim
Minifuge	T	Sigma, Steinheim
Umkehrmikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Hamburg

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Butterfly Venofix 19G, 23G	Braun, Melsungen
Deckgläschen, rund, Ø 13mm	Engelbrecht, Furth
Einwegkanülen	Braun, Melsungen
Einwegspritzen	Braun, Melsungen
Entwicklerkassette	Rego, Augsburg
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Falcon Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Fotofilm AGFA APX 100	AGFA Leverkusen
Gießstation für SDS-Gele	Hofer, Hamburg
Glasküvetten	Roth, Karlsruhe
Glasobjektträger	Roth, Karlsruhe
Kunststoffpipetten	Greiner, Solingen-Wald
Nahtmaterial Mersilene	Ethicon GmbH, Norderstedt
Nitrozellulose Transfer Membran Protran®	Schleicher&Schuell, Dassel
Parafilm	Pechiney, Mühlthal
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim

Petrischalen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen, gestopft	Greiner, Solingen-Wald
Silikonstift PapPen	G. Kisker, Steinfurt
Sterilfilter	Sarstedt, Nürnberg
Steril-Kompressen	Beese, Barsbüttel
Tropfenfänger Intrafix Air	Braun, Melsungen
6-, 24-, 96-Well-Platten	Greiner, Solingen-Wald
Whatman-Filterpapier	Schleicher&Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen	Greiner, Solingen-Wald
<u>Sezierbesteck:</u> Chirurgische Schere, 13cm Dumont Präzisionspinzette, 5/45°	Hauptner, Zürich, Schweiz Roth, Karlsruhe

2.1.2 Chemikalien

Acrylamid (30%ig)	Biomol, Hamburg
Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Ampicillin	Sigma, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Biomol, Hamburg
ASB-14	Sigma, Steinheim
Borsäure	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Braun-H ₂ O	Braun, Melsungen
Bromphenolblau-Natriumsalz	Merck, Darmstadt
BSA (bovine serum albumine)	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chaps	Sigma, Steinheim
Choramphenicol	Sigma, Steinheim
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Complete Freund's Adjuvant	Sigma, Steinheim
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma, Steinheim
DAKO Fluorescent Mounting Medium	DAKO, Carpinteria, USA

dNTP-Mix	Sigma, Steinheim
DMSO	Biomol, Hamburg
DTT	Biomol, Hamburg
Dulbecco`s MEM	PAA, Pasching, Österreich
ECL™ Western Blotting Detection Reagent	Amersham, Buckinghamshire
EDTA Natriumsalz	Biomol, Hamburg
Earls MEM	PAA, Pasching, Österreich
ECL™ -Western-Blotting-Detection Reagents	Amersham, Buckinghamshire, England
Essigsäure (100%)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Biomol, Hamburg
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
complete Freund`s Adjuvanz	Sigma, Steinheim
incomplete Freund`s Adjuvanz	Sigma, Steinheim
Glucose	Roth, Karlsruhe
Gluthation, reduziert	Roth, Karlsruhe
Glutathion Sepharose 4B	Amersham, Buckinghamshire, England
Glycerin	Biomol, Hamburg
Heparin, Thombophob®-100.000	Braun, Melsungen
Hepatocyte Wash-Medium	Gibco, Eggenstein
HEPES	Biomol, Hamburg
Hoechst 33258 (bis-benzimide)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
³ H-Thymidin (79mCi/mM)	Amersham, Buckinghamshire, England
IPTG	Biomol, Hamburg
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
JAA (Jodacetamid)	Sigma, Steinheim
Kolloidale Coomassiefärbelösung	Roth, Karlsruhe
LB-Agar	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen, Paisley, GB
Liver Digest-Medium	Gibco, Eggenstein
Liver Perfusion-Medium	Gibco, Eggenstein
LB-Medium (LB Broth Base)	Roth, Karlsruhe

Methanol	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
MOPS	Sigma, Steinheim
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
NucleoSpin[®] Extract II	Macherey&Nagel, Düren
NucleoSpin[®] RNA II	Macherey&Nagel, Düren
Oligofectamin[™]	Invitrogen, Paisley, GB
OptiMEM	Invitrogen, Paisley, GB
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAA, Pasching, Österreich
Rompum	Bayer, Leverkusen
RPMI-Medium	PAA, Pasching, Österreich
Saponin	Sigma, Steinheim
SDS	Biomol, Hamburg
SOC-Medium	Invitrogen
Sorbitol	Sigma, Steinheim
Szintillationsflüssigkeit für β-Counter	Roth, Karlsruhe
TEMED	Biomol, Hamburg
Thiourea	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Biomol, Hamburg
Triton-X-100	Sigma, Steinheim
Tween 20	Sigma, Steinheim
Trypan Blue Solution	Fluka, Steinheim
Urea	Merck, Darmstadt
Wright Stain	Sigma, Steinheim
Xtreme Gene Transfection Reagent	Roche, Grenzach

2.1.3 Enzyme

BamHI	NEB, Frankfurt
EcoRI	NEB, Frankfurt

HindIII	NEB, Frankfurt
Hot FirePol [®]	Solis BioDyne, Tartu, Estonia
Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche, Grenzach
PstI	NEB, Frankfurt
Superscript RT II	Invitrogen, Paisley, GB
T4-DNA-Ligase	MBI-Fermentas, St.-Leon-Rot
Trypsin	PAA, Pasching, Österreich
Short Cut [™] RNAi Kit	NEB, Frankfurt
XhoI	NEB, Frankfurt

2.1.4 Inhibitoren

Genistein	Calbiochem, Schwalbach
JNK-Inhibitor-II	Calbiochem, Schwalbach
SB202190	Calbiochem, Schwalbach
SB203580	Calbiochem, Schwalbach
U0126	Calbiochem, Schwalbach

2.1.5 Antikörper

<u>Antikörperbezeichnung</u>	<u>Verdünnung in</u> IF / WB	<u>Quelle</u>
Ziege-Anti-Maus Alexa 594	1:1000	Molecular Probes, Leiden, NL
Anti-Maus-HRP-labeled	1:10.000	Pierce, Rockford, USA
Ziege-Anti-Hase Cy3	1:1000	Dianova, Hamburg
Ziege-Anti-Huhn, Cy2	1:500	Dianova, Hamburg
Huhn-Anti-PbExp1	1:200	BNI AG Heussler, Hamburg
Huhn-Anti-PbHSP90	1:200	BNI AG Heussler, Hamburg
Maus-Anti-PbMAPK1-GST	1:200 / 1:2000	BNI AG Heussler, Hamburg
Maus-Anti-PbMAPK1-10xHis	1:1000 / 1:2000	BNI AG Heussler, Hamburg
Huhn-Anti-PfMAPK1-PIN	1:100	C. Doerig, Glasgow, Schottland
Maus-Anti-P-Tyrosin	1:100	NEB, Frankfurt
Maus-Anti-ERK	1:100 / 1:2000	BD Biosciences, Heidelberg

Maus-Anti-P-ERK	1:100 / 1:1000	BD Biosciences, Heidelberg
Hase-Anti-P-ERK	1:100	Promega, Mannheim
Maus-Anti-panJNK	1:100 / 1:2000	BD Biosciences, Heidelberg
Maus-Anti-P-JNK	1:100 / 1:2000	BD Biosciences, Heidelberg
Hase-Anti-P-JNK	1:100	Promega, Mannheim
Hase-Anti-P-JNK	1:100 / 1:1000	Biosource, Camarillo, USA
Maus-Anti-Lamin A/C	1:2000	Novocastra, Dossenheim
Maus-Anti-MEK1/2	1:100 / 1:2000	BD Biosciences, Heidelberg
Rabbit-Anti-MEK1/2	1:100 / 1:2500	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Maus-Anti-P-MEK1/2	1:100 / 1:2000	BD Biosciences, Heidelberg
Maus-Anti-p38	1:100 / 1:1000	BD Biosciences, Heidelberg
Hase-Anti-P-p38	1:50	Promega, Mannheim
Hase-Anti-P-p38	1:100 / 1:1000	Biosource, Camarillo, USA
Maus-Anti-V5	1:200	Invitrogen, Paisley, GB
Maus-Anti-GST	1:2000	Amersham, Buckinghamshire, England

2.1.6 Plasmide

<u>Plasmidbezeichnung</u>	<u>genutzte Schnittstellen</u>	<u>Quelle</u>
pCODON+/pRIG	/	F. Seeber, Uni-Marburg
pcDNA3.1	EcoRI/BamHI	Invitrogen, Paisley, GB
pGEX6P-1	BamHI/XhoI	Amersham, Buckinghamshire, England
pJC45	HindIII/XhoI	J. Clos, BNI, Hamburg
pLitmus	EcoRI	NEB, Frankfurt
pMal-cRI	BamHI/PstI	NEB, Frankfurt

2.1.7 Oligonukleotide (ohne Restriktionsschnittstellen)

Oligo-d(T)	10-15x T
Pb-Tubulin-for-	TGGAGCAGGAAATAACTGGG
Pb-Tubulin-rev-	ACCTGACATAGCGGCTGAAA
PbMAPK1-s-	ATGGAGAGAGAAAACAGAAGAAA
PbMAPK1-Kinase-Domäne-as-	ATATGTTTGCAAATTGGTTCCTC

PbMAPK1-C-Term.-intern-as-	GTCCCTAGGTTTGCATTTG
PbMAPK1-C-Term.-as-	ATAGACATTGTATTTTCGATACTGAGC
PbMAPK2-s-	AAAGAATACTCTGGAATTGAAAAAGA
PbMAPK2-as-	TTAACTGCTAGGTTTCTCATTGTTAT
HsMEK-s-	GCAGTTAACGGGACCAGCTC
HsMEK-as-	AGCAGCATGGGTTGGTGT

2.1.8 Marker

Hyperladder I	Bioline, Luckenwalde
Protein Ladder Page Ruler	MBI-Fermentas, St.-Leon-Rot
Prestained Protein Ladder	MBI-Fermentas, St.-Leon-Rot

2.1.9 Zellen, Parasiten, Mäuse

<i>Anopheles stephensi</i>	Prof. Dr. W. Maier, Bonn
COS, transform. Fibroblastenzelllinie(Affen)	BNI, Hamburg
humane Erythrozyten, 0, RH+	UKE, Hamburg
<i>Escherichia coli</i> , BL21	BNI, Hamburg
HeLa, humane Cervixkarzinomzelllinie	BNI, Hamburg
HepG2, humane Hepatomazelllinie	BNI, Hamburg
Hepa1-6, murine Hepatomazelllinie	BNI, Hamburg
<i>Mus musculus</i> , NMRI	Charles-River-Laboratory, Sulzfeld
<i>Plasmodium berghei</i> , ANKA	BNI, Hamburg
<i>Plasmodium falciparum</i> , 3D7	BNI, Hamburg

2.1.10 Programme, Datenbanken und Internetseiten

http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi	Primerdesign
http://ambion.com/techlib/misc/siRNA_design.html	siRNA-Design
http://www.dharmacon.com	siRNA-Design
http://www.genedb.org	Datenbank

http://www.plasmodg.org	Datenbank
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi	NCBI-Datenbank
Openlab 4.01	Improvision, Coventry, GB
MacVector™ 7.2.3	Accelrys, Cambridge, GB

2.1.11 Puffer und Medien

Coomassiefärbelösung	1g Coomassie Blue 40% Methanol 10% Essigsäure in 1l dH ₂ O
Dulbecco's MEM komplett für die Kultivierung von Hepa1-6- und HeLa-Zellen	0,5l Dulbecco's MEM 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 1% nicht-essentielle Aminosäuren 1% L-Glutamin
6xDNA-Ladepuffer	30% Glycerol 0,25% Bromphenolblau in dH ₂ O
Earle's MEM komplett für die Kultivierung von HepG2-Zellen	0,5L Earle's MEM 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 1% nicht-essentielle Aminosäuren 1% L-Glutamin
Earle's MEM komplett für die Kultivierung von primären Hepatozyten	0,5l Earle's MEM komplett (s.o.) 0,5mg Insulin 0,005mg holo-Transferrin
Elutionspuffer für GST-Fusionsproteine	15mM reduziertes Glutathion 10mM DTT 50mM Tris/HCl in dH ₂ O
Entfärbelösung für Coomassiegele	20% Methanol 10% Essigsäure in 1l dH ₂ O
HNET-Puffer	25mM HEPES-NaOH 150mM NaCl 1mM EDTA 0,5% Triton-X-100 in dH ₂ O, pH 7,4 + PI
Hybridisierungspuffer für 2D-Gele	50mM Tris pH 8,8 6M Urea 30% Glycerol 2% SCS
Kinase-Assay-Standardpuffer	2mM MnCl ₂ , 10mM MgCl ₂ , 100mM NaCl, 50mM MOPS in dH ₂ O, pH7,2

2xLaemmli-Puffer	125mM Tris/HCl 2% SDS 20% Glycerol 20mM DTT 0,001% Bromphenolblau in 100ml dH ₂ O, pH6,8
5x Laufpuffer für SDS-PAGE	125mM Tris 960mM Glycin 0,5 % SDS in dH ₂ O
LeberLysepuffer	4M Guanidin-Thiocyanat 25mM Na-Citrat pH 7,0 0,5% Sarcosyl 0,1M β-Mercaptoethanol
NewWash-Puffer	500ml Ethanol 10ml Tris/HCl pH7,5 1ml 0,5M Na ₂ EDTA pH8,0 2,9g NaCl in 1l dH ₂ O
10x PBS	100mM Na ₂ HPO ₄ 100mM NaH ₂ PO ₄ 1,5M NaCl in dH ₂ O, pH 7,4
RPMI komplett für die Kultivierung von COS-Zellen	0,5l RPMI 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 1% nicht-essentielle Aminosäuren 1% L-Glutamin
RPMI komplett für die Kultivierung <i>P.falciparum</i> - infizierten Erythrozyten	0,5l RPMI 0,5g NaHCO ₃ 1g D-Glucose 2,98g HEPES 2,5g AlbuMaxII™ in 25ml dH ₂ O 0,0136g Hypoxanthin in 1ml 1N NaOH
Sammelgelpuffer für SDS-PAGE	0,5M Tris/HCl 0,4% SDS in dH ₂ O, pH6,8
STET-Puffer	80g Sucrose 50ml Tris/HCl pH8,0 100ml 0,5M Na ₂ EDTA pH8,0 50ml Triton-X-100 in 1l dH ₂ O
TAE-Puffer	5mM Natriumacetat 40mM Tris 2mM Na ₂ EDTA in dH ₂ O, pH 7,9
10x TBE-Puffer	890mM Tris 890mM Borsäure 20mM EDTA, pH 8,0
TBS	50mM Tris 150mM NaCl in dH ₂ O, pH 7,4

TBS-Tween	+ 0,05% Tween 20
Transfer-Puffer	192mM Glycin 25mM Tris 1,3mM SDS 20% Methanol in dH ₂ O, pH 8,3
Trenngelppuffer für SDS-PAGE	1,5M Tris/HCl 0,4% SDS in dH ₂ O pH 8,8
UGB-Puffer für 2D-Gele	8M Urea 2M Thiourea 4% Chaps 2,4% ASB-14

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung und Transfektion von eukaryotischen Zelllinien

2.2.1.1 Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien

Humane (HepG2-) und murine (Hepa1-6-) Hepatomazellen, humane Cervixkarzinomzellen (HeLa) und transformierte Affennierenfibroblasten (COS) wurden in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 12,5 bis 175 cm² in Flüssigmedium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen binden fest an den Gefäßboden und wachsen dort zu einem Zellrasen aus. Wenn eine Zelldichte von 80-90% erreicht ist, müssen die Zellen, um lebensfähig zu bleiben, durch Trypsinierung aus dem Zellverband gelöst und in geringerer Zelldichte neu ausgesät werden. Die Kultivierung der HepG2-Zellen erfolgte in komplettem Earle's MEM; Hepa1-6- und HeLa-Zellen wurden in komplettem Dulbecco's MEM kultiviert. COS-Zellen wurden in komplettem RPMI-Medium ausgesät.

2.2.1.2 Präparation von primären Maushepatozyten

Vier bis sechs Wochen alte Balb/c-Mäuse wurden mit 60-80µl Ketamin/Rompun intramuskulär betäubt. Die anästhesierten Tiere wurden durch Hand- und Fußwurzelknochen auf dem Operationstisch fixiert. Folgend wurde die Bauchhöhle geöffnet und die Leber- und Hohlvene freigelegt, indem Magen und Darm neben die Maus verlagert wurden. Unter der Vena hepatica wurde durch das Fettgewebe chirurgisches Nahtmaterial geführt, das als Gegenzug bei der Punktion der Vene mit dem 23G Butterfly diente. Nachdem der mit Liver-Perfusion-Medium gefüllte Butterfly in das Gefäß eingeführt worden ist, wurde die Vene cava durchschnitten und der Butterfly folgend an die Durchflußpumpe angeschlossen. Durch das Einbringen eines Tropfenfängers ins System wurde die Gefahr der Gefäßkollabierung

minimiert. Während die Leber für 7min mit Liver-Perfusion-Medium (300ml/h) gespült wurde, wurde der Butterfly in seiner Position fixiert. Nach dem Waschschrift wurde die Leber für 8-10min mit Collagenase-haltigem Liver-Digestion-Medium perfundiert. Bei einer erfolgreichen Perfusion war die Leber komplett blutfrei, schwohl leicht an und in den Leberlappen bildeten sich kleine Bläschen. Folgend wurde das Organ aus der Maus herausoperiert und die Hepatozyten durch Schwenken der zerrupften Leberlappen in 20ml Hepatocyte Wash Medium ausgeschüttelt. Kapselreste wurden durch Filtrierung durch Sterilkompressen aus der Zellsuspension entfernt. Die isolierten Hepatozyten wurden zweimal gewaschen, in dem sie für 20min bei 1g und RT sedimentiert und folgend die Überstände mit Zellresten und toten Zellen verworfen wurden. Die Lebendzellzahl wurde in einer Trypanblau-Färbung bestimmt und die Hepatozyten anschließend in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/Well auf Deckgläschen in 24-Well-Platten ausgesät. Für eine bessere Haftung der Zellen auf der Glasoberfläche wurden die Deckgläschen zuvor für 20min mit $8 \mu\text{g}$ Rat Tail Collagen in $100 \mu\text{l}$ /Well bei RT inkubiert und folgend unter der Sterilbank getrocknet. Die primären Hepatozyten wurden drei Stunden nach Aussaat zur Entfernung von toten Zellen einmal mit PBS gewaschen und folgend bei 37°C und 5% CO_2 mit komplettem EMEM für Maushepatozyten kultiviert.

2.2.1.3 Subkultivierung von eukaryotischen Zellen in 24-Well-Platten

Die Karzinomzelllinien wurden für Infektionen mit *P.berghei* oder für Transfektionsversuche auf Glasdeckgläschen in 24-Well-Platten in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/Well ausgesät. Zur besseren Haftung der Zellen auf der Glasoberfläche wurden die Deckgläschen mit Collagen beschichtet. Zu diesem Zweck wurden $15 \mu\text{g}$ Collagen in $200 \mu\text{l}$ PBS auf den Glasplättchen für 4h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Lösung wurde folgend abgesaugt und die Deckgläschen unter der Sterilbank getrocknet.

2.2.1.4 Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen

Zellen wurden in komplettem Medium auf Deckgläschen in 24-Well-Platten bis zu einer Dichte von 50-70% kultiviert. Vor der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und $400 \mu\text{l}$ Medium ohne Antibiotika auf die Zellen gegeben.

$50 \mu\text{l}$ Optimem wurden in einem $1,5\text{ml}$ Reaktionsgefäß mit $2 \mu\text{l}$ Lipofectamine2000 gemischt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden zu $50 \mu\text{l}$ Optimem $2 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA pipettiert. Beide Ansätze wurden nach einer 5minütigen Inkubation bei RT vereint. Die Komplexbildung erfolgte für 30min bei RT. Im Anschluß wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise unter Schwenken auf die Zellen gegeben. Nach 4 Stunden wurde das Medium

auf den Zellen durch komplettes Medium ersetzt. 24h-72h nach Transfektionsbeginn wurden die Zellen fixiert.

2.2.1.5 siRNA-Design & -Synthese

21bp-Sequenzen zur Verminderung der Proteinexpression von humanem JNK1 mittels siRNA wurden mit Hilfe der siRNA-Design-Programme von Dharmacon und Ambion ermittelt. Die Synthese des Oligos mit der Basenabfolge

JNK1: 5`- AA GCC GAC CAT TTC AGA ATC A -3`

wurde bei der Firma MWG in Auftrag gegeben, die ebenfalls den LaminA/C-Kontroll-siRNA-Duplex (5`-AA CTG GAC TTC CAG AAG AAC A) lieferten.

Zur Synthese eines siRNA-Pools mit dem ShortCut RNAi-Kit von NEB wurde die Kinasesequenz zunächst ungerichtet in den Vektor pLitmus 28i kloniert. Die Präparation der siRNA wurde anhand des NEB-Protokolls durchgeführt.

2.2.1.6 Transfektion von siRNA in eukaryotische Zellen und Ernte der transfizierten Zellen

Zellen wurden in komplettem Medium auf Deckgläschen in 24-Well-Platten bis zu einer Zelldichte von 80-90% kultiviert. Vor der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 100µl Medium ohne Antibiotika und ohne FCS auf die Zellen gegeben. 50µl Optimem wurden in einem 1,5ml Reaktionsgefäß mit 3µl Lipofectamine2000 gemischt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden zu 50µl Optimem 80pmol siRNA pipettiert. Beide Ansätze wurden nach einer 5minütigen Inkubation bei RT vereint. Die Komplexbildung erfolgte für 30min bei RT. Im Anschluß wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise unter Schwenken auf die Zellen gegeben. Nach 4 Stunden wurde das Medium auf den Zellen durch komplettes Medium ersetzt.

Nach 48 Stunden wurden die transfizierten Zellen für Western Immunoblot-Analysen geerntet. Zu diesem Zweck wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Schaber in 1ml PBS vom Untergrund gelöst und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden kurz bei 2000rpm und RT abzentrifugiert, bevor sie in 50µl 1x Laemmli-Puffer aufgenommen wurden. Die Extrakte wurden vor der gelelektrophoretischen Analyse im Ultraschallbad behandelt und für fünf Minuten bei 95°C aufgeköcht.

2.2.2 Kultivierung und Behandlung von *P.falciparum*-Blutstadien

2.2.2.1 Kultivierung von *P.falciparum*-Blutstadien

Die Blutstadien des *P.falciparum*-Stammes 3D7+ wurden *in vitro* bei 37°C in einem Miniexikator unter Begasung mit einem Gemisch aus 5% CO₂, 5% O₂ und 90% N₂ kultiviert. Als Wirtszellen dienten humane Erythrozyten der Blutgruppe 0 RH+. Die Kultivierung erfolgte in komplettem RPMI bei einem Hämatokrit von 4%. Unter Kulturbedingungen konnte eine maximale Parasitämie von 10-12% erreicht werden. Diese wurde anhand von Ausstrichen der Blutkulturen bestimmt, die mit dem Wright-Stain (1mg/ml in Methanol) gefärbt wurden. Die Färbung erlaubte nicht nur eine Unterscheidung der nicht-infizierten von den infizierten Erythrozyten sondern eine genaue Bestimmung der verschiedenen Entwicklungsstadien (Ring-, Trophozoiten- und Schizontenstadium).

2.2.2.2 Synchronisierung mit anschließender Inhibitorbehandlung der *P.falciparum*-Blutstadien

Da *P.falciparum*-infizierte Erythrozyten Unterschiede in ihrer Membranpermeabilität aufweisen, kann durch die Behandlung von infiziertem Blut mit Sorbitol eine Synchronisierung der Blutkultur erreicht werden. Blutzellen, in denen Plasmodien im Trophozoiten- oder Schizontenstadium parasitieren, nehmen aufgrund von parasiten-induzierten Veränderungen in der Membrandurchlässigkeit Zucker auf und platzen, wenn sie folgend in einer hypotone Lösung überführt werden. Die Membranen von nicht-infizierten und mit Ringstadien-infizierten Erythrozyten sind für Sorbitol nicht permeabel.

P.falciparum-infizierte Blutkulturen wurden bei 1500rpm und RT für 5min sedimentiert und das Zellpellet folgend im fünffachen Volumen 5% Sorbitol in 10mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,4) resuspendiert. Im Anschluß an eine zehnminütige Inkubation bei 37°C wurden die Erythrozyten für fünf Minuten bei 1200rpm pelletiert. Bei der anschließenden Aufnahme der Zellen in komplettem RPMI erfolgte die Lyse der späten Entwicklungsstadien.

Die synchronisierte Blutkultur enthielt nur noch nicht-infizierte und mit Ringstadien-infizierte Erythrozyten und wurde folgend in Inhibitorversuchen eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden dem Medium 50µM Genistein bzw. Tyrphostin, 50µM U0126 bzw. 25 oder 50µM PD98059, 20 oder 50µM JNK-Inhibitor-II oder 10 oder 50µM SB203580 zugesetzt. 24h später wurden Blutausstriche angefertigt und anhand der Färbung mit dem Wright-Stain die Entwicklung der Parasiten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bewertet. Des Weiteren wurden synchronisierte Blutkulturen für 24h kultiviert und die Inhibitoren erst im Trophozoitenstadium zugegeben.

2.2.3 *P.berghei*-Infektion und Behandlung von Hepatozyten (und Mäusen)

2.2.3.1 Infektion von Hepatozyten mit *P.berghei*-Sporozoiten

Primäre Hepatozyten und Hepatomazellen wurden in einer Zelldichte von 5×10^4 bis 5×10^5 Zellen pro ml in entsprechendem Medium auf Deckgläschen in einer 24-Well Platte ausgesät. In *Anopheles stephensi*-Mücken, die bei einer Blutmahlzeit an einer *P.berghei*-positiven Maus infiziert wurden, entwickelten sich in den folgenden 14-21 Tagen bei 27 °C und 80% Luftfeuchtigkeit Sporozoiten, die in die Speicheldrüsen der Insekten einwanderten. Zur Isolierung der Parasiten wurden *Anopheles*-Mücken zunächst mit Chloroform betäubt und anschließend durch Abtrennung der Flügel und Beinpaare immobilisiert. Unter dem Binokular wurden die Speicheldrüsenlappen unter 20facher Vergrößerung in EMEM präpariert. Mit Hilfe von Pinzetten wurden die Läppchen auseinandergesupft und die Sporozoiten so freigesetzt. Die Parasiten wurden anschließend tröpfchenweise in einem Gesamtvolumen von ungefähr 250µl komplettem EMEM auf den Hepatozytenrasen gegeben. Nach 4-6 Stunden wurde das Medium auf den infizierten Deckgläschen gewechselt. Die Kultivierung der infizierten Zellen erfolgte für 4-72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank.

2.2.3.2 Bestimmung der Vitalität von HepG2-Zellen unter Inhibitoreinwirkung im radioaktiven Proliferationsassay

HepG2-Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^4 -Zellen/Well in einer 96-Well-Platte ausgesät. MAPK-Inhibitoren wurden in Mengen von 1, 10 und 50µM in Dreifachbestimmungen für 19h mit den Zellen inkubiert. Folgend wurden zu jedem Well für weitere fünf Stunden $0,2 \mu\text{Ci } ^3\text{H-Thymidin}$ pipettiert. Durch einmaliges Einfrieren und Auftauen wurden die Zellen lysiert und mit einem automatischen Zellerntegerät aus den Vertiefungen der Platte in dH₂O überführt. Das Zelllysate wurde anschließend durch einen Glasfaserfilter gesaugt, wobei die DNA im Filter zurückgehalten wurde. Dieser wurde in einer Mikrowelle getrocknet und in Folie eingeschweißt, die mit Szintillationsflüssigkeit gefüllt wurde. Diese Flüssigkeit diente als Verstärker der β -Strahlung, da die hier produzierten Lichtblitze in einem β -Szintillationszähler als Radioaktivität in Zerfällen pro Minute (counts per minute) erfasst werden konnten. Je geringer die gemessene Aktivität ausfiel, desto stärker wurden die Zellen unter Inhibitoreinwirkung in ihrer Proliferation beeinträchtigt.

2.2.3.3 Behandlung von *P.berghei*-infizierten Hepatozyten mit verschiedenen Drogen

Zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion wurde das Medium von *P.berghei*-infizierten Zellen gegen EMEM mit Inhibitor ausgetauscht. Die Hepatomazellen wurden für weitere 2h bis 24h kultiviert und folgend fixiert.

In Tabelle 2 sind die Konzentrationen der Drogen angeben, mit denen 6h, 24h oder 48h infizierte Zellen für weitere 24h oder für weitere zwei Stunden inkubiert wurden.

<u>Inhibitor</u>	<u>Menge</u>	<u>Zugabe für 24h</u>	<u>Menge</u>	<u>Zugabe für 2h</u>
Genistein	10µM, 20µM, 50µM	6h, 24h, 48h p.I.	100µM, 200µM	48h p.I.
Tyrphostin	10µM, 20µM, 50µM	6h, 24h, 48h p.I.	100µM, 200µM	48h p.I.
U0126	10µM, 25µM, 50µM	6h, 24h, 48h p.I.	100µM, 200µM	48h p.I.
PD 98059	20µM, 50µM	4h, 24h, 48h p.I.	100µM, 200µM	48h p.I.
JNK-Inhibitor-II	5µM, 10µM, 20µM	4h, 24h, 48h p.I.	100µM, 200µM	48h p.I.
SB203580	10µM, 20µM	4h, 24h, 48h p.I.	100µM, 200µM	48h p.I.
SB202190	10µM, 20µM	4h, 24h, 48h p.I.	100µM, 200µM	48h p.I.

Tab.2: Variierung der Inhibitormenge. Unterschiedliche Mengen an Inhibitor wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion für weitere 24h oder zwei Stunden zu den infizierten Zellen gegeben.

2.2.3.4 Infektion von Mäusen mit *P.berghei*-Sporozoitien mit anschließender Genistein-Behandlung

Zur intravenösen Infektion von Mäusen mit *P.berghei* wurden aus infizierten *Anopheles*-Mücken die Speicheldrüsen in EMEM ohne Serum präpariert. Die Speicheldrüsenläppchen wurden mit einem Mikrogasmörser aufgeschlossen und die Zahl der freigesetzten Sporozoitien in der Neubauerzählkammer bestimmt.

In einem ersten Versuch wurden 3 Tiere mit 6×10^4 Sporozoitien in einem Volumen von je 100µl über die Schwanzvene infiziert. Den Mäusen wurde 24h, 35h und 48h p.I. 0,3mg Genistein (20mg/kg/Tag) in 300µl PBS/Cornoil (1:1) in die Bauchhöhle injiziert. In den nächsten 5 Tagen wurde der Erfolg der Behandlung anhand der Bestimmung der Parasitämie von Giemsa-gefärbten Ausstrichen bewertet.

In einem anderen Versuch wurden 10 Mäuse über die Schwanzvene mit 2×10^4 Sporozoitien infiziert. 24h und 30h p.I. wurde fünf Tieren jeweils 0,5µg Genistein in 100µl PBS in die Schwanzvene injiziert. 40h p.I. wurden die 10 Mäuse geopfert und die Lebern entnommen. Die Organe wurden kurz in PBS geschwenkt und folgend in einem Mörser in

LeberLysepuffer zerrieben. Ein Aliquot der Proben wurde in RealTime-PCR-Analysen im Hinblick auf die Infektionsrate von der Arbeitsgruppe von Maria Mota in Portugal untersucht.

2.2.4 Fixierung und Färbung von Hepatozyten

2.2.4.1 Fixierung von infizierten/transfizierten Hepatozyten

Von den infizierten oder transfizierten Hepatozyten wurde das Medium entfernt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, bevor sie auf den Deckgläschen durch Zugabe von 4% PFA in PBS fixiert wurden. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei RT wurden die Zellen dreimal für 5min mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Zellen in 100% Methanol für 10min bei -20°C. Vor der Durchführung einer Antikörperfärbung mußte der Alkohol durch dreimaliges Waschen in PBS ausgespült werden.

2.2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung von fixierten Hepatozyten

Zur Reduzierung unspezifischer Hintergrundfärbungen wurden Bindungsstellen auf dem fixierten Zellrasen in einem Blockierungsschritt mit 10% FCS in PBS für 30min-3h bei RT abgesättigt. Der primäre Antikörper wurde mit den Zellen in der entsprechenden Verdünnung (s. 2.1.6) in 10% FCS in PBS in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach fünf fünfminütigen Waschschritten mit PBS wurde der sekundäre, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Antikörper (s.2.1.6) in 10% FCS in PBS verdünnt und unter Lichtabschluß bei RT für 2h mit den Zellen inkubiert. Im Anschluß an fünf fünfminütige Waschschrritte mit PBS wurde die DNA der Zellen mit dem Hoechst 33258-Farbstoff angefärbt. Zu diesem Zweck wurde der Farbstoff 1:2000 in PBS verdünnt für fünf Minuten unter Lichtabschluß mit den Zellen inkubiert. Die Deckgläschen wurden einmal kurz in Wasser geschwenkt, bevor sie mit Mounting Medium eingedeckelt wurden. Bis zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurden die gefärbten Zellen bei 4°C unter Lichtabschluß aufbewahrt.

2.2.5 Isolierung von RNA aus verschiedenen *P.berghei*-Entwicklungsstadien

Aus einer *P.berghei*-infizierten Maus wurde mittels Herzpunktion das Vollblut isoliert und die Parasiten mittels Saponinlyse isoliert (s. 2.2.7.1). Die Plasmodien wurden im Lysepuffer RI des RNA-Extract-II-Kits von Macherey & Nagel (M&N) aufgenommen und die Aufreinigung nach Anleitung durchgeführt. Die RNA wurde folgend mit RNase-freiem Wasser eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt.

Für die Präparation von RNA des Oozysten-Stadiums wurden die Mitteldärme von 20 *P.berghei*-infizierten Mücken präpariert und in RI-Puffer aufgeschlossen. Die Isolierung der RNA erfolgte nach Anleitung mit dem M&N-Kit.

Zur Isolierung von Sporoziten-spezifischer RNA wurde von 20 *P.berghei*-infizierten Mücken der Thorax präpariert, in dem die Tiere zunächst immobilisiert und folgend Kopf und Abdomen abgetrennt wurden. Die Thori wurden im RI-Puffer aufgeschlossen und die mRNA nach Vorschrift mit dem M&N-Kit isoliert.

HepG2-Zellen wurden mit *P.berghei*-Sporoziten infiziert und die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung im RI-Puffer lysiert. Die Isolierung der RNA aus den infizierten Hepatomazellen wurde nach Anleitung mit dem M&N-Kit durchgeführt.

Die RNA-Präparationen wurden bei -70°C gelagert.

2.2.6 Klonierungsstrategien

2.2.6.1 Reverse Transkription

In einem ersten Schritt wurden Sekundärstrukturen in der RNA (0,5µg/Ansatz) durch eine zweiminütige Inkubation bei 70°C im Thermoblock aufgelöst, so dass sich die Oligo-dT-Nukleotide (50ng/Ansatz) an die 3'-PolyA-Reste der mRNA anlagern konnten. Der Ansatz wurde anschließend direkt auf Eis gestellt. Folgend wurde 1x RT-Puffer, 1mM dNTPs, 2mM DTT und 100 Units Reverse Transkriptase zugegeben. Die Transkription der mRNA in cDNA erfolgte für 45min bei 42°C im Thermocycler mit anschließender Inaktivierung des Enzyms für 7min bei 72°C. Der Ansatz wurde mit dH₂O auf 50µl aufgefüllt und die cDNA bei -20°C gelagert.

2.2.6.2 Oligonukleotid-Design

In Datenbankanalysen wurden die kodierenden Sequenzen der MAPK identifiziert und mit Hilfe des Programms Primer3 Oligonukleotide zur Amplifikation der Sequenzen aus cDNA konstruiert. Als Voraussetzung für eine gerichtete Klonierung wurden die Primer zusätzlich mit Basenabfolgen für Restriktionsschnittstellen versehen. Die Synthese der Oligos wurde bei der Firma Invitrogen in Auftrag gegeben.

2.2.6.3 PCR

In der Polymerasekettenreaktion wurden 5-10µl cDNA als Matrize eingesetzt. In einem 50µl Reaktionsansatz wurde die cDNA mit 1xReaktionspuffer, 200µM dNTP, 2,5mM MgCl₂, 200pmol Primer und 5 Units Hot Fire Taq Polymerase gemischt. Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Verlaufschemata durchgeführt:

94°C 5min

94°C 1min
55°C 1min
72°C 2min

} 35x

72°C 7min

4°C ∞

Der Erfolg der PCR wurde anschließend in einer Gelelektrophorese überprüft, in dem 5-10µl der Ansatzes auf einem 1%igen Agarosegel in TBE untersucht wurden.

2.2.6.4 Agarosegelelektrophorese

Im Anschluß an RT-PCR- oder Restriktionsanalysen wurde der Erfolg der Experimente in einer analytischen Agarosegelelektrophorese untersucht. Zu diesem Zweck wurde 1% Agarose in 1xTBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und in einer Elektrophoresekammer ausgegossen. Nachdem das Agarosegel ausgehärtet war, wurden Probenaliquots mit 6x Probenpuffer versetzt in die Geltaschen aufgetragen. Als Größenstandard diente der Marker Hyperladder I. An das Gel wurde eine Spannung von 80-100V angebracht. Nachdem das Gel nach dem Lauf für 10min in einer Ethidiumbromid-Lösung (1µg/ml) gefärbt wurde, konnte der Erfolg der DNA-Auftrennung durch die Abbildung des Agarosegels auf dem UV-Tisch mit einer digitalen Kamera dokumentiert werden.

2.2.6.5 Restriktionsanalyse

0,3-0,5µg Plasmid-DNA wurden in einem Volumen von 50µl mit 1x Restriktionspuffer und 20 Units Restriktionsenzym gemischt und für 60min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Restriktion des Inserts fand unter identischen Bedingungen statt, nachdem der PCR-Ansatz zuvor mit dem M&N-Extract-II-Kit aufgereinigt und ankonzentriert worden war. Im Anschluß an eine Restriktion wurde der Ansatz mit dem M&N-Extract-II-Kit aufgereinigt und folgend mit dem entsprechenden 1xReaktionspuffer und dem zweiten Restriktionsenzym versetzt. Nach einer erneuten Inkubation bei 37°C für 60min wurde der Ansatz wie oben aufgereinigt und bis zur Ligation bei 4°C gelagert.

2.2.6.6 Aufreinigung von DNA mittels M&N-Extract II-Kit

Die DNA aus PCR- und Restriktionsansätzen wurden mit Hilfe des M&N-Extract II-Kits aufgereinigt und in einem Volumen von 15-30µl mit dH₂O eluiert. Der Erfolg der Ankonzentrierung der DNA wurde in einer photometrischen Messung oder in einer Gelelektrophorese untersucht.

2.2.6.7 Ligation

Im Anschluß an die Aufreinigung mit dem M&N-Extract II-Kit wurden die DNA-Mengen in einer agarosegelelektrophoretischen Analyse im Vergleich zu einem DNA-Größenstandard abgeschätzt. In der Ligationsreaktion sollte das Insert im 10fachen Überschuß zum Vektor

vorliegen. Aufgrund des unterschiedlichen Größenverhältnisses vom Vektor zum Insert wurde die einzusetzende Insertmenge anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{100\text{ng Vektor} \times \text{Größe des Inserts (kb)}}{\text{Größe des Vektors (kb)}} \times 10 = \text{ng Insertmenge}$$

In dem 15µl Reaktionsansatz lagen außer der jeweiligen Insertmenge und 100ng Vektor 1x Reaktionspuffer und 5 Units T4-DNA-Ligase vor. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C im Thermocycler.

2.2.6.8 Transformation chemisch-kompetenter *E.coli*

100µl chemisch-kompetente Bakterien des Stammes BL21 wurden auf Eis aufgetaut. In einem 14ml Reaktionsgefäß wurden 0,1-1µg Plasmid-DNA und Zellen durch Anschneiden gemischt und für 30min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte im 42°C-warmen Wasserbad der Hitzeschock für 1min. Nach einer zweiminütigen Inkubation auf Eis wurden 900µl SOC-Medium auf die Zellen gegeben und diese für 1 Stunde bei 180rpm und 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit Selektionsmarker ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.6.9 Plasmid-DNA-Präparation im „Mini-Format“

Von einer Übernachtskultur wurden 3ml Bakteriensuspension abzentrifugiert und folgend in 250µl STET-Puffer aufgenommen. Durch Zugabe von 100µg Lysozym erfolgte die Lyse der Bakterien für 10min auf Eis. In einer 11/2 minütigen Inkubation bei 95°C wurde das Enzym folgend inaktiviert. Im Anschluß an eine kurze Inkubation auf Eis wurde die Suspension für 15min bei RT und 14.000rpm abzentrifugiert. In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden währenddessen 500µl NaI und 10µl Glasmilch vorgelegt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand zur Glasmilch gegeben. Die Bindung erfolgte für 5min bei RT unter Rotation. Die Glasmilch wurde kurz bei Höchstgeschwindigkeit und RT abzentrifugiert und mit 1ml New Wash-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde für 5min bei 56°C im Thermoblock getrocknet. Die Elution erfolgte mit 50µl dH₂O ebenfalls für 5min bei 56°C mit anschließender Zentrifugation bei 14.000rpm und RT für 1min. Die Plasmid-DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach photometrischer Konzentrationsbestimmung bei -20°C gelagert.

2.2.6.10 Nukleinsäurefällung

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3M Natrium-Acetat gemischt. Folgend wurden 2,5 Volumen eiskalter abs. Ethanol zugegeben und die Lösung für 20min oder über Nacht bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde in einer 15minütigen Zentrifugation bei 4°C und 14.000rpm präzipitiert und das Pellet anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde an der Luft getrocknet, in dH_2O oder TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.2.7.1 Präparation von *P.berghei*-Parasiten aus murinem Vollblut, *P.falciparum*-Parasiten aus humanen Blutkulturen und Leukozyten aus Mausblut

Aus einer *P.berghei*-infizierten Maus wurde mittels Herzpunktion das Vollblut isoliert und dieses dreimal mit PBS gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde das Blut zwei Minuten bei 1500rpm und RT abzentrifugiert. *P.falciparum*-infizierte Blutkulturen wurden unter identischen Bedingungen von Mediumresten befreit.

Die infizierten Erythrozyten wurden durch Zugabe von 0,15 % Saponin in PBS für fünf Minuten bei RT lysiert. Anschließend wurden die freigesetzten Parasiten durch eine 10minütige Zentrifugation bei RT pelletiert. Hämoglobin und Erythrozytenmembranen wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die isolierten Parasiten wurden aliquotiert und bei -70°C gelagert.

Mittels Herzpunktion wurde aus einer nicht-infizierten Maus das Herzblut gewonnen, das im Anschluß wie oben gewaschen wurde. Durch Zugabe des fünffachen Volumens an dH_2O zum Pellet wurden die Erythrozyten im Vollblut lysiert. Die Lyse wurde mit der gleichen Menge 2xPBS gestoppt, die Zellen folgend abzentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Dieser Lyse- und Waschvorgang wurde solange wiederholt, bis alle Erythrozyten im Vollblut lysiert waren und nach den Waschschritten das Leukozytenpellet sedimentiert wurde. Die weißen Blutzellen wurden in 1x Laemmli-Puffer aufgenommen und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

2.2.7.2 Immunpräzipitation

Zunächst wurden Parasitenlysate hergestellt, indem die isolierten Parasiten in 1-5Vol. HNET-PI-Puffer aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren aufgeschlossen wurden. Die vollständige Lyse erfolgte für 5min bei 37°C im Thermoblock. Die Zelltrümmer wurden in einer anschließenden Zentrifugation bei 14.000rpm und 4°C sedimentiert. Ein Aliquot des Lysats wurde vor der Immunpräzipitation abgenommen und mit 2x Probenpuffer versetzt. In einem ersten Schritt wurde das Lysat mit einem Aliquot in HNET-PI-Puffer gewaschener Protein-A- oder -G-Sepharose prä-inkubiert, um unspezifisch bindende Protein aus dem

Extrakt zu entfernen. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 4°C unter Rotation wurde die Probe für 5min bei 2000rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Lysat wurde nun der primäre Antikörper pipettiert und die Bindung an das Antigen erfolgte über Nacht bei 4°C unter Rotation. Die Protein-A- bzw. -G-Sepharose wurde dreimal mit Lysepuffer gewaschen. Schließlich wurden 50-200µl einer 50%igen Sepharoselösung zum Antigen-Antikörperkomplex pipettiert. Die Bindung der Protein-A/-G-Sepharose an die konstanten Regionen des primären Antikörpers erfolgte für 2 Stunden bei 4°C unter Rotation. In Abhängigkeit vom Antikörper konnte die Präzipitation auch bei RT durchgeführt werden. Hier verkürzte sich die Bindung von Antikörper an Antigen auf eine Stunde unter Rotation, an deren Anschluß für 20min die Protein-A/-G-Sepharose zugegeben wurde.

Unabhängig vom Präzipitationsverlauf wurden ungebundene Proteine durch eine 5minütige Zentrifugation bei 2000rpm und 4°C von der Sepharose getrennt und mit 2xProbenpuffer versetzt. Die Sepharose wurde anschließend mehrfach gewaschen, um die Präzipitation verunreinigende Proteine zu entfernen. Hier kamen nach Stringenz der Versuchsdurchführung verschiedene Waschpuffer zum Einsatz. Folgender Ablauf sei nur beispielhaft aufgeführt: Der Sepharose-Antigen/Antikörper-Komplex wurde zweimal mit eiskaltem HNET-PI-Puffer, einmal mit eiskaltem 0,1M NaCl und zweimal mit eiskaltem PBS/PI gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand abgenommen und die Sepharose mit 1x Probenpuffer versetzt.

Der Erfolg der Präzipitation wurde auf einem Proteingel mit anschließendem Western Blot oder Coomassie-Färbung kontrolliert.

2.2.7.3 Protein-Fällung

Die Proteinlösung wurde mit 3 Volumen 10% TCA in Aceton + 20mM DTT gemischt und für 1 Stunde bei -20°C inkubiert. Im Anschluß an eine 15minütige Zentrifugation bei 4°C und 14.000rpm wurde das Pellet mit eiskaltem Aceton + 20mM DTT gewaschen.

Das an der Luft getrocknete Proteinpellet wurde in (UGB-)Puffer unter Rotation bei RT wieder in Lösung gebracht.

2.2.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht kann eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt werden. Zunächst wurde in einer entsprechenden Gießstation ein 10%iges Trenngel gegossen, das nach Auspolymerisierung mit einem 12%igen Sammelgel überschichtet wurde, in das mit einem Kamm Taschen eingebracht wurden. Vor dem Auftragen wurden die Proteinextrakte in Laemmli-Puffer für 10min bei 95°C

aufgekocht. Pro Gel wurde für den Lauf eine Stromstärke von 25mA angelegt. Im Anschluß wurde entweder eine Western-Immunoblotanalyse durchgeführt oder das Proteingel wurde für 1h in Coomassie-Färbelösung inkubiert, bevor es anschließend wieder entfärbt wurde.

2.2.7.5 Western Immunoblotanalyse

Im Anschluss an eine SDS-PAGE können die nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine durch direkte Elektrophorese aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Der Transfer erfolgte in einer TankBlot-Apparatur. Zunächst wurden pro Gel eine Membran sowie 4 Whatman-Papiere zugeschnitten. Die Nitrozellulosemembran wurde folgend in dH₂O, die Filterpapiere in Transferpuffer eingeweicht. Das „Blotting-Sandwich“ wurde so zusammgebaut, das beim Anlegen einer Stromstärke von 400mA die durch SDS negativ-geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran Richtung +-Pol transferiert wurden. Nach einer Stunde wurde die Nitrozellulosemembran entnommen und zur Absättigung von Bindungsstellen für mindestens eine Stunde bei RT in 5% Milchpulver in TBS/T blockiert. Der primäre Antikörper wurde den Angaben entsprechend (s. Material) in 5% Milchpulver/TBS/T verdünnt und für 1h bei RT oder bis zu 12h bei 4°C mit der Membran inkubiert. Nach fünf zehnmütigen Waschschritten mit TBS/T wurde der sekundäre, HRP-gekoppelte Antikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 in 5% Milchpulver/TBS/T für zwei Stunden mit der Membran bei RT inkubiert. Nach Wiederholung der Waschvorgänge wurde der enzymatische Nachweis der Antikörper-Bindung mit dem ECL-Kit erbracht. Bei der Umsetzung des Substrats durch HRP wurden durch Chemolumineszenz Bereiche auf einem Röntgenfilm belichtet, der folgend entwickelt wurde.

2.2.7.6 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Parasitenproteinextrakte wurden nach o.a. Protokoll gefällt und das Proteinpellet in UGB-Buffer aufgenommen. Nach 2 Stunden Rotation bei RT wurden Ampholyte in einer Endkonzentration von 1,5% und 20mM DTT zugegeben. Die Solubilisierung des Proteinpellets erfolgte über Nacht unter Rotation bei RT. Zur isoelektrischen Fokussierung wurde der Gelstreifen zunächst in der dafür vorgesehenen Kammer mit der Proteinlösung über Nacht für mind. 15 Stunden bei RT rehydriert. Im Anschluß wurde die erste Dimension der Gelelektrophorese unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

200V 20min; 450V 20min; 750V 30min; 2000V 40min; 3000V 90min

Die Stromstärke betrug pro Gelstreifen maximal 0,05mA. Der Gelstreifen wurde nach dem Lauf der Kassette entnommen und in einem 15ml Reaktionsgefäß mit 5ml Equilibrierungspuffer + 50mM DTT bei RT unter Rotation inkubiert. Nach 15min wurde der Gelstreifen in ein neues 15ml Reaktionsgefäß mit 5ml Equilibrierungspuffer und 116mg JAA

transferiert und für weitere 15min unter Rotation inkubiert. Die zweite Dimension der Gelelektrophorese wurde mit NuPage-Proteingelen von Invitrogen durchgeführt. Der Gelstreifen wurde am „negativen“-Ende gehalten und mit dem „positiven“-Ende neben der Markertasche luftblasenfrei in die Geltasche geschoben. Das Gel wurde folgend mit 450µl 1% Agarose in TAE abgedichtet. In die äußere Kammer wurden 600ml 1x TAE und die innere Kammer 200ml 1xTAE + 500µl Antioxidant-Reagenz gefüllt. Die Gelelektrophorese erfolgte für 40min bei 200V. Das zweidimensionale Proteingel wurde im Anschluß entweder geblottet oder über Nacht in kolloidaler Coomassielösung gefärbt.

2.2.8 Rekombinante Expression und Affinitätsaufreinigung von eukaryotischen Proteinen in *E.coli*

2.2.8.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus Bakterien

Eine Bakterienübernachtkultur wurde 1:5 mit LB + Antibiotikum verdünnt und bei 37°C und 180rpm bis zu einer OD600 von 0,4 bis 0,6 inkubiert. Die rekombinante Expression des Fusionsproteins wurde mit 1mM IPTG bei 37°C oder RT induziert. Zur Kontrolle der Induktion wurde zuvor 1ml Kultur abgenommen, pelletiert und in 1x Laemmli aufgenommen. Nach 1-3 Stunden wurde die gesamte Bakterienkultur pelletiert und in 1/10 Volumen eiskaltem PBS mit Proteaseinhibitoren und 1% Triton-X-100 aufgenommen. Die Suspension wurde in Ethanol mit Trockeneis schockgefroren und in Eiswasser langsam wieder aufgetaut. Direkt im Anschluß wurde die Bakterienlösung dreimal für 20sek sonifiziert. Die Suspension wurde für 15min bei 14.000rpm und 4°C abzentrifugiert und das Lysat in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Ein Aliquot des Lysats wurde mit 2x Probenpuffer versetzt.

Nachdem die Glutathion-Sepharose dreimal mit PBS gewaschen worden war, wurde eine 50%ige Glutathion-Sepharosesuspension in PBS hergestellt. Diese wurde zum Lysat gegeben und die Bindung erfolgte unter Rotation entweder für 30min bei RT oder über Nacht bei 4°C. Folgend wurde die Glutathion-Sepharose bei 2000rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand als ungebundene Fraktion abgenommen. Die Glutathion-Sepharose wurde in eine Säule überführt und darin mit 250ml PBS gewaschen. Anschließend wurde die Bindung zwischen der Glutathion-S-Transferase des Fusionsproteins und der Glutathion-Sepharose durch Zugabe eines Glutathionüberschusses wieder gelöst. Die Elution erfolgte für 30min bei RT unter Rotation.

2.2.8.2 Rekombinante Expression und Affinitätsaufreinigung von His-markierten Proteinen aus Bakterien

Nach Transformation des Plasmids pJC45-PbMAPK1 in BL21-Zellen wurden 50ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert. Folgend wurde die Proteinexpression für 1h bei 37°C mit 1mM IPTG induziert. Die Bakterienkultur wurde anschließend abzentrifugiert und das Pellet in 2ml Lysepuffer für denaturierende Aufreinigungen resuspendiert. Nach einer dreistündigen Lyse auf dem Roller bei RT wurde die Probe für 15min bei 14.000rpm und RT zentrifugiert. Währenddessen wurden 500µl Ni-NTA-Agarose dreimal mit denaturierendem Lysepuffer mit 10mM Imidazol gewaschen. Das Bakterienlysat wurde über Nacht bei RT auf dem Roller mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Folgend wurden die Beads in einer Säule mit insgesamt 200ml Waschpuffer gewaschen. Die Bindung zwischen dem Fusionsprotein und der Ni-NTA-Agarose konnte entweder durch einen pH-Shift oder die Zugabe von Imidazol in den Elutionspuffer gelöst werden.

2.2.8.3 Rekombinante Expression und Affinitätsaufreinigung von MBP-Fusionsproteinen aus Bakterien

Dem Protokoll der Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen (s.o.) entsprechend wurden zunächst Bakterienlysate hergestellt. Die Amylose-Sepharose wurde dreimal mit PBS gewaschen. Zu 10ml Lysat wurde 1ml 50%ige Amylose-Sepharose in PBS pipettiert. Die Bindung des MBP an die Amylose erfolgte für 1 Stunde bei RT unter Rotation. Die Sepharose wurde anschließend für 5min bei 2000rpm und 4°C abzentrifugiert. Ein Aliquot der ungebundenen Fraktion wurde mit 2x Probenpuffer versetzt. Die Sepharose wurde in einer Säule mit insgesamt 250ml eiskaltem PBS gewaschen. Das an die Amylose gebundene Fusionsprotein konnte in PBS/PI bei 4°C gelagert werden. Alternativ konnte die Bindung zwischen Amylose-Agarose und MBP-Fusionsprotein in einem zwei- bis 12stündigen Elutionsschritt bei 4°C durch Zugabe von 10mM Maltose in PBS/PI wieder gelöst werden.

2.2.9 Experimente mit rekombinant exprimierten, eukaryotischen Proteinen

2.2.9.1 Affinitätsaufreinigung von Antisera

Auf einem präparativen, 10%igen Proteingel wurde das rekombinante Parasitenprotein, mit dem auch immunisiert wurde, aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde diese mit Ponceau-Rot gefärbt und die Proteinbande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Der Membranstreifen wurde kurz in TBS/Tween gewaschen und folgend unspezifische Bindungen für mindestens 3 Stunden in einem 15ml Reaktionsgefäß mit 3% BSA in TBS/Tween unter Rotation bei RT blockiert. Der Streifen wurde in kleine

Stücke geschnitten und in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt. In diesem wurde das aufzureinigende Antiserum 1: 20 in 0,3% BSA in TBS/Tween verdünnt. Die Bindung der antigenspezifischen Antikörper an den Membranstreifen erfolgte über Nacht bei 4°C unter Rotation. Das nicht-gebundene Serum wurde abgenommen und für die 2. Bindungsrunde aufbewahrt. Die Membranstreifen wurden fünfmal 15min mit TBS/Tween gewaschen, bevor sie kurz in dH₂O geschwenkt wurden. Auf Eis wurden 500µl Elutionspuffer in einem 1,5ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Die Elution erfolgte für 5min auf Eis mit gelegentlichem Vortexen der Probe. Anschließend wurden die Streifen entnommen und das Eluat sofort mit 15-20µl Tris/Base neutralisiert (Kontrolle mit pH-Papier). Zusätzlich wurden 10% 3%iges BSA/TBS/Tween in die Antikörpersuspension gegeben und diese zweimal für 10min bei 14.000rpm und 4°C zentrifugiert, um Membranreste zu entfernen. Die Membranstreifen wurden zweimal in TBS/Tween gewaschen und der Bindungs- und Elutionsvorgang mit der ungebundenen Fraktion des ersten Durchlaufs einmal wiederholt.

Die Eluate wurden aliquotiert und bei 4°C, -20°C und zu 50% mit Glycerol versetzt bei -20°C gelagert.

2.2.9.2 PullDown-Experimente

1x10⁷ primäre Rattenhepatozyten und 2x10⁷ HepG2-Zellen wurden in je 1ml Lysepuffer resuspendiert und für 20min auf Eis inkubiert. Nach einer 15minütigen Zentrifugation bei 4°C und 15.000rpm wurde der Überstand abgenommen. Das PbMAPK1-GST-Fusionsprotein wurde nach o.a. Protokoll aufgereinigt und 500µl einer 50%igen AgaroseBeads-Fusionsprotein-Lösung mit dem Hepatozytenlysat für eine Stunde bei 4°C auf dem Roller inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde die ungebundene Fraktion abgenommen. Die Beads wurden fünfmal mit 10ml Lysepuffer gewaschen, bevor sie in 1xLaemmli-Probenpuffer aufgenommen und der Erfolg des PullDowns im Western Immunoblot überprüft wurde.

2.2.9.3 Kinase-Assay

Fusionsproteine wurden nach rekombinanter Expression in Bakterien aus Lysaten mittels Affinitätsaufreinigung ankonzentriert. Auf Eis wurden in einem 50µl Reaktionsansatz 2-4µg der zu untersuchenden Kinase (MEK1-GST) mit 1µg Substrat (MBP bzw. PbMAPK1) in 1x Reaktionspuffer vermischt. Im Radioaktivlabor wurden 5µl eines 1:10 ATP-Gemisches zugegeben (³²pATP vs ATP). Die Reaktion erfolgte bei 37°C für eine Stunde. Anschließend wurde 5x Probenpuffer zu den Proben pipettiert und diese sofort 10min bei 95°C aufgekocht. Bis zur Analyse konnten die Proben bei -20°C gelagert werden. Aufgrund der geringen Größe von MBP (16kDa) wurden die Reaktionsansätze auf einem 12%igen Proteingel analysiert.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel mit Coomassie-Färbelösung für 45min gefärbt. Bei der anschließenden Inkubation in Entfärbelösung für 1-2 Stunden wurden die Proteinbanden im Gel sichtbar. Es folgte ein 10minütiges Wässern, an dessen Anschluß das Proteingel für 30min in Trocknungslösung geschwenkt wurde, bevor es über Nacht getrocknet wurde. In einer Filmkassette wurden für 3 Stunden bis zu 3 Tagen Röntgenfilme auf dem radioaktiven Gel bei -70°C exponiert. Die Filme wurden in der Dunkelkammer entwickelt.

3. Ergebnisse

3.1 Parasiten-induzierte Phosphorylierungsereignisse in *P. berghei*-infizierten Hepatozyten

3.1.1 Tyrosin-Phosphorylierungen in *P.berghei*-infizierten HepG2-Hepatomazellen.

In Immunfluoreszenzfärbungen wurde der Phosphorylierungsstatus in *P.berghei*-infizierten Hepatozyten untersucht. Zu diesem Zweck wurden infizierte Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der exo-erythrozytären Phase fixiert und mit einem monoklonalen α -Phospho-Tyrosin-Antikörper inkubiert, der Proteine mit Phosphorylierungen an Tyrosin-Resten detektierte. Die intrazelluläre Lokalisation des Parasiten wurde mit einem polyklonalen α -Exp1-Antikörper bestimmt, mit dem das in der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) inserierte Parasitenprotein Exp1 nachgewiesen wurde.

In Immunfluoreszenzanalysen konnten deutliche Unterschiede zwischen *P.berghei*-infizierten und nicht-infizierten Hepatomazellen festgestellt werden. In allen Stadien der exo-erythrozytären Entwicklung von *P.berghei* wurden Tyrosin-Phosphorylierungen an Proteinen in der parasitophoren Vakuolenmembran detektiert (Abb. 5). Die α -P-Tyrosin-Färbungen colokalisierten teilweise mit den α -Exp1-Färbungen (Abb. 5, überlagert).

Durchschnittlich zeigten zwei Drittel der infizierten Hepatomazellen 6h, 24h und 48h post Infektion (p.I.) die oben beschriebenen Phosphorylierungsmuster. Somit schien es nicht zu einer permanenten Phosphorylierung von Proteinen in der PVM zu kommen. Teilweise wurden außerdem Vesikel in PVM-Nähe gefärbt (Abb.5, Pfeile). Die infizierten, α -P-Tyrosin-positiven Zellen unterschieden sich zudem hinsichtlich der Intensität der detektierten Phosphorylierungsmuster in der PVM. Die in Abbildung 5 dargestellten Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen Beispiele für stark fluoreszierende, infizierte HepG2-Zellen.

Die Konzentration der Phosphorylierungsmuster auf die parasitophore Vakuolenmembran in *P.berghei*-infizierten Hepatomazellen überraschte angesichts der Tatsache, dass für andere apikomplexe Parasiten bereits Phosphorylierungen von Wirtszellproteinen im Wirtszellzytoplasma beschrieben wurden. So kommt es z.B. im Rahmen der Invasion von *T.gondii* in humane Monozyten zu einer transienten Aktivierung von Wirtszell-MAPK (Valere et. al., 2003). In *P.berghei*-infizierten Hepatomazellen hingegen wurden 6h, 24h und 48h p.I. keine verstärkten Tyrosin-Phosphorylierungen im Zytoplasma der Wirtszelle nachgewiesen. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass in den Wirtszellen

induzierte Phosphorylierungen in den ersten zwei Tagen der Infektion auf einem Niveau stattgefunden haben, das unterhalb der Nachweisgrenze von Immunfluoreszenzanalysen lag.

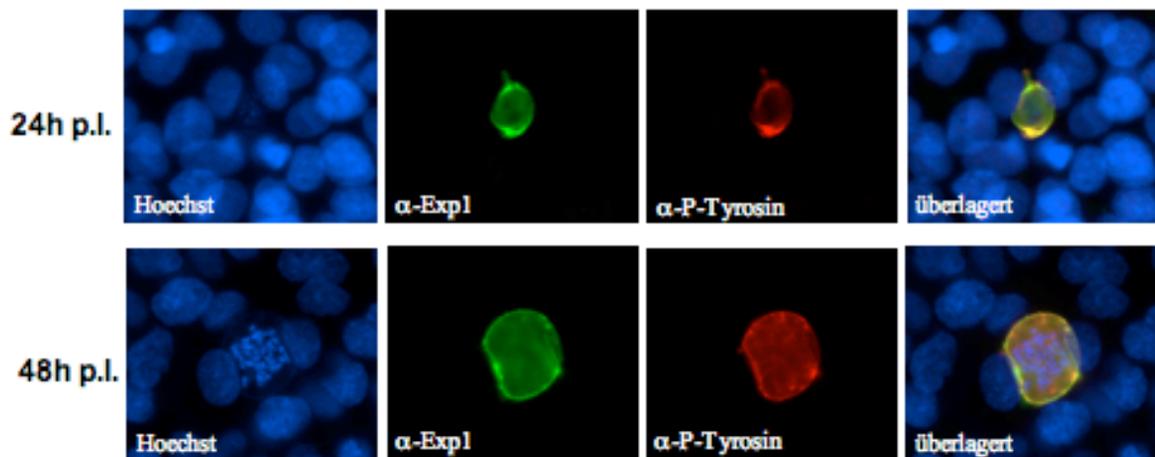


Abb.5:Nachweis von Tyrosin-Phosphorylierungen in der PVM von *P.berghei*-infizierten HepG2-Zellen. *P.berghei*-infizierte HepG2-Zellen wurden 24h und 48h p.I. fixiert. Mit dem parasitenspezifischen, polyklonalen α -Exp1- (grün, Cy2) und dem monoklonalen α -Phospho-Tyrosin-Antikörper (rot, Alexa 594) wurden in Immunfluoreszenzanalysen verschiedener *P.berghei*-Entwicklungsstadien z.T. identische Muster in der PVM detektiert. Die DNA der Wirtszellen und des Parasiten wurden mit dem Hoechst 33258-Farbstoff (blau) angefärbt.

Gegen Ende der exo-erythrozytären Entwicklung wurden Veränderungen in den Phosphorylierungsmustern von *P.berghei*-infizierten Hepatomazellen beobachtet. So konnten nun z.T. verstärkt Tyrosin-Phosphorylierungen im Zytoplasma der Wirtszelle nachgewiesen werden (Abb. 6 A, Pfeile). Gegen Ende der exo-erythrozytären Entwicklung kommt es *in vitro* und *in vivo* zu einem Ablösen der infizierten Zellen aus dem Verband (Heussler, unveröffentlicht). Ein weiteres, morphologisches Charakteristikum dieser Phase ist der stark kondensierte Kern der infizierten, abgelösten Wirtszelle. In diesem Stadium der Infektion wurden in den infizierten Zellen ebenfalls Phosphorylierungen im Wirtszellzytoplasma nachgewiesen (Abb. 6 B, Pfeil). Zeitgleich mit dem Auflösen der PVM konnten α -Phospho-Tyrosin-gefärbte Vesikel detektiert werden (Abb. 6 C), die nur z.T. mit den α -Exp1-positiven PVM-Resten zu co-lokalisieren schienen (Abb.7).

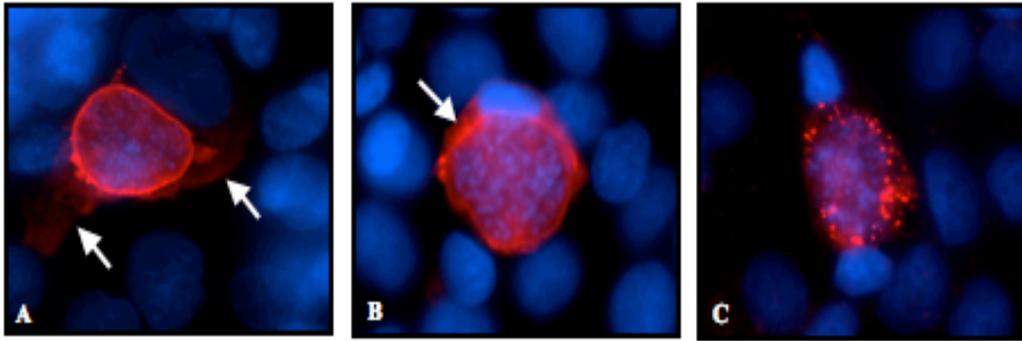


Abb. 6: Veränderungen in den α -P-Tyrosin-Färbungen in *P.berghei*-infizierten HepG2-Zellen gegen Ende der exo-erythrozytären Phase. *P.berghei*-infizierte Hepatomazellen wurden 52h (A), 60h (B) und 65h (C) p.I. fixiert und die DNA der Wirtszellen und der Parasiten mit dem Hoechst 33258-Farbstoff (blau) angefärbt. Mit dem α -P-Tyrosin-Antikörper (Alexa 594, rot) wurden in den späten Stadien der exo-erythrozytären Entwicklung ebenfalls das Hepatozytenzytoplasma (A und B, s. Pfeile) sowie einhergehend mit der Freisetzung der Merozoiten kleine Vesikel (C) gefärbt.

Zur Identifizierung der Proteine, die in infizierten Zellen Tyrosinphosphorylierungen aufwiesen, wurden Western Immunoblot-Analysen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). In Extrakten von *P.berghei*-infizierten HepG2-Zellen konnten keine zusätzlichen oder verstärkt phosphorylierten Proteine detektiert werden. Aufgrund der niedrigen Infektionsrate von 1 bis 5% Prozent führten proteinbiochemische Analysen von infizierten Hepatomazellen zu keinen aussagekräftigen Ergebnissen. Der prozentuale Anteil der Parasitenproteine in den Extrakten reichte nicht aus, um die Identität der Tyrosin-phosphorylierten Proteine mit Hilfe von Western Immunblots oder Immunpräzipitationen zu klären. Des Weiteren erschwerten spontan auftretende Dephosphorylierungen trotz der Anwesenheit von Phosphataseinhibitoren die Isolierung der zu untersuchenden, phosphorylierten Proteine.

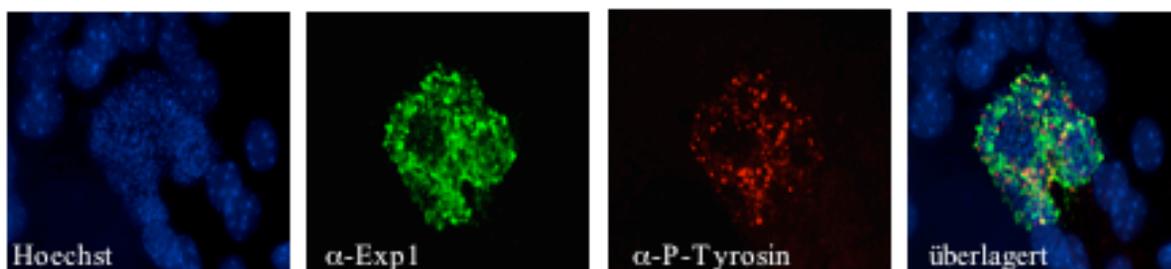


Abb. 7: Merozoitenfreisetzung am Ende der exo-erythrozytären Phase. Primäre Maushepatozyten wurden mit *P.berghei* infiziert und 65h p.I. fixiert. Die α -Exp1-Färbung (Cy2, grün) zeigte deutlich, dass sich die PVM zum Fixierungszeitpunkt gerade aufgelöste. Mit dem α -P-Tyrosin-Antikörper (Alexa 594, rot) wurden Vesikel-ähnliche Strukturen angefärbt, die nur zum Teil mit den α -Exp1-Färbungen co-lokalisierten (überlagert). Die Zellkerne der Hepatozyten und der Parasiten wurden mit dem Hoechst 33258-Farbstoff (blau) detektiert.

3.1.2 Beeinflussung der Plasmodien-Infektion durch Tyrosinkinaseinhibitoren

3.1.2.1 PTK-Behandlungen von *P.berghei*-infizierten Hepatomazellen führten zu einer Reduzierung der α -P-Tyrosin-positiven Zellen

Folgend sollte untersucht werden, ob PTK-Inhibitoren einen Einfluss auf die Tyrosinphosphorylierungen in der PVM von infizierten HepG2-Zellen hatten. Zu diesem Zweck wurden *P.berghei*-infizierte Hepatomazellen für 2h mit 200 μ M Genistein bzw. Tyrphostin inkubiert. Bei beiden Wirkstoffen handelt es sich um Tyrosinkinaseinhibitoren, die sich jedoch in ihrer Wirkungsweise unterscheiden. Genistein ist das wichtigste Isoflavonoid der Sojabohne, das an die ATP-Bindungsstelle im aktiven Zentrum von Kinasen bindet. Tyrphostine hingegen inhibieren die Aktivität von Kinasen, in dem sie mit der Substratbindungsstelle interagieren.

Die statistische Auswertung von Immunfluoreszenzfärbungen behandelter, infizierter HepG2-Zellen zeigte deutlich, dass die Inhibitor-Behandlungen in infizierten Zellen zu einer mehr als 50%igen Reduzierung der Anzahl der α -P-Tyrosin-positiven Zellen führte. Nach der Inkubation mit den Drogen zeigten nur noch 31-32% der infizierten Zellen Phosphorylierungen von membranständigen Proteinen; in der unbehandelten Kontrolle wiesen dagegen durchschnittlich 68% der infizierten Zellen die typischen Färbemuster in der PVM auf (Abb. 8).

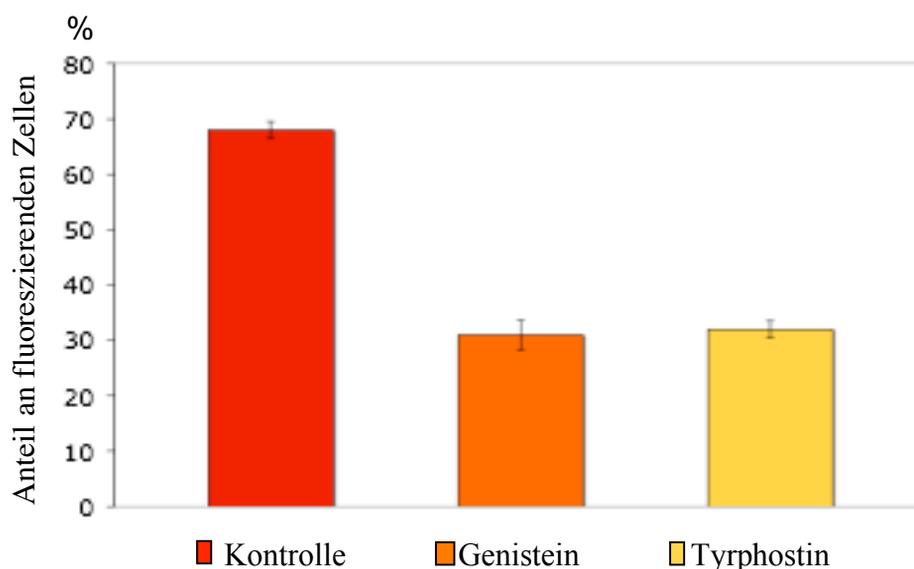


Abb. 8: Tyrosinkinaseinhibitoren bewirkten eine deutliche Verminderung der α -P-Tyrosin-positiven, *P.berghei*-infizierten Hepatomazellen. Die statistische Auswertung von Immunfluoreszenzfärbungen PTK-Inhibitor-behandelter, *P.berghei*-infizierter HepG2-Zellen zeigte eine deutliche Verminderung der Anzahl der α -P-Tyrosin-positiven, infizierten Hepatozyten nach Zugabe von Genistein oder Tyrphostin.

3.1.2.2 PTK-Inhibitor-Behandlungen von *Plasmodium*-infizierten Zellen führten zur Blockierung des Parasitenwachstums

Im Rahmen der Untersuchungen zur Einflußnahme von Genistein und Tyrphostin konnte beobachtet werden, dass die Tyrosinkinaseinhibitoren nicht nur eine Reduzierung der Phosphorylierungsmuster in der PVM bewirkten (3.1.2.1), sondern auch die Entwicklung des Parasiten in seiner Wirtszelle beeinflussten.

Anhand von morphologischen Untersuchungen wurde die Konzentration an Inhibitor bestimmt, die die Wirtszelle in einer längeren Inkubationsphase nicht schädigte. Zu diesem Zweck wurden HepG2-Zellen für 24-48h in Anwesenheit von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen kultiviert und die Zellkerne anschließend mit dem Hoechst33258-Farbstoff gefärbt. Apoptotische Zellen zeichneten sich durch einen kondensierten Nukleus aus. In Fluoreszenzanalysen wurde anhand dieses Merkmals die Menge an Inhibitor ermittelt, die in den Wirtszellen offenbar keine Apoptose auslöste (Daten nicht gezeigt). Die Inkubation der infizierten HepG2-Zellen mit 50µM Genistein bzw. Tyrphostin schien die Hepatomazellen in ihrer Entwicklung nicht zu beeinflussen. Der Parasit hingegen war in seiner Proliferation deutlich beeinträchtigt (Abb. 9). Die Zugabe von Genistein oder Tyrphostin 6h, 12h und 24h nach Infektion für weitere 24h Stunden resultierte in der Blockierung der Parasitenentwicklung.

Abbildung 9 zeigt die statistische Auswertung von 24-stündigen Behandlungen, in denen Hepatomazellen einen Tag p.I. mit 50µM Genistein oder Tyrphostin behandelt wurden. Die 48h p.I. fixierten Parasiten wurden in DNA-Färbungen im Hinblick auf ihren Entwicklungsstand im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle untersucht. Die behandelten, infizierten Zellen zeigten im Gegensatz zur Kontrolle einen Parasiten, der auf dem Entwicklungsstand zum Zeitpunkt der Inhibitorzugabe 24h p.I. stehengeblieben war. Die Tyrosinkinaseinhibitoren schienen einen entscheidenden Einfluss auf die Replikation der Parasiten-DNA zu nehmen und damit verbunden zu einer deutlichen Inhibierung des Parasitenwachstums zu führen. Der Parasit hatte während der 24-stündigen Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht an Größe zugenommen. Immunfluoreszenzanalysen von behandelten Zellen zeigten keine Veränderungen der typischen α -Exp1- oder α -P-Tyrosinfärbungen im Vergleich zu unbehandelten, infizierten Zellen; die PVM schien intakt zu sein (Daten nicht gezeigt). In den späten Stadien der Entwicklung (ab 48 h p.I.) konnte keine Beeinflussung der Proliferation festgestellt werden. Nachdem der Parasit das Merozoitenstadium erreicht hatte, schien er seine Entwicklung trotz Tyrosinkinaseinhibitoren abschließen zu können (Daten nicht gezeigt).

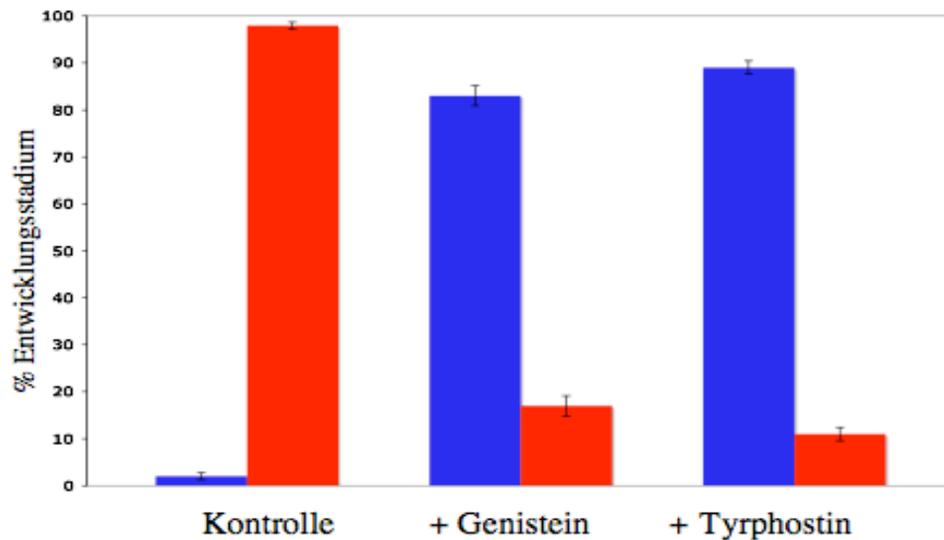


Abb. 9: Genistein und Tyrphostin inhibierten die Proliferation von *P.berghei* in den frühen Stadien der hepatozytären Entwicklung. *P.berghei*-infizierte HepG2-Zellen wurden 24h p.I. für weitere 24h mit 50 μ M Genistein/Tyrphostin inkubiert. 48h p.I. wurden die Zellen fixiert und die Parasiten- und Wirtszellkerne mit dem Hoechst-Farbstoff gefärbt. Der Entwicklungsstand der Parasiten wurde anhand der Morphologie der Parasitenzellkerne als frühes, mittleres und spätes Stadium bewertet. In der unbehandelten Kontrolle wurden zum Zeitpunkt der Fixierung fast ausschließlich der Infektionszeit entsprechende Entwicklungsstadien detektiert (Kontrolle).

Da Genistein die Entwicklung des Parasiten in den Hepatomazellen deutlich blockierte und die Wirtszellen bei geringer Inhibitormenge nicht angegriffen wurden, kam der Wirkstoff auch in *in vivo*-Experimenten zum Einsatz. Nach Infektion mit *P.berghei*-Sporozoitien wurde drei Mäusen 24h, 35h und 48h p.I. intraperitoneal jeweils 0,3mg Genistein injiziert. Im Blut der behandelten Mäuse wurden zum gleichen Zeitpunkt wie bei der unbehandelten Kontrollmaus *P.berghei*-infizierte Erythrozyten nachgewiesen. Folglich konnte durch diese Genistein-Behandlung *in vivo* keine Inhibierung des Parasitenwachstums erreicht werden.

In einem anderen *in vivo*-Experiment wurde die Vitalität der Parasiten in der Leberphase behandelter Mäuse mittels RealTime-PCR untersucht. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Maria Mota von der Universität Lissabon, Portugal. Fünf von zehn infizierten Mäusen wurden 24h und 30h p.I. intravenös 0,5 μ g Genistein injiziert und 40h p.I. die Lebern entnommen. Die Analysen ergaben, dass es sowohl bei den behandelten als auch bei den unbehandelten Mäusen Unterschiede in der Parasitämie in der Leber gab. Eine Inhibierung der exo-erythrozytären Entwicklung von *P.berghei* durch Genistein konnte somit unter den gewählten Bedingungen *in vivo* nicht bestätigt werden.

Der Einfluß von Tyrosinkinaseinhibitoren auf die Parasitenentwicklung wurde sowohl in der exo-erythrozytären als auch in der erythrozytären Phase der *Plasmodium*-Infektion untersucht. Das Blutstadium von *P.berghei* lässt sich nur für einen Zyklus (vom Ring- bis zum Schizontenstadium) *in vitro* kultivieren. Da die Infektion in Mäusen nicht synchron abläuft,

sind im Blut alle Parasiten-Stadien enthalten. Die Kultivierung des isolierten Vollbluts erwies sich als schwierig; selbst unbehandelte Parasiten entwickelten sich 12-24h nach Kultivierungsbeginn nicht mehr weiter. Eine aussagekräftige, statistische Auswertung von behandeltem und unbehandeltem, infiziertem *P.berghei*-Blut war demnach nicht möglich. Wesentlich standardisierter lässt sich das Blutstadium des nahe verwandeten Parasiten *P.falciparum* *in vitro* kultivieren (Trager und Jensen, 1976). Sowohl Genistein als auch Tyrphostin hatten einen deutlichen Einfluß auf die Proliferation des Parasiten in den frühen Stadien der erythrozytären Entwicklung. Bei Zugabe der Inhibitoren im Ringstadium kam es zu einer Blockierung der Parasitenentwicklung (Auswertung eines beispielhaften Experiments s. Abb.10). Diese Ergebnisse stimmten mit Beobachtungen von Dluzewski und Garcia überein, die 1996 zeigen konnten, dass Tyrosinkinaseinhibitoren in der Blutphase der *P.falciparum*-Infektion die Proliferation des Parasiten inhibierten (Dluzewski & Garcia, 1996). Eine Zugabe der Tyrosinkinaseinhibitoren im Trophozoitenstadium der Infektion schien dagegen keinen Einfluß auf die weitere Proliferation des Parasiten zu haben. Anscheinend wirkten die Inhibitoren auch im Erythrozytenstadium vornehmlich auf einen sich replizierenden Parasiten.

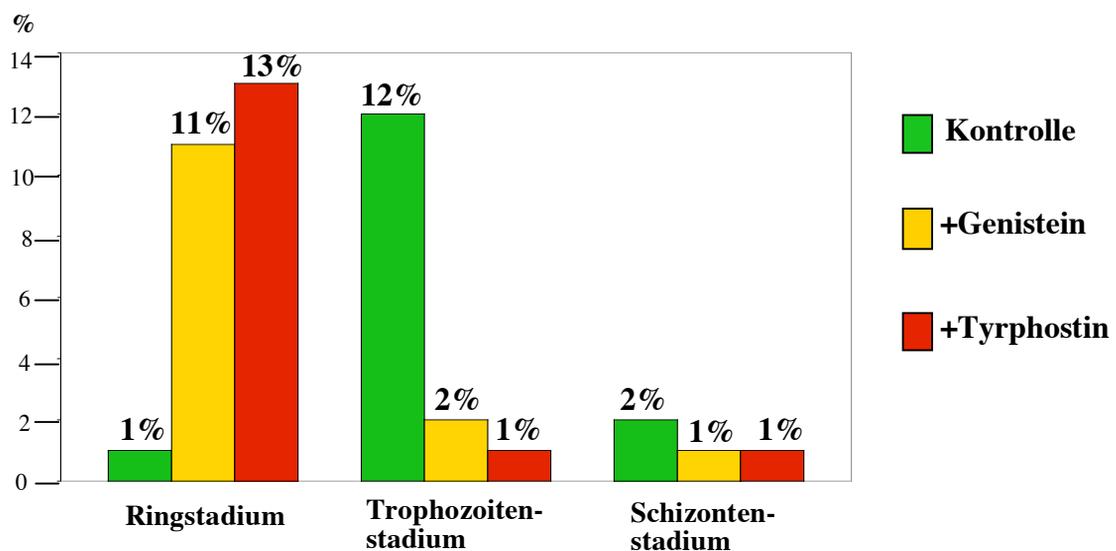


Abb.10: Tyrosinkinaseinhibitoren blockierten das Wachstum von *P.falciparum* in Erythrozyten. *P.falciparum* infizierte Blutkulturen (maximal 15% Parasitämie) wurden beispielhaft im Ringstadium mit 50µM Genistein oder Tyrphostin inkubiert und die Entwicklung der Parasiten nach 24h Behandlung im Giemsa-gefärbten Blutausstrich bewertet. In Anwesenheit der Tyrosinkinaseinhibitoren kam es zu einer deutlichen Blockierung des Parasitenwachstums. Während sich in der unbehandelten Kontrolle zum Zeitpunkt der Fixierung die Parasiten bereits zu Trophozoiten bzw. Schizonten differenziert hatten, wurden in den behandelten Kulturen (+ Genistein, + Tyrphostin) hauptsächlich Ringstadien detektiert.

3.2 Aktivierte MAPK wurden in *P.berghei*-infizierten Zellen in der PVM detektiert.

3.2.1 Antikörper gegen die aktivierte Form von MAPK färbten in infizierten Hepatomazellen Proteine in der PVM.

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) werden durch Phosphorylierungen an Threonin- und Tyrosinresten in einem konservierten Motiv aktiviert. Mit Antikörpern, die gegen das zweifach phosphorylierte Epitop in der Aktivierungsdomäne von humanen MAPK gerichtet waren, sollte untersucht werden, ob es sich bei den membranständigen, Tyrosin-phosphorylierten Proteinen in infizierten Hepatozyten um aktivierte MAPK handelte.

Mit α -Phospho-MAPK-Antikörpern wurden in *P.berghei*-infizierten HepG2-Hepatomazellen Proteine in der PVM angefärbt. Sowohl der α -Phospho-JNK- (Abb. 11) als auch α -Phospho-ERK-Antikörper (Daten nicht gezeigt) erkannten phosphorylierte Proteine in der parasitophoren Vakuolenmembran. Zur Bestätigung der Spezifität der Antikörperreaktion wurden Färbungen mit Phospho-Antikörpern von drei verschiedenen Herstellern durchgeführt, die alle identische Muster in der PVM in unterschiedlicher Intensität detektierten. Diese waren bereits in den frühen Stadien der Infektion nachweisbar und beschränkten sich in der späteren Entwicklung nicht mehr auf die PVM, sondern färbten auch das Parasitenzytosol (Abb.11).

Mit α -P-p38-Antikörpern wurden im Gegensatz zu den anderen α -P-MAPK-Antikörpern während der gesamten exo-erythrozytären Phase nicht Bereiche in der PVM sondern die Parasitenzellkerne angefärbt. Hierbei schien es sich um eine Kreuzreaktion mit einem Parasitenprotein zu handeln (siehe auch 3.5).

Es konnten weder direkt nach der Infektion noch zu einem späteren Zeitpunkt der Parasitenproliferation verstärkt aktivierte MAPK im Zytosol der infizierten Wirtszellen nachgewiesen werden. Die Phosphorylierungsmuster konzentrierten sich in den ersten zwei Tagen der Infektion auf die PVM. Gegen Ende der exo-erythrozytären Entwicklung konnten ebenfalls Färbungen in der PV beobachtet werden (Abb. 11, 60h p.I.). Die Spezifität der Antikörper wurde durch eine typische Färbung von aktivierten MAPK in mitotischen, nicht infizierten Zellen bestätigt (Abb. 11, 60h p.I.).

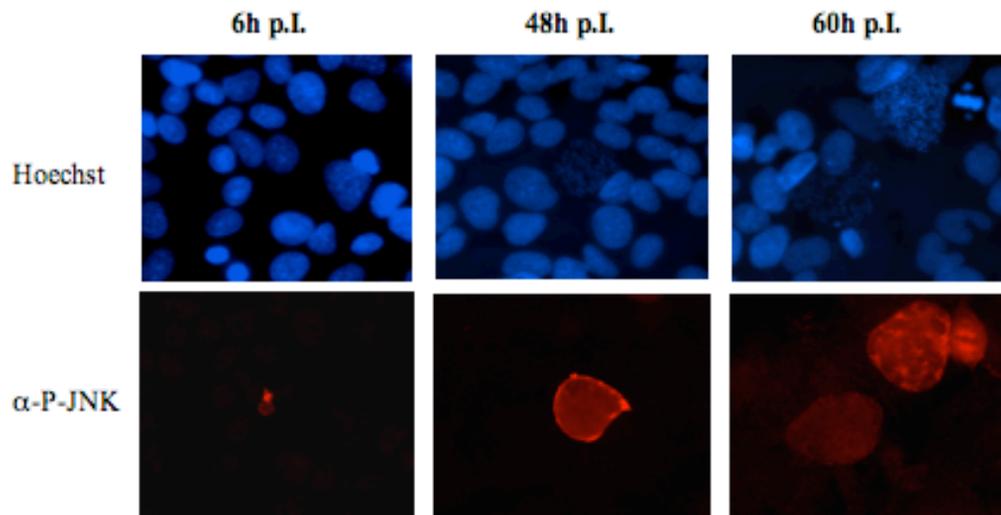


Abb. 11: Aktivierte MAPK wurden in infizierten HepG2-Zellen mit α -P-JNK-Antikörpern in der PVM und der PV nachgewiesen. *P.berghei*-infizierte HepG2-Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der exo-erythrozytären Entwicklung fixiert und mit dem α -P-JNK-Antikörper gefärbt (Alexa 594, rot). In allen Stadien der Infektion (6h, 48h, 60h p.I.) wurden Bereiche in der PVM sowie gegen Ende der Leberphase (60h p.I.) auch in der PV gefärbt. Die Zellkerne der Parasiten und der Hepatozyten wurden mit dem Hoechst33258-Farbstoff (blau) angefärbt.

3.2.2 Rekombinante Expression von humanem JNK1 in Hepatomazellen

Die α -Phospho-MAPK-Antikörper wurden gegen Epitope der aktivierten Formen der humanen MAPK generiert. Als solche sollten sie nur die Wirtszellkinasen erkennen; eine Kreuzreaktion mit ähnlichen Motiven in Parasitenproteinen konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden. Folgend sollte der Ursprung der detektierten, phosphorylierten Proteine in infizierten Leberzellen genauer determiniert werden.

Zu diesem Zweck wurde die Lokalisation einer in infizierten Leberzellen rekombinant exprimierten, humanen MAPK untersucht. Nach Transfektion des Vektors pcDNA3.1-JNK1 wurde JNK1 als rekombinantes V5-Fusionsprotein in Hepatomazellen exprimiert. HepG2-Zellen, die die rekombinante MAPK synthetisierten, wurden mit verschiedenen Antikörpern identifiziert: Zum einen wurden Färbungen mit einem α -panJNK-Antikörper durchgeführt, der alle drei Formen der Kinase (JNK1, 2 und 3) detektierte. Des Weiteren kam ein monoklonaler α -V5-Antikörper zum Einsatz. Abb.12 zeigt Immunfluoreszenzanalysen von für 48h transfizierten Zellen, die mit dem α -panJNK- und dem α -V5-Antikörper gefärbt wurden. Die unterschiedliche Intensität der Färbungen macht deutlich, dass transfizierte Zellen, die ein Plasmid trugen, das rekombinante Protein verschieden stark exprimierten. Rekombinantes JNK1 wurde mit beiden Antikörpern sowohl im Zytosol als auch im Kern der

Leberzellen nachgewiesen. Die Überexpression schien die Zellen in ihrer Proliferation nicht zu beeinträchtigen.

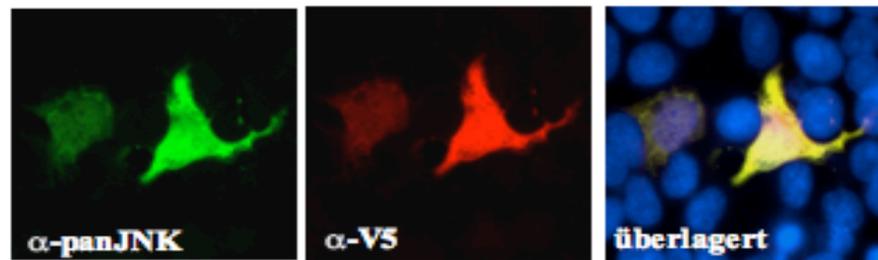


Abb. 12: Nachweis von in HepG2-Zellen rekombinant exprimiertem JNK1 in Immunfluoreszenzfärbungen. HepG2-Zellen wurden mit dem Plasmid pcDNA3.1-JNK1 transfiziert. Die rekombinante Expression des humanen JNK1-V5-Fusionsproteins konnte 48h nach Transfektion in Immunfluoreszenzanalysen mit dem α -panJNK- (Cy2, grün) und dem α -V5-Antikörper (Alexa 594, rot) nachgewiesen werden. Die Kerne der Zellen wurden mit dem Hoechst33258-Farbstoff (blau) detektiert.

3.2.3 Rekombinante Expression von humanem JNK1 in *P.berghei*-infizierten Hepatomazellen

Gegenstand der folgenden Analysen war die Bestimmung der Lokalisation des rekombinant exprimierten JNK1-V5-Fusionsproteins in *P.berghei*-infizierten HepG2-Zellen. Eine Assoziation der rekombinanten MAPK mit der PVM oder eine Aufnahme in die PV wäre ein Hinweis darauf gewesen, dass es sich bei den detektierten, phosphorylierten Proteinen in der PVM um Wirtszellproteine handelte.

Transfizierte und zudem infizierte HepG2-Zellen wurden in Immunfluoreszenzanalysen in Doppelfärbungen mit dem α -V5- und dem α -Exp1-Antikörper identifiziert (Abb.13). Die rekombinant exprimierte Kinase wurde sowohl im Zytoplasma als auch in der Nähe der PVM nachgewiesen. Es konnte jedoch keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob die MAPK gezielt mit der PVM assoziierte oder sogar in sie integriert wurde. Eine Translokation in die PV konnte nicht nachgewiesen werden.

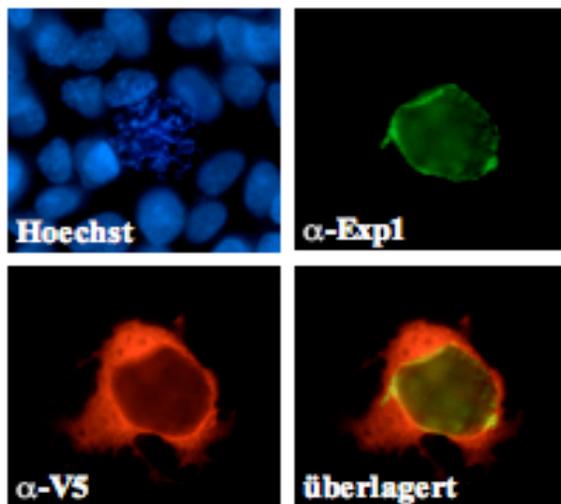


Abb. 13: In infizierten HepG2-Zellen rekombinant exprimierte JNK1 wurde im Zytoplasma der Wirtszelle und nicht in der PV nachgewiesen.

Hepatomazellen wurden mit dem Vektor pcDNA3.1-JNK1 transfiziert und folgend infiziert. Nach 48h konnte die rekombinant exprimierte Kinase in Immunfluoreszenzanalysen mit dem α -V5-Antikörper (Alexa 594, rot) in der gesamten Wirtszelle und somit auch in PVM-Nähe (α -Exp1, Cy2, grün), nicht jedoch in der PV detektiert werden. Wirtszell- und Parasitenzellkerne wurden mit dem Hoechst33258-Farbstoff (blau) gefärbt.

Des Weiteren wurden Doppelfärbungen mit dem α -V5- und dem α -Phospho-JNK- (Abb.14) bzw. dem α -Phospho-Tyrosin-Antikörper (Daten nicht gezeigt) durchgeführt. Auch hier wurde die rekombinant exprimierte Kinase im Zytosol der Wirtszelle und somit auch in PVM-Nähe; nicht jedoch in der PV nachgewiesen. Phosphorylierte Proteine konnten auch in transfizierten Zellen nur in der PVM detektiert werden.

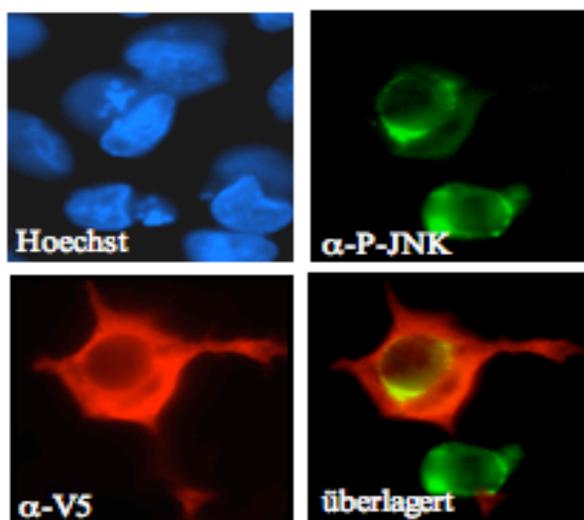


Abb. 14: In transfizierten, infizierten Zellen wurden phosphorylierte Proteine nur in der PVM nachgewiesen.

Hepatomazellen wurden mit dem Vektor pcDNA3.1-JNK1 transfiziert und folgend infiziert. In den nach 48h fixierten Hepatomazellen konnten aktivierte MAPK nur in der PVM detektiert werden (α -P-JNK, Cy2, grün), obwohl die rekombinant exprimierte, humane MAPK JNK1 in der gesamten Wirtszelle nachgewiesen wurde (α -V5, Alexa 594, rot). Wirtszell- und Parasitenzellkerne wurden mit dem Hoechst33258-Farbstoff (blau) gefärbt.

3.3 Manipulation der Proteinexpression in eukaryotischen Zellen

Da anhand der Studien zur rekombinanten Expression der humanen MAPK JNK1 in infizierten Hepatomazellen keine eindeutige Aussage zum Ursprung der phosphorylierten Proteine in der PVM getroffen werden konnte, sollte folgend der Effekt einer Verminderung der Expression der Wirtszell-MAPK durch JNK1-siRNA auf die *Plasmodium*-Infektion untersucht werden. Durch den Einsatz eines α -LaminA/C-siRNA-Kontroll-Duplex sollte zusätzlich die Effektivität derartiger Manipulationen von Proteinexpressionen in Hepatomazellen bestätigt werden.

3.3.1 Etablierung der Transfektionsbedingungen mit fluoreszierendem siRNA-Duplex

Die Bedingungen zur Transfektion von siRNA in Hepatomazellen wurden mit Hilfe eines fluoreszierenden siRNA-Oligos etabliert. Der siRNA-Duplex Block-iT™ Fluorescent Oligo hatte dieselbe Länge, Ladung und Konfiguration wie Standard-siRNA.

Abb.15 zeigt HepG2-Zellen, die 24h nach Transfektion infiziert wurden. Die grün-fluoreszierende siRNA schien in unterschiedlicher Konzentration von ungefähr 30 Prozent der Zellen aufgenommen worden zu sein. In den transfizierten Hepatomazellen wurde sie zum größten Teil im Nukleus nachgewiesen. Eine Translokation der siRNA durch die PVM des Parasiten schien nicht stattzufinden.

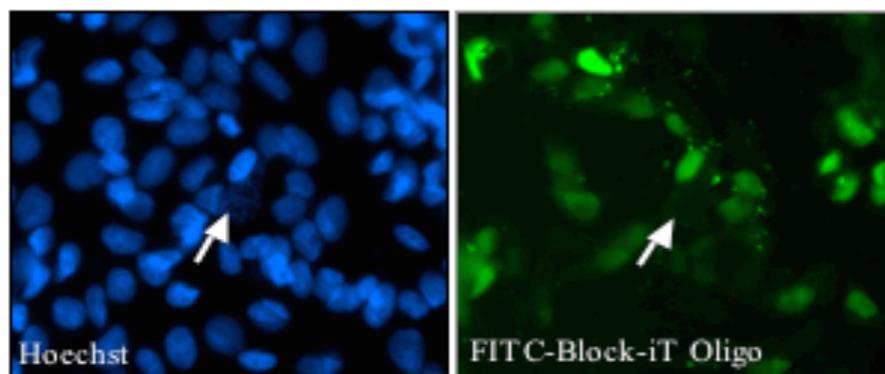


Abb. 15: Der Block-iT™ Fluorescent Oligo war in transfizierten HepG2-Zellen in den Zellkernen lokalisiert. Mit einem FITC (grün)-gekoppeltem siRNA-Oligo wurden die Transfektionsbedingungen in HepG2-Zellen etabliert. Transfizierte Zellen wurden mit *P.berghei* infiziert und 48h p.I. fixiert. Die Kerne der Zellen und der Parasiten wurden mit dem Hoechst33258-Farbstoff gefärbt (blau). Der fluoreszierende Oligo konnte in den Kernen der HepG2-Zellen, nicht jedoch innerhalb der PV von infizierten Zellen (s.Pfeil) nachgewiesen werden.

Durch Variierung verschiedener Versuchsparameter (Tab.3) wurden die Bedingungen zur Transfektion von siRNA in Hepatomazellen etabliert. In Tabelle 3 sind die Versuchsbedingungen, unter denen der größte Teil der HepG2-Zellen (45-55%) transfiziert werden konnten, farblich hervorgehoben.

Parameter	
Zellkulturformat	6-, 12- und 24-Well-Platten
Zelldichte	30-90% konfluent
Transfektionsreagenz	Lipofectamine, Oligofectamine, X-tremeGene
siRNA-Konzentration	5-300nM
Kultivierungsbedingungen	<ul style="list-style-type: none"> - Mediumwechsel nach 4h-12h Transfektion - Transfektion in Opti-MEM[®] Reduced Serum Medium - Transfektionsvolumen: 250-1000µl - (keine) Antibiotikazugabe - Ernte der Zellen 24h, 48h oder 72h nach Transfektion

Tab.3: Versuchsparameter, die zur Etablierung der Transfektionsbedingungen von siRNA in Hepatomazellen variiert wurden.

3.3.2 Versuche zur Verminderung der Proteinexpression von Lamin A/C und JNK1 in Hepatomazellen

Folgend wurden unter den o.a. Bedingungen Versuche zur Verminderung der Expression von Lamin A/C sowie JNK1 in HepG2-Zellen durchgeführt. Beim Einsatz von 80pmol Lamin A/C-siRNA konnte nach 48h Transfektion in HepG2-Zellen eine deutliche Verminderung der Expression sowohl von Lamin A als auch Lamin C erreicht werden. Abb. 16 zeigt einen Western Immunoblot (WB), in dem Extrakte von transfizierten Zellen untersucht wurden. Mit Lipofectamine als Transfektionsreagenz konnte mit der α -LaminA/C-siRNA eine wesentliche Verminderung der Expression sowohl von Lamin C (62kDa) als auch von Lamin A (72kDa) im Vergleich zu unbehandelten Zellen erreicht werden. Mit dem Reagenz X-tremeGene wurden wesentlich weniger Zellen transfiziert. Durch die Wiederholung des Western Immunblots mit denselben Extrakten und einem Antikörper gegen Tubulin konnte gezeigt werden, dass die Abschwächung der Signale in den transfizierten Proben nicht auf die Analyse unterschiedlicher Proteinmengen zurückzuführen war. Der Blot zeigte deutlich, dass

in allen Spuren vergleichbare Proteinmengen untersucht wurden und somit in den Lysaten aufgrund der Verminderung der Expression mittels siRNA weniger Lamin nachgewiesen wurde.

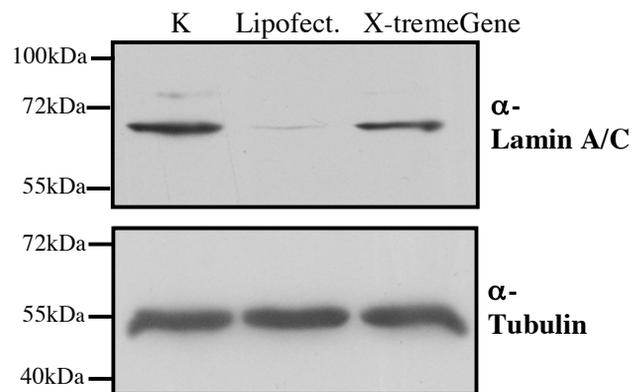


Abb. 16: Verminderung der Proteinexpression von LaminA/C in HepG2-Zellen. HepG2-Zellen wurden mit einem synthetischen α -Lamin A/C-siRNA-Oligo transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen lysiert und die Extrakte im Western Immunoblot analysiert. Lamin A wurde in HepG2-Zellen deutlich weniger exprimiert als Lamin C (K). Im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Kontrolle K) konnte durch die siRNA eine Verminderung der Lamin C-Expression erreicht werden. Der α -Tubulin-WB bestätigte, dass in allen Spuren vergleichbare Proteinmengen analysiert wurden.

Unter identischen Versuchsbedingungen konnte mit der JNK1-siRNA ebenfalls eine Verminderung der Expression des JNK1 (49kDa) im Vergleich zur Kontrolle erreicht werden (Abb. 17). Obwohl die siRNA spezifisch für JNK1 konstruiert wurde, konnte ebenfalls eine Verminderung der Expression von JNK2 (54kDa) beobachtet werden.

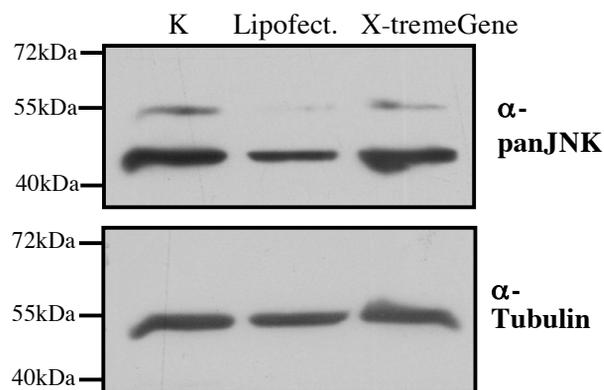


Abb. 17: Verminderung der Proteinexpression von JNK in HepG2-Zellen. HepG2-Zellen wurden mit einem α -JNK1-siRNA-Oligo transfiziert. Die Analyse der Extrakte im WB zeigte eine Verminderung der Proteinexpression von JNK1 in mit Lipofectamine (Lipofect.) transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (K). Mit dem X-Gene-Reagenz wurden wesentlich weniger Zellen transfiziert, sodass eine Verminderung der Proteinexpression nicht nachweisbar war. Durch eine erneute Entwicklung des Blots mit einem α -Tubulin-Antikörper konnte gezeigt werden, dass alle Fraktion vergleichbare Proteinmengen enthielten.

3.3.3 Verminderung der Expression von Lamin A/C und JNK1 in HeLa-Zellen

Aufgrund des geringen Erfolgs der Manipulation der JNK1-Expression mittels siRNA in HepG2-Zellen sollte die Eignung des synthetischen α -JNK1-siRNA-Oligos in einer Zelllinie bestätigt werden, deren Tauglichkeit für siRNA-Transfektionsstudien schon mehrfach beschrieben wurde (Elbashir et. al., 2001; Harborth et. al., 2001). In der humanen Gebärmutterhalskrebs-Zelllinie HeLa konnte mit den synthetischen siRNAs eine effiziente Verminderung der Proteinexpression sowohl von Lamin A und C als auch JNK1 erreicht werden (Abb.18 & Abb.19).

Die Wahl des Transfektionsvolumens hatte einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg der Transfektion. Die größte Effizienz wurde erzielt, wenn der Lipid-DNA-Komplex in einem geringen Volumen direkt auf den Zellen inkubiert wurde. Aufgrund der Toxizität des Transfektionsreagenz wurden die HeLa-Zellen unter diesen Bedingungen stark angegriffen. Um das Überleben der Zellen zu garantieren, mußte 4h nach Transfektion ein Mediumwechsel durchgeführt werden. In transfizierten HeLa-Zellen konnte eine deutliche Verminderung die Expression von Lamin A und Lamin C nachgewiesen werden (Abb. 18). Offensichtlich erfolgte der Transfer der siRNA in kleinen Volumina mit einer größeren Effizienz, sodass hier bereits mit geringen Mengen siRNA deutliche Effekte erzielt wurden.

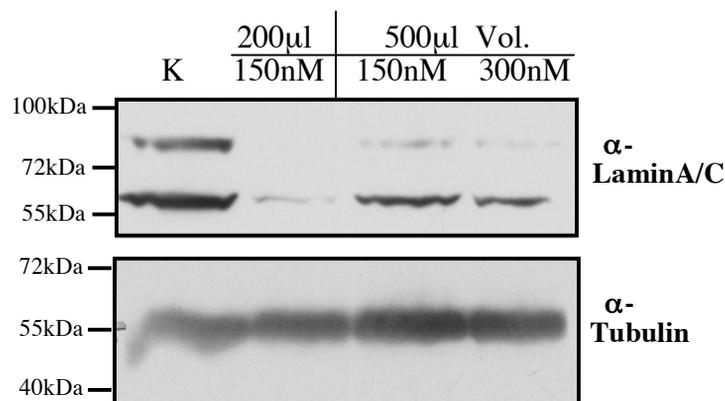


Abb.18: Verminderung der Proteinexpression von LaminA/C in HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden mit der synthetischen α -Lamin A/C-siRNA transfiziert und nach 48h die Zellextrakte im Western Immunoblot untersucht. Es konnte eine deutliche Verminderung der Expression von Lamin A und C festgestellt werden; die Effizienz hing wesentlich vom Transfektionsvolumen ab. In der Analyse der Extrakte im WB mit dem α -Tubulin-Antikörper wurde bestätigt, dass vergleichbare Proteinmengen untersucht wurden.

Mit dem synthetischen α -JNK1-siRNA-Oligo konnte in HeLa-Zellen im Gegensatz zu Hepatomazellen in Abhängigkeit vom verwendeten Reaktionsvolumen eine deutliche Verminderung der JNK1-Expression erzielt werden. In Western Immunoblotanalysen wurde in Extrakten von transfizierten Zellen im Vergleich zu Extrakten von nicht-transfizierten Zellen deutlich weniger JNK1 nachgewiesen (Abb. 19).

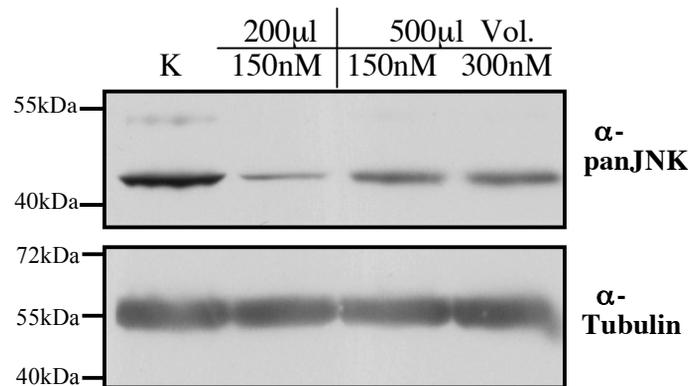


Abb.19: Verminderung der Proteinexpression von JNK1 in HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden für 48h mit dem α -JNK1-siRNA-Oligo transfiziert und die Zelllysate anschließend im WB analysiert. Im Gegensatz zur Kontrolle (K) wurde in transfizierten Zellen deutlich weniger JNK1 exprimiert. Die Effizienz war hier erneut abhängig vom Reaktionsvolumen. Eine Analyse des WB mit dem α -Tubulin-Antikörper bestätigte, dass die beobachteten Effekte nicht auf unterschiedliche Proteinmengen in den Extrakten zurückzuführen waren.

Ein Erfolg der Verminderung der JNK1-Expression mit der synthetischen α -JNK1-siRNA von Dharmacon schien von der Zelllinie abzuhängen. In HeLa-Zellen konnte die Proteinexpression deutlich manipuliert werden. Für unsere Versuche wäre jedoch ein Effekt der siRNA in den Hepatomazellen entscheidend gewesen, der hier jedoch nicht mit der erforderlichen Effizienz erzielt werden konnte. Bei der Auswahl nur eines siRNA-Oligos zur Manipulation der Proteinexpression besteht die Gefahr, dass die ausgewählte Sequenz im verwendeten System nicht zu einem brauchbaren Ergebnis führt. Alternativ zu den synthetischen Oligos, die nur gegen jeweils ein 21bp-großes Teilstück der Zielsequenz gerichtet sind, besteht die Möglichkeit zur Generierung von siRNA-Pools. Diese enthalten ein Vielfaches von 21bp großen Fragmenten, die gegen das gesamte Genprodukt gerichtet sind, da die komplette Sequenz als Vorlage zur Synthese der dsRNA dient. Mit Hilfe eines ShortCut siRNA-Kits von NEB wurden siRNA-Pools der humanen MAPK JNK sowie MEK hergestellt. Mit den siRNA-Gemischen konnten jedoch weder in HepG2- noch in HeLa-Zellen eine effektive Manipulation der Proteinexpression erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

Da mit siRNA keine flächendeckende Verminderung der Expression von MAPK in Hepatomazellen erreicht wurde, konnte mit diesem Ansatz nicht der Beweis erbracht werden, dass in infizierten Zellen Wirtszell-MAPK mit der PVM assoziierten, dort aktiviert und folgend in Immunfluoreszenzanalysen nachgewiesen wurden.

3.4 Behandlung von *Plasmodium*-infizierten Zellen mit MAPK-Inhibitoren

Folgend sollte untersucht werden, welchen Einfluss MAPK-Inhibitoren auf die Phosphorylierungsmuster in der PVM und eventuell auch auf den Parasiten haben. Zunächst wurde in einem Proliferationsassay die Inhibitormenge bestimmt, bei der die Hepatomazellen in ihrer Proliferation nur geringfügig beeinflusst wurden (Abb. 20). Ab einer Inhibitormenge von 50 μ M wurde der Thymidineinbau in die DNA und damit das Wachstum der Hepatomazellen beeinträchtigt. Die Inhibitoren wurden folgend bei infizierten Zellen in Mengen von 5-50 μ M eingesetzt.

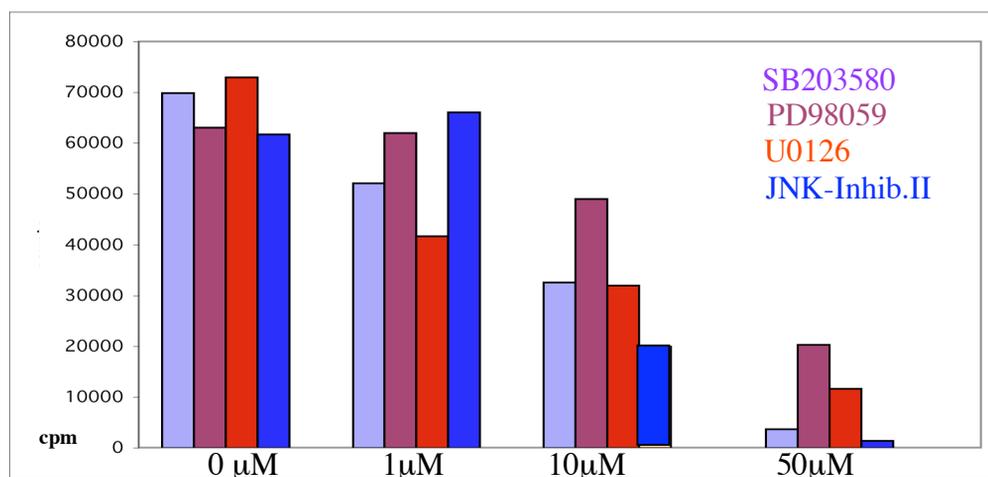


Abb. 20: Konzentrationsabhängige Inhibition des Hepatomazellwachstums durch MAPK-Inhibitoren. HepG2-Zellen wurden in Anwesenheit von verschiedenen MAPK-Inhibitoren kultiviert. Nach 19h wurde dem Medium für weitere 5h radioaktiv-markiertes Thymidin zugesetzt. Die Zellen wurden anschließend geerntet und die Menge an eingebauter Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen. Mit steigender Inhibitormenge wurden weniger radioaktive Zerfälle gemessen, d. h. die Zellen wurden in ihrer Proliferation stärker beeinflusst.

Durch den Einsatz von SB203580 kann spezifisch die MAPK p38 inhibiert werden. Eine Inkubation von infizierten Hepatomazellen mit diesem Inhibitor hatte zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung einen Einfluß weder auf die Proliferation des Parasiten noch auf die Phosphorylierungsmuster in der PVM oder in der PV. Des Weiteren wurde die Wirkung des p38-Inhibitors SB202190 untersucht, der ebenfalls spezifisch mit der ATP-Bindungsstelle in

der Kinase interagiert. Auch hier wurde keine Beeinflussung des Parasitenwachstums festgestellt.

Eine Inhibierung von ERK kann sowohl durch U0126 als auch durch PD98059 erreicht werden. Beide Chemikalien binden nicht wie andere MAPK-Inhibitoren an die ATP-Bindungsstelle der MAPK, sondern verhindern ihre Aktivierung durch Blockierung der MAPKK MEK. Trotz der Abwesenheit eines typischen MEK-Homologs im Plasmodien-Kinom konnte eine deutliche Wirkung des MEK-Inhibitors U0126 auf die Parasitenproliferation in der exo- und erythrozytäre Phase der Infektion festgestellt werden.

Abbildung 21 zeigt Hoechst-Färbungen von *P.berghei*-infizierten HepG2-Zellen, die 6h p.I. und 24h p.I. für weitere 24h mit 50 μ M U0126 inkubiert wurden. Anhand der DNA-Färbung wurden die Parasiten hinsichtlich ihres Entwicklungsstandes charakterisiert. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle hatten sich die Parasiten nach Inhibitorzugabe nicht mehr weiterentwickelt (Abb.21, Pfeile). Der Zellzyklus und das Parasitenwachstum wurden deutlich blockiert. Die Zugabe des Inhibitors hatte jedoch 48h p.I. keine Blockierung der weiteren Parasitenproliferation zur Folge. Zudem konnte nach der Behandlung mit U0126 keine wesentliche Reduzierung der Phosphorylierungen in der PVM von infizierten Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

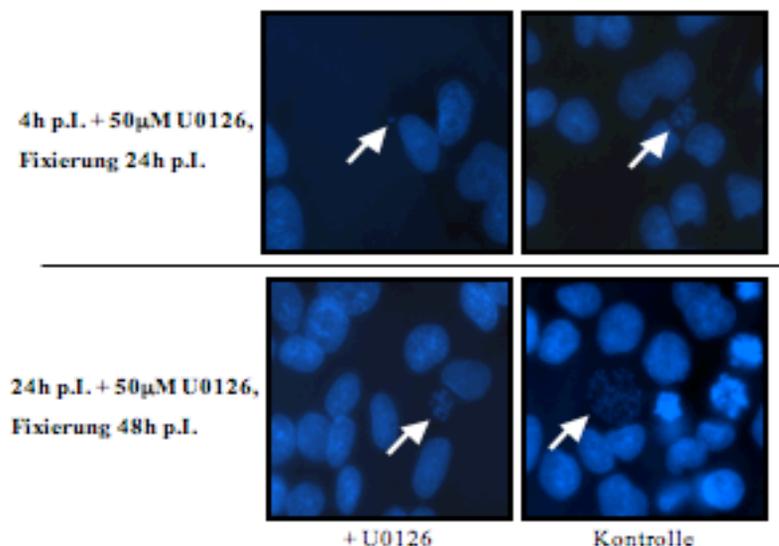


Abb. 21: U0126 blockierte die Entwicklung von *P.berghei* in den frühen Stadien der Leberphase.

P.berghei-infizierte HepG2-Zellen wurden 6h bzw. 24h p.I. für weitere 24h mit U0126 inkubiert und die Zellkerne nach Fixierung mit dem Hoechst33258-Farbstoff (blau) gefärbt. Im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle wurden die behandelten Parasiten in ihrer Proliferation deutlich blockiert.

Der MEK-Inhibitor PD98059 hatte weder einen Einfluss auf die Phosphorylierungen in der PVM von infizierten Zellen noch auf die Entwicklung des Parasiten im Leberstadium. In der erythrozytären Phase der Infektion war PD98059 ebenfalls wirkungslos, wohingegen die Inkubation von *P.falciparum*-infizierten Erythrozyten im Ringstadium der Infektion mit dem Inhibitor U0126 zu einer deutlichen Blockierung der Parasitenentwicklung führte. Ähnlich wie im exo-erythrozytären Stadium schien der Inhibitor nur auf die frühen Entwicklungsstadien einen Einfluss zu haben (Daten nicht gezeigt).

Die Inhibierung der MAPK JNK kann durch den JNK-Inhibitor-II (SP600125) erreicht werden, der an die ATP-Bindungsstelle im aktiven Zentrum der Kinase bindet. Eine Behandlung infizierter HepG2-Zellen mit diesem Inhibitor hatte jedoch weder Einfluß auf die Proliferation des Parasiten noch auf die Tyrosinphosphorylierungsmuster in der PVM. Immunfluoreszenzanalysen von zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung behandelten Zellen wiesen gegenüber den unbehandelten Kontrollen keine Unterschiede in den α -Exp1-, α -P-Tyrosin- oder α -P-JNK-Färbungen auf. Die DNA-Färbung zeigte deutlich, dass sich die behandelten Parasiten jeweils im gleichen Entwicklungsstadium wie die unbehandelten Plasmodien befanden (Daten nicht gezeigt).

Alle MAPK-Inhibitoren wurden ebenfalls im Hinblick auf ihre Wirkung auf das erythrozytäre Stadium der *P.falciparum*-Infektion untersucht. Auch in dieser Phase der Entwicklung schien nur der MEK-Inhibitor U0126, nicht jedoch einer der anderen MAPK-Inhibitoren, Einfluss auf die Proliferation des Parasiten zu nehmen.

3.5 Versuche zur Identifizierung des α -Phospho-p38-positiven Parasitenproteins

3.5.1 Nachweis eines α -Phospho-p38-positiven Parasitenproteins in der exo-erythrozytären Phase der *P.berghei*-Infektion

Mit dem α -Phospho-p38-Antikörper wurden in *P.berghei*-infizierten Hepatozyten die Zellkerne der Parasiten deutlich angefärbt. Da Immunfluoreszenzanalysen mit Antikörpern gegen die komplette, aber inaktive Form von p38 keine vergleichbare Färbung zeigten (Daten nicht gezeigt), handelte es sich vermutlich um eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit einem Parasitenprotein. Zudem hatten p38-Inhibitoren weder einen Einfluß auf die Phosphorylierungsmuster in infizierten Zellen noch auf die Proliferation des Parasiten in der exo- und erythrozytären Phase der Infektion (3.4). Abb. 22 zeigt primäre Maushepatozyten, die 24h und 48h nach Infektion mit dem α -P-p38-Antikörper gefärbt wurden. Die mit dem α -P-p38-Antikörper in Maushepatozyten detektierten Phosphorylierungsmuster konnten in Immunfluoreszenzanalysen von infizierten Hepatomazellen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Immunfluoreszenzfärbungen mit dem α -Phospho-p38-Antikörper eines anderen Herstellers machten deutlich, dass es sich bei dem detektierten Signal nicht um ein Antikörperartefakt zu handeln schien. Im *P.berghei*-Genom wurde jedoch bisher keine kodierende Sequenz für ein mit p38-homologes Parasitenprotein identifiziert.

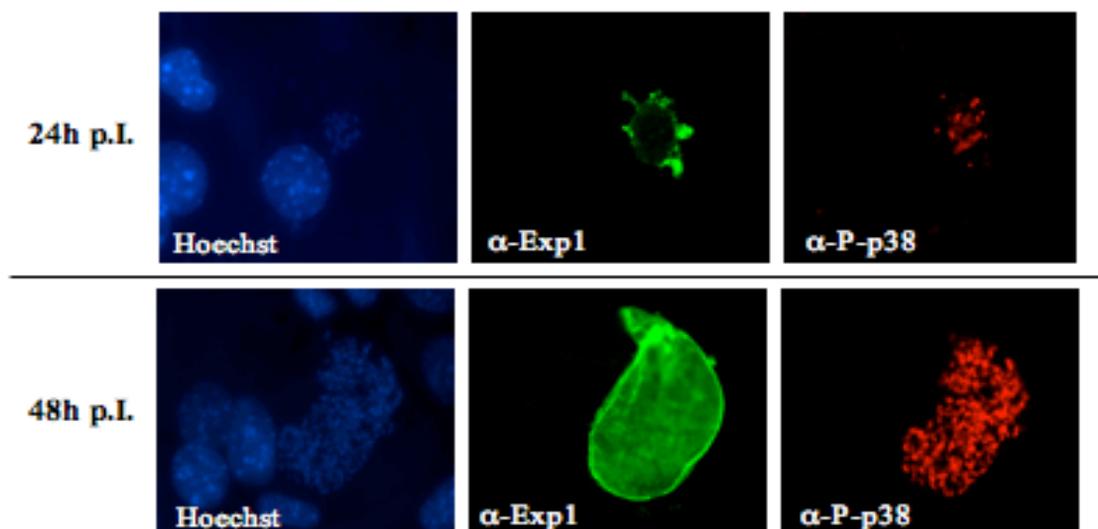


Abb. 22: α -P-p38-Antikörper detektierte in Immunfluoreszenzfärbungen von infizierten Maushepatozyten die Parasitenzellkerne. Mit *P.berghei*-infizierte, primäre Maushepatozyten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion fixiert und mit dem α -Exp1- (Cy2, grün) und dem α -P-p38-Antikörper (Cy3, rot) gefärbt. Während der gesamten hepatozytären Entwicklung wurden mit dem α -Phospho-p38 Antikörper die Parasitenzellkerne angefärbt. Die Kerne der Hepatozyten und der Parasiten wurden mit dem Hoechst33258-Farbstoff (blau) gefärbt.

Folgend sollte die Identität des Parasitenproteins geklärt werden, das ein mit p38 vergleichbares Phosphorylierungsmotiv zu enthalten schien. In Western Immunoblot-Analysen wurde in Extrakten infizierter HepG2-Zellen neben dem p38-Protein der Wirtszelle zusätzlich ein Parasitenprotein von ungefähr 75 kDa detektiert (Daten nicht gezeigt). Für eine Isolierung mittels Immunpräzipitation aus *P.berghei*-infizierten HepG2-Zellen reichte die Menge des Parasitenproteins jedoch nicht aus. Immunfluoreszenzanalysen von *P.berghei*-infizierten, roten Blutzellen machten deutlich, dass der α -Phospho-p38-AK im erythrozytären Stadium der Infektion ebenfalls Phosphorylierungen im Parasiten detektierte (Daten nicht gezeigt). Western Immunoblot-Analysen von Zellextrakten aus infiziertem Vollblut zeigten, dass auch hier eine Bande von 75 kDa detektiert wurde (Abb. 23). Ein Vergleich mit Leukozytenextrakten bestätigte, dass es sich bei dem detektierten Protein um ein Parasitenprotein handelte.

3.5.2 Spontan auftretende Dephosphorylierungen des α -Phospho-p38-positiven Parasitenproteins erschwerten seine Isolierung

Da das mit dem α -Phospho-p38-Antikörper nachgewiesene Parasitenprotein ebenfalls im erythrozytären Stadium der Infektion exprimiert zu werden schien, wurde der Versuch einer Isolierung aus Vollblut von *P.berghei*-infizierten Mäusen unternommen. Hierbei erwies sich die Instabilität der Phosphorylierung als Hauptproblem, aufgrund derer eine Identifizierung des Proteins nicht möglich war. Abb. 23 zeigt den Western Immunoblot einer Immunpräzipitation (IP) mit dem α -Phospho-p38-Antikörper.

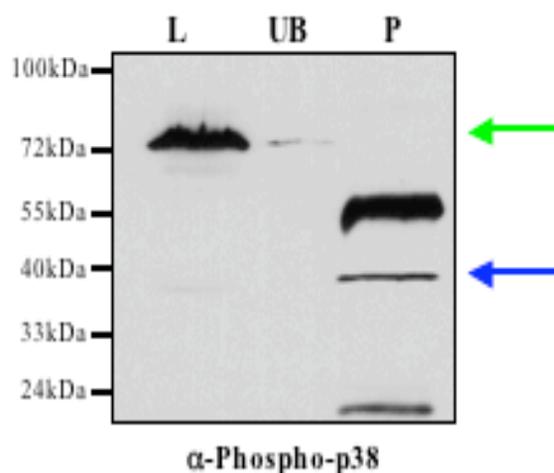


Abb. 23: IP des α -p38-positiven Parasitenproteins aus infizierten Erythrozyten. *P.berghei*-Parasiten wurden aus Vollblut isoliert und mit dem Parasitenlysat eine Immunpräzipitation mit dem α -P-p38-Antikörper durchgeführt. Im Ausgangslysat (L) war das phosphorylierte Parasitenprotein deutlich nachweisbar, wohingegen es in der ungebundenen Fraktion (UB) kaum noch detektierbar war (grüner Pfeil). Die Präzipitationsfraktion enthielt kein angereichertes Protein, obwohl eine Ankonzentration der im Ausgangslysat nur schwach nachweisbaren, aktivierten p38-MAPK der Wirtszelle und Leukozyten erreicht werden konnte (blauer Pfeil).

Die p38-MAPK aus den im Vollblut enthaltenen Leukozyten und Erythrozyten wurde mit Hilfe des α -Phospho-p38-Antikörpers präzipitiert (Abb.23, P). Hier wurde durch die Präzipitation eine Anreicherung des Proteins erreicht, das im Ausgangslysat nur schwach detektierbar war (Abb.23, L, blauer Pfeil). Das Parasitenprotein hingegen, das im Western Immunoblot direkt nach der Lyse deutlich nachgewiesen werden konnte (Abb.23, L), unterlag im Verlauf der Präzipitation einer massiven Dephosphorylierung. In der ungebundenen Fraktion (Abb.23, UB, grüner Pfeil) wurde nach der Präzipitation eine wesentlich geringere Menge des phosphorylierten Proteins detektiert. In der Präzipitationsfraktion konnte im Western Immunoblot mit dem α -Phospho-p38-Antikörper kein phosphoryliertes, 75kDa großes Protein nachgewiesen werden (Abb.23, P). Alle Fraktionen wurden ebenfalls einer Proteinfärbung im Coomassiegel unterzogen (Daten nicht gezeigt). Hier wurde deutlich, dass die Dephosphorylierung bereits während der Inkubationszeit erfolgt sein mußte, da in der Präzipitationsspur keine Proteinbande von 75kDa Größe nachgewiesen werden konnte. Klar sichtbar waren hingegen sowohl im Western Immunoblot als auch im Coomassiegel die schweren (55 kDa) und die leichten (25 kDa) Ketten des polyklonalen Antikörpers.

Indem die Interaktionen zwischen Antigen und Antikörper in diesem Fall entscheidend über die zwei phosphorylierten Aminosäurereste des Epitops vermittelt wurden, führte die Dephosphorylierung zu einer Abnahme der Stringenz der Bindung und minderte somit den Erfolg einer Präzipitation des Proteins erheblich.

Durch den Einsatz von verschiedenen Phosphataseinhibitoren sollte eine Stabilisierung der Phosphorylierung im Parasitenprotein erreicht werden. Des Weiteren wurde durch die Variierung von Lysis- und Waschpuffer, Inkubationszeiten und -temperaturen die Stringenz der Versuchsbedingungen verändert (Tab.4). Trotz verschiedener Versuche zur Optimierung der Versuchsdurchführung konnte das Parasitenprotein über das Phosphorylierungsmotiv in Immunpräzipitationen nicht isoliert werden.

Parameter	
Lysepuffer mit Inhibitoren	<ul style="list-style-type: none"> • Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren (PI) • Lysepuffer mit PI und 1-10mM Natrium-Orthovanadat • Phospho-Safe-Puffer mit PI: <ul style="list-style-type: none"> Natriumfluorid Natrium-Orthovanadat β-Glycerolphosphat Natriumpyrophosphat (keine Konzentrationsangaben) • Phosphatase-Inhibitor-Cocktail: <ul style="list-style-type: none"> 10mM Natriumfluorid 10mM 4-Nitrophenylphosphat 10mM 4-Natrium-Pyrophosphat 10mM β-Glycerolphosphat 10mM Natrium-Orthovanadat
Inkubationszeit	<ul style="list-style-type: none"> • Ag-AK-Bindung: <ul style="list-style-type: none"> - 12h 4°C - 4h 4°C - 2h RT • Bindung an die ProteinA/G-Sepharose: <ul style="list-style-type: none"> - 1-4h 4°C - 30min-1h RT
Stringenz	<ul style="list-style-type: none"> • Lysepuffer: 20mM Tris-HCl, pH 7,5 150mM NaCl 1mM EDTA, 1mM EGTA 1% Triton-X-100 (nach d. IP 2x Waschen mit LP, 1x mit Tris-HCl) • HNET-Puffer (3x Waschen mit HNET, 1x mit PBS) • Phospho-Safe-Puffer (3x mit PSP Waschen)

Tab.4: Variierung der Versuchsparameter zur Optimierung der Immunpräzipitation mit dem α-Phospho-p38-Antikörper

3.5.3 Isolierung des α -P-p38-positiven Parasitenproteins mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese.

Voraussetzung für die erfolgreiche Isolierung und die Identifizierung des p38-Homologs durch eine Immunpräzipitation vermittelt über Antigen-Antikörper-Bindung war eine stabile Phosphorylierung des Parasitenproteins. Da diese auf Dauer nicht gewährleistet werden konnte, wurde der Versuch einer Isolierung mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese unternommen. Das Parasitenprotein konnte im Western Immunoblot über seine Phosphorylierung identifiziert werden, eine erfolgreiche, zweidimensionale Auftrennung des Parasitenproteins erwies sich jedoch als problematisch. Eine optimale isoelektrische Fokussierung wurde beim Einsatz von geringen Proteinmengen erreicht, die für eine MALDI-Analyse jedoch nicht ausreichten. Abb. 24 A zeigt einen mit dem α -P-p38-AK im Western Immunoblot detektierten Proteinpunkt, die der erwarteten Größe von 75kDa entsprach. Dem erhaltenen Signal konnte jedoch kein klar abgrenzbares Protein im Coomassiegel zugeordnet werden.

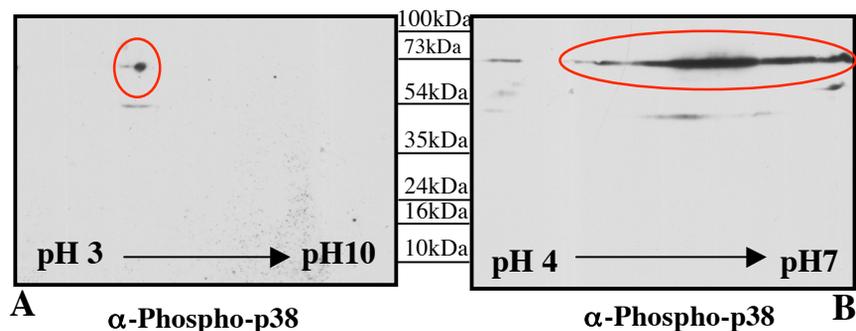


Abb. 24: Isolierung des α -P-p38-positiven Parasitenproteins mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese mit anschließendem WB. Parasitenlysate wurden einer zweidimensionalen Gelelektrophorese mit anschließendem Western Immunoblot unterzogen. Beim Einsatz von geringen Proteinmengen konnte das Parasitenprotein erfolgreich fokussiert werden (A); dem im WB detektierten Signal konnte im Coomassiegel jedoch kein Proteinpunkt zugeordnet werden. Bei Erhöhung der Proteinkonzentration und einer Einschränkung des pH-Bereichs traten Probleme hinsichtlich der Solubilisierung und der Fokussierung des Parasitenproteins in der 1. Dimension auf. Das Phospho-Protein wurde im WB nun nicht mehr als Punkt, sondern als Bande nachgewiesen, die sich über die gesamte 2. Dimension erstreckte (B).

Als Konsequenz wurde die eingesetzte Proteinmenge erhöht. Die Proteine mußten anschließend aus dem größeren Volumen durch Fällung angereichert werden. Die erneute Solubilisierung des Proteins erwies sich als schwierig. Zudem ergaben sich bei einer Erhöhung der Proteinkonzentration Probleme bei der Fokussierung des Phospho-Proteins.

Wie in Abb. 24 B gezeigt, erstreckte sich das Protein infolge einer ungenügenden isoelektrischen Fokussierung über die gesamte 2. Dimension. Zur Optimierung der Fokussierung wurden verschiedene Parameter der Durchführung verändert:

- Variierung der Ampholytmenge von 0,5% bis 1,5%
- Verlängerung der Solubilisierungszeit von 1h auf bis zu 12h
- Verlängerung der Rehydrierungsphase von 12h auf bis zu 24h
- Variierung der Spannungsverhältnisse und der Laufzeiten der 1.Dimension

Trotz der Versuche zur Optimierung der Isolierung des Proteins konnte die Identität des α -P-p38-positiven Parasitenproteins nicht geklärt werden.

3.6 Immunfluoreszenzanalysen mit α -PfMAPK1-Peptidantikörper

Da eine Kreuzreaktion der α -Phospho-Antikörper mit Parasitenproteinen nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde folgend untersucht, ob mit Antikörpern gegen Parasiten-MAPK vergleichbare Muster in infizierten Hepatomazellen detektieren werden konnten. Zu diesem Zweck wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit *P.falciparum*-spezifischen Antikörpern durchgeführt, die gegen Peptidsequenzen der PfMAPK 1 generiert und uns von der Arbeitsgruppe von C. Doerig aus Glasgow zur Verfügung gestellt wurden. Die humanen MAPK enthalten keine mit diesen Epitopen identischen Sequenzen.

Mit den α -*P.falciparum*-MAPK1-Antikörpern konnten in Immunfluoreszenzanalysen in *P.berghei*-infizierten HepG2-Zellen Bereiche sowohl in der PVM als auch in der PV detektiert werden. Beispielhaft zeigten Doppelfärbungen mit dem α -Exp1-Antikörper, dass der α -PfMAPK1-Antikörper gegen ein Peptid aus der Kinase-Domäne der Parasitenkinase (s. Anhang III) deutlich Teile der PVM anfärbte. Des Weiteren wurde in Immunfluoreszenzanalysen eine partielle Co-Lokalisation der α -Phospho-Tyrosin- mit den α -PfMAPK1-positiven Parasitenproteinen nachgewiesen, die in der PVM inseriert oder mit ihr assoziiert vorlagen (Abb. 25, obere Reihe). In Untersuchungen von infizierten HepG2-Zellen mit dem Antikörper gegen Parasiten-HSP90 als Zytosolmarker wurde deutlich, dass mit den α -PfMAPK1-Antikörpern zusätzlich zu den Mustern in der PVM und PPM (Parasitenplasmamembran) auch das Parasitenzytosol angefärbt wurde (Abb. 25, untere Reihe). In *P.berghei* schien es zu der *P.falciparum*-MAPK1 ähnliche Proteine zu geben, die in infizierten Hepatozyten zytosolisch und membranassoziiert vorlagen. Diese Proteine schienen zudem in der PVM Tyrosin-phosphoryliert zu werden.

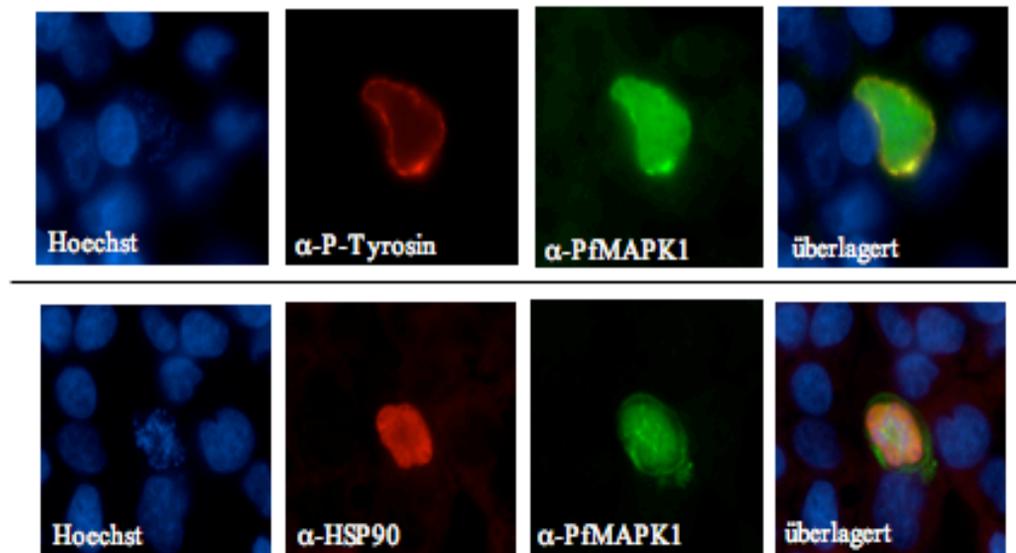


Abb. 25: α -PfMAPK1-Antikörper detektierten in Immunfluoreszenzanalysen von *P. berghei*-infizierten HepG2-Zellen Bereiche der PVM und der PV. *P. berghei*-infizierte Hepatomazellen wurden 48h p.I. fixiert. In Immunfluoreszenzanalysen konnte eine partielle Co-Lokalisation der durch den α -PfMAPK1- (Cy2, grün) und α -P-Tyrosin-Antikörper (Alexa 594, rot) detektierten Bereiche in der PVM nachgewiesen werden (obere Reihe). In Doppelfärbungen mit dem α -HSP90-Antikörper (Cy3, rot) wurde bestätigt, dass mit dem α -PfMAPK1-Antikörper ebenfalls die PV angefärbt wurde (untere Reihe). Die Kerne der Parasiten und der Hepatomazellen wurden mit dem Hoechst33258-Farbstoff (blau) detektiert.

3.7 Charakterisierung von *P.berghei*-Mitogen-aktivierten Proteinkinasen

In GeneDB sind große Bereiche des Genoms von *P.berghei* bereits veröffentlicht und im Hinblick auf Homologien zu bekannten Proteinen charakterisiert worden. Anhand typischer MAPK-Domänen wurden zwei Sequenzen als putative PbMAPK1 (PB000806.03.0) und PbMAPK2 (PB000659.00.0) identifiziert (s. Anhang I und II).

Ein Vergleich der Phosphorylierungsmotive verschiedener humaner MAPK resultiert in einer Konsensussequenz, die als Aktivierungsrippe unter den MAPK hoch konserviert ist. Ein entsprechendes Epitop wurde auch in den Sequenzen der putativen *Plasmodium*-MAPK identifiziert, das folglich von den α -P-MAPK-Antikörpern erkannt werden konnte (Abb. 26):

ERK:	193GFL	TEYVATR WYR	APE.....	215
JNK:	173FMM	TPYV VTRY YR	APE.....	195
P38:	170XEM	TGYV XTRWYR	APE.....	192
P.f.MAPK1:	174PIL	TDYVATR WYR	APE.....	196
P.b.MAPK1:	195PVL	TDYVATR WYR	APD.....	210
P.f.MAPK2:	280KQL	TSHV VTRWYR	APE.....	302
P.b.MAPK2:	297KQL	TSHV VTRWYR	APE.....	313

Abb. 26: Alignment der Phosphorylierungssequenz verschiedener MAPK.

MAPK werden im Rahmen ihrer Aktivierung an einem Threonin und einem Tyrosin (rot hervorgehoben) in einer Konsensussequenz phosphoryliert, deren Aminosäureabfolge zwischen den verschiedenen Kinasen konserviert ist. Die Epitope der putativen *P.berghei*- (P.b) und der *P.falciparum*-(P.f.) MAPK1 und 2 sind fast identisch und weisen hohe Homologien zu denen humaner MAPK (ERK, JNK, p38) auf.

3.7.1 mRNA-Synthese von PbMAPK1 und PbMAPK2 im Entwicklungszyklus des Parasiten

In RT-PCR-Analysen wurde untersucht, in welchen Stadien der *P.berghei*-Infektion eine mRNA-Synthese der oben beschriebenen Parasitenkinasen nachgewiesen werden konnte. Zu diesem Zweck wurden anhand der in GeneDB-annotierten Sequenzen der putativen P.b.MAPK1 und 2 Primer konstruiert, die zur Amplifikation der kodierenden Sequenzen aus cDNA verschiedener Entwicklungsstadien eingesetzt wurden. Es zeigte sich, dass die PbMAPK1-mRNA sowohl in den Moskito- als auch in den Vertebratenstadien der Infektion hergestellt wurde (Abb. 27, obere Reihe). Da Transkripte der PbMAPK2 nur im erythrozytären Stadium der Infektion nachgewiesen werden konnten (Abb. 27, zweite Reihe), wurde diese Kinase in weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt. Zur Kontrolle der RNA-

Präparationen wurde in allen Ansätzen ebenfalls ein Nachweis der mRNA-Transkription des konstitutiv synthetisierten Parasitentubulins erbracht (Abb. 27, untere Reihe).

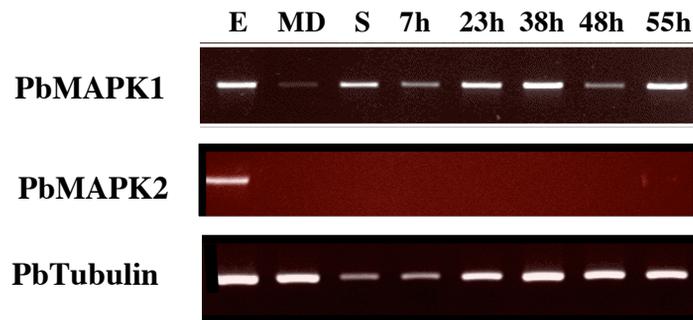


Abb. 27: Stadienspezifische Synthese der PbMAPK1- und -2-mRNA. mRNA aus allen Entwicklungsstadien von *P.berghei* wurde in RT-PCR-Analysen zur Amplifikation der putativen PbMAPK1&2 eingesetzt. Transkripte der MAPK1 konnten sowohl in der erythrozytären Phase (E), als auch im Moskito-Stadium (Mitteldarmoozysten (MD), Sporoziten (S) und in allen untersuchten Stadien der exo-erythrozytären Phase (7h – 55h) nachgewiesen werden. Die PbMAPK2 wurde nur in der erythrozytären Phase exprimiert.

3.7.2 Klonierung und rekombinante Expression der PbMAPK1 als GST-Fusionsprotein in *E.coli*

Folgend wurde die Sequenz der putativen PbMAPK1 in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert. Die Ligation der DNA-Sequenz in den Vektor pGEX6P-1 erlaubte eine N-terminale Fusion mit der für die Glutathion-S-Transferase kodierenden Sequenz. Das GST-PbMAPK1-Fusionsprotein wurde in BL21-Zellen rekombinant exprimiert, die zusätzlich das RIG-Plasmid trugen. Dieser Vektor trägt die kodierenden Sequenzen von seltenen tRNAs, die die rekombinante Expression des Parasitenproteins in Bakterien unterstützen sollten (Baca and Hol, 2000).

Das rekombinante Protein setzte sich aus der in GeneDB annotierten, kodierenden Sequenz der PbMAPK1 (ungefähr 37kDa) und der Glutathion-S-Transferase (ungefähr 25kDa) zusammen, sodass bei vollständiger Expression ein 62kDa großes Fusionsprotein erwartet werden konnte. Eine Analyse der Proteinextrakte im Coomassie-gefärbten Proteingel zeigte deutlich, dass in transformierten Bakterien zwei fast gleich große Formen der rekombinanten Kinase exprimiert wurden (Abb. 28). Zudem wurde das Fusionsprotein bereits während der rekombinanten Expression teilweise degradiert. Beide Formen der Kinase sowie die verkürzten Proteine konnten zudem in Western Immunoblotanalysen von Bakterienextrakten als GST-Fusionsproteine mit einem Antikörper gegen die Glutathione-S-Transferase nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Eine Verminderung der Induktionstemperatur von 37°C auf Raumtemperatur (22-25°C) oder 18°C und eine Variierung der Induktionsdauer (1h-12h) sowie der Menge des eingesetzten IPTG (0,05-2 mM) führten nicht zu einer Stabilisierung des rekombinanten Proteins. Die Veränderung der Expressionsbedingungen hatte auch keinen positiven Einfluss auf die Löslichkeit der rekombinanten *Plasmodium*-Kinase: Nach Trennung der Bakterienextrakte in zytoplasmatische Fraktion und Membranfraktion wurde der Großteil des Fusionsproteins in der Pelletprobe nachgewiesen (Abb. 28, P). Mit Hilfe von Glutathion-beladener Sepharose konnte das in geringen Mengen löslich vorliegenden PbMAPK1-GST-Fusionsprotein (Abb. 28, L) aufgereinigt werden (Abb. 28, B). Durch Zugabe von Glutathion sollte die reversible Bindung des rekombinanten Proteins an die Beads wieder gelöst werden. Nur 50% der rekombinanten Kinase konnte auf diese Weise von den Sepharose-Beads eluiert werden (Daten nicht gezeigt).

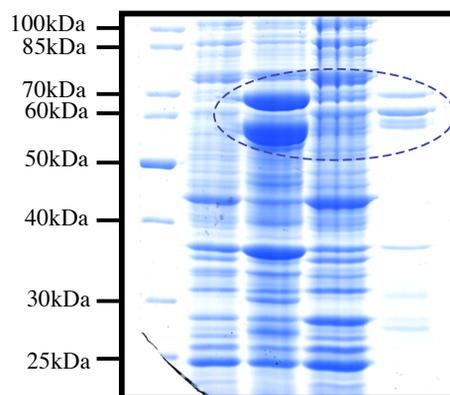


Abb. 28: Rekombinante Expression & Aufreinigung der PbMAPK1 als GST-Fusionsprotein. Die putative PbMAPK1 wurde als GST-Fusionsprotein in BL21-Zellen rekombinant exprimiert. Nach Trennung der Bakterienextrakte in zytoplasmatische Fraktion und Membranfraktion wurden der Großteil des rekombinanten Proteins im Coomassiegelel als unlösliches Präzipitat im Pellet detektiert (P). Der lösliche Anteil (L) konnte in einer Affinitätsaufreinigung effektiv mit GST-Sepharose aufgereinigt werden (B).

3.7.3 Immunfluoreszenzanalysen mit α -*P.berghei*-MAPK1-GST-Antiserum vor und nach Affinitätsaufreinigung

Zur Generierung von Antikörpern wurden Mäuse mit dem rekombinanten PbMAPK1-GST-Fusionsprotein immunisiert. Da der Großteil des rekombinanten Proteins nach Induktion unlöslich in der Pelletfraktion vorlag, wurde für die erste Immunisierung ein Aliquot der Membranprobe in PBS durch Sonifizierung weitgehend solubilisiert und den Mäusen in Kombination mit dem kompletten Freund's Adjuvanz intra peritoneal injiziert. Die folgenden zwei Immunisierungen in zweiwöchigem Abstand wurden mit einer Mischung aus eluiertem und an Beads gekoppeltem Fusionsprotein durchgeführt. Nach 7 Wochen wurde das Antiserum aus den Mäusen gewonnen.

Ein Aliquot des Serums wurde einer Affinitätsaufreinigung unterzogen. Als Affinitätsmatrix diente die PbMAPK1 in Fusion mit 10 Histidinresten (siehe auch 3.7.5). In Abb. 29 sind

Immunfluoreszenzfärbungen verschiedener Stadien der exo-erythrozytären Entwicklung gezeigt, in denen die Färbemuster des Serums vor und nach Affinitätsaufreinigung gegenübergestellt wurden. Mit dem unaufgereinigten Serum wurden in den ersten 48h der Infektion deutlich Strukturen innerhalb der PV angefärbt, die sich gegen Ende der Leberphase aufzulösen schienen. Das aufgereinigte Antiserum detektierte dagegen Bereiche in der PV und der PVM. Kurz vor der Freisetzung der Merozoiten aus den Hepatomazellen konzentrierten sich die Färbemuster auf das Parasitenzytoplasma. Folglich konnten durch die Affinitätsaufreinigung PbMAPK1-spezifische Antikörper erfolgreich ankonzentriert und unspezifische Antikörper gegen z.B. den GST-Teil des Fusionsproteins aus dem Serum entfernt werden.

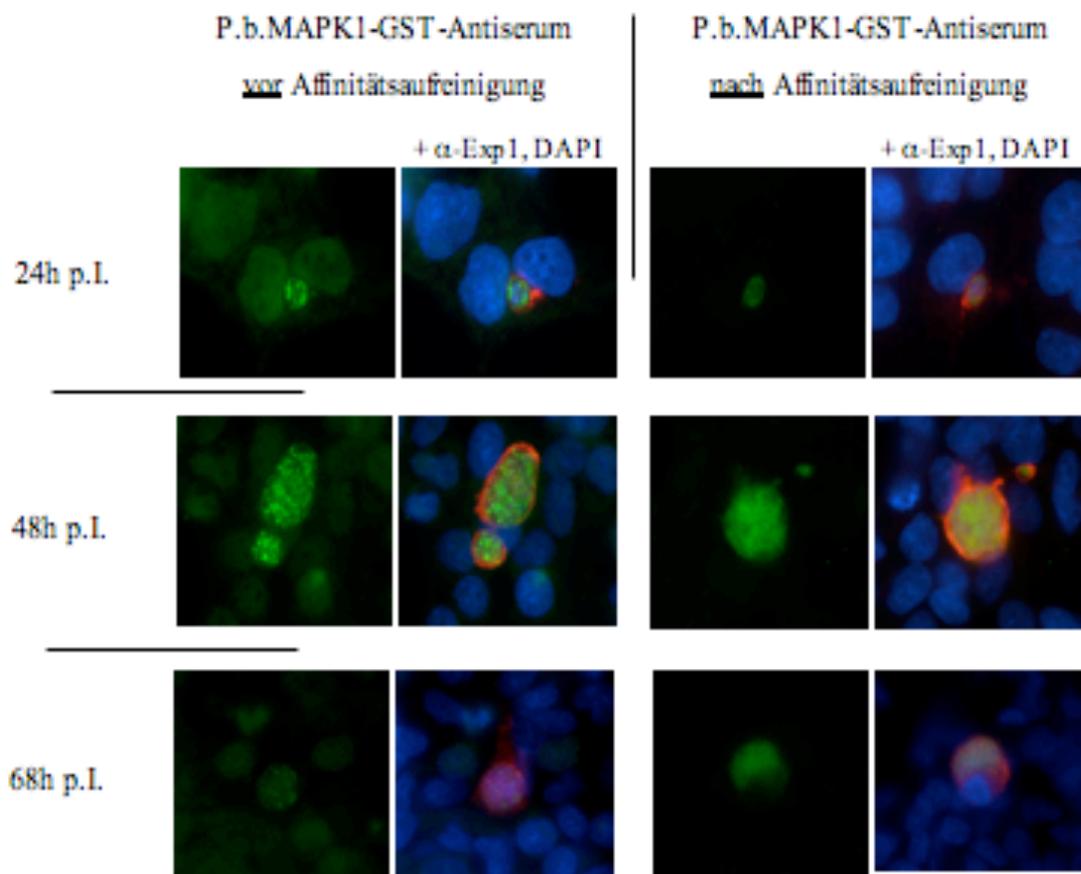


Abb. 29: Vergleichende Immunfluoreszenzanalysen des α -PbMAPK1-GST-Antiserum vor und nach Affinitätsaufreinigung. *P.berghei*-infizierte HepG2-Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert und in Immunfluoreszenzanalysen mit dem α -PbMAPK1-GST-Antiserum vor (links) und nach (rechts) Affinitätsaufreinigung gefärbt (Cy2, grün). Die DNA wurde mit dem Hoechst33258 Farbstoff (blau), die PVM in infizierten Zellen mit dem α -Exp1-Antikörper (Cy3, rot) gefärbt.

3.7.4 Western Immunoblot-Analysen mit α -PbMAPK1-GST-Antiserum

Das α -PbMAPK1-GST-Antiserum wurde ebenfalls zum Nachweis der Parasitenkinase im Western Immunoblot eingesetzt. Da der prozentuale Anteil von Parasitenproteinen in Extrakten infizierter Hepatomazellen mengenmäßig nicht ausreichte, um in WB-Analysen aussagekräftige Signale zu erhalten, wurden die Experimente mit Extrakten von aus Vollblut isolierten Parasiten durchgeführt. In RT-PCR-Analysen konnte bereits eine Expression der PbMAPK1 im erythrozytären Stadium der Infektion bestätigt werden (Abb. 27).

Die in GeneDB annotierte Sequenz kodierte für eine putative PbMAPK1 mit einer Größe von 37kDa. Im Western Immunoblot wurden mit dem α -PbMAPK1-GST-Antiserum diverse Proteinbanden sowohl in Parasiten- als auch in HepG2-Extrakten detektiert (Abb. 30). Es schien zu keinen Kreuzreaktionen mit Proteinen aus dem Leukozytenextrakt zu kommen (Abb. 30, Spur 5). Zusätzlich zu den *P.berghei*-Extrakten wurden *P.falciparum*-Lysate analysiert. Zu diesem Zweck wurden aus *P.falciparum*-infizierten Blutkulturen die Parasiten isoliert und die gewonnenen Extrakte in zytosolische - und Membranfraktion separiert. Mit dem α -PbMAPK1-GST-Antiserum konnte in den zytosolischen *P.falciparum*-Extrakten zwei Proteine mit einer Größe von 100-130 kDa sowie ein ungefähr 26 kDa großes Protein detektiert werden (Abb. 30, Spur1). Letzteres wurde ebenfalls in der Membranfraktion nachgewiesen (Abb. 30, Spur2). Lin et. al. detektierten mit einem α -PfMAPK1-Antiserum in Gametozyten-Extrakten von *P.falciparum* ebenfalls ein 100 kDa großes Protein, das der kalkulierten Größe der PfMAPK1 entsprach und als Proform deklariert wurde (Lin et. al., 1996). Graeser et. al hingegen konnten mit einem Antiserum drei Formen der PfMAPK1 mit einer Größe von 40, 80 und 150 kDa in Lysaten der asexuellen Stadien der erythrozytären Phase identifizieren (Graeser et. al., 1997). Von allen Autoren wurde eine stadienspezifische Expression verschiedener Formen der PfMAPK1 postuliert.

In den zytosolischen *P.berghei*-Extrakten wurden mit dem α -PbMAPK1-Antiserum unter anderem Proteine mit einer Größe von 36, 50 und 72 kDa detektiert, wobei das kleinste Protein in dieser Präparation mit der größten Intensität visualisiert wurde (Abb. 30, Spur 3). Die 50 kDa und 72 kDa Parasitenproteine schienen zudem teilweise membrangebunden vorzuliegen (Abb. 30, Spur 4). Es konnten ebenfalls diverse Kreuzreaktionen des Antiserums mit Wirtszellproteinen beobachtet werden (Abb. 30, Spuren 6, 7 und 8). Da in der Immunisierung die Kinasedomäne der Parasitenkinase eingesetzt wurde, konnten Kreuzreaktionen des Antiserums mit homologen Sequenzen wie z.B. der ATP-Bindungsstelle in Wirtszellkinasen nicht ausgeschlossen werden.

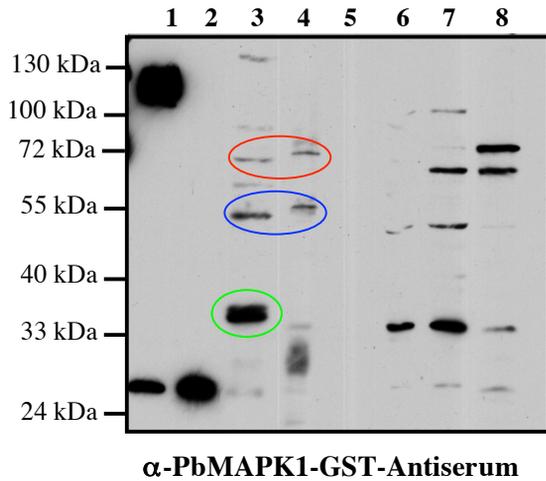


Abb. 30: Western Immunoblot mit dem α -PbMAPK1-GST-Antiserum. Die Spezifität des α -PbMAPK1-GST-Antiserums wurde im Western Immunoblot mit verschiedenen Zellextrakten untersucht. Im zytosolischen *P.falciparum*-Lysat schien die "Proform" der PfMAPK1 (1) sowie ein 26kDa Parasitenprotein detektiert zu werden, das auch membrangebunden vorlag (2). In *P.berghei*-Extrakten wurden diverse Banden detektiert. Die 50 und 72 kDa großen Parasitenproteine schienen sowohl zytosolisch (3) als auch membrangebunden (4) vorzuliegen. Das 36kDa Protein wurde nur im Zytoplasma detektiert. Es konnte keine Kreuzreaktionen mit Proteinen aus einem Leukozytenextrakt festgestellt werden (5). Des Weiteren wurden diverse unspezifische Bindungen des Antiserums an Hepatozytenproteine sowohl im Totallysat (6) als auch in der Zytosol- (7) und Membranfraktion (8) detektiert.

Mit dem α -PbMAPK1-GST-Antiserum wurden in *P.berghei*-Extrakten außer der putativen PbMAPK1 mit einer Größe von 36kDa weitere Parasitenproteine nachgewiesen. Da unklar war, ob es sich hierbei um unspezifische Reaktionen des Antiserums handelte, sollten die Ergebnisse mit einem Serum gegen die putative PbMAPK1 in Fusion mit 10xHistidinen reproduziert werden (3.7.6)

3.7.5 Rekombinante Expression und Aufreinigung der *P.berghei*-MAPK1 in Fusion mit 10 Histidinen bzw. MBP in *E.coli*

Angeichts der starken Degradierung und der Unlöslichkeit der PbMAPK1 als GST-Fusionsprotein wurden weitere Expressionssysteme erprobt, um eine stabile, rekombinante Expression der Parasitenkinase zu erreichen. Die PbMAPK1 sollte zudem erneut in Immunisierungen eingesetzt werden, um die mit dem α -PbMAPK1-GST-Serum erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen.

Die Sequenz der putativen PbMAPK1 wurde in den Vektor pJC45 umklontiert, in dem das Insert N-terminal mit 10 Histidinen verbunden wurde. Im Gegensatz zum GST-Fusionsprotein wurde die rekombinante 10xHis-PbMAPK1 während der Expression in den Bakterien nicht massiv degradiert (Abb. 31). Stattdessen lag die Parasitenkinase ausschließlich unlöslich in „Einschlußkörperchen“ in der Pelletfraktion vor. Die N-terminale Fusion der PbMAPK1-Sequenz mit 10 Histidinen erlaubte eine Aufreinigung des rekombinanten Proteins unter denaturierenden Bedingungen. Durch die Wirkung des

Harnstoffs wurde die PbMAPK1 komplett entfaltet und die exponierte Histidinabfolge vermittelte die Interaktion mit aktivierter Nickel-NTA-Agarose (Abb. 31, B). Trotz der Anwesenheit von Detergenzien und mehrfachen Waschschrritten konnten unspezifische Bindungen diverser Bakterienproteine an die Matrix nicht reduziert werden. In Konsequenz wurde die rekombinante PbMAPK1 aus einem Coomassie-gefärbten Proteingel ausgeschnitten und zur Immunisierung aufbereitet. Die Elution des rekombinanten Proteins von der Agarose konnte für die folgenden Immunisierungen durch Zugabe von Imidazol anstelle einer pH-Wert-Senkung optimiert werden.

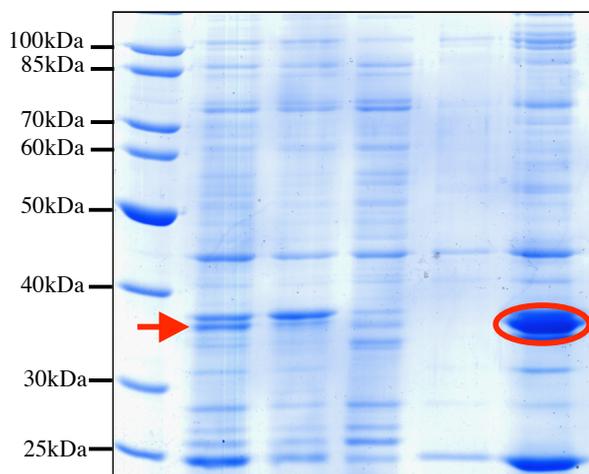


Abb. 31: Aufreinigung der rekombinanten *P.berghei*-MAPK1 unter denaturierenden Bedingungen. Unter denaturierenden Bedingungen konnte die rekombinante PbMAPK1 über die Bindung des Histidin-Epitops an Ni-NTA-Agarose aufgereinigt werden. Im Coomassiegel wurde aufgrund der geringen Reprimierbarkeit des Operons die rekombinante Kinase bereits im Lysat der nicht induzierten Bakterienkultur detektiert (n.i.). Nach Inkubation mit Ni-NTA-Agarose war eine geringe Restmenge an rekombinantem Protein in der Pellet-(P) und in der ungebundenen Fraktion (UB) enthalten. Der Großteil der rekombinanten PbMAPK1 hatte jedoch an die Agarose gebunden (B). Durch Senkung des pH-Wertes konnte hier keine Elution der Kinase von den Beads erreicht werden (E).

Da das Löslichkeitsverhalten der rekombinanten Kinase auch in Fusion mit 10xHistidinen unverändert blieb, wurde ein drittes Expressionssystem erprobt. Eine Fusion mit dem Maltose-bindenden Protein (MBP) sollte die rekombinante PbMAPK1 stabilisieren, was sich im optimalen Fall in einer erhöhten Solubilisierung widerspiegelte. Der pMalcRI-Vektor erlaubt eine N-terminale Fusion der inserierten Sequenz mit MBP. Die Aufreinigung des Fusionsproteins erfolgte durch Bindung an Amylose-Agarose. In der Analyse der Bakterienextrakte im Coomassiegel wurde deutlich, dass durch eine Fusion mit MBP die Löslichkeit der PbMAPK1 nicht erhöht wurde (Abb. 32, Pellet P und Lysat L). Abb. 32 zeigt den Ausschnitt eines Coomassiegels, auf dem der Erfolg der rekombinanten Proteinexpression und -aufreinigung kontrolliert wurde. Bemerkenswert ist hier die effiziente Ankonzentrierung der geringen Mengen an löslichem Fusionsprotein mit Hilfe der Amylose-Agarose (Abb. 32, Amylose-Agarose A). Des Weiteren unterlag die rekombinante Kinase in Fusion mit MBP während der Expression keiner starken Degradierung. Die rekombinante Parasitenkinase wurde ähnlich wie im GST-Expressionssystem im Proteingel als Doppelbande detektiert.

Neben dem Protein mit der kalkulierten Größe von 80kDa wurde eine etwa 10kDa größere Form nachgewiesen. Das PbMAPK1-MBP-Fusionsprotein wurde folgend nicht in Immunisierungen, sondern in Kinase-Assays und in Affinitätsaufreinigungen eingesetzt.

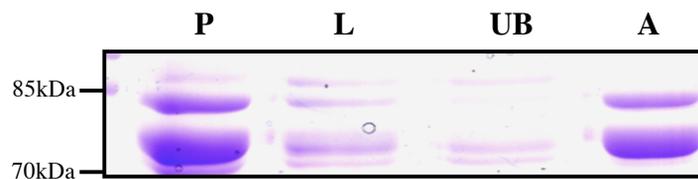


Abb. 32: Aufreinigung des rekombinanten PbMAPK1-MBP-Fusionsproteins

Nach dreistündiger Induktion der Expression des PbMAPK1-MBP-Fusionsproteins wurde der Bakterienextrakt in zytosolische und Membranfraktion getrennt und das Fusionsprotein mit Amylose-Agarose aufgereinigt. Im Coomassie-gefärbten Proteingel wurde der Großteil des Fusionsproteins in der Pelletfraktion detektiert (P). Der geringe Anteil an löslichem, rekombinantem Protein (L) konnte mit der Amylose-Agarose effizient ankonzentriert werden (A). UB = ungebundenes Fusionsprotein

3.7.6 Immunfluoreszenzfärbungen von *P.berghei*-infizierten Hepatomazellen mit α -PbMAPK1-His-Antiserum

Nach neun Wochen mit insgesamt vier Immunisierungen mit dem rekombinanten PbMAPK1-10xHis-Fusionsprotein wurde aus dem Mauserzblut das Serum gewonnen und in Immunfluoreszenzanalysen mit *P.berghei*-infizierten HepG2-Zellen eingesetzt.

Das α -PbMAPK1-10xHis-Serum zeigte zusätzlich zu parasitenspezifischen Färbungen von Bereichen der PVM und der PV in allen Stadien der hepatozytären Infektion starke Kreuzreaktionen mit Proteinen der Wirtszelle. In *P.berghei*-infizierten Hepatomazellen wurde auch mit diesem neuen α -PbMAPK1-Antiserum die PV sowie Bereiche der PVM detektiert. Abbildung 33 zeigt beispielhaft eine Immunfluoreszenzfärbung von 60h p.I. fixierten HepG2-Zellen.

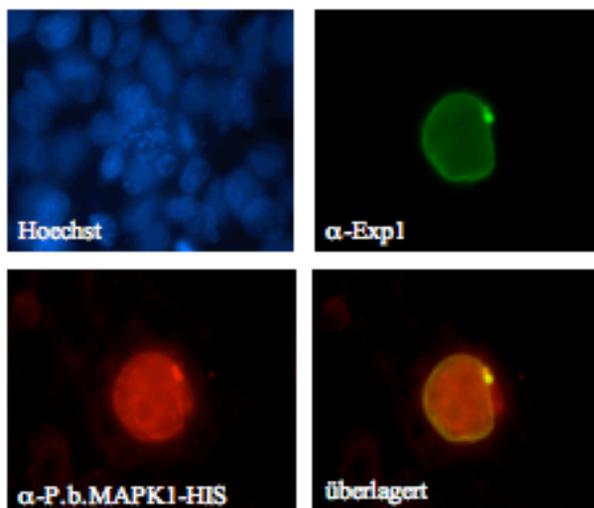


Abb. 33: Immunfluoreszenzanalyse mit dem α -PbMAPK1-10xHis-Serum.

In Immunfluoreszenzanalysen wurden mit dem α -PbMAPK1-His-Antiserum Bereiche der PVM und der PV in infizierten Hepatomazellen gefärbt. Die Abbildung zeigt beispielhaft die Färbung eines Parasiten im Zytomerstadium 60hp.I.. α -Exp1- (Cy2, grün) und α -PbMAPK1-10xHis-Antiserum (Alexa 694, rot) detektierten z.T. identische Bereiche in der PVM. Des Weiteren wurde das Zytoplasma des Parasiten mit dem Mauserum angefärbt. Die Kerne des Parasiten und der Wirtszellen wurden mit dem Hoechst33258 Farbstoff (blau) angefärbt.

3.7.7 Western Immunoblot-Analysen mit α -*P.berghei*-MAPK1-10xHis-Antiserum

Das α -PbMAPK1-10xHis-Antiserum zeigte in Western Immunoblotanalysen eine hohe Affinität in der Detektion der rekombinanten PbMAPK1 sowohl in Fusion mit GST als auch mit zehn Histidinen (Abb. 34, Spuren 8 und 7, weiße Markierung). Im *P.berghei*-Extrakt wurden zwei ungefähr 50 kDa große Proteine detektiert, von denen das Größere ebenfalls in der Membranfraktion nachgewiesen werden konnte (Abb. 34, Spuren 3 und 4, blaue Markierung). Zudem wurden mit etwas schwächerer Intensität 30kDa und 48kDa große Parasitenproteine detektiert. Die zuvor mit dem α -PbMAPK1-GST-Antiserum nachgewiesenen 36 kDa und 75 kDa großen *P.berghei*-Proteine wurden in diesem Western Immunoblot mit dem neuen Antiserum sehr schwach nachgewiesen. In den *P.falciparum*-Extrakten wurden verschiedene Proteine detektiert (Abb. 34, Spuren 1 und 2), bei denen es sich vermutlich nicht um die bereits beschriebenen Formen der PfMAPK1 von 40, 80 und 100/150kDa handelte (Graeser et. al., 1997; Lin et. al., 1996). Das PbMAPK1-10xHis-Antiserum reagierte ebenfalls mit diversen Proteinen in Hepatozytenextrakten (Abb. 34, Spur 6). Es wurden jedoch keine unspezifischen Bindungen an Leukozytenproteine detektiert (Abb 34, Spur 5).

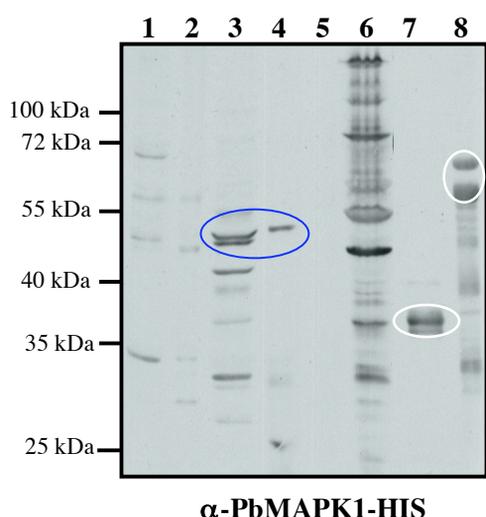


Abb. 34: Western Immunoblot mit dem α -PbMAPK1-10xHis-Antiserum.

Im Western Immunoblot wurden mit dem α -PbMAPK1-Antiserum verschiedene Proteine in den zytosolischen Fraktionen und den Membranfraktionen der *P.falciparum*- (Spuren 1+2) und *P.berghei*- (Spuren 3+4) Extrakte detektiert. Mit Proteinen aus den Leukozytenlysaten (Spur 5) kam es zu keinen Kreuzreaktionen, wohingegen in Spur 6 diverse unspezifische Bindungen an Wirtszellproteine nachgewiesen wurden. Das Antiserum erkannte spezifisch die rekombinante PbMAPK1 (weiße Markierung) in Fusion mit 10 Histidinen (Spur 7) oder mit GST (Spur 8).

Folgend sollte die Identität der ungefähr 50kDa großen Parasitenproteine geklärt werden, die in Western Immunoblotanalysen in *P.berghei*-Extrakten von beiden PbMAPK1-Antiseren erkannt wurden. Eine Isolierung der Parasitenproteine war weder in Immunpräzipitationen noch in zweidimensionalen Gelelektrophoresen möglich. Weder mit dem α -PbMAPK1-GST- noch mit dem α -PbMAPK1-10xHis-Antiserum konnte eine erfolgreiche Anreicherung von

Parasitenproteinen durch Präzipitation aus dem Blutstadium der Infektion erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

Zudem war es nicht möglich, in Western Immunoblotanalysen mit den Antikörpern gegen aktivierte MAPK oder phosphoryliertes Tyrosin die phosphorylierte Form der putativen PbMAPK1 zu detektieren.

3.7.8 Rekombinante Expression der PbMAPK1 in eukaryotischen Zellen

Die putative *P.berghei*-MAPK1 konnte sowohl mit den verschiedenen α -PbMAPK1-Antisera als auch mit den α -PfMAPK1-Peptidantikörpern in Immunfluoreszenzanalysen von infizierten Hepatozyten u.a. in der PVM lokalisiert werden. Da auch nur in dieser Position zumindest in den ersten 48h der Infektion Phosphorylierungen nachgewiesen wurden, konnte die in der PVM inserierte Parasitenkinase mit Wirtszellproteinen wie z.B. MEK interagieren und durch sie aktiviert werden. Die PbMAPK1 sollte folgend in Hepatomazellen rekombinant exprimiert werden, um mögliche Interaktionspartner der Parasitenkinase in PullDown-Experimenten isolieren zu können.

Zu diesem Zweck wurde die Sequenz der PbMAPK1 in den Vektor pcDNA3.1 inseriert, der die Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen erlaubt. Mit Antikörpern gegen das N-terminal fusionierte V5-Epitop sollten transfizierte HepG2-Zellen identifiziert werden. In Immunfluoreszenzanalysen konnten weder 24h noch 48h oder 72h nach Transfektionsbeginn vitale Zellen detektiert werden, die das PbMAPK1-V5 Fusionsprotein rekombinant exprimierten. Die wenigen α -V5-positiven Zellen zeigten alle deutliche Charakteristika apoptotischer Zellen, wie einen kondensierten Nukleus und den Verlust des Zell-Zell-Kontakts (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund ihrer Eignung für Transfektionsstudien wurden ebenfalls HeLa-Zellen mit dem pcDNA3.1-PbMAPK1-Konstrukt transfiziert. Auch hier konnten in Immunfluoreszenzanalysen mit dem α -V5-Antikörper keine vitalen, transfizierten Zellen nachgewiesen werden, die die Parasitenkinasen rekombinant exprimierten (Daten nicht gezeigt).

Graeser et al. hatten bereits Studien zur Expression der PfMAPK1 in COS-Zellen durchgeführt (Graeser et al., 1997). Folgend sollte in der COS-Zelllinie ebenfalls die rekombinante Expression der *P.berghei*-MAPK1 erprobt werden. Zur Kontrolle wurden COS-Zellen mit dem Vektor pcDNA3.1-JNK1 transfiziert. In Immunfluoreszenzanalysen konnte mit dem α -V5-Antikörper eine flächige Verteilung der rekombinant exprimierten, humanen MAPK JNK1 in der gesamten Zelle nachgewiesen werden (Abb. 35, A).

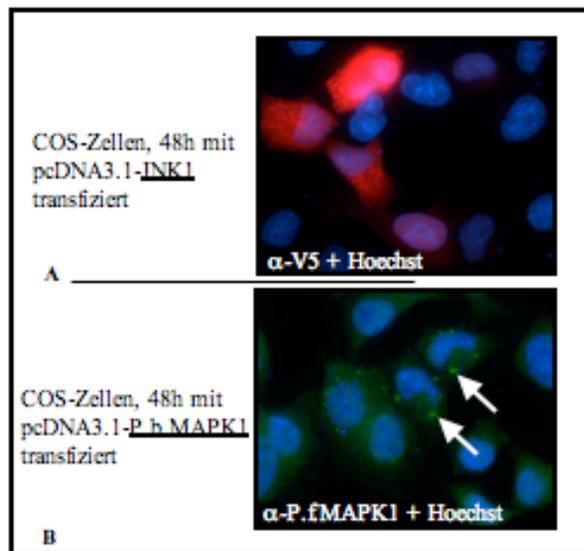


Abb. 35: Rekombinante Expression von JNK1 und PbMAPK1 in COS-Zellen.

Die rekombinante Expression von JNK1 und PbMAPK1 wurde 48h nach Transfektion in COS-Zellen in Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Die rekombinant exprimierte JNK1 konnte mit dem α -V5-Antikörper (Alexa 594, rot) in den transfizierten Zellen in unterschiedlicher Intensität detektiert werden (A). Mit dem α -PfMAPK1-Antikörper wurden in transfizierten Zellen fluoreszierende Proteinaggregate nachgewiesen (B, Pfeile, Cy2, grün). Die Zellkerne wurde mit dem Hoechst33258 Farbstoff (blau) angefärbt.

Mit dem α -V5-Epitop-Antikörper konnte in pcDNA3.1-PbMAPK1-transfizierten COS-Zellen keine rekombinante Expression der Parasitenkinase nachgewiesen werden. Da in Western Immunoblotanalysen mit α -PfMAPK1-Antikörpern die rekombinante PbMAPK1 detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurden diese Antikörper auch in Immunfluoreszenzfärbungen transfizierter Zellen eingesetzt. Mit dem α -PfMAPK1-Antikörper wurden in einigen pcDNA3.1-PbMAPK1-transfizierten COS-Zellen kleine, fluoreszierende Aggregate im Zytoplasma detektiert (Abb. 35, B, Pfeile). Mit dem α -V5-Antikörper wurden derartige Strukturen in transfizierten COS-Zellen nicht nachgewiesen. Die mit dem α -PfMAPK1-Antikörper detektierten Strukturen wurden weder in nicht-transfizierten, noch in pcDNA3.1-JNK1-transfizierten COS-Zellen beobachtet.

Aufgrund der Toxizität der Parasitenkinase für die Expressionszellen wäre ein induzierbares System hilfreich gewesen, das die kontrollierte Induktion einer transienten Expression erlaubt hätte. Zu Beginn der Dissertation wurde der Versuch einer Etablierung eines solchen Systems in Hepatomazellen unternommen. Aufgrund der geringen Effizienz, mit der sich HepG2-Zellen transfizieren ließen und mit der stabil-exprimierende Zelllinien generiert werden konnten, wurden die Experimente zur Etablierung eines solchen Systems eingestellt.

3.7.9 PullDown-Versuche von MEK aus Hepatozytenextrakten mit rekombinanter PbMAPK1

Da sich die rekombinante Expression der PbMAPK1 zum Tod der Hepatomazellen führte, sollte der Nachweis einer möglichen Interaktion zwischen der PbMAPK1 und der Wirtszell-MEK in einer anderen Variante des PullDowns erbracht werden. Zu diesem Zweck wurde die PbMAPK1 in Fusion mit GST in Bakterien rekombinant exprimiert und aufgereinigt (siehe

auch 3.7.2). Die an die Glutathion-Agarose gebundene Parasitenkinase diente als Matrix für Extrakte aus primären Hepatozyten und aus HepG2-Zellen, die direkt nach der Lyse mit dem rekombinanten Protein inkubiert wurden. Bei einer Interaktion von MEK1 und PbMAPK1 sollte erstere an die mit rekombinatem Protein beladene Agarose gebunden werden. Die Analyse der Fraktionen im Western Immunoblot zeigte jedoch, dass weder die MAPKK von primären Hepatozyten noch die von HepG2-Zellen unter den gewählten Versuchsbedingungen an die PbMAPK1-Agarose gebunden wurde (Abb. 36, A), sondern in der ungebundenen Fraktion nachweisbar war (Abb. 36, UB).

Des Weiteren wurde ein PullDown der Parasitenkinase mit rekombinanter, humaner MEK versucht. Zu diesem Zweck wurde die kodierende Sequenz der humanen MEK1 aus der cDNA von HepG2-Zellen amplifiziert und in den pGEX6P-1-Vektor kloniert. Nach Transformation in BL21-Zellen konnte die MAPKK als GST-Fusionsprotein mit einer Größe von ungefähr 75kDa in den Bakterien rekombinant exprimiert und aufgereinigt werden (Daten nicht gezeigt). Das MEK-GST-Fusionsprotein wurde an eine Glutathion-Matrix gebunden und folgend mit *P.berghei*-Parasitenlysaten inkubiert wurde. Der Nachweis einer Proteininteraktion zwischen Wirtszell-MEK und Parasiten-MAPK1 konnte auch mit diesem Ansatz nicht erbracht werden (Daten nicht gezeigt).

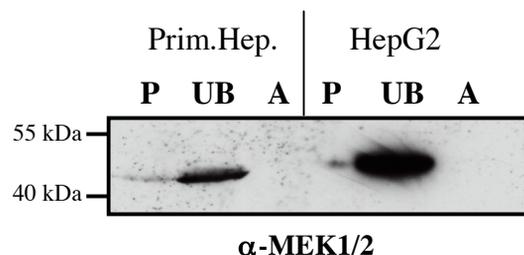


Abb. 36: In PullDown-Experimenten konnte keine Interaktion zwischen MEK und PbMAPK1 nachgewiesen werden. Im Anschluß an die Inkubation zytosolischer Hepatozytenextrakte mit der PbMAPK1-GST-Agarose wurden die Fraktionen im Western Immunoblot analysiert. Eine Interaktion der Wirtszell-MEK mit der PbMAPK1 konnte nicht nachgewiesen werden, da MEK aus dem primären Hepatozyten- (Prim.Hep.) und aus dem HepG2-Extrakt in den ungebundenen Fraktionen detektiert wurde (UB). Geringe Anteile der Kinase waren noch in den Zellpellets enthalten (P); es konnte jedoch kein Protein in der PbMAPK1-Agarose-Fraktion (A) nachgewiesen werden.

3.7.10 Kinase-Assay zum Nachweis der Aktivierung von PbMAPK1 durch MEK

Folgend sollte in einem Kinase-Assay untersucht werden, ob die putative Parasitenkinase PbMAPK1 *in vitro* als Substrat von der Wirtszell-MEK phosphoryliert werden konnte. Die Kinasen wurden über die Glutathion-S-Transferase als Bestandteil der Fusionsproteine aufgereinigt. Anschließend wurden die Kinasen in Versuchsansätzen miteinander kombiniert bzw. mit MBP als Substrat versetzt. In einem ersten Versuch wurde die Reaktion für 1 Stunde

bei 37°C durchgeführt. Das Autoradiogramm in Abbildung 37 zeigt, dass rekombinant exprimiertes MEK in Fusion mit GST aktiv war, da das Testsubstrat MBP (16 kDa) phosphoryliert wurde (Abb. 37, Spur 1, unterer Pfeil). Zudem konnte eine starke Autophosphorylierung der Kinase festgestellt werden (Abb. 37, Spur 1, oberer Pfeil). Die rekombinante PbMAPK1 schien in der exprimierten Form nicht aktiv zu sein, da weder MBP als Substrat umgesetzt wurde, noch eine Autophosphorylierung nachgewiesen werden konnte (Abb. 37, Spur 2). Es wurde ebenfalls keine Phosphorylierung der rekombinanten PbMAPK1 durch MEK *in vitro* festgestellt (Abb. 37, Spur 3). Die Autophosphorylierung der rekombinanten MEK wies darauf hin, dass die humane MAPKK zwar aktiv war, sie die rekombinante Parasitenkinase unter den gewählten Bedingungen jedoch nicht phosphorylierte. Die Inkubationstemperatur wurde folgend auf 30°C gesenkt; zudem wurden verschiedene Kinase-Puffer in der Reaktion getestet. Es konnte jedoch keine Phosphorylierung der Parasiten-MAPK1 durch Wirtszell-MEK nachgewiesen werden.

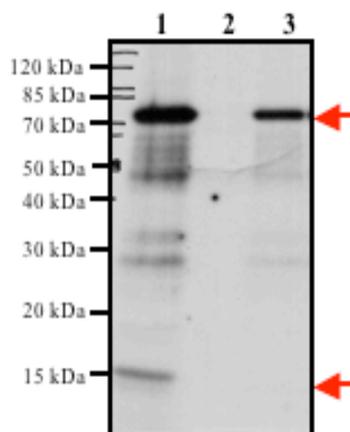


Abb. 37: Im Kinase-Assay wurde keine Phosphorylierung der PbMAPK1 durch Wirtszell-MEK nachgewiesen.

Im Autoradiogramm konnte eine starke Autophosphorylierung von MEK detektiert werden (Spur 1, oberer Pfeil). MBP (Spur 1, unterer Pfeil) wurde im Gegensatz zur PbMAPK1 (Spur 3) als Substrat phosphoryliert. Die Parasiten-MAPK1 wies weder eine Autoaktivität noch eine Aktivität gegenüber MBP auf (Spur 2).

3.7.11 Nachweis einer C-terminalen Verlängerung der kodierenden Sequenz der putativen PbMAPK1

Bei der Suche nach einer Erklärung für die Inaktivität der rekombinanten PbMAPK1 wurden erneut Vergleiche mit der Sequenz der PfMAPK1 angestellt. Charakteristikum dieser Kinase ist u.a. ein C-terminaler Anhang unbekannter Funktion im Anschluß an die Kinase-Domäne. Intensive Datenbankanalysen in der Endphase der Dissertation haben ergeben, dass auch die Sequenz der putativen PbMAPK1 eine Verlängerung am C-Terminus besitzt, die jedoch in GeneDB vermutlich aufgrund fehlender Homologien zu bereits beschriebenen Proteinen nicht als Teil der Parasitenkinase annotiert wurde (Abb. 38 A).

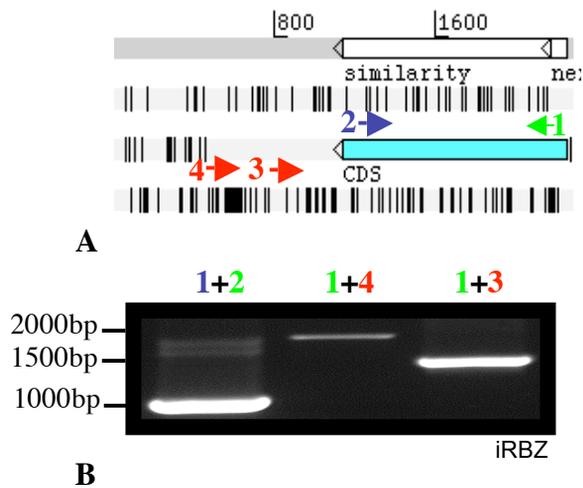


Abb. 38: Identifizierung eines C-terminalen Anhangs in der PbMAPK1.

In der Analyse des Genabschnitts (A, entnommen aus Artemis) wurde deutlich, dass die kodierende Sequenz der PbMAPK1 über den annotierten Bereich (hellblau) hinausgeht. In RT-PCR-Analysen konnte der C-Terminus als Bestandteil des PbMAPK1-Transkripts im erythrozytären Stadium der Infektion bestätigt werden (B).

Folgend wurde in RT-PCR-Analysen untersucht, ob die C-terminale Verlängerung in den exo- und erythrozytären Stadien der *P.berghei*-Infektion einen Teil des PbMAPK1-Transkripts bildete. Zu diesem Zweck wurden zwei Primer synthetisiert, von denen der eine mit dem C-terminalen Ende (Primer4, PCR-Produkt 1750bp) und der andere mit einem Bereich in der Mitte der Verlängerung hybridisierte (Primer3, PCR-Produkt 1400bp). Abbildung 38 B zeigt die agarosegelelektrophoretische Auftrennung von RT-PCR-Produkten aus dem Blutstadium. Sowohl in der exo-erythrozytären (Daten nicht gezeigt) als auch in der erythrozytären Phase der *P.berghei*-Infektion konnten PbMAPK1-Transkripte voller Länge nachgewiesen werden. Es konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob die beobachteten Unterschiede in der Transkriptmenge auf eine Prozessierung der mRNA oder auf eine unzureichende Aktivität der Polymerase bei der Amplifikation des Transkripts voller Größe zurückzuführen waren.

Die Entdeckung, dass die in GeneDB veröffentlichte Sequenz nicht dem gesamten kodierenden Bereich der putativen PbMAPK1 entsprach, wurde erst gegen Ende der Dissertation gemacht. Als Konsequenz konnten bisherige Experimente wie z.B. Proteininteraktionsstudien mit einer rekombinanten Parasitenkinase voller Länge nicht wiederholt werden. In zukünftigen Studien wird u.a. mit Antiseren gegen die verschiedenen Domänen der PbMAPK1 untersucht werden, ob die Parasitenkinase während der Entwicklung prozessiert und auf diese Weise ebenfalls die Lokalisation der Kinase bestimmt wird.

4. Diskussion

4.1 Tyrosin-Phosphorylierungen in der exo-erythrozytären Phase der *Plasmodium*-Infektion

4.1.1 Charakterisierung von Tyrosin-Phosphorylierungen in der PVM

Die Invasion diverser Pathogene in ihre Wirtszelle wird entscheidend über Protein-Phosphorylierungen vermittelt. Eine wesentliche Rolle spielen hier in Abhängigkeit vom Zelltyp post-translationelle Modifikationen an Tyrosin-Resten sowohl von Parasiten- als auch Wirtszellproteinen, deren Inhibierung die Invasionsfähigkeit des Pathogens wesentlich verringert (Brown, 2003; Ferreira et al., 2003; Limongi et al., 2003). In Studien mit *Plasmodium*-infizierten Erythrozyten konnte bereits gezeigt werden, dass nicht nur bei der Invasion des Parasiten sondern auch in der weiteren intrazellulären Entwicklung Tyrosin-Phosphorylierungen eine wichtige Bedeutung haben (Dluzewski and Garcia, 1996). Obwohl in Genom-Analysen keine typischen PTK/RTK identifiziert werden konnten (Anamika et al., 2005; Ward et al., 2004), hatte die Behandlung mit PTK-Inhibitoren eine Blockierung des Parasitenwachstums zur Folge (Gazarini and Garcia, 2003). Bisher konnte nicht geklärt werden, ob derartige Phosphorylierungsereignisse auch in der exo-erythrozytären Phase der *Plasmodium*-Infektion im Wirbeltierwirt von Bedeutung sind.

Die Leberzelle ist im Gegensatz zum reifen Erythrozyten eine stoffwechselaktive Zelle, in der der Parasit bei der Manifestierung einer Infektion vor verschiedene Herausforderungen gestellt wird: Während der Proliferationsphase muß das Überleben der Zelle gesichert werden. Intrazelluläre Parasiten verfolgen hier mit gezielter Stimulierung (*Theileria*, (Dobbelaere and Kuenzi, 2004)) oder Repremierung (*Leishmania*, (Brandonisio et al., 2000)) der Wirtszellmaschinerie unterschiedliche Strategien. Des Weiteren müssen im Rahmen der Entwicklung des Pathogens Nährstoffe aquiriert und die mit der Proliferation einhergehende Größenzunahme kompensiert werden. Die intrazelluläre Lebensweise erfordert zudem die „Maskierung“ des Parasiten, um zum einen die Erkennung und einen Angriff durch die Wirtszelle z.B. in Form von Lysosomen zu verhindern. Infizierte Leberzellen können außerdem Parasitenepitope im MHC I-Komplex präsentieren und folgend durch Effektorzellen des Immunsystems erkannt werden, die ihre Eliminierung einleiten würden (Hollingdale et al., 1998).

Diverse intrazelluläre Prozesse werden über Signaltransduktionsereignisse vermittelt, mit denen generell Protein-Phosphorylierungen einhergehen. In der vorliegenden Arbeit wurde in

Immunfluoreszenzanalysen von *P.berghei*-infizierten Hepatomazellen zunächst deren Phosphorylierungsstatus untersucht. Während der gesamten exo-erythrozytären Phase konnten massive Phosphorylierungen von Tyrosinresten in Proteinen in der PVM detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurden im Wirtszellzytosol in den ersten zwei Tagen der Infektion keine Phosphorylierungen detektiert. In Konsequenz könnte die PVM in dieser Phase der *Plasmodium*-Infektion als „Signaltransduktionsplattform“ dienen, von der aus gezielt Signale in Richtung Parasiten- und auch Wirtszellzytosol vermittelt werden. Die Beobachtungen deuten zudem darauf hin, dass es in infizierten Leberzellen ähnlich der Situation in *Leishmania*- oder *Toxoplasma*-infizierten Makrophagen (Nandan et al., 2000, Kim et al., 2004) in den ersten Tagen der Infektion nicht zu einer massiven Stimulierung der Wirtszellmaschinerie kommt. Allerdings sind Proteinphosphorylierungen der Wirtszelle auf einem niedrigen Niveau nicht auszuschließen, da Immunfluoreszenzanalysen für solche schwachen Signale möglicherweise nicht ausreichend sensitiv sind.

Da die exo-erythrozytäre Phase aufgrund einer *in vitro*-Infektionsrate von 1-5% proteinbiochemischen Untersuchungen kaum zugänglich ist, stützen sich die Ergebnisse auf der Analyse einzelner infizierter Zellen. Als Konsequenz war eine Identifizierung der detektierten, Tyrosin-phosphorylierten Proteine weder in Western Immunoblot-Analysen noch in Immunpräzipitationen möglich.

Die Co-Lokalisation der α -P-Tyrosin-positiven Proteine mit dem membranständigen Parasitenprotein Exp1 deutete auf eine Integration oder eine enge Assoziation der phosphorylierten Proteine mit der parasitophoren Vakuolenmembran hin. Da die genaue Zusammensetzung der PVM in der exo-erythrozytären Phase von *Plasmodium* bisher noch ungeklärt ist, können die in dieser Arbeit detektierten, phosphorylierten Proteine sowohl von der Wirtszelle als auch vom Parasiten stammen. Studien von *Toxoplasma*-infizierten Zellen haben gezeigt, dass Wirtszellproteine bei der Invasion gezielt ausgeschlossen werden (Lingelbach and Joiner, 1998). Dies hat primär den Sinn, die Erkennung durch zelluläre Komponenten wie Lysosomen zu verhindern. Die Erforschung der Komposition der PVM hat in der erythrozytären Phase der *Plasmodium*-Infektion bereits Fortschritte gemacht. So konnte gezeigt werden, dass bei der Generierung der PVM 10 Wirtszellproteine aus Detergenz-resistenten „Lipid-Rafts“ (DRM) als membraninserierte Moleküle erhalten bleiben (Murphy et al., 2004). Zu dieser Gruppe gehören auch Flotilline (Reggie-Proteine), die mit einem intramolekularen Teil Raft-assoziiert vorliegen, so dass der N- und der C-Terminus in das Zytoplasma exponiert werden (Morrow et al., 2002). Da es sich bei dem Vorgang der Invasion um eine aktive Penetration der Wirtszelle handelt, wird die Erythrozytenmembran

durch den Parasiten „eingestülpt“ und folglich behalten Flotilline in der PVM ihre zytoplasmatische Orientierung (Murphy et al., 2004), in der sie in ihrer Funktion als Scaffolding-Proteine (Langhorst et al., 2005) Interaktionen vermitteln könnten. Da bereits Assoziationen von Tyrosinkinasen und von Mitgliedern verschiedener Signaltransduktionskaskaden wie H-Ras mit Lipid-Rafts nachgewiesen wurden (Moffett et al., 2000; Roy et al., 1999), ist es durchaus möglich, dass Wirtszellproteine an der PVM phosphoryliert werden. Für derartige Interaktionen sind jedoch Proteinmodifikationen wie Myristinylierungen oder Palmitoylierungen Voraussetzung (Brown and London, 1998). Da im *Plasmodium*-Genom bisher keine kodierenden Sequenzen für typische Tyrosinkinasen oder Kinasen, die sowohl Serin/Threonin- als auch Tyrosin-Reste phosphorylieren können, identifiziert wurden, könnten (auch) Wirtszellkinasen für Phosphorylierungen von membraninsertierten Parasitenproteinen verantwortlich sein. Immunfluoreszenzanalysen geben erste Hinweise darauf, dass auch in *Plasmodium*-infizierten Hepatozyten Reggie-Proteine in der PVM enthalten sind. Da bisher im *Plasmodium*-Genom ebenfalls keine zu Reggie homologen Sequenzen identifiziert werden konnten, muß beispielsweise in siRNA-Versuchen geklärt werden, ob es sich bei den detektierten Signalen um Kreuzreaktionen mit kryptischen Parasitenproteinen oder um eine spezifische Erkennung der Wirtszell-Reggies handelt, die im Zuge der Generierung der PVM bei der Invasion in den Hepatozyten integriert bleiben (Arbeitsgruppe Heussler, unveröffentlicht).

Vollkommen unklar ist bisher, wie der selektive Ausschluß von Wirtszellproteinen aus der PVM erfolgt. So wird zum Beispiel ein wesentlicher Bestandteil der Lipid-Rafts, das Wirtszell-Stomatin, bei der Invasion aus der PVM ausgeschlossen (Murphy et al., 2004). Interessanterweise wurde bereits ein Parasitenhomolog beschrieben, das vermutlich anstelle des Wirtszellproteins integriert wird (Hiller et al., 2003). Der genaue Vorgang dieser Selektion ist unklar.

Membranassoziierte Tyrosin-Phosphorylierungen könnten nicht nur das Ergebnis von Proteininteraktionen im Zusammenhang mit Lipid-Rafts sein, sondern auch auf Membraninsertierte Rezeptortyrosinkinasen zurückgeführt werden. Ihre Aktivierung resultiert sowohl in Phosphorylierungen interner Tyrosinreste als auch in der Stimulierung anderer Kinasen, die ebenfalls an Tyrosinen phosphoryliert werden können. Bisher wurden im Genom von *Plasmodium* keine für Rezeptortyrosinkinasen oder Wachstumsfaktoren kodierenden Sequenzen identifiziert. Bei den Trypanosomatiden hingegen sind trotz der Abwesenheit klassischer RTKs Wachstumsfaktorrezeptor-ähnliche Proteine identifiziert worden (Hide et al., 1989), die durch Wirtszell-EGF stimuliert werden können. Dies resultiert unter anderem in

der Aktivierung von Parasiten-MAPK und hat die Proliferation des Parasiten zur Folge (Ghansah et al., 2002). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass in *Plasmodium* kryptische Proteine mit vergleichbaren Funktionen exprimiert werden.

Interessanterweise besitzen einige *Plasmodium*-Proteine wie MSP 1, 8 und 10 (merozoite-associated surface protein) EGF-Domänen im C-Terminus (Drew et al., 2005). Ihre Expression wurde bisher hauptsächlich in der erythrozytären Phase der *Plasmodium*-Infektion untersucht; sie spielen dort vermutlich bei der Wirtszellerkennung eine Rolle. RT-PCR-Analysen haben jedoch gezeigt, dass MSP-mRNA bereits in der exo-erythrozytären Phase der *Plasmodium*-Infektion synthetisiert wird (Horstmann, persönliche Mitteilung). Transkripte sind bereits 23 Stunden nach Infektion nachweisbar und ihre Menge nimmt im Laufe der Leberphase zu. *Plasmodium*-Parasiten wurden jedoch in der exo-erythrozytären Phase noch nicht hinsichtlich einer Expression von MSP-Proteinen untersucht. Eventuell werden die GPI-verankerten Proteine bereits in infizierten Leberzellen in der Parasitenplasmamembran intergriert, aus der sich später die Merozoiten abschnüren. Da die Regeln der Selektion, die zum Ausschluß von Wirtszellproteinen aus der PVM führen, noch nicht geklärt sind, könnten zudem Wirtszell-RTK bei der Invasion in der PVM erhalten bleiben. Dabei würden die Rezeptorbindenden Domänen der Kinasen in die PV hineinragen, während die katalytischen Domänen ins Wirtszellzytoplasma exponiert werden würden. Aufgrund dieser Orientierung könnte durch den Parasiten gezielt eine Stimulierung der RTK vermittelt werden. Besonders in der Endphase der Infektion könnten über Kontakte von PPM und PVM gezielt Rezeptortyrosinkinasen in der PVM stimuliert werden. Hierdurch würden Wirtszell-Phosphorylierungskaskaden initiiert, die die Maschinerie der Zelle gezielt beeinflussen oder wiederum membranständige Parasitenproteine aktivieren könnten. In Immunfluoreszenzfärbungen dieser Arbeit wurden besonders in den späten Stadien der exo-erythrozytären Entwicklung Tyrosinphosphorylierungen im Zytoplasma infizierter Zellen detektiert. Mit Hilfe von α -RTK- und α -MSP-Antikörpern könnte die Lokalisation der Proteine im Hinblick auf eine PVM- oder PPM-Insertion bestimmt werden.

4.1.2 Beeinflussung der Tyrosin-Phosphorylierungen in der PVM und der Parasitenproliferation durch PTK-Inhibitoren

Durch den Einsatz des PTK-Inhibitors Genistein kann generell gezeigt werden, dass zelluläre Signaltransduktionsprozesse aus einer Wachstumsfaktor- oder Zytokin-stimulierten Rezeptortyrosinkinaseaktivität resultieren, indem diese gezielt inhibiert wird (Akiyama et al., 1987). Obwohl im Kinom von *Plasmodium* keine klassischen RTKs identifiziert werden

konnten, hat Genistein einen erheblichen Effekt sowohl auf die Tyrosin-Phosphorylierungsmuster in der PVM als auch auf die Proliferation des Parasiten. Zweistündige Inkubationen von *P.berghei*-infizierten Hepatozyten mit Genistein resultierte in einer Reduzierung der α -Phospho-Tyrosin-positiven Zellen um 50%. Eine 24-stündige Behandlung blockierte die Parasitenentwicklung sowohl in Erythrozyten als auch in Hepatozyten. Vergleichbare Effekte wurden auch bei anderen parasitären Protozoen beobachtet: Genistein-Behandlungen blockierten Tyrosin-Phosphorylierungen von Trypanosomen-Proteinen (Yoshida et al., 2000) und inhibierten die Proliferation von obligat-extrazellulären *Trypanosoma brucei* (Wheeler-Alm and Shapiro, 1993). Hier übt der Inhibitor seine reprimierende Wirkung eindeutig auf Parasitenproteine aus. In Experimenten mit intrazellulären Parasiten muß jedoch die Einflußnahme des Inhibitors auf die Wirtszellmaschinerie und damit verbundene Effekte für das Parasitenwachstum beachtet werden. Gargala et al. haben 2005 die Wirkung von 52 Genistein-Analogen auf die intrazelluläre Entwicklung der apikomplexen Parasiten *Sarcocystis neurona*, *Neospora caninum* und *Cryptosporidium parvum in vitro* untersucht (Gargala et al., 2005). Mit einigen Derivaten konnte eine bis zu 95%ige Inhibierung der Parasitenproliferation erreicht werden, wohingegen die Wirtszellen nicht beeinflusst wurden. Derartige Effekte konnten zum Teil auch *in vivo* bestätigt werden. Die Drogen wurden den Tieren mit dem Futter verabreicht, wodurch eine gleichmäßige Applikation der Inhibitoren erreicht wurde (Gargala et al., 2005). Die intra venöse oder intra peritoneale Gabe der Drogen birgt das Risiko der ungenügenden Resorption in Organen wie der Leber und kommt als Ursache für den Misserfolg der in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*-Versuche in Betracht. Zudem sollten die von Gargala getesteten Genistein-Derivate hinsichtlich ihrer Wirkung auf *Plasmodium*-Infektionen untersucht werden. Auf diese Weise könnte ausgeschlossen werden, dass die Reprimierung der Parasitenproliferation auf eine Beeinflussung der Wirtszellmaschinerie zurückzuführen ist.

Für Genistein sind zudem Effekte auf andere Enzymklassen als RTK und PTK beschrieben worden. Markovits et al. zeigten 1989, dass Genistein *in vitro* ebenfalls eine reprimierende Wirkung auf die Topoisomerase II ausübt, indem es vermutlich an eine der ATP-Bindungsstelle ähnlichen Sequenz im Enzym bindet (Markovits et al., 1989). Auf diese Weise wurden Protein-DNA-Komplexe stabilisiert und folgend Doppelstrangbrüche induziert. Die Schäden in der DNA-Struktur konnten auch *in vivo* beobachtet werden und resultierten in einer Arretierung der Zellen in der G₂-Phase. In Genistein-behandelten, infizierten Leberzellen schien es ebenfalls zu einer Beeinflussung des Parasitenzellzyklus zu kommen, da hier nach Inhibitorzugabe die DNA-Replikation und anschließende Mitosen reprimiert

wurden. Folglich könnten Parasitentopoisomerasen in der exo- und erythrozytären Phase von *Plasmodium* als Substrate vom PTK-Inhibitor erkannt worden sein. Bereits 1986 konnte in Untersuchungen der *P.berghei*-Topoisomerase II gezeigt werden, dass anti-Tumor-Medikamente die Aktivität zur Induktion von DNA-Doppelstrang-Brüchen stimulieren können (Riou et al., 1986). Eine Beeinflussung des Zellzyklus wurde auch in *in vivo*-Versuchen mit Blutstromformen von Trypanosomen festgestellt da die Parasiten unter Genisteineinwirkung in ihrer Zellteilung massiv beeinträchtigt wurden (Wheeler-Alm and Shapiro, 1993). Neben der Topoisomerase II kann Genistein ebenfalls in Abhängigkeit vom Zelltyp einen direkten Einfluss auf Enzyme der Zellzyklus-Kontrolle nehmen. So resultiert die Inhibitorzugabe in diversen Krebszelllinien in eine Arretierung des Zellzyklus in der G2-/M-Phase, der auf eine Inhibierung der Cyclin-Dependent-Kinase 2 (Cdc2) zurückzuführen ist. Die Aktivierung der Kinase wird verhindert, in dem zum einen die Expression der PTK Wee1 stimuliert wird, welche Cdc2 durch eine reprimierende Tyrosin-Phosphorylierung kontrolliert. Zusätzlich kommt es zu einer vermehrten Deaktivierung der Phosphatase Cdc25C, die generell die stimulierende Dephosphorylierung der Cdc2 vermittelt. In den behandelten Zellen wurde zudem eine gesteigerte Expression des Cdc2-Inhibitors p21waf1/cip1 beobachtet (Chang et al., 2004). Die genaue Kontrolle des Parasitenzellzyklus ist noch ungeklärt. Obwohl bisher im *Plasmodium*-Genom keine homologen Moleküle zu den zellulären Proteinen Wee1, Cdc25C und p21waf1/cip1 identifiziert wurden, werden Cdc2-ähnliche Kinasen auch in der exo-erythrozytären Phase exprimiert (Daten nicht gezeigt), deren Aktivität wahrscheinlich wie in den Wirtszellproteinen durch (De-) Phosphorylierungen an konservierten Aminosäureresten kontrolliert wird (Doerig et al., 2002). Die durch Genistein induzierten Effekte der Cdc2-Inhibierung treten in Abhängigkeit von der verwendeten Inhibitormenge und der Inkubationszeit auch in Hepatomazellen auf, so dass ein geringer Effekt auf die Wirtszelle trotz vorheriger Untersuchung der Wirtszelltoxizität nicht ausgeschlossen werden kann. So wurden von Su et al. in HepG2-Zellen nach Einwirkung von Genistein neben der Zellzyklusarretierung auch Anzeichen von Apoptose nachgewiesen (Su et al., 2003). Hierzu gehörte unter anderem die nach 24-stündiger Inkubationszeit detektierbare Aktivierung der Caspase 3. Van de Sand et al. konnten einen Parasitenvermittelten Schutz der Wirtszelle vor Apoptose zeigen, der zwei Tage p.I. besonders ausgeprägt war (van de Sand et al., 2005). Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine Blockierung der Parasitenentwicklung auch auf die Beeinflussung der Wirtszelle zurückzuführen war. Zwei Tage p.I. konnte keine reprimierende Wirkung durch Genistein mehr festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt sind jedoch auch die Replikationen und

Mitosen der Parasiten-DNA weitgehend abgeschlossen, so dass eine eventuelle Inhibierung der Zellzyklusmaschinerie keinen wesentlichen Einfluss auf den Fortlauf der Parasitenentwicklung haben sollte.

Neben der DNA-Replikation wurde auch das Wachstum des Parasiten nach 24-stündiger Behandlung mit Genistein reprimiert. Bisher ist unklar, ob es sich hierbei wirklich um eine Blockierung der Parasitenentwicklung handelt, oder ob der Parasit in der Vakuole abgetötet wird. Da die α -Exp1- und die α -P-Tyrosin-Färbungen nach der Behandlung unverändert blieben, scheint eine Arretierung wahrscheinlich. So konnten in über einen längeren Zeitraum behandelten, infizierten Zellen Tyrosin-phosphorylierte Proteine in der PVM nachgewiesen werden. Die Inhibierung der Phosphorylierungen schien bei niedrigen Konzentrationen des Inhibitors somit nicht absolut zu sein. Zudem konnte von Beard et al. gezeigt werden, dass in niedrigen Dosen über einen längeren Zeitraum appliziertes Genistein von Karzinomzellen anscheinend verstoffwechselt wird (Beard et al., 2005). In Konsequenz müßte untersucht werden, ob nach einem Abbau der Droge die reprimierende Wirkung auf den Parasiten aufgehoben ist und dieser seine Entwicklung fortsetzen kann.

Interessanterweise hatten Genistein und Tyrphostin sowohl in der exo- als auch in der erythrozytären Phase vergleichbare reprimierende Effekte auf die Proliferation von *Plasmodium*. Beide Drogen üben als PTK-Inhibitoren ihre Wirkung auf unterschiedliche Domänen der Kinasen aus: Während Genistein mit der ATP-Bindungsstelle interagiert, blockiert Tyrphostin die Substratbindungsstelle. Für Tyrphostine wurden jedoch ähnlich wie für Genistein zusätzliche Effekte auf nicht-PTK beschrieben: So inhibiert AG555 ebenfalls Topoisomerasen (Bendetz-Nezer et al., 2004) und die Aktivität der Cdk2, was in einer Arretierung des Zellzyklus in der G1/S-Phase resultiert (Kleinberger-Doron et al., 1998). Folglich kann nicht ausgeschlossen werden, dass Wechselwirkungen von Genistein oder Tyrphostin mit Parasitenproteinen aufgetreten sind, die wie die Topoisomerasen den PTK-vergleichbare ATP- oder Substratbindungsstellen enthalten. Obwohl im *Plasmodium*-Kinom bisher keine typischen PTK oder RTK identifiziert wurden, könnten die Inhibitoren ihrer eigentlichen Spezifität entsprechend ebenfalls den Tyrosin-Kinasen-ähnliche Parasitenproteine reprimieren.

Über die Zielproteine der Inhibitoren in den *P.berghei*-infizierten Hepatomazellen bzw. *P.falciparum*-infizierten Erythrozyten kann nur spekuliert werden. Vermutlich resultierte die Behandlung in der Inhibierung sowohl von Parasiten- als auch von Wirtszellproteinen, die in der Proliferationsphase von *Plasmodium* entscheidend sind. Als Folge der Reprimierung könnten Autophosphorylierungen oder Übertragungen von Phosphatresten auf Tyrosinreste

anderer Proteine verhindert werden, die in einer Inaktivität der Effektor- und Zielproteine resultierte.

4.2 MAPK des Parasiten und/oder der Wirtszelle wurden in *P.berghei*-infizierten Hepatozyten in der PVM aktiviert

4.2.1 Charakterisierung der aktivierten MAPK in der PVM

Phosphorylierungen an Tyrosin- und Threonin-Resten im Aktivierungsmotiv von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen wie ERK werden durch die Initiierung von RTK- oder PTK-Kaskaden vermittelt (Rubinfeld and Seger, 2005) und sind somit durch Tyrosinkinaseinhibitoren hemmbar. In Immunfluoreszenzfärbungen von *P.berghei*-infizierten Hepatomazellen mit α -Phospho-MAPK-Antikörpern konnte bestätigt werden, dass aktivierte MAPK in der PVM vorhanden sind. Die phosphorylierten Kinasen co-lokalisieren mit den α -Phospho-Tyrosin-Färbungen in der parasitophoren Vakuolenmembran. Im Zytoplasma der Wirtszelle wurden in den ersten zwei Tagen der Infektion keine auffälligen Phosphorylierungen detektiert. Aktivierungen von MAPK können ebenfalls indirekt durch die Analyse des Phosphorylierungsstatus ihrer Substrate nachgewiesen werden. In *P.berghei*-infizierten Hepatomazellen wurden in Immunfluoreszenzanalysen mit Antikörpern gegen die aktivierten Transkriptionsfaktoren c-Jun und Elk-1 keine intensiven Phosphorylierungen in den Wirtszellkernen detektiert, die auf eine Parasiten-induzierte Aktivierung hingedeutet hätten (Daten nicht gezeigt). Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Infektion induzierte zytoplasmatische MAPK- oder Transkriptionsfaktor-Phosphorylierungen unter der Nachweisgrenze von Immunfluoreszenzfärbungen stattgefunden haben. Aufgrund der geringen Infektionseffizienz konnten keine Untersuchungen hinsichtlich des Aktivierungsstatus von Wirtszell-MAPK in Western Immunoblot-Analysen oder Immunpräzipitationen durchgeführt werden. Untersuchungen von *T.gondii*-infizierten Monozyten haben gezeigt, dass es im Rahmen der Invasion zu einer Aktivierung von Wirtszell-MAPK kommt. Diese ist jedoch transienter Natur, da einige Stunden p.I. keine Phosphorylierungen mehr nachgewiesen wurden (Valere et al., 2003). Der Parasit scheint hier aktiv in die Wirtszellmaschinerie einzugreifen, da Aktivierungen von Wirtszell-MAPK durch einen äußeren Stimulus nicht wieder induziert werden konnten (Kim et al., 2004). In mit Leishmanien-infizierten Zellen wird durch den Parasiten ebenfalls gezielt die Aktivierung der Wirtszell-MAPK reprimiert (Guizani-Tabbane et al., 2000; Prive and Descoteaux, 2000). Vermutlich regulieren auch Plasmodien in der exo-erythrozytären Phase der Infektion die Stimulierung von Wirtszell-MAPK. Die Kontrolle könnte gezielt über die PVM als Signaltransduktionsplattform vermittelt werden, da hier Phosphorylierungsereignisse

nachgewiesen wurden. Folglich konnte nicht ausgeschlossen werden, dass gezielt Phosphorylierungskaskaden von der parasitophoren Vakuolenmembran ausgehend im Wirtszellzytosol stimuliert wurden. Die Aktivierungen könnten hier auf einem niedrigen Niveau zeitlich beschränkt oder konstant induziert werden, das nicht mit dem der z.B. in Theilerien-infizierten Zellen stimulierten JNK-Aktivierung (Galley et al., 1997) vergleichbar zu sein scheint.

Da die α -P-MAPK-Antikörper gegen die doppelt-phosphorylierten Aktivierungsmotive der humanen Kinasen ERK und JNK generiert wurden, kann über den Ursprung der detektierten, phosphorylierten Kinasen nur spekuliert werden. Bisher beschriebene Wirtszell-MAPK weisen in ihrer Sequenz keine Transmembrandomänen auf und sind generell im Zytoplasma oder im Nukleus von Zellen lokalisiert (Pearson et al., 2001). Die in der PVM von *P. berghei*-infizierten Hepatomazellen nachgewiesenen, aktivierten MAPK co-lokalisieren mit Exp1 des Parasiten. Die genaue Funktion dieses Parasitenproteins konnte bisher nicht geklärt werden. Wie bereits beschrieben sind vermutlich Bestandteile von Lipid Rafts auch in der exoerythrozytären Phase der *Plasmodium*-Infektion in der PVM enthalten, die eine Rekrutierung von Wirtszellproteinen in die Nähe der Membran ermöglichen könnten.

Die rekombinant expremierte, humane MAPK-JNK1 wurde mit einem α -V5-Antikörper im Zytoplasma und in den Kernen der transfizierten, infizierten Hepatomazellen detektiert. Die Färbungen gaben jedoch keinen Aufschluß darüber, ob die Wirtszellkinase gezielt in die PVM inseriert bzw. in ihrer Nähe akkumuliert wurde. Die Aktivierungsmuster beschränkten sich auch in transfizierten Zellen auf die PVM, es konnte keine Phosphorylierung der humanen, rekombinanten MAPK im Zytoplasma festgestellt werden. In den späten Stadien der exoerythrozytären Phase wurden mit den α -Phospho-MAPK-Antikörpern ebenfalls aktivierte Proteine innerhalb der PV detektiert. Hierbei schien es sich um phosphorylierte Parasitenkinasen zu handeln, da eine Aufnahme der rekombinanten Kinase in die Vakuole in den Immunfluoreszenzanalysen nicht festgestellt werden konnte. Ein Import zellulärer Proteine in die PV wurde zudem bisher noch nicht beschrieben: Eine passive Diffusion durch die PVM gilt als unwahrscheinlich, da die PVM nur für Moleküle bis 1,9 kDa durchlässig ist (Schwab et al., 1994). Des Weiteren wurden bisher noch keine Endozytosevorgänge in die PV nachgewiesen.

Versuche zur Manipulation der Proteinexpression von Wirtszell-MAPK mit Hilfe von siRNA waren in HepG2-Zellen bisher nicht erfolgreich, da in den Hepatomazellen keine effektive Reduzierung der JNK-Expression erreicht werden konnte. Vergleichende Kontrollexperimente mit HeLa-Zellen haben gezeigt, dass mit der synthetischen JNK1-siRNA

prinzipiell eine Beeinflussung der Kinaseexpression erreicht werden kann. Da in HepG2-Zellen keine flächendeckende Verminderung der Proteinexpression möglich war, könnten in Zukunft Versuche mit Fluoreszenz-Farbstoff-gekoppelter siRNA durchgeführt werden, die eine Untersuchung auf Einzelzellebene erlauben.

4.2.2 Wirkung von MAPK-Inhibitoren auf die Parasitenproliferation

Der Einsatz spezifischer MAPK-Inhibitoren zeigte deutlich, dass diese Drogen im Gegensatz zu den PTK-Inhibitoren keinerlei Wirkung auf die Phosphorylierungsmuster in der PVM ausübten, zum Teil jedoch einen erheblich Einfluss auf die Parasitenproliferation hatten. Der JNK-Inhibitor II zeichnet sich neben einer relativen schwachen Aktivität gegenüber den JNK-Isoformen durch eine geringe Substratspezifität aus, da er ebenfalls andere Kinasen wie z.B. SGK (Serum and Glucocorticoid induced protein Kinase) oder CDK2 (Cyclin-Dependent Kinase 2) (Davies et al., 2002) inhibiert. Trotz der geringen Selektivität des Inhibitors schien es zu keiner Kreuzreaktion mit essentiellen Parasitenproteinen zu kommen. Zudem schien das Wirtszell-JNK für die Infektion nicht elementar zu sein bzw. seine Reprimierung konnte eventuell durch andere MAPK kompensiert werden. Da sowohl spezifische α -P-ERK- als auch α -P-JNK-Antikörper Bereiche der PVM färbten, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Phosphorylierungsmuster aus der Summe der Aktivierung mehrerer Proteine resultierten und die Inhibierung einer Kinase nicht zu der Reduzierung der gesamten Phosphorylierungsmuster führte. Aus diesem Grund mußte die Inhibierung einer Kinase nicht zwangsläufig in einer Unterdrückung der Substratreaktion resultieren, da andere Kinasen deren Aktivierung katalysieren konnten. In KnockOut-Studien verschiedener MAPK hat sich beispielhaft gezeigt, dass eine einzelne Disruption von ERK1 (Pages et al., 1999) oder JNK1 (Dong et al., 1998) kaum Auswirkungen auf die Ausbildung des Phänotyps hat.

Eine Inhibierung von ERK wird im Gegensatz zu JNK nicht durch die Reprimierung der Kinaseaktivität sondern durch die Verhinderung ihrer Aktivierung erreicht. Die Aktivität der Initiator kinase MEK wird durch Inhibitoreinwirkung manipuliert, infolgedessen die Kinase die Phosphorylierung der MAPK nicht mehr katalysieren kann. Die MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 zeichnen sich im Gegensatz zum JNK-Inhibitor II durch eine hohe Substrat-Spezifität aus. Die Bindung der Chemikalien an die MAPKK erfolgt nicht-kompetitiv mit ATP an vermutlich identischer Position (Favata et al., 1998). Die Behandlung von *P.berghei*-infizierten Zellen mit der Droge U0126 hatte keinen Einfluss auf das Phosphorylierungsmuster in der PVM. Dies mag zum einen darin begründet sein, dass die Aktivierung einer MAPK durch MEK nacheinander in zwei Schritten erfolgt. Bei der

Aktivierung der Kinasen ERK1/2 durch MEK wird sowohl *in vitro* und auch *in vivo* der Tyrosinrest im Phosphorylierungsmotiv zeitlich vor dem Threoninrest phosphoryliert (Ferrell and Bhatt, 1997). Als Folge dieser nicht-progressiven Phosphorylierung akkumulieren Tyrosin-phosphorylierte, inaktive MAPK bis zu einem bestimmten Schwellenwert. Wird dieser erreicht, erfolgt die Phosphorylierung des Threoninrestes und es kommt zu einer massiven Aktivierung der MAPK. In den infizierten, behandelten Zellen konnte folglich eine einfache Tyrosin-Phosphorylierung der detektierten, membraninserierten MAPK vorliegen. Des Weiteren resultieren die Phosphorylierungsmuster vermutlich aus der Summe mehrerer Kinasen, die wahrscheinlich z.T. in ihrer Aktivität durch U0126 nicht beeinflusst werden.

Eine 24-stündige Behandlung von *Plasmodium*-infizierten Erythrozyten und Hepatozyten mit U0126 resultierte in der Blockierung der Parasitenentwicklung. Da im *Plasmodium*-Genom bisher keine kodierende Sequenz für ein MEK-Homolog gefunden werden konnte, stellte sich erneut die Frage nach dem Ursprung der Proteine, die durch den Inhibitor U0126 reprimiert werden. In Mengen ab 50µM hat der MEK-Inhibitor auch einen Effekt auf die Aktivität der Kinasen p38α, PRAK (p38-related/activated protein kinase) und PKBα (Protein Kinase B α) (English and Cobb, 2002), so dass nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Droge ebenfalls andere Wirtszell- und/oder Parasitenproteine reprimierte.

Eine Wirkung des Inhibitors auf die Wirtszellmaschinerie konnte in diesem Zusammenhang nicht ausgeschlossen werden, da U0126 nach Untersuchungen von Huynh et al. schon in niedrigen Mengen in HepG2-Zellen Apoptose induziert (Huynh et al., 2003). Obwohl bereits gezeigt werden konnte, dass *P.berghei* seine Wirtszelle vor der Induktion des programmierten Zelltods zu schützen vermag (van de Sand et al., 2005), konnte die reprimierende Wirkung der Droge auf die frühen Entwicklungsstadien auch auf eine Beeinflussung der Wirtszelle zurückgeführt werden. Gegen diese Annahme sprechen zwei Beobachtungen: Zum einen konnten die von Huynh et al. publizierten Ergebnisse nur teilweise nachvollzogen werden, da es in HepG2-Zellen nach Western Immunoblot-Analysen dieser Arbeit erst nach einer Inkubationszeit von 48h und nicht bereits nach 24h zu einer nachweisbaren Aktivierung der Caspase 3 kam (Daten nicht gezeigt). Die Behandlungen von *P.berghei*-infizierten Zellen wurden nur für 24h durchgeführt, so dass hier von einem milden Effekt der Droge auf die Wirtszellen ausgegangen werden kann. Des Weiteren konnte nach Behandlung mit U0126 auch in der frühen Phase der erythrozytären Phase eine Blockierung der Parasitenentwicklung beobachtet werden. Erste Untersuchungen deuten darauf hin, dass hier der Parasit ähnlich der PTK-Behandlung nicht abgetötet wird, sondern nur arretiert: Nach dem Abtöten von *P.falciparum*-Blutkulturen durch das Pyrimethamin-Derivat WR90210 zeigte die infizierte

Wirtszelle Anzeichen von Apoptose (Phosphatidylserin-Exponierung), die in U0126-behandelten, infizierten Erythrozyten nicht nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die inhibierende Wirkung der Droge auf die erythrozytäre Phase konnte ebenfalls von Doerig et al. beobachtet werden (Doerig et al., 2005). Diese gehen entgegen der Tatsache, dass es sich bei Erythrozyten praktisch um inaktive Zellen handelt, davon aus, dass die Effekte auf Wirtszell- und nicht auf Parasitenkinasen ausgeübt werden, von denen der Parasit in seiner Entwicklung abhängig zu sein scheint. Da im Kinom von *Plasmodium* keine klassischen Parasiten-MAPKK identifiziert werden konnten, ist eine Aktivierung von Parasiten-Kinasen durch MEK der Wirtszelle vorstellbar. Eine Reprimierung der MEK-Expression durch siRNA war in HepG2- und Hepa1-6-Hepatomazellen jedoch nicht erfolgreich. Als Konsequenz konnte die durch die MEK-Inhibitor-Behandlung erbrachten Hinweise auf eine Abhängigkeit der Parasitenentpflanzung von der Wirtszellkinase nicht durch eine spezifische Reprimierung des MEK-Expression bestätigt werden.

4.3 Charakterisierung der *P.berghei*-MAPK

4.3.1 PbMAPK2 wird in der exo-erythrozytären Phase der *Plasmodium*-Infektion nicht expremiert

In Datenbankanalysen wurden in den kodierenden Sequenzen der putativen PbMAPK 1 & 2 Epitope identifiziert, die potentiell von den α -P-Tyrosin- bzw. α -P-MAPK-Antikörpern erkannt werden konnten. In RT-PCR-Versuchen wurde mit vorangehenden Untersuchungen von Tewari et al. übereinstimmend festgestellt, dass die PbMAPK2 jedoch nur in der erythrozytären Phase von *P.berghei* expremiert wird (Tewari et al., 2005). Bei der Präparation des Vollbluts wurden asexuelle und sexuelle Stadien nicht separiert; Tewari et al. konnten aber bereits zeigen, dass die PbMAPK2 nur in Mikrogametozyten expremiert wird und dort eine entscheidende Rolle in der Ausbildung männlicher Gameten übernimmt. Zudem trägt diese Kinase ein Phosphorylierungsmotiv, in dem der konservierte Tyrosinrest durch ein Histidin ersetzt ist. Unklar ist bisher die Art der *in vivo*-Aktivierung dieser Kinase. Das homologe Protein aus *P.falciparum* wurde *in vitro* von PfNek-1 phosphoryliert. Diese Kinase besitzt zwar eine MAPKK-ähnliche Aktivierungsdomäne, zeigt jedoch die meisten Übereinstimmungen mit NIMA-Kinasen und wird interessanterweise ebenfalls spezifisch in Mikrogametozyten expremiert (Dorin et al., 2001). Aufgrund der stadienspezifischen Expression der PbMAPK2 scheidet sie als Kandidat für eine Membraninsertion in der exo-erythrozytären Phase aus.

4.3.2 Die Kinase-Domäne der PbMAPK1 vereint Merkmale von Ser/Thr- und Tyr-Kinasen

Die kodierende Sequenz der PbMAPK1 wird in GeneDB wahrscheinlich aufgrund von Homologie-Kriterien nur teilweise zitiert. Die gesamte Sequenz der Kinase beinhaltet im Anschluß an die katalytische Domäne eine C-terminale Verlängerung und stimmt damit in ihrer Organisation mit dem entsprechenden Protein aus *P.falciparum* überein. Anhand von Homologie-Vergleichen sind von Hanks und Quinn charakteristische Aminosäureabfolgen identifiziert worden, die in der Sequenz einer funktionellen Kinase enthalten sein müssen (Hanks and Quinn, 1991): Insgesamt wurden 11 typische Domänen bestimmt. Beispielfhaft vermitteln die Glycin-reiche Abfolge in Subdomäne I, der K-Rest in Subdomäne II im N-terminalen Bereich der Kinase-Domäne und dem DFG-Motiv in Subdomäne VII in der Mitte der Kinase-Domäne die Bindung und Orientierung des ATP. Die katalytische Domäne in Abschnitt VIb enthält die konservierte Abfolge HRDL und für die Substratbindung und –verankerung ist das Motiv APE in Subdomäne VIII im C-terminalen Abschnitt verantwortlich. Die Konsensussequenzen der Domänen unterscheiden sich geringfügig zwischen den Klassen der Serin/Threonin- und Tyrosin-Proteinkinasen. In der N-terminalen Sequenz der putativen PbMAPK1 konnte anhand der 11 Motive die Kinase-Domäne identifiziert werden (s. Anhang III), welche folgend als Fusionsprotein zur Generierung von Antikörpern und für *in vitro*-Versuche in *E.coli* rekombinant expremiert wurde.

Obwohl die meisten Übereinstimmungen mit Konsensussequenzen von Serin/Threonin-Kinasen festgestellt worden sind, kann die Parasitenkinase nicht eindeutig als solche deklariert werden. Vielmehr finden sich zusätzlich Homologien zu Tyrosinkinase, die darauf hindeuten, dass die PbMAPK1 Eigenschaften beider Proteinklassen in sich vereint. Die Einteilung in eine der beiden Kinasegruppen wird entscheidend durch die Aminosäureabfolgen in den Subdomänen VI und VIII beeinflusst: In Serin/Threonin-Kinasen setzt sich das Motiv in Subdomäne VI aus den AS Asp-Leu-**Lys-Pro-Glu**-Asn zusammen, wohingegen Tyrosin-Kinasen hier die Abfolge Asp-Leu-**Arg/Ala-Ala-Ala/Arg**-Asn tragen. Die Sequenz der PbMAPK1 kann aufgrund der Abfolge Asp-*Iso*-**Lys-Pro-Ser**-Asn eher den Ser/Thr-Kinasen zugeordnet werden, unterscheidet sich jedoch in 2 AS-Resten von beiden vorgegebenen Konsensussequenzen. Derartige Abweichungen sind auch im Phosphorylierungsmotiv in der Subdomäne VIII zu finden: Ser/Thr-Kinasen zeigen an dieser Stelle die Abfolge **Gly-Thr/Ser-X-X-Tyr/Phe-X**-Ala-Pro-Glu, wohingegen für Tyrosinkinase die stärker konservierte Sequenz **Pro-Ile/Val-Lys/Arg-Trp-Thr/Met**-Ala-Pro-Glu charakteristisch ist. Mit dem Motiv Ala-**Thr-Arg-Trp-Tyr**-Arg-Ala-Pro-**Asp** vereint die Parasitenkinase charakteristische Aminosäurereste beider Proteinklassen. Da gerade in diesem

Bereich die Substratspezifität festgelegt wird, sind die Variabilität und auch der Austausch der C-terminalen Glutaminsäure gegen Asparaginsäure ungewöhnlich. Das APE-Motiv ist verantwortlich für die Verankerung des Substrats und beeinflusst damit die Spezifität der Interaktion mit dem Protein, das phosphoryliert werden soll. Zudem wird über den Glutamatrest am Ende des Phosphorylierungsmotivs die Faltung des C-Terminus von Kinasen wie ERK2 stabilisiert (Zhang et al., 1995). Casein-Kinasen hingegen besitzen an dieser Position auch kein Glutamat und sind trotzdem aktiv (Rowles et al., 1991). Interessanterweise trägt die PbMAPK1 zudem in der Subdomäne XI ein Motiv, das in Proteinkinasen konserviert ist, die Phosphorylierungen an internen Tyrosinresten katalysieren können (DLxxxxLxxxPxKRxxxxxxLxHK(statt P), (Seger et al., 1991)). Folglich scheint für diese Kinase zumindest eine partielle Aktivierung durch Intraphosphorylierung möglich zu sein.

Ungeachtet der unklaren Substratbindungsstelle kann die Parasitenkinase aufgrund von zwei konservierten Motiven als MAPK klassifiziert werden:

Die Domänen F-X₁₀-RE-X₇₃-R-D-X-K-X₁₀-A (Dorin et al., 1999) und [LIVM][TS]XX[LIVM]XT[RK][WY]YRXPX[LIVM][LIVM] als Phosphorylierungsmotiv (Kultz, 1998) dienen als charakteristische Merkmale von MAPK. Die genaue Zuordnung zu einer MAPK-Subfamilie kann aufgrund der Anzahl der zwischen den Subdomänen VII und VIII inserierten Aminosäuren erfolgen: Bei p38-Kinasen sind die Domänen durch 6 AS-Reste separiert, wohingegen die Insertion in JNK-Kinasen 8 Aminosäuren und in ERK-Kinasen 12 Aminosäuren lang ist. Da der Einschub in der PbMAPK1 14 AS beträgt, wird diese Kinase der ERK-Subfamilie zugeordnet. Im Phosphorylierungsmotiv besitzt die Parasitenkinase zudem die Abfolge Thr-Asp-Tyr und ähnelt damit den ERK-MAPK, die die strukturell-vergleichbare Aminosäure Glutaminsäure zwischen den phosphorylierbaren Threonin- und Tyrosinresten tragen (ERK: T-E-Y, JNK: T-P-Y, p38: T-G-Y).

4.3.3 Wirtszell-MEK als Initiator kinase für PbMAPK1

Die putative PbMAPK1 zeigt Charakteristika einer ERK-ähnlichen Proteinkinase, die als Teil einer typischen MAPK-Kaskade von einer MAPKK durch Phosphorylierung im Aktivierungsmotiv stimuliert werden könnte. Analysen des *Plasmodium*-Kinoms haben jedoch ergeben, dass die Aktivierung von Parasiten-MAPK nicht in klassischen Signaltransduktionskaskaden organisiert ist (Dorin et al., 2005). Es konnten keine zu MEK-homologen Parasitenproteine identifiziert werden. Die einzigen MAPKK-ähnlichen Proteine werden entweder nur in Mikrogametozyten expremiert (PfNek-1, (Dorin et al., 2001)) oder sie besitzen keine funktionelle Aktivierungsdomäne (PfPK7, (Dorin et al., 2005)). Folglich stellt sich die Frage nach der Initiator kinase, die eine Phosphorylierung der PbMAPK1 katalysieren

könnte.

In Immunfluoreszenzfärbungen von *P.berghei*-infizierten Hepatomazellen mit α -PfMAPK1- und α -PbMAPK1-Antikörpern konnte die Parasiten-MAPK1 sowohl in der PV als auch in der PPM und der PVM detektiert werden. Aktivierungen in Form von Phosphorylierungen konnten jedoch nur in der PVM (α -P-Tyr-AK, α -P-ERK-AK, α -P-JNK-AK) und in Parasitenzellkernen (α -P-p38-AK) detektiert werden. In Analysen der Aminosäuresequenz der PbMAPK1 wurde an Position 221-240 direkt im Anschluß an das Phosphorylierungsmotiv eine putative Transmembrandomäne identifiziert. Nach Programmvorhersagen könnte eine Membraninsertion der Kinase in der Art erfolgen, dass der N-Terminus in das Wirtszell- und der C-Terminus in das Parasitenzytosol exponiert werden. Eine Erkennung des Phosphorylierungsmotivs durch Wirtszell-MAPKK würde in der Aktivierung der Parasitenkinase resultieren, die folgend zytoplasmatische Substrate phosphorylieren könnte. In Immunfluoreszenzfärbungen von *P.berghei*-infizierten Hepatomazellen konnte eine Akkumulierung von Wirtszell-MEK in PVM-Nähe beobachtet werden, das jedoch nach Färbungen mit einem α -Phospho-MEK-AK selber nicht aktiv zu sein schien. Im *in vitro*-Kinase-Assay konnte ebenfalls kein direkter Beweis einer Aktivierung der PbMAPK1 durch Wirtszell-MEK1/2 erbracht werden. Vermutlich ist jedoch die C-terminale Verlängerung der Parasitenkinasen für deren Aktivität von entscheidender Bedeutung (s.u.), da unter *in vitro*-Bedingungen im Gegensatz zur PfMAPK1 (Graeser et al., 1997) auch keine Autophosphorylierung der rekombinanten PbMAPK1 festgestellt werden konnte.

Wesentlich für die Aktivierung von MAPK durch MEK ist *in vitro* und *in vivo* die enge Interaktion der Kinasen, die durch ein Motiv im N-terminalen Teil der MAPKK, die D-Domäne, vermittelt wird. So beeinträchtigen MEK-Deletionsmutanten ohne D-Domäne die durch EGF induzierte Aktivierung von ERK2 (Xu et al., 1999). D-Domänen sind nicht nur in fast allen MKKs enthalten, sondern auch als klassische Motive in MAPK-Phosphatasen und – Substraten nachweisbar. Eine Interaktion mit der D-Domäne von MEK wird in ERK2 über zwei Aspartatreste vermittelt, die an Position 316 und 319 kurz hinter der katalytischen Domäne zu finden sind. Die Strukturanalyse der MAPK hat ergeben, dass diese beiden Reste in der nativen Form des Proteins nah beieinander liegen und die Seitenketten an der Oberfläche exponiert werden, wodurch eine Interaktion zwischen diesen negativ geladenen Aminosäuren und den positiv-geladenen Resten der D-Domänen forciert wird. Vergleichbare CD-Domänen wurden ebenfalls in JNK und p38 gefunden. In PullDown-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Proteininteraktion zwischen ERK und MEK tatsächlich über

die D-Domäne im N-terminalen Teil der MKK vermittelt wird (Tanoue and Nishida, 2002). Eine vergleichbare CD-Domäne ist in der Sequenz der putativen PbMAPK1 jedoch nicht vorhanden. Folglich können zwischen der Wirtszell-MEK und der Parasitenkinase keine stabilen Bindungen aufgebaut werden, aufgrund derer der Nachweis einer Interaktion zwischen der Parasitenkinase und der rekombinanten MAPKK im PullDown-Experiment hätte erbracht werden können. MAPK, denen die CD-Domäne fehlt, werden mit einer deutlich geringeren Effizienz phosphoryliert und sind zudem Substraten mit D-Domänen wie Elk-1 gegenüber in ihrer Aktivität deutlich eingeschränkt. MBP, das generell keine D-Domäne besitzt, wird hingegen mit unverminderter Effektivität als Substrat erkannt und umgesetzt. Neben der Regulierung der enzymatischen Aktivität scheint die CD-Domäne ebenfalls an der Determinierung der intrazellulären Lokalisation der Kinase beteiligt zu sein. So wird ERK2, dem die CD-Domäne fehlt, trotz Anwesenheit von MEK in den Zellkern transloziert. In unstimulierten Zellen resultiert die Interaktion zwischen ERK und MEK im Zurückhalten der MAPK im Zytoplasma (Tanoue and Nishida, 2002).

Es gibt jedoch Varianten von MKK3, MKK6 und MKK7, die keine D-Domäne besitzen und damit verbunden auch eine schwächere Aktivität den jeweiligen MAPK gegenüber aufweisen (Han et al., 1996). Folglich könnte die PbMAPK1 zusätzlich zu oder anstelle von MEK durch andere MAPKK der Wirtszelle phosphoryliert werden, deren Aktivität nicht durch U0126 reprimiert wird. So zeigt MKK6 im Gegensatz zu MEK eine geringere Substratspezifität, da sie sowohl alle p38-Isoformen als auch JNK, p38/ERK-Chimere und NLK phosphorylieren kann. NLK ist als MAPK-Verwandte zu 45% mit ERK2 identisch, besitzt jedoch anstelle eines typischen Phosphorylierungsmotivs die Abfolge TQE, welche eher dem THE-Motiv in CDKs gleicht (Pearson et al., 2001). Aufgrund der geringen Selektivität hinsichtlich des Aktivierungsmotivs könnte auch die Parasiten-MAPK als Substrat erkannt werden.

4.3.4 PbMAPK1 besitzt eine C-terminale Verlängerung

Atypische Mitglieder der ERK-Familie zeichnen sich dadurch aus, dass sie in ihrer Aktivität nicht durch MEK-Inhibitoren wie U0126 und PD98059 reprimierbar sind, keine CD-Domäne besitzen und unabhängig von MEK-ähnlichen Initiator kinasen aktiv sind.

Vergleiche der Aminosäuresequenz der PbMAPK1 mit der anderer MAPK zeigen deutlich, dass die Parasitenkinase die meisten Übereinstimmungen mit ERK7 von *Rattus norvegicus* und *Mus musculus* sowie humaner ERK8 aufweist (s. Anhang III und Abb.39). ERK7 und 8 werden nicht als Mitglieder klassischer MAPK-Kaskaden eingeordnet, da ihre Aktivierung anscheinend nicht von MAPKK katalysiert wird. Die Sequenzen beider Kinasen beinhalten charakteristische, C-terminale Verlängerungen im Anschluß an die katalytische Domäne,

deren Aminosäuresequenzen jedoch nur zu 53% übereinstimmen (Abe et al., 2002). Vermutlich gehören die Kinasen zu unterschiedlichen MAPK-Familien, da sie sich ebenfalls in ihrer Aktivität und Substratspezifität unterscheiden. In eukaryotischen oder prokaryotischen Zellen überexprimiertes ERK7 zeigt im Gegensatz zu ERK8 eine hohe basale Aktivität, da es an den Threonin- und Tyrosinresten autophosphoryliert und sowohl MBP als auch c-Fos als Substrate erkennt (Abe et al., 1999). Diese Aktivität wird durch extrazelluläre Stimuli weder gesteigert noch durch MEK-Inhibitoren verringert. Obwohl ERK1 und 2 als Ser/Thr-Kinasen klassifiziert sind, konnte bei beiden ebenfalls die Fähigkeit zur Autophosphorylierung am Tyrosin in der Aktivierungsdomäne *in vitro* festgestellt werden (Seeger et al., 1991). Diese Phosphorylierung findet in den Bakterien jedoch zu einem sehr geringen Teil statt und resultiert in einem einfach-phosphorylierten Protein. Im Vergleich zu ERK1/2 hat ERK7 *in vitro* eine bis zu 1000fach stärkere Aktivität. Das hohe Maß an basaler Phosphorylierung von ERK7 scheint durch den C-Terminus vermittelt zu werden, da Deletionen in der Verlängerung einen entscheidenden Einfluss auf die Autophosphorylierung und die Aktivität der MAPK haben. Hierbei üben jedoch unterschiedliche Kürzungen verschiedene Effekte aus, aufgrund dessen wahrscheinlich verschiedene Abschnitte der C-terminalen Verlängerung bei der Regulierung der Kinaseaktivität eine Rolle spielen (Abe et al., 2001). Die Autophosphorylierung dieser MAPK scheint durch eine Wechselwirkung innerhalb des Proteins zustande zu kommen (=Intraphosphorylierung) und nicht aus einer Interaktion mit einem anderen ERK7-Molekül zu resultieren (=Interphosphorylierung). Zusätzlich übernimmt der C-Terminus vermutlich Aufgaben in der intramolekularen Stabilisierung der Struktur und der Vermittlung von Proteininteraktionen. Der C-terminale Anhang der MAPK ERK5 hingegen vermittelt nicht die Aktivierung sondern die Reprimierung der Kinase. In einem Yeast-Two-Hybrid-Ansatz konnte ein 14-3-3-Protein als Interaktionspartner von ERK5 isoliert werden (Zheng et al., 2004). Die Bindung des Skaffold-Proteins wird durch die Phosphorylierung eines Serins im C-Terminus vermittelt, woraufhin die inaktive Form von ERK5 stabilisiert und die Aktivierung durch die Initiator kinase MEK5 verhindert wird. Zur effektiven Stimulierung muß diese MAPK im Aktivierungsmotiv phosphoryliert und im C-Terminus dephosphoryliert werden. Eine relevante Phosphatase konnte bisher nicht identifiziert werden.

Das Fehlen der C-terminalen Verlängerung im rekombinanten Protein könnte der ausschlaggebende Grund für die nicht nachweisbare Autophosphorylierung oder Aktivität der PbMAPK1 gegenüber MBP in den *in vitro*-Kinase-Assays sein. Des Weiteren nehmen diverse andere Parameter Einfluss auf die Aktivität einer rekombinanten Kinase: So zeichnet sich

ERK7 in C-terminaler Fusion mit einem HIS-Tag durch eine zehnfach höhere Aktivität gegenüber dem GST-ERK7-Fusionsprotein aus (Abe et al., 2001). Zudem bevorzugen Kinasen unterschiedliche Ionen als Co-Faktoren. Ihre maximale Aktivität erreichte die rekombinante PfMAPK2 in *in vitro*-Experimenten in Anwesenheit von Mg^{2+} als Co-Faktor. Einen wesentlich geringeren Effekt hatte Mn^{2+} , und in Gegenwart von Ca^{2+} konnte keine Substratphosphorylierung festgestellt werden (Dorin et al., 1999). Des Weiteren besitzen Kinasen oft unterschiedliche Substratspezifitäten, so dass z.B. ERK7 c-Fos in *in vitro*-Versuchen phosphorylierte, wohingegen es von ERK8 nicht als Substrat erkannt wurde.

Im Gegensatz zu ERK7 weisen die meisten MAPK *in vitro* und *in vivo* ohne Stimulus eine geringe basale Aktivität auf. ERK8 kann *in vitro* aufgrund eines Serum-Stimulus oder durch die zyttoplasmatische Tyrosinkinase Src phosphoryliert werden (Abe et al., 2002). Die MAPK scheint über C-terminale SH3-Domänen-Bindungsstellen mit der PTK Src zu interagieren, in der die Motive zuerst entdeckt wurden (SH2/SH3 = Src-Homology Domain 2/3). Da zur vollständigen Aktivierung von MAPK jedoch die gleichzeitige Phosphorylierung am Tyrosin- und Threoninrest notwendig ist, bleibt fraglich, welche Kinase die Threonin-Phosphorylierung in ERK8 katalysiert.

Im C-Terminus von ERK7 wurden ebenfalls SH3-Domänen-Bindungsstellen identifiziert, deren potentielle Interaktionspartner bisher noch nicht ermittelt werden konnten. Im Gegensatz zu SH2-Domänen, die Bindungsstellen in unphosphorylierten Proteinen nicht erkennen, interagieren SH3-Domänen (wie z.B. in GRB-2) mit ihren Zielsequenzen auch dann, wenn die Reste nicht phosphoryliert sind. Eine erfolgreiche Bindung ist hier vom Anteil hydrophober Aminosäuren und Prolinen abhängig. Der C-Terminus der putativen PbMAPK1 enthält mehrere putative SH2- und eine putative SH3-Domänen-Bindungsstelle, über die eine Interaktion mit SH2/SH3-Domänen tragenden Proteinen erfolgen könnte (s. Anhang I). Die Phosphorylierung des Tyrosinrestes in den kurzen SH2-Motiven könnte von der katalytischen Domäne der Kinase vermittelt werden. SH2-Domänen-Bindungsstellen sind ebenfalls in aktivierten Wachstumsfaktorrezeptoren, Proto-Onkogenprodukten und anderen Tyrosin-phosphorylierten Proteinen zu finden (Moran et al., 1990). SH2-Domänen setzen sich aus zwei Teilen zusammen: Die eine Hälfte formt eine Tasche zur Bindung des phosphorylierten Tyrosins, der andere Teil vermittelt die Erkennung von drei der Phosphorylierung C-terminal gelegenen Aminosäuren. Die Sequenz der P-Tyrosinbindungstasche ist konserviert, wohingegen die Variabilität im C-terminalen Teil die Erkennung unterschiedlicher Proteine vermittelt und somit die Substratspezifität der Bindung garantiert (Smithgall, 1995). Diese Spezifität in der Erkennungssequenz wird in der Konstruktion von Inhibitoren der SH2-

Domänen-Bindungsstellen ausgenutzt. Derartige, kurze Peptid-Inhibitoren wurden bereits zur spezifischen Reprimierung von Proteininteraktionen eingesetzt (Piccione et al., 1993) und könnten auch in *Plasmodium*-Infektionen einen Einblick in die Relevanz der durch die PbMAPK1 vermittelten Aktivität geben.

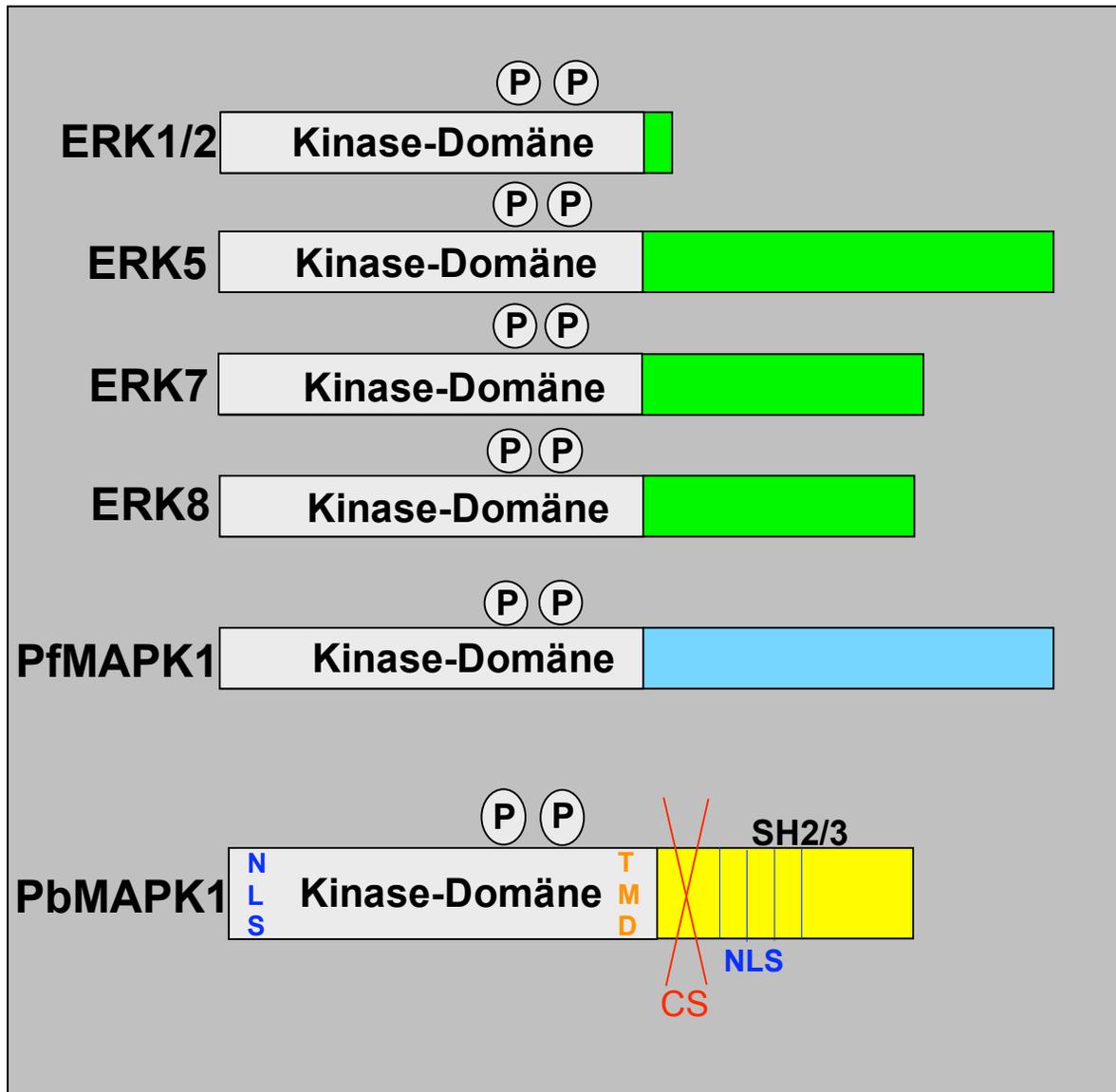


Abb. 39: Schematischer Vergleich verschiedener MAPK. Die Plasmodien-MAPK1 gleicht in ihrer Organisation atypischen MAPK wie ERK5, 7 und 8, da sie eine C-terminale Verlängerung im Anschluß an die Kinase-Domäne trägt. In einer Sequenzanalyse der PbMAPK1 konnten N- und C-terminale putative NLS (Nukleäre Lokalisationssequenz), eine putative TMD (Transmembrandomäne), CS (cleavage site) und SH2/3-Bindungsdomänen identifiziert werden.

4.4.4 Welche Funktionen könnte die PbMAPK1 in infizierten Hepatozyten ausüben?

Unklar ist weiterhin, welche Aufgabe die PbMAPK1 in infizierten Zellen übernimmt. Klassische Substrate von MAPK sind Transkriptionsfaktoren, die sie entweder direkt im Zellkern oder indirekt aktivieren, in dem sie zunächst zytoplasmatische Kinasen phosphorylieren, die an ihrer Stelle in den Zellkern translozieren (Pearson et al., 2001). Unphosphorylierte MAPK wie ERK sind generell im Zytoplasma in Assoziation mit MEK lokalisiert und gelangen erst nach ihrer Aktivierung vermutlich mit Hilfe von Skaffoldproteinen in den Zellkern. Im Gegensatz zu den klassischen MAPK besitzt die PbMAPK1 im N-Terminus eine zweiteilige Kernlokalisationssequenz, die eine gerichtete Translokation vermitteln könnte. Sequenzanalysenprogramme postulieren für die Parasiten-MAPK1 eine zu 70% wahrscheinliche, nukleäre Lokalisation. Diese wird vermutlich zusätzlich über den C-Terminus determiniert, da in der Verlängerung vier weitere putative NLS vorhanden sind. Der intrazelluläre Bestimmungsort der atypischen MAPK ERK5 und ERK7 wird ebenfalls über den C-Terminus vermittelt. ERK5 transloziert nach der Aktivierung vermittelt durch eine C-terminale, zweiteilige NLS in den Zellkern. ERK7 ist unabhängig vom Aktivierungsstatus aufgrund einer NLS im C-Terminus dauerhaft im Zellkern lokalisiert. Die Deletion der Verlängerung resultiert im Verbleiben der Kinase im Zytoplasma (Abe et al., 2001). Die intrazelluläre Lokalisation der MAPK ERK8 ist bislang ungeklärt. Da sie durch die zytoplasmatische PTK Src aktiviert werden kann, liegt die Kinase wahrscheinlich nicht permanent nukleär vor (Abe et al., 2002).

Die intrazellulären Funktionen der atypischen MAPK ERK 7 und 8 sind bisher nahezu unerforscht. Die Verlängerung von ERK7 hat unabhängig von der Aktivität der Kinase einen reprimierenden Effekt auf die DNA-Synthese. Zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner der Kinasen wurden mit den C-Termini Yeast-Two-Hybrid-Screens durchgeführt. Auf diesem Weg konnte eine Bindung des Skaffold-Proteins 14-3-3 an ERK5 nachgewiesen werden (Zheng et al., 2004). Des Weiteren wurde das CLIC3-Protein als Interaktionspartner von ERK7 isoliert, das zu humanen, intrazellulären Chlorid-Kanal-Proteinen homolog ist (Qian et al., 1999). Mit diesem Versuchsansatz könnten auch Wirtszell- oder Parasitenproteine identifiziert werden, die mit der PbMAPK1 *in vivo* interagieren.

In der C-terminalen Sequenz der PfMAPK1 konnten sich wiederholende Motive unbekannter Funktion identifiziert werden (5xIKEQ, Pos.535-554 und 9xKKYVDGSN, Pos.672-745) (Doerig et al., 1996), die jedoch nicht in der Aminosäureabfolge der PbMAPK1 vorhanden sind. Der C-Terminus der PbMAPK1 enthält keinerlei repetitive Elemente.

In *in vitro*-Experimenten werden Transkriptionsfaktoren wie c-Myc und c-Fos von ERK5 und ERK7 als klassische Substrate erkannt (Abe et al., 1999). ERK8 hingegen kann c-Fos nicht phosphorylieren und auch ERK7 zeigt gegenüber anderen Faktoren wie Elk-1, c-Jun oder ATF2 keine Aktivität (Abe et al., 1999; Abe et al., 2002). Im Kinase-Assay wurde MBP von der verkürzten Form der PbMAPK1 nicht phosphoryliert, wohingegen MBP von der rekombinanten PfMAPK1 und PbMAPK2 als Substrat erkannt wurde (Graeser et al., 1997; Tewari et al., 2005). Die Identität der *in vivo*-Substrate der Parasitenkinasen ist somit unklar. Die nur in Mikrogametozyten exprimierte PfMAPK2 phosphorylierte in Gametozytenextrakten einige Parasitenproteine, die bisher noch nicht identifiziert werden konnten (Dorin et al., 1999). Im PullDown-Experiment konnten ebenfalls mit der rekombinanten PbMAPK1 interagierende Proteine aus Parasitenextrakten der erythrozytäre Phase isoliert werden, deren Sequenzen in MALDI-Analysen noch untersucht werden müssen (Daten nicht gezeigt).

Der exakte Mechanismus der Regulierung der Genexpression ist in Plasmodien nur wenig verstanden. So konnten bisher nur sehr wenige Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Untersuchungen von Callebaut et al. deuten jedoch darauf hin, dass es in Plasmodien mehr trans-aktivierende Elemente gibt als bisher angenommen (Callebaut et al., 2005). Die Genstruktur der Plasmodien ist im Gegensatz zu den Trypanosomatiden typisch eukaryotisch, d.h. die Gene werden monocistronisch transkribiert und besitzen 5'-/3'-untranslatierte Regionen, Introns und Promotorregionen (Horrocks et al., 1998). In Micro-Array-Untersuchungen der erythrozytären Phase wurde deutlich, dass es einen zeitlichen Ablauf gibt, in dem bestimmte mRNAs transkribiert werden: Zunächst werden Transkripte von Genen, deren Produkte die Proteinsynthese vermitteln, hergestellt. Anschließend werden mRNAs von am Stoffwechsel beteiligten Genen, für Adhäsion und Invasion notwendige Gene und letztendlich von Genen für Proteinkinasen synthetisiert. Gene einer funktionellen Gruppe sind auf den Chromosomen zum Teil in Clustern organisiert. Des Weiteren könnten Gene, die gleichzeitig exprimiert werden, eine gemeinsame Konsensussequenz in der Promotorregion tragen. Es wird vermutet, dass die Transkription von multiplen Genen durch ein einziges Ereignis initiiert wird, welches in einer Kaskade von Genexpressionen resultiert. Für diese Initiation werden vermutlich nur wenige Transkriptionsfaktoren benötigt (Bozdech and Ginsburg, 2005).

Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass in der erythrozytären Phase 60% aller Gene permanent exprimiert werden und eine entscheidende Regulierung der Expression im Parasiten auch auf post-transkriptioneller Ebene stattzufinden scheint (Bozdech and Ginsburg,

2005). Auf diese Weise passt sich der Parasit den Herausforderungen seines Lebenszyklus an, da z.B. nach der Aufnahme der Gametozyten durch eine *Anopheles*-Mücke die Gametenbildung und die Fusion zur Zygote innerhalb von 10 bis 30 Minuten abgeschlossen sein müssen. Aus diesem Grund bevorrätet sich der Parasit zuvor mit den in dieser Phase der Entwicklung entscheidenden Molekülen. Dies geschieht auf Protein- und mRNA-Ebene, wobei noch nicht geklärt werden konnte, wie die Unterschiede in der Art der Stockbildung determiniert werden. So werden z.B. Proteinkinasen in den Gametozyten „gelagert“, bis durch entsprechende Signale ihre Aktivierung bestimmt wird. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass auch mRNA-Moleküle in den weiblichen Gametozyten unter Reprimierung der Translation gesammelt werden (Hall et al., 2005). Vermutlich wird sowohl die Aktivierung der Kinasen als auch die Translation der mRNAs im Laufe der Gametogenese durch Phosphorylierungen initiiert (Khan et al., 2005). Die Vermittlung derartiger Modifikationen könnte unter anderem eine Aufgabe der PbMAPK1 sein, da bisher keine klassischen MAPK-Substrate wie Parasiten-Transkriptionsfaktoren identifiziert werden konnten.

4.4.5 Regulierung von MAPK-Aktivitäten in parasitären Protozoen

Anhand der Sequenzanalyse der PbMAPK1 wurde deutlich, dass es sich hier zwar um eine MAPK handelt, diese in ihrer Organisation aufgrund der C-terminalen Verlängerung jedoch eher atypischen Kinasen wie ERK7 und 8 ähnelt. Vertreter seltener MAPK-Gruppen sind ebenfalls in anderen parasitären Protozoen beschrieben worden. Sowohl bei den Trypanosomen als auch bei den Leishmanien (LmxMPK 2, 3, 6, 7, 8, 9) wurden bereits MAPK-ähnliche Parasitenproteine identifiziert, die einen C-terminalen Anhang im Anschluß an die Kinase-Domäne aufweisen (Ellis et al., 2004; Wiese et al., 2003). So trägt die 70kda große TbECK1 (*Trypanosoma brucei* ERK-like, CDK-like Protein Kinase) eine C-terminale Verlängerung von 300 Aminosäuren, die zwar keine Übereinstimmungen mit denen von ERK5, 7 und 8 aufweist, jedoch die Aktivität der Kinase durch Bindung in *cis* negativ autoreguliert (Ellis et al., 2004). Interaktionspartner, die zudem an die putative SH3-Domäne im C-Terminus binden könnten, wurden bisher noch nicht identifiziert. Die Überexpression einer C-terminalen Deletionsmutante in prozyklischen Trypanosomen resultierte in einer mehrtägigen Wachstumsblockierung, wobei der genaue Einfluss auf den Zellzyklus noch nicht geklärt werden konnte.

Die TbECK1 scheint auf Proteinebene in allen Entwicklungsstadien konstitutiv exprimiert zu werden. Im Gegensatz dazu konnten bei den neun MAPK von *Leishmania mexicana* in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium Unterschiede im mRNA-Level festgestellt werden. Die LmxMPK scheinen folglich stadienspezifisch exprimiert zu werden, obwohl die

transkriptionelle Kontrolle auch bei den Trypanosomatiden bislang unverstanden ist. Im Unterschied zu den Leishmanien-MAPK erfolgt die Synthese der MAPKK LmxMKK- und LmxPK4-mRNA sowohl im Pro- als auch im Amastigotenstadium. Da eine Proteinexpression der Kinasen jedoch nur im Promastigoten-Stadium nachgewiesen werden konnte, scheinen sie einer post-transkriptionellen Kontrolle zu unterliegen (Wiese et al., 2003; Kuhn and Wiese, 2005). Von Lin et al. und Graeser et al. wurde ebenfalls eine stadienspezifische Expression der PfMAPK1 in der erythrozytären Phase von Plasmodium postuliert, wobei beide Arbeitsgruppen jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen kamen: So detektierten Lin et al. nur in den Parasitenextrakten von sexuellen Stadien die PfMAPK1 mit der kalkulierten Größe von 100kDa. In Lysaten der asexuellen Stadien konnte ein 150kDa großes Protein nachgewiesen werden, das Lin et al. als Proform deklarierten. Der Größenunterschied könnte aber auch auf post-translationelle Modifikationen zurückgeführt werden (Graeser et al., 1997). Graeser und Kollegen detektierten in Extrakten der erythrozytären Phase in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium drei Formen (40, 80 und 150kDa) der PfMAPK1. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind darauf zurückzuführen, dass Lin et al. die Western Immunoblot-Analysen mit Antiseren, die gegen den C-Terminus der Kinase gerichtet waren, durchführten, wohingegen die Antiseren in den Versuchen von Graeser et al. gegen den N-Terminus der PfMAPK1 generiert wurden. In Konsequenz mußte eine C-terminale Prozessierung der Kinase angenommen werden. Die Proteinverkürzung schien zudem in der Aktivierung der Kinase zu resultieren, da nur in den 40 und 80kDa großen Formen des Proteins Tyrosin-Phosphorylierungen nachgewiesen werden konnten. Eine derartige Prozessierung wäre auch für die PbMAPK1 vorstellbar und würde die Detektion von Parasitenproteinen verschiedener Größe in Extrakten der erythrozytären Phase mit den PbMAPK1-Antiseren erklären. Im Anschluß an die katalytische Domäne sind nach Datenbankanalysen putative Erkennungssequenzen für Endopeptidasen enthalten, über die eine Verkürzung der Kinase katalysiert werden könnte. Die Prozessierung würde nach Datenbankangaben durch Subtilisin-ähnliche Proprotein Konvertasen erfolgen, die Zielproteine in ihre aktive Form überführen. Subtilisin-ähnliche Proteine sind in *Plasmodium* bereits identifiziert und beschrieben worden: Ihnen wird bisher eine entscheidende Rolle bei der Prozessierung von für die Invasion essentiellen Parasitenproteinen zugesprochen (Withers-Martinez et al., 2004). Mit Antikörpern, die gegen verschiedene Abschnitte der PbMAPK1 generiert wurden, könnte eine Prozessierung im Western Immunoblot von Parasitenextrakten untersucht und eventuelle Unterschiede in der Lokalisation der verschiedenen Formen der Parasitenkinase in Immunfluoreszenzfärbungen infizierter Zellen aufgedeckt werden.

Da weder die α -P-ERK-/JNK-Antikörper noch der α -P-Tyrosin-Antikörper in Western Immunoblotanalysen zu eindeutigen Ergebnissen führten, konnte keine Aussage zum Aktivierungsstatus der verschiedenen PbMAPK1-Formen getroffen werden. Eine Zuordnung von Phosphorylierungssignalen zu einem Parasitenprotein definierter Größe konnte nur mit den α -Phospho-p38-Antikörpern erreicht werden: Im WB wurde in *P.berghei*-Extrakten der erythrozytären Phase ein etwa 75kDa großes Parasitenprotein detektiert, dessen Identität aufgrund von massiven Dephosphorylierungen während der Präparationen nicht geklärt werden konnte. Im Kinom von *Plasmodium* gibt es jedoch kein klassisches p38-Homolog. Zudem hatten p38-Inhibitoren weder Einfluss auf die Phosphorylierungen in den Parasitenzellkernen noch auf die Proliferation des Parasiten in der exo- oder erythrozytären Phase. Obwohl die verwendeten Inhibitoren als Drogen mit einer hohen Permeabilität ausgeschrieben wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass SB203580 und SB202190 die PVM und die PPM auf dem Weg in den Zellkern nicht durchdringen konnten. Zudem wird durch die primäre Bindung an Wirtszell-p38 die in den Parasiten gelangende Inhibitormenge deutlich reduziert. Eine erfolgreiche Bindung der p38-Inhibitoren hängt zudem entscheidend von der Aminosäurezusammensetzung der ATP-Bindungsstelle der MAPK ab. Die Sensitivität der Interaktion wird entscheidend von der Aminosäure an Position 106 (in humaner p38) beeinflusst. Die Isoformen α und β der p38-MAPK tragen an dieser Position ein Threonin, das eine optimale Interaktion mit dem Inhibitormolekül vermittelt und somit die Kinase bereits bei submikromolaren Mengen inhibiert wird. Die Isoformen p38 δ und p38 γ weisen in ihrer Sequenz an identischer Position ein Methionin auf, aufgrund dessen die Affinität des Inhibitors bereits erheblich gesenkt ist und erst hohe Konzentrationen die Aktivität dieser Kinaseisoformen beeinträchtigen (English and Cobb, 2002). Aufgrund der Tatsache, dass lediglich der α -Phospho-p38-Epitopantikörper, nicht jedoch der Antikörper, der gegen die gesamte p38-Kinase gerichtet war, das Parasitenprotein detektierte und in Datenbankanalysen keine zu p38 homologe Sequenz identifiziert werden konnte, muß angenommen werden, dass sich die Homologien auf das phosphorylierte Motiv in der Aktivierungslippe beschränkten. Folglich können in den Bereichen vor und nach dem Phospho-Motiv erhebliche Sequenzunterschiede vorliegen, die sich ebenfalls in einer Aminosäuresubstitution in der ATP-Bindungsstelle widerspiegeln. Als Konsequenz würden die p38-Inhibitoren mit einer geringen Sensitivität vergleichbar den p38 δ und p38 γ -Isoformen an das Parasitenprotein binden oder es gar nicht als Zielprotein erkennen.

Im Gegensatz zur PbMAPK1 besitzt die MAPK1 von *T.gondii* eine der p38-Kinase-ähnliche ATP-Bindungsstelle. Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese Parasitenkinase in ihrer

Aktivität von den p38-Inhibitoren deutlich reprimiert wird (Wei et al., 2002). Die Sequenz der *Toxoplasma*-MAPK1 weist jedoch keine Homologien zu der *Plasmodium*-MAPK1 auf; eine vergleichbare Sequenz konnte im *Plasmodium*-Genom bisher nicht identifiziert werden. Eine zur PbMAPK1 homologe Kinase wurde in *Toxoplasma* als TgMAPK2 deklariert (AAZ52559), die bisher jedoch noch nicht charakterisiert worden ist.

Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die α -P-p38-Antikörper ebenfalls die PbMAPK1 detektierten, da für sie aufgrund der N- und C-terminalen, putativen NLS eine nukleäre Lokalisation vorhergesagt wird. Bei dem im Parasitenzellkern detektierten Protein könnte es sich aufgrund der Größe von ungefähr 75kDa um die unprozessierte Form der Kinase handeln, deren Aktivität und Lokalisation vergleichbar mit ERK7 unabhängig von einer MAPKK über den C-Terminus reguliert wird. So konnte bereits für die TbECK1 gezeigt werden, dass die Threonin- und Tyrosinreste im Phosphorylierungsmotiv in Bezug auf die Aktivität der Kinase funktionell redundant sind: In Abwesenheit des autoregulatorischen C-Terminus üben TbECK1-Mutanten ihren Einfluss auf den Zellzyklus auch aus, wenn im Phosphorylierungsmotiv nur ein Threonin- oder ein Tyrosinrest vorhanden sind (Ellis et al., 2004). Folglich könnte auch die Aktivierung der PbMAPK1 über eine Autophosphorylierung (vgl. ERK7) oder durch RTK/PTK-vermittelte Phosphorylierung (vgl. ERK8) am Tyrosinrest erfolgen (Abb. 40).

Abhängig oder unabhängig vom Entwicklungsstadium könnte zudem eine Prozessierung der PbMAPK1 am C-Terminus durch Parasiten-Endopeptidasen katalysiert werden. Obwohl in der Sequenz der PbMAPK1 keine typische Signalsequenz enthalten ist, könnte sie über in *Plasmodium* bereits beschriebene alternative Sekretionswege (Cortes et al., 2003) zur PPM und PVM transportiert und dort inseriert werden. Aufgrund der C-terminalen Deletion könnte die Parasitenkinase vergleichbar mit ERK7 membrangebunden in inaktiver Form vorliegen und erst in der PVM durch MAPKK, PTK oder RTK der Wirtszelle im Aktivierungsmotiv phosphoryliert werden (Abb. 40). In dieser Position würde die Parasiten-MAPK1 die PVM in ihrer putativen Funktion als Signaltransduktionsplattform unterstützen und die Aktivierung von Wirtszellproteinen stimulieren. Ein vergleichbarer Vorgang ist bereits in *Toxoplasma*-infizierten Zellen beschrieben worden. Hierbei konnte die Aktivität einer PVM-inserierten Parasitenkinase dokumentiert werden, die gezielt die Phosphorylierung des in PVM-Nähe rekrutierten NFkappaB-Inhibitors IkappaB katalysiert und somit eine Freisetzung des Transkriptionsfaktors der Wirtszelle vermittelt (Molestina and Sinai, 2005).

Vorstellbar wäre ebenfalls eine Sekretion der prozessierten PbMAPK1 in das Wirtszellzytoplasma. Für Mitglieder FIKK-Familie konnte in der erythrozytären Phase bereits

eine Lokalisation außerhalb der PV nachgewiesen werden. Diese Kinasen verfügen jedoch im Gegensatz zur PbMAPK1 über ein PEXEL-Motiv, das die Translokation vermittelt (Schneider and Mercereau-Puijalon, 2005). In Immunfluoreszenzanalysen von *P.berghei*-infizierten Hepatomazellen konnten bereits sich von der PVM abschnürende Vesikel mit α -P-Tyrosin- und α -P-MAPK-positiven Proteine beobachtet werden. Durch einen Vesikelvermittelten Transport würden phosphorylierte Parasitenproteine beim Transport durch die Zelle vor einem Angriff durch Phosphatasen geschützt werden. Über die zweiteilige NLS im N-Terminus der PbMAPK1 könnte ein Import der Parasitenkinase in den Wirtszell-Zellkern vermittelt werden. *In vitro*-Experimente haben bereits gezeigt, dass die rekombinante Überexpression sowohl der PfMAPK1 (Graeser et al., 1997) als auch der PbMAPK1 in eukaryotischen Zellen Apoptose auslöst (vorliegende Arbeit). Die PfMAPK1 wurde primär in den Nukleoli im Kern der transfizierten Zellen detektiert. In *Trypanosoma brucei* konnten bereits Tyrosin-phosphorylierte Proteine charakterisiert werden, die im Nukleolus lokalisiert sind und dort über C-terminale RGG-Boxen mit RNA interagieren (Das et al., 1996). Derartige Motive sind in den Sequenzen der PfMAPK1 und der PbMAPK1 nicht enthalten. Der Effekt auf die transfizierte Zelle scheint nicht vom C-Terminus, sondern von der katalytischen Aktivität der Parasitenkinase abzuhängen, da zum einen die PbMAPK1 ohne C-terminale Verlängerung überexprimiert wurde und zum anderen eine PfMAPK1-Mutante mit inaktiver Kinase-Domäne in den eukaryotischen Zellen keine Apoptose auslöst (Graeser et al., 1997). Folglich könnte die PbMAPK1 nicht nur membraninseriert oder im Parasitenzellkern vorliegen, sondern auch sekretiert oder einfach bei der Auflösung der PVM freigesetzt werden.

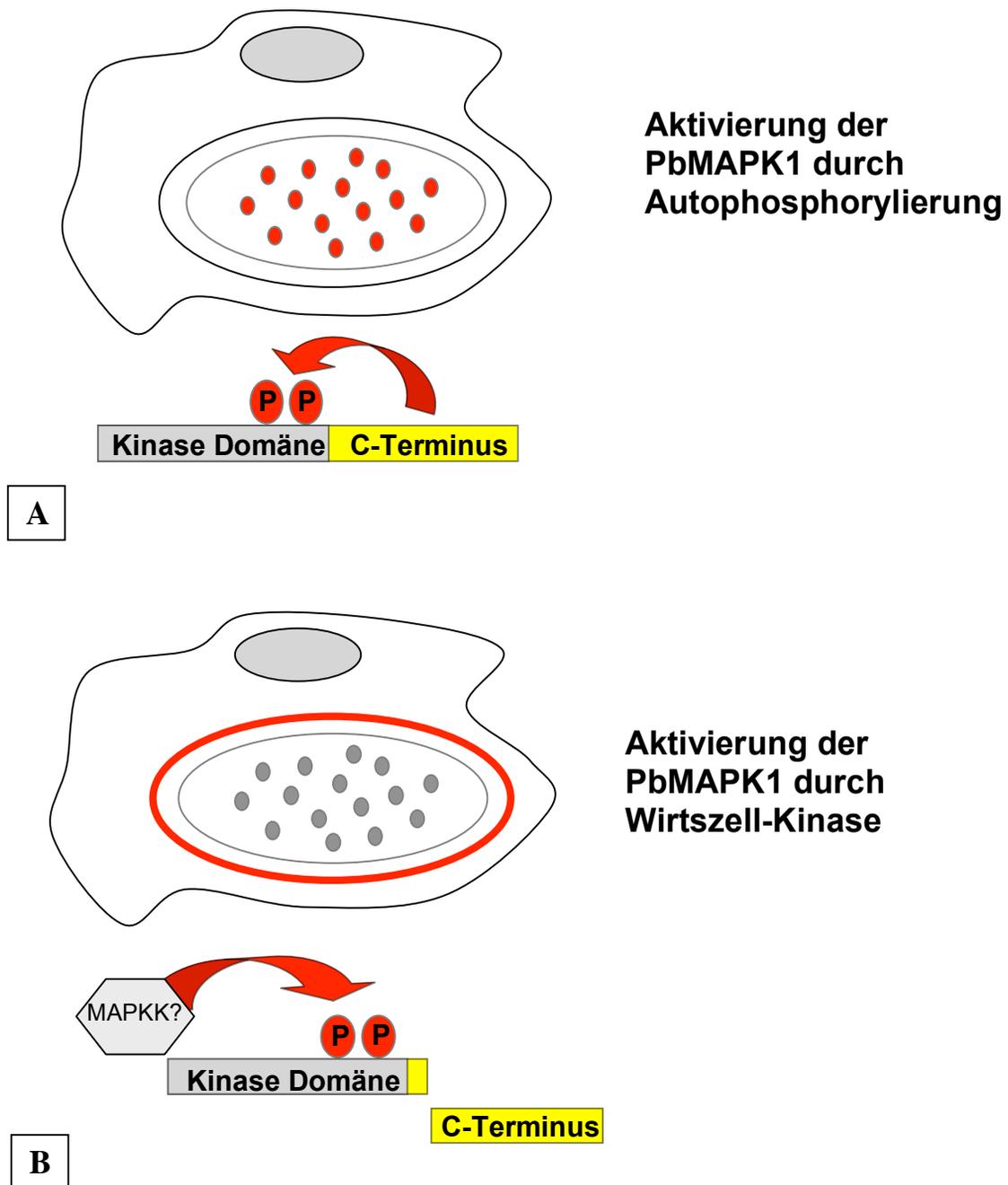


Abb.: 40 Modelle der Aktivierung der PbMAPK1 in der exo-erythrozytären Phase.

In der Abbildung sind Plasmodien-infizierte Hepatozyten skizziert. Es wird postuliert, dass sich die PbMAPK1 über ihren C-Terminus autophosphorylieren kann und in unprozessierter Form im Kern der Parasiten lokalisiert ist (A). Nach proteolytischer Verkürzung am C-Terminus könnte die Parasiten-MAPK jedoch auch in der PVM inseriert und dort von Wirtszell-MAPKK aktiviert werden (B).

In zukünftigen Experimenten könnte ein konditioneller KnockOut der PbMAPK1 durchgeführt werden, dessen Ziel ein Entwicklungsstadiumsspezifisches Ausschalten des Gens wäre. Dieser Versuchansatz könnte Aufschluß über die Relevanz der PbMAPK1-Expression in der exo-erythrozytären Phase der *Plasmodium*-Infektion geben. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die *Plasmodium*-MAPK2 eine entscheidende Rolle in der sexuellen Entwicklung des Parasiten übernimmt. Ein KnockOut des *Pbmap-2*-Gens resultierte in einer Inhibierung des Prozesses der Exflagellation von Mikrogametozyten und führte somit zu einer Blockierung der Parasitenproliferation (Tewari et al., 2005). Der KnockDown der Expression von Plasmodien-Proteinen mittels siRNA wird derzeit kontrovers diskutiert: Die Arbeitsgruppe von R. Kumar konnte in zwei Publikationen eine siRNA-vermittelte Reduktion der Expression einer Parasiten-Phosphatase und einer -Cysteinprotease in der erythrozytären Phase der Infektion zeigen (Malhotra et al., 2002; Kumar et al., 2002). Bisher konnte jedoch von keiner anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden, dass die Manipulation der Expression von Parasitenproteinen mittels siRNA in Plasmodien möglich ist. Vielmehr muß davon ausgegangen werden, dass derartige Experimente in Plasmodien nicht durchführbar sind, da den Parasiten notwendige Komponenten der siRNA-Maschinerie wie der Dicer und weitere Bestandteile des RISC-Komplexes fehlen (Aravind et al., 2003). Im Gegensatz zu Leishmanien und Plasmodien sind derartige Manipulationen der Proteinexpression in Trypanosomen generell möglich. So wurde mit Hilfe von siRNA in *T.brucei* unter anderem die Rolle von bestimmten Cyclinen im Zellzyklus des Parasiten untersucht (Hammarton et al., 2003).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass *Plasmodium* zwei atypische Mitglieder der MAPK-Familie besitzt, die anscheinend nicht Teile klassischer Signaltransduktionskaskaden sind, da typische Initiatorinasen wie MAPKK oder MAPKKK und typische Substrate wie Transkriptionsfaktoren im Parasiten-Proteom bisher noch nicht identifiziert werden konnten. In der exo-erythrozytären Phase der Infektion scheint nur die PbMAPK1 exprimiert zu werden, für die eine Aktivierung durch einen autoregulatorischen C-Terminus und/oder durch Wirtszell-MAPKK postuliert wurde (Abb. 40). In Abhängigkeit von der Lokalisation übernimmt diese MAPK vermutlich eine Rolle in der Regulierung der Parasitenproliferation und in der Kommunikation zwischen Parasit und Wirtszelle.

5. Anhang

Anhang I:

Sequenzanalyse der *P.berghei*-MAPK 1

```

10          50
ATG GAG AGA GAA AAA CAG AAG AAG ACT CAA AAA AAT GTG TCT AAA CAG TTG CAT ACC AAA TCG AAT AAG AAT GAA
M E R E K Q K K T Q K N V S K Q L H T K S N K N E
100
ACA GAT AAT ATT GAT GAA CAT GTT CTA AAA AAA TAT GAT ATA ATA AAA AAA ATT GGA AAG GGA GCA TAT GGT ATA
T D N I D E H V L K K Y D I I K K I G K G A Y G I
200
GTA TTC AAA GCA CCG TGT AGA AAA TAT AAA AAA ATT GTA GCA GTA AAA AAA ATA TTT GGA GCA TTT CAA AAT TCT
V F K A R C R K K I V A V K K I F G A F Q N S
250
ACA GAT GCT CAA AGA ACA TTT CGA GAA ATC ATG TTT TTA CAT CAA TTA AAT GGA CAT GAT AAT ATA ATT AAA CTA
E D A Q R T P R E I M P L H Q L N G H D N I I K L
300
TTG GAC GTA ATG AGA GCC AAA AAT GAT CAA GAC ATT TAT TTG GTG TTT GAA TAT ATG GAA ACA GAT TTA CAT GAA
L D V M R A K N D Q D I Y L V F E Y M E T D L H E
400
GTT ATA AGA GCA GAT ATA TTA GAA GAA GTT CAT AAA AAA TAT ATA TTA TTA CAA TTG TTA AGA GCA TTG AAA TAT
V I R A D I L E E V H K K Y I I Y Q L L R A L L K Y
500
ATG CAC TCA GGT TTA TTA TTG CAT AGA GAT ATT AAG CCA TCA AAT ATA TTA TTA AAT TCA GAA TCC CAT TTA AAA
M H S G L L L H R D I K P S N I L L N S E C H L K
600
ATA TGT GAT TTT GGA TTG GCG CGA AGT ATA TCA ACA GAA GTC AAT GAA AAT AAA ATA CCA GTA TTA ACA GAT TAT
I C D F G L A R S I S T E V N E N K I P V L T D Y
700
GTA GCA ACA CGT TGG TAT AGA GCT CCT GAT ATT TTA TTA GGA AGC ACA AAT TAT ACA GAA GGT GTC GAT ATG TGG
V A T R W Y R A P D I L L G S T N Y T E G V D M H
750
TCG CTT GCG TCC ATT ATG GCC GAA TTA TTA TTA GGA AAG CCA TTA TTT AGA GGT AAT TCA ACT ATG AAC CAA CTA
S L G C T M A E L L G K P L F R G N S T M N Q L
800
GAA AAA ATT ATT GAA ATA GTT GGA AAA CCA AAT AAA AAA GAT ATT GAA GAT ATA AAA TCA CCA TAT CCT GAA ACT
E K I I E I V G K P N K K D I E D I K S P Y A E T
850
ATT ATA TCT TCT TTT GCT GAT ACT GGA AAA AAA AAA AAA AAA TTT TCA GAA ATT TTT CAT AAA GCA TCC CAA GAT
I I S S F A D T G K K K K K F S E I P H K A S Q D
900
TCT ATA GAT TTA CTT GAA AAA CTA TTA CAA TTT AAT CCA ACA AAA AGA ATA ACA CCA GAA ATG GCG CTT AAA CAT
S I D L L E K L L Q F N P T K R I T A E M A L K H
1000
AAA TAT GTA GAA AAC TTT CAT CTT TTA ATA GAG GAA CCA ATT TCC AAA CAT AAT ATT ACA ATA CCA GTT GAT GAA
K Y V E N F H L L I E E P I C K H I I T I P V D E
1100
AGT ACA AAA TAT AAA GTT GAT TTT TAT CGA AAT ATT ATA TAT TAC AAT ATT TTA AAA AGG AAA AAA ATT TTT ATT
S T K Y K V D F Y R N I I Y Y N I L K R K K I F I
1200
CAC AGA GAG CAT TCC CCA GAT GTT CAA ATT AAT AAT TCT AGA AAT GAA ACA ATA AAA GAA AAT TTG TTA GAA TCA
H R E H C P D V Q I N N S R N E T I K E N L L E S
1250
CAA ATT AGT AAT GAT GTA AAG ACA GAT GTA CCA ATA GAT GGT GAA AAA ATA GTT GAA TAT GTA ATT CAA AAA GAA
Q I S N D V K T D V P I D G E K I V E F V I G K E
1300
GAT AAT TAT GAT ATG CAT CAA ATT GAT TCA AAA AAA AAA CGA GGA AAA AAA CGA CAT TTT ATA TCT AAT TCC
D N Y D M H Q I D S K K K R G K K K R H F I S N S
1400
CCA AAT ACA CCA AAT GCA AAC CTA GGG ACA TAT CAA AAA TAT GAA ACG AAT TCC AGA GAA AAC AGC TCA CAA TAT
P N T P N A N L G T Y Q K Y E T N C R E N S S Q Y
1450
TTT GTG GAA AAA AAA GGA GAT CTG AAT ATA TAT CAA GGG AAC AAA GAA AAA GGA AAT AAT GCA AAA AAA AAA TTA
F V E K K G D L N I Y Q G N K E K G N N A K K K L
1550
AAA AAT AAA ATA AAA TCG AAA CAA AAA ACA TTA ACC ATA AAA AAT TCT GAA AAA ACA AAT ACA GTA AAT TGC TAT
K N K I K S K Q K T L T I K N S E K T N T V N C Y
1600
GAT AAA TCA GAA GTT TTA TAC GAC AAA AAT GAA AAG TAT TAT TAT GAG CAT ACA GGT GAA AAT AAT AAT AAT GTA
D K S E V L Y D K N E K Y Y Y E H T G E N N N N V
1700
AAT GAA AGA ACT GAA CAA AAT GAC TAT TAT AAA AAT ATA GTT AAT CCA GAT ATT GAA GCT CAG TAT GGA AAT ACA
N E R T E Q N D Y F K N V N P D I E A Q Y R N E
1750
ATG TCT ATA CAT AAT TAT AAC CCT GAT CAA GAT TTT AGT AAA CAT TAT TTT TAT AAA CAA AAG AAA AAA TAT TGA
M S I H N Y N P D Q D F S K H Y F Y K Q K K K Y X

```

DNA- und Proteinsequenz der P_hMAPK1, Angaben aus GeneDB, Nr. PB000806.03.0

Primersequenzen, Kinasedomäne, putative Transmembrandomäne, putative Protease-Cleavage-Sites, putative SH2-Domäne-Bindungsstellen und putative SH3-Domäne-Bindungsstellen sind farblich hervorgehoben.

Anhang II:

DNA- und Proteinsequenz der *P.berghei*-MAPK 2**PbMAPK2-DNA-Sequenz :****1**

ATGTTGAAAAAAAAAA**AAAGAATACTCTGGAATTGAAAAAGA**GGAAAAAAAAATACAAAAAAAAAAAAACAA
 TGCTTCAGAATGTTTAAGCATGCAAAATGATGATAGCACATATATAGATAGCAATGAAGAAGATAAAA
 GTTGGAATACATAAATGAGAACACAAATGAAAATATAAAAAATAACGACGATATTAACAAAAAATCT
 GGCGAAAAAGAATACAATGCATCCGAGACAAAAAACCATAATAACGAGAAAAACAAAAATAATAG
 TAACAATAAACTAGCAAAATAAATGATGAAAAATAAATATAAAGAAGCTATTATAAAAAATGTGC
 ATGTGCCAGATAATTACATAATTAAGCACTTAATAGGAAGAGGGTTCGTATGGGTATGTATATTTAGCT
 TATGATAAAAAATACAGAAAAAATGTTGCAATAAAAAAGGTAAATCGAATGTTTGAAGATTTAATTGA
 TTGTAAGAATATTAAGAGAAATAACAATTTTGAATAGACTAAAAAGTGATTATATTATAAGATTAT
 ATGATTTAATAATACCTGATGATTTATTAATAATTTGACGAATTGTATATAGTATTAGAAATAGCCGAT
 TCGGACTTAAAAAATTTATTTAAACCCCAATATTTTGGACAGAAGAACATATAAAAACTATATTATA
 TAATTTATTATTAGGTGAAAATTTTATTCACGAATCAGGTATTATCCATAGAGATTTAAAACCAGCTA
 ACTGTTTATTAAATCAAGATTGCTCTGTTAAAGTATGTGATTTTGGTTTAGCTAGAACGATAAATAGT
 GAAAAAGATACTAATATAGTAAATGATTTAGAAGAAAAATGAAGAACCAGGGCCACATAATAAAAAATTT
 AAAAAACAATTAAGTAGCCATGTAGTTACTAGATGGTATAGAGCCCCGTAATTAATCCTGTTACAAG
 AAAATTATACTAAATCTATAGATATATGGTCTACTGGTGTATTTTGCAGAACTATTAAATATGTTA
 CAAAGCCATATTAATGATCCCACTAATAGATTTCCCTTATTTCCAGGATCTTCTTGTTTCCACTATC
 TCCAGACCCTAATTCAAAAAAGTACATGAGAAAAGTAATAGAGACCAATTAATATTTTAAATA
 TCATAGGTACACCTACAGAAGATGATCTTAAAAATATTAACAAACCCGAAGTTATAAAATATATTAA
 TTATTTCCCGCACAGAAAACCTATAAATCTAAAGCAAAAAATACCCATCTATTTTCAGATGATGGAATAA
 TTTATTAGAATCAATGTTAAAATTTAATCCAAATAAACGAATCACAATTGACCAGGCTTTAGATCATC
 CTTATCTAAAAGATGTTAGAAAAAATAATAGAAAAATTTCTCAACAAAAAATAATTTCTTCTTTT
 GATGATTGGATGGTTTTATCTGAAACACAATTGAGATATATATTTTAAAAGAAGTGCAATCCTTTCA
 TCCTGAATTAGTTATACCTTCTGTATTACTATACACGAAAACAATTTCT**ATAACAATGAGAAACCTA**
GCAGTTAA

1572**PbMAPK2-Proteinsequenz :****1**

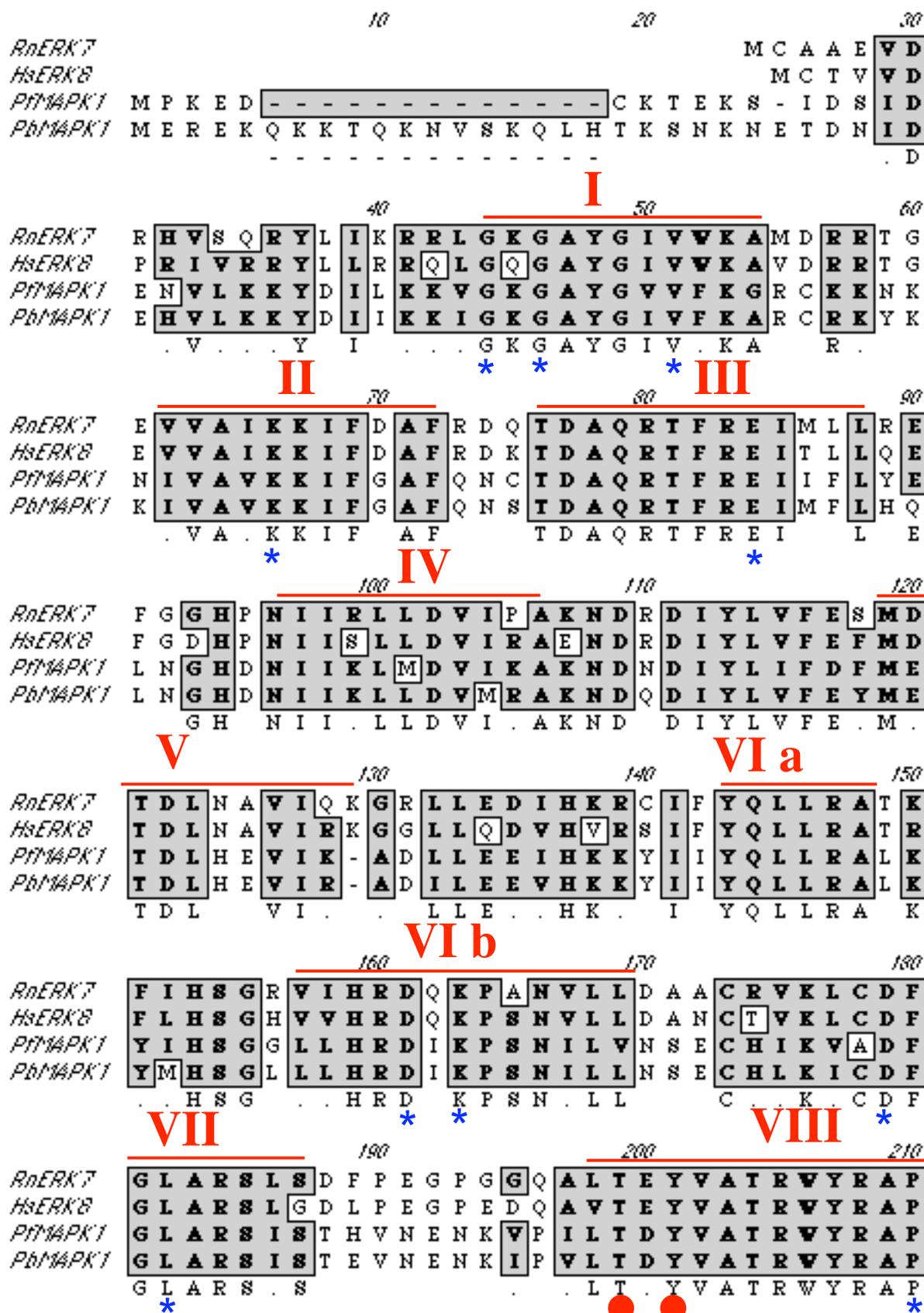
MLKKKEYSGIEKEEKNTKKKNNASECLSMQNDSTYIDSNEEDKSWEYINENTNENIKNND
 DINKKSGEKEYNASETKKTNNNEKNKNSNKNKTSKINDEKINIKEAIKKNVHVPDNYIIKHL
 IGRGSYGYVYLAYDKNTEKNVAIKKVNRMFEDLIDCKRILREITILNRLKSDYIIRLYDLII
 PDDLKFDELYIVLEIADSDLKKLFKTPIFLTEEHIKTILYNLLLGENFIHESGIIHRDLKP
 ANCLLNQDCSVKVCDFGLARTINSEKDTNIVNDLEENEEPGRAPHNKNLKKQLTSHVVTRWYRA
 PELILLQENYTKSIDIWSTGCIFAELNMLQSHINDPTNRFPLFPGSSCFPLSPDRNSKKVH
 EKSNRDQLNIIFNIIIGTPTEDDLKNINKPEVIKYIKLFPHRKPINLKQKYPISDDGINLLE
 SMLKFNPNKRITIDQALDHPYLKDVRRKKLENFSTKKIILPFDDWMVLSETQLRYIFLKEVQ
 SFHPELVIPSVFTIHENNFYNNEKPSS

523

(Angaben aus GeneDB, Nr. PB000659.00.0, Primer grün markiert)

Anhang III:

Aminosäuresequenz-Alignment von RnERK7 (*Rattus norvegicus*), HsERK8 (*Homo sapiens*), PfMAPK1 (*P.falciparum*, C-terminal verkürzt) und PbMAPK1 (*P.berghei*)



6. Literaturverzeichnis

Abe, M. K., Kahle, K. T., Saelzler, M. P., Orth, K., Dixon, J. E., and Rosner, M. R. (2001). ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family. *J Biol Chem* 276, 21272-21279.

Abe, M. K., Kuo, W. L., Hershenson, M. B., and Rosner, M. R. (1999). Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol Cell Biol* 19, 1301-1312.

Abe, M. K., Saelzler, M. P., Espinosa, R., 3rd, Kahle, K. T., Hershenson, M. B., Le Beau, M. M., and Rosner, M. R. (2002). ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem* 277, 16733-16743.

Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., and Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262, 5592-5595.

Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T., and Saltiel, A. R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270, 27489-27494.

Alexander, A. D., Villalta, F., and Lima, M. F. (2003). Transforming growth factor alpha binds to *Trypanosoma cruzi* amastigotes to induce signaling and cellular proliferation. *Infect Immun* 71, 4201-4205.

Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F., and Menard, R. (2006). Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nat Med* 12, 220-224.

Anamika, Srinivasan, N., and Krupa, A. (2005). A genomic perspective of protein kinases in *Plasmodium falciparum*. *Proteins* 58, 180-189.

Andrews, N. W. (1995). Lysosome recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Trends Cell Biol* 5, 133-137.

Aravind, L., Iyer, L. M., Wellems, T. E., and Miller, L. H. (2003). Plasmodium biology: genomic gleanings. *Cell* 115, 771-785.

Baca, A.M., and Hol, W.G. (2000). Overcoming codon bias: a method for high-level overexpression of *Plasmodium* and other AT-rich parasite gens in *Escherichia coli*. *Int. J. Parasitol.*, 30 (2), 113-8.

Bairoch, A., and Claverie, J. M. (1988). Sequence patterns in protein kinases. *Nature* 331, 22.

Beard, N., Benghuzzi, H., Tucci, M., and Cason, Z. (2005). The effects of genistein concentrations on Hep-2 cellular function. *Biomed Sci Instrum* 41, 199-204.

Bendetz-Nezer, S., Gazit, A., and Priel, E. (2004). DNA topoisomerase I as one of the cellular targets of certain tyrophostin derivatives. *Mol Pharmacol* 66, 627-634.

- Bennett, B. L., Sasaki, D. T., Murray, B. W., O'Leary, E. C., Sakata, S. T., Xu, W., Leisten, J. C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., *et al.* (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13681-13686.
- Blanchette, J., Racette, N., Faure, R., Siminovitch, K. A., and Olivier, M. (1999). Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. *Eur J Immunol* 29, 3737-3744.
- Bogoyevitch, M. A., and Court, N. W. (2004). Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. *Cell Signal* 16, 1345-1354.
- Bolen, J. B. (1991). Signal transduction by the SRC family of tyrosine protein kinases in hemopoietic cells. *Cell Growth Differ* 2, 409-414.
- Boulton, T. G., and Cobb, M. H. (1991). Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul* 2, 357-371.
- Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., DePinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H., and Yancopoulos, G. D. (1991). ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65, 663-675.
- Bozdech, Z., and Ginsburg, H. (2005). Data mining of the transcriptome of *Plasmodium falciparum*: the pentose phosphate pathway and ancillary processes. *Malar J* 4, 17.
- Brandonisio, O., Panaro, M. A., Sisto, M., Acquafredda, A., Fumarola, L., and Leogrande, D. (2000). Interactions between Leishmania parasites and host cells. *Parassitologia* 42, 183-190.
- Brondello, J. M., Pouyssegur, J., and McKenzie, F. R. (1999). Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science* 286, 2514-2517.
- Brown, D. A., and London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 111-136.
- Brown, M. (2003). Tyrosine phosphorylation and invasion mechanisms in *Eimeria tenella*. *J Parasitol* 89, 606-608.
- Callebaut, I., Prat, K., Meurice, E., Mornon, J. P., and Tomavo, S. (2005). Prediction of the general transcription factors associated with RNA polymerase II in *Plasmodium falciparum*: conserved features and differences relative to other eukaryotes. *BMC Genomics* 6, 100.
- Carlton, J. M., Angiuoli, S. V., Suh, B. B., Kooij, T. W., Pertea, M., Silva, J. C., Ermolaeva, M. D., Allen, J. E., Selengut, J. D., Koo, H. L., *et al.* (2002). Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature* 419, 512-519.
- Chang, K. L., Kung, M. L., Chow, N. H., and Su, S. J. (2004). Genistein arrests hepatoma cells at G2/M phase: involvement of ATM activation and upregulation of p21waf1/cip1 and Wee1. *Biochem Pharmacol* 67, 717-726.

- Chou, S. Y., Baichwal, V., and Ferrell, J. E., Jr. (1992). Inhibition of c-Jun DNA binding by mitogen-activated protein kinase. *Mol Biol Cell* 3, 1117-1130.
- Cooper, J. A., and Hunter, T. (1983). Regulation of cell growth and transformation by tyrosine-specific protein kinases: the search for important cellular substrate proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 107, 125-161.
- Cortes, G. T., Winograd, E., and Wiser, M. F. (2003). Characterization of proteins localized to a subcellular compartment associated with an alternate secretory pathway of the malaria parasite. *Mol Biochem Parasitol* 129, 127-135.
- Das, A., Peterson, G. C., Kanner, S. B., Frevert, U., and Parsons, M. (1996). A major tyrosine-phosphorylated protein of *Trypanosoma brucei* is a nucleolar RNA-binding protein. *J Biol Chem* 271, 15675-15681.
- Davies, T. G., Pratt, D. J., Endicott, J. A., Johnson, L. N., and Noble, M. E. (2002). Structure-based design of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Pharmacol Ther* 93, 125-133.
- Diaz, B., Barnard, D., Filson, A., MacDonald, S., King, A., and Marshall, M. (1997). Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling. *Mol Cell Biol* 17, 4509-4516.
- Dluzewski, A. R., and Garcia, C. R. (1996). Inhibition of invasion and intraerythrocytic development of *Plasmodium falciparum* by kinase inhibitors. *Experientia* 52, 621-623.
- Dobbelaere, D. A., and Kuenzi, P. (2004). The strategies of the *Theileria* parasite: a new twist in host-pathogen interactions. *Curr Opin Immunol* 16, 524-530.
- Doerig, C., Billker, O., Pratt, D., and Endicott, J. (2005). Protein kinases as targets for antimalarial intervention: Kinomics, structure-based design, transmission-blockade, and targeting host cell enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1754, 132-150.
- Doerig, C., Endicott, J., and Chakrabarti, D. (2002). Cyclin-dependent kinase homologues of *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* 32, 1575-1585.
- Doerig, C. M., Parzy, D., Langsley, G., Horrocks, P., Carter, R., and Doerig, C. D. (1996). A MAP kinase homologue from the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Gene* 177, 1-6.
- Dominguez, C., Powers, D. A., and Tamayo, N. (2005). p38 MAP kinase inhibitors: many are made, but few are chosen. *Curr Opin Drug Discov Devel* 8, 421-430.
- Dong, C., Yang, D. D., Wusk, M., Whitmarsh, A. J., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (1998). Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* 282, 2092-2095.
- Dorin, D., Alano, P., Boccaccio, I., Ciceron, L., Doerig, C., Sulpice, R., and Parzy, D. (1999). An atypical mitogen-activated protein kinase (MAPK) homologue expressed in gametocytes of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Identification of a MAPK signature. *J Biol Chem* 274, 29912-29920.

Dorin, D., Le Roch, K., Sallicandro, P., Alano, P., Parzy, D., Poulet, P., Meijer, L., and Doerig, C. (2001). Pfnek-1, a NIMA-related kinase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* Biochemical properties and possible involvement in MAPK regulation. *Eur J Biochem* 268, 2600-2608.

Dorin, D., Semblat, J. P., Poulet, P., Alano, P., Goldring, J. P., Whittle, C., Patterson, S., Chakrabarti, D., and Doerig, C. (2005). PfPK7, an atypical MEK-related protein kinase, reflects the absence of classical three-component MAPK pathways in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 55, 184-196.

Drew, D. R., Sanders, P. R., and Crabb, B. S. (2005). *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 8 is a ring-stage membrane protein that localizes to the parasitophorous vacuole of infected erythrocytes. *Infect Immun* 73, 3912-3922.

Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 (6836), 494-8.

Ellis, J., Sarkar, M., Hendriks, E., and Matthews, K. (2004). A novel ERK-like, CRK-like protein kinase that modulates growth in *Trypanosoma brucei* via an autoregulatory C-terminal extension. *Mol Microbiol* 53, 1487-1499.

English, J. M., and Cobb, M. H. (2002). Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci* 23, 40-45.

Enslin, H., Brancho, D. M., and Davis, R. J. (2000). Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *Embo J* 19, 1301-1311.

Fabian, J. R., Daar, I. O., and Morrison, D. K. (1993). Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol Cell Biol* 13, 7170-7179.

Fantl, W. J., Johnson, D. E., and Williams, L. T. (1993). Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 62, 453-481.

Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., *et al.* (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 273, 18623-18632.

Favoreto, S., Jr., Dorta, M. L., and Yoshida, N. (1998). *Trypanosoma cruzi* 175-kDa protein tyrosine phosphorylation is associated with host cell invasion. *Exp Parasitol* 89, 188-194.

Ferreira, S., De Carvalho, T. M., and De Souza, W. (2003). Protein phosphorylation during the process of interaction of *Toxoplasma gondii* with host cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 35, 245-252.

Ferrell, J. E., Jr., and Bhatt, R. R. (1997). Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272, 19008-19016.

Galley, Y., Hagens, G., Glaser, I., Davis, W., Eichhorn, M., and Dobbelaere, D. (1997). Jun NH2-terminal kinase is constitutively activated in T cells transformed by the intracellular parasite *Theileria parva*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5119-5124.

- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., *et al.* (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* *419*, 498-511.
- Gargala, G., Baishanbo, A., Favennec, L., Francois, A., Ballet, J. J., and Rossignol, J. F. (2005). Inhibitory activities of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase-targeted dihydroxyisoflavone and trihydroxydeoxybenzoin derivatives on *Sarcocystis neurona*, *Neospora caninum*, and *Cryptosporidium parvum* development. *Antimicrob Agents Chemother* *49*, 4628-4634.
- Gautier, J., Solomon, M. J., Booher, R. N., Bazan, J. F., and Kirschner, M. W. (1991). *cdc25* is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34^{cdc2}. *Cell* *67*, 197-211.
- Gazarini, M. L., and Garcia, C. R. (2003). Interruption of the blood-stage cycle of the malaria parasite, *Plasmodium chabaudi*, by protein tyrosine kinase inhibitors. *Braz J Med Biol Res* *36*, 1465-1469.
- Ghansah, T. J., Ager, E. C., Freeman-Junior, P., Villalta, F., and Lima, M. F. (2002). Epidermal growth factor binds to a receptor on *Trypanosoma cruzi* amastigotes inducing signal transduction events and cell proliferation. *J Eukaryot Microbiol* *49*, 383-390.
- Graeser, R., Kury, P., Franklin, R. M., and Kappes, B. (1997). Characterization of a mitogen-activated protein (MAP) kinase from *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* *23*, 151-159.
- Guizani-Tabbane, L., Ouni, I., Sassi, A., and Dellagi, K. (2000). *Leishmania major* induces deactivation of extracellular signal regulated kinases 2 in human U937 macrophage like cells. *Arch Inst Pasteur Tunis* *77*, 45-50.
- Hai, T., and Curran, T. (1991). Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 3720-3724.
- Hall, N., Karras, M., Raine, J. D., Carlton, J. M., Kooij, T. W., Berriman, M., Florens, L., Janssen, C. S., Pain, A., Christophides, G. K., *et al.* (2005). A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science* *307*, 82-86.
- Hammarton, T. C., Clark, J., Douglas, F., Boshart, M., and Mottram, J. C. (2003). Stage-specific differences in cell cycle control in *Trypanosoma brucei* revealed by RNA interference of a mitotic cyclin. *J Biol Chem* *278*, 22877-22886.
- Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L., and Ulevitch, R. J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* *265*, 808-811.
- Han, J., Lee, J. D., Jiang, Y., Li, Z., Feng, L., and Ulevitch, R. J. (1996). Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J Biol Chem* *271*, 2886-2891.
- Hanks, S. K., and Quinn, A. M. (1991). Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol* *200*, 38-62.

- Hanks, S. K., Quinn, A. M., and Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42-52.
- Harborth J, Elbashir S.M., Bechert K., Tuschl T., Weber K. (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 114(Pt 24), 4557-65
- Haystead, T. A., Dent, P., Wu, J., Haystead, C. M., and Sturgill, T. W. (1992). Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase. *FEBS Lett* 306, 17-22.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., and Karin, M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7, 2135-2148.
- Hide, G., Gray, A., Harrison, C. M., and Tait, A. (1989). Identification of an epidermal growth factor receptor homologue in trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* 36, 51-59.
- Hiller, N. L., Akompong, T., Morrow, J. S., Holder, A. A., and Haldar, K. (2003). Identification of a stomatin orthologue in vacuoles induced in human erythrocytes by malaria parasites. A role for microbial raft proteins in apicomplexan vacuole biogenesis. *J Biol Chem* 278, 48413-48421.
- Hollingdale, M. R., Leland, P., and Schwartz, A. L. (1983). In vitro cultivation of the exoerythrocytic stage of *Plasmodium berghei* in a hepatoma cell line. *Am J Trop Med Hyg* 32, 682-684.
- Hollingdale, M. R., McCormick, C. J., Heal, K. G., Taylor-Robinson, A. W., Reeve, P., Boykins, R., and Kazura, J. W. (1998). Biology of malarial liver stages: implications for vaccine design. *Ann Trop Med Parasitol* 92, 411-417.
- Horrocks, P., Dechering, K., and Lanzer, M. (1998). Control of gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 95, 171-181.
- Hunter, T., and Cooper, J. A. (1985). Protein-tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 54, 897-930.
- Hunter, T. (1998-99). The role of tyrosine phosphorylation in cell growth and disease. *Hervey Lect.* 96, 81-119.
- Hunter, T., and Sefton, B. M. (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1311-1315.
- Huynh, H., Nguyen, T. T., Chow, K. H., Tan, P. H., Soo, K. C., and Tran, E. (2003). Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterol* 3, 19.
- Ihle, J. N. (1994). The Janus kinase family and signaling through members of the cytokine receptor superfamily. *Proc Soc Exp Biol Med* 206, 268-272.
- Kallunki, T., Deng, T., Hibi, M., and Karin, M. (1996). c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell* 87, 929-939.

- Kappes, B., Doerig, C. D., and Graeser, R. (1999). An overview of Plasmodium protein kinases. *Parasitol Today* 15, 449-454.
- Kasler, H. G., Victoria, J., Duramad, O., and Winoto, A. (2000). ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol* 20, 8382-8389.
- Khan, S. M., Franke-Fayard, B., Mair, G. R., Lasonder, E., Janse, C. J., Mann, M., and Waters, A. P. (2005). Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific Plasmodium biology. *Cell* 121, 675-687.
- Kim, L., Butcher, B. A., and Denkers, E. Y. (2004). *Toxoplasma gondii* interferes with lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase activation by mechanisms distinct from endotoxin tolerance. *J Immunol* 172, 3003-3010.
- Kleinberger-Doron, N., Shelah, N., Capone, R., Gazit, A., and Levitzki, A. (1998). Inhibition of Cdk2 activation by selected tyrphostins causes cell cycle arrest at late G1 and S phase. *Exp Cell Res* 241, 340-351.
- Kohno, M. (1985). Diverse mitogenic agents induce rapid phosphorylation of a common set of cellular proteins at tyrosine in quiescent mammalian cells. *J Biol Chem* 260, 1771-1779.
- Kuhn, D., and Wiese, M. (2005). LmxPK4, a mitogen-activated protein kinase kinase homologue of *Leishmania mexicana* with a potential role in parasite differentiation. *Mol Microbiol* 56, 1169-1182.
- Kultz, D. (1998). Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinases. *J Mol Evol* 46, 571-588.
- Kumar, R., Adams, B., Oldenburg, A., Musiyenko, A., and Barik, S. (2002). Characterisation and expression of a PP1 serine/threonine protein phosphatase (PfPP1) from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: demonstration of its essential role using RNA interference. *Malar J* 1, 5.
- Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (1990). pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem* 265, 17355-17363.
- Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J., and Woodgett, J. R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369, 156-160.
- Langhorst, M. F., Reuter, A., and Stuermer, C. A. (2005). Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cell Mol Life Sci* 62, 2228-2240.
- Lee, J. C., Kassis, S., Kumar, S., Badger, A., and Adams, J. L. (1999). p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacol Ther* 82, 389-397.

- Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W., and et al. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372, 739-746.
- Leiriao, P., Albuquerque, S. S., Corso, S., van Gemert, G. J., Sauerwein, R. W., Rodriguez, A., Giordano, S., and Mota, M. M. (2005). HGF/MET signalling protects Plasmodium-infected host cells from apoptosis. *Cell Microbiol* 7, 603-609.
- Levitzki, A., Gazit, A., Osherov, N., Posner, I., and Gilon, C. (1991). Inhibition of protein-tyrosine kinases by typhostins. *Methods Enzymol* 201, 347-361.
- Lewis, T. S., Shapiro, P. S., and Ahn, N. G. (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74, 49-139.
- Limongi, C. L., De Souza, W., and Rozental, S. (2003). Protein kinase antagonists inhibit invasion of mammalian cells by *Fonsecaea pedrosoi*. *J Med Microbiol* 52, 201-209.
- Lin, D. T., Goldman, N. D., and Syin, C. (1996). Stage-specific expression of a *Plasmodium falciparum* protein related to the eukaryotic mitogen-activated protein kinases. *Mol Biochem Parasitol* 78, 67-77.
- Lingelbach, K., and Joiner, K. A. (1998). The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 11), 1467-1475.
- Love, D. C., Mentink Kane, M., and Mosser, D. M. (1998). Leishmania amazonensis: the phagocytosis of amastigotes by macrophages. *Exp Parasitol* 88, 161-171.
- Lüder, C.G., Lang C., Giraldo-Velasquez M., Algner M. Gerdes J., Gross U. (2003). *Toxoplasma gondii* inhibits MHC class II expression in neural antigen-presenting cells by down-regulating the class II transactivator CIITA. *J Neuroimmunol* 134 (1-2), 12-24
- Malhotra, P., Dasaradhi, P. V., Kumar, A., Mohammed, A., Agrawal, N., Bhatnagar, R. K., and Chauhan, V. S. (2002). Double-stranded RNA-mediated gene silencing of cysteine proteases (falcipain-1 and -2) of *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 45, 1245-1254.
- Markovits, J., Linassier, C., Fosse, P., Couprie, J., Pierre, J., Jacquemin-Sablon, A., Saucier, J. M., Le Pecq, J. B., and Larsen, A. K. (1989). Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res* 49, 5111-5117.
- Martiny, A., Vannier-Santos, M. A., Borges, V. M., Meyer-Fernandes, J. R., Assreuy, J., Cunha e Silva, N. L., and de Souza, W. (1996). Leishmania-induced tyrosine phosphorylation in the host macrophage and its implication to infection. *Eur J Cell Biol* 71, 206-215.
- McGowan, C. H., and Russell, P. (1995). Cell cycle regulation of human WEE1. *Embo J* 14, 2166-2175.
- Meier, R., Rouse, J., Cuenda, A., Nebreda, A. R., and Cohen, P. (1996). Cellular stresses and cytokines activate multiple mitogen-activated-protein kinase kinase homologues in PC12 and KB cells. *Eur J Biochem* 236, 796-805.

- Meis, J. F., Verhave, J. P., Meuwissen, J. H., Jap, P. H., Princen, H. M., and Yap, S. H. (1984). Fine structure of *Plasmodium berghei* exoerythrocytic forms in cultured primary rat hepatocytes. *Cell Biol Int Rep* 8, 755-765.
- Moffett, S., Brown, D. A., and Linder, M. E. (2000). Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. *J Biol Chem* 275, 2191-2198.
- Molestina, R. E., and Sinai, A. P. (2005). Detection of a novel parasite kinase activity at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane capable of phosphorylating host IkappaBalpha. *Cell Microbiol* 7, 351-362.
- Moran, M. F., Koch, C. A., Anderson, D., Ellis, C., England, L., Martin, G. S., and Pawson, T. (1990). Src homology region 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8622-8626.
- Morrison, D. K., and Cutler, R. E. (1997). The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9, 174-179.
- Morrow, I. C., Rea, S., Martin, S., Prior, I. A., Prohaska, R., Hancock, J. F., James, D. E., and Parton, R. G. (2002). Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation. *J Biol Chem* 277, 48834-48841.
- Mota, M. M., Giordano, S., and Rodriguez, A. (2004). Targeting Plasmodium host cells: survival within hepatocytes. *Trends Mol Med* 10, 487-492.
- Mota, M. M., Pradel, G., Vanderberg, J. P., Hafalla, J. C., Frevert, U., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., and Rodriguez, A. (2001). Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science* 291, 141-144.
- Mourey, R. J., Vega, Q. C., Campbell, J. S., Wenderoth, M. P., Hauschka, S. D., Krebs, E. G., and Dixon, J. E. (1996). A novel cytoplasmic dual specificity protein tyrosine phosphatase implicated in muscle and neuronal differentiation. *J Biol Chem* 271, 3795-3802.
- Murphy, S. C., Samuel, B. U., Harrison, T., Speicher, K. D., Speicher, D. W., Reid, M. E., Prohaska, R., Low, P. S., Tanner, M. J., Mohandas, N., and Halder, K. (2004). Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection. *Blood* 103, 1920-1928.
- Nandan, D., Knutson, K. L., Lo, R., and Reiner, N. E. (2000). Exploitation of host cell signaling machinery: activation of macrophage phosphotyrosine phosphatases as a novel mechanism of molecular microbial pathogenesis. *J Leukoc Biol* 67, 464-470.
- Nandan, D., Lo, R., and Reiner, N. E. (1999). Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-FOS and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 67, 4055-4063.
- Nichols, A., Camps, M., Gillieron, C., Chabert, C., Brunet, A., Wilsbacher, J., Cobb, M., Pouyssegur, J., Shaw, J. P., and Arkininstall, S. (2000). Substrate recognition domains within

- extracellular signal-regulated kinase mediate binding and catalytic activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-3. *J Biol Chem* 275, 24613-24621.
- Osmani, S. A., Pu, R. T., and Morris, N. R. (1988). Mitotic induction and maintenance by overexpression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase. *Cell* 53, 237-244.
- Pages, G., Guerin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auberge, P., and Pouyssegur, J. (1999). Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 286, 1374-1377.
- Parsons, M., Carter, V., Muthiani, A., and Murphy, N. (1995). *Trypanosoma congolense*: developmental regulation of protein kinases and tyrosine phosphorylation during the life cycle. *Exp Parasitol* 80, 507-514.
- Parsons, M., Ledbetter, J. A., Schieven, G. L., Nel, A. E., and Kanner, S. B. (1994). Developmental regulation of pp44/46, tyrosine-phosphorylated proteins associated with tyrosine/serine kinase activity in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 63, 69-78.
- Parsons, M., Valentine, M., Deans, J., Schieven, G. L., and Ledbetter, J. A. (1991). Distinct patterns of tyrosine phosphorylation during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 45, 241-248.
- Parsons, M., Worthey, E. A., Ward, P. N., and Mottram, J. C. (2005). Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 6, 127.
- Payne, D. M., Rossomando, A. J., Martino, P., Erickson, A. K., Her, J. H., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Weber, M. J., and Sturgill, T. W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *Embo J* 10, 885-892.
- Payne, T. M., Molestina, R. E., and Sinai, A. P. (2003). Inhibition of caspase activation and a requirement for NF-kappaB function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. *J Cell Sci* 116, 4345-4358.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.
- Piccione, E., Case, R. D., Domchek, S. M., Hu, P., Chaudhuri, M., Backer, J. M., Schlessinger, J., and Shoelson, S. E. (1993). Phosphatidylinositol 3-kinase p85 SH2 domain specificity defined by direct phosphopeptide/SH2 domain binding. *Biochemistry* 32, 3197-3202.
- Pradel, G., and Frevert, U. (2001). Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology* 33, 1154-1165.
- Pradel, G., Garapaty, S., and Frevert, U. (2002). Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. *Mol Microbiol* 45, 637-651.

- Prive, C., and Descoteaux, A. (2000). *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. *Eur J Immunol* 30, 2235-2244.
- Qian, Z., Okuhara, D., Abe, M. K., and Rosner, M. R. (1999). Molecular cloning and characterization of a mitogen-activated protein kinase-associated intracellular chloride channel. *J Biol Chem* 274, 1621-1627.
- Resing, K. A., Mansour, S. J., Hermann, A. S., Johnson, R. S., Candia, J. M., Fukasawa, K., Vande Woude, G. F., and Ahn, N. G. (1995). Determination of v-Mos-catalyzed phosphorylation sites and autophosphorylation sites on MAP kinase kinase by ESI/MS. *Biochemistry* 34, 2610-2620.
- Riou, J. F., Gabillot, M., Philippe, M., Schrevel, J., and Riou, G. (1986). Purification and characterization of *Plasmodium berghei* DNA topoisomerases I and II: drug action, inhibition of decatenation and relaxation, and stimulation of DNA cleavage. *Biochemistry* 25, 1471-1479.
- Robert-Gangneux, F., Creuzet, C., Dupouy-Camet, J., and Roisin, M. P. (2000). Involvement of the mitogen-activated protein (MAP) kinase signalling pathway in host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Parasite* 7, 95-101.
- Rodrigues, G. A., and Park, M. (1994). Oncogenic activation of tyrosine kinases. *Curr Opin Genet Dev* 4, 15-24.
- Rodriguez, A., Rioult, M. G., Ora, A., and Andrews, N. W. (1995). A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J Cell Biol* 129, 1263-1273.
- Ross, A. H., Baltimore, D., and Eisen, H. N. (1981). Phosphotyrosine-containing proteins isolated by affinity chromatography with antibodies to a synthetic hapten. *Nature* 294, 654-656.
- Rossomando, A. J., Payne, D. M., Weber, M. J., and Sturgill, T. W. (1989). Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6940-6943.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., and Nebreda, A. R. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78, 1027-1037.
- Rowles, J., Slaughter, C., Moomaw, C., Hsu, J., and Cobb, M. H. (1991). Purification of casein kinase I and isolation of cDNAs encoding multiple casein kinase I-like enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9548-9552.
- Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, J. F., and Parton, R. G. (1999). Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol* 1, 98-105.

- Rubinfeld, H., and Seger, R. (2005). The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol* *31*, 151-174.
- Salotra, P., Ralhan, R., and Sreenivas, G. (2000). Heat-stress induced modulation of protein phosphorylation in virulent promastigotes of *Leishmania donovani*. *Int J Biochem Cell Biol* *32*, 309-316.
- Sawyers, C. L. (1992). The bcr-abl gene in chronic myelogenous leukaemia. *Cancer Surv* *15*, 37-51.
- Schlessinger, J. (1993). How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci* *18*, 273-275.
- Schneider, A. G., and Mercereau-Puijalon, O. (2005). A new Apicomplexa-specific protein kinase family: multiple members in *Plasmodium falciparum*, all with an export signature. *BMC Genomics* *6*, 30.
- Schwab, J. C., Beckers, C. J., and Joiner, K. A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 509-513.
- Seger, R., Ahn, N. G., Boulton, T. G., Yancopoulos, G. D., Panayotatos, N., Radziejewska, E., Ericsson, L., Bratlien, R. L., Cobb, M. H., and Krebs, E. G. (1991). Microtubule-associated protein 2 kinases, ERK1 and ERK2, undergo autophosphorylation on both tyrosine and threonine residues: implications for their mechanism of activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 6142-6146.
- Shiu, S. H., and Li, W. H. (2004). Origins, lineage-specific expansions, and multiple losses of tyrosine kinases in eukaryotes. *Mol Biol Evol* *21*, 828-840.
- Sinai, A. P., and Joiner, K. A. (1997). Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Annu Rev Microbiol* *51*, 415-462.
- Smithgall, T. E. (1995). SH2 and SH3 domains: potential targets for anti-cancer drug design. *J Pharmacol Toxicol Methods* *34*, 125-132.
- Su, S. J., Chow, N. H., Kung, M. L., Hung, T. C., and Chang, K. L. (2003). Effects of soy isoflavones on apoptosis induction and G2-M arrest in human hepatoma cells involvement of caspase-3 activation, Bcl-2 and Bcl-XL downregulation, and Cdc2 kinase activity. *Nutr Cancer* *45*, 113-123.
- Sun, H., Charles, C. H., Lau, L. F., and Tonks, N. K. (1993). MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* *75*, 487-493.
- Tanoue, T., and Nishida, E. (2002). Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Pharmacol Ther* *93*, 193-202.
- Tardieux, I., Webster, P., Ravesloot, J., Boron, W., Lunn, J. A., Heuser, J. E., and Andrews, N. W. (1992). Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell* *71*, 1117-1130.

- Tewari, R., Dorin, D., Moon, R., Doerig, C., and Billker, O. (2005). An atypical mitogen-activated protein kinase controls cytokinesis and flagellar motility during male gamete formation in a malaria parasite. *Mol Microbiol* 58, 1253-1263.
- Trager, W., and Jensen, J. B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193, 673-675.
- Valere, A., Garnotel, R., Villena, I., Guenounou, M., Pinon, J. M., and Aubert, D. (2003). Activation of the cellular mitogen-activated protein kinase pathways ERK, P38 and JNK during *Toxoplasma gondii* invasion. *Parasite* 10, 59-64.
- van de Sand, C., Horstmann, S., Schmidt, A., Sturm, A., Bolte, S., Krueger, A., Lutgehetmann, M., Pollok, J. M., Libert, C., and Heussler, V. T. (2005). The liver stage of *Plasmodium berghei* inhibits host cell apoptosis. *Mol Microbiol* 58, 731-742.
- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., and Laskay, T. (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 173, 6521-6525.
- Vieira, M. C., de Carvalho, T. U., and de Souza, W. (1994). Effect of protein kinase inhibitors on the invasion process of macrophages by *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 203, 967-971.
- Villalta, F., Zhang, Y., Bibb, K. E., Burns, J. M., Jr., and Lima, M. F. (1998). Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through the MAP kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 247-252.
- Vincke, I.H., and Lips, M. (1948). Un nouveau *Plasmodium* d'un Rongeur sauvage du Congo *Plasmodium berghei* n.sp. *Annale de la Société Belge de Médecine Tropicale*. 28, 97-104
- Wang, J. Y. (1993). Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation. *Curr Opin Genet Dev* 3, 35-43.
- Ward, P., Equinet, L., Packer, J., and Doerig, C. (2004). Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics* 5, 79.
- Wei, S., Marches, F., Daniel, B., Sonda, S., Heidenreich, K., and Curiel, T. (2002). Pyridinylimidazole p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors block intracellular *Toxoplasma gondii* replication. *Int J Parasitol* 32, 969-977.
- Wheeler-Alm, E., and Shapiro, S. Z. (1992). Evidence of tyrosine kinase activity in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*. *J Protozool* 39, 413-416.
- Wheeler-Alm, E., and Shapiro, S. Z. (1993). Glycosome-associated tyrosine-phosphorylated protein in *Trypanosoma brucei*. *Trop Med Parasitol* 44, 281-284.
- Wiese, M., Wang, Q., and Gorcke, I. (2003). Identification of mitogen-activated protein kinase homologues from *Leishmania mexicana*. *Int J Parasitol* 33, 1577-1587.

Withers-Martinez, C., Jean, L., and Blackman, M. J. (2004). Subtilisin-like proteases of the malaria parasite. *Mol Microbiol* 53, 55-63.

Xu, B., Wilsbacher, J. L., Collisson, T., and Cobb, M. H. (1999). The N-terminal ERK-binding site of MEK1 is required for efficient feedback phosphorylation by ERK2 in vitro and ERK activation in vivo. *J Biol Chem* 274, 34029-34035.

Yoshida, N., Favoreto, S., Jr., Ferreira, A. T., and Manque, P. M. (2000). Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. *Braz J Med Biol Res* 33, 269-278.

Zhang, J., Zhang, F., Ebert, D., Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J. (1995). Activity of the MAP kinase ERK2 is controlled by a flexible surface loop. *Structure* 3, 299-307.

Zheng, Q., Yin, G., Yan, C., Cavet, M., and Berk, B. C. (2004). 14-3-3beta binds to big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1/ERK5) and regulates BMK1 function. *J Biol Chem* 279, 8787-8791.

Zhong, L., Lu, H. G., Moreno, S. N., and Docampo, R. (1998). Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by *Trypanosoma cruzi* is linked to cell invasion. *FEMS Microbiol Lett* 161, 15-20.

7. Zusammenfassung

Der Malariaerreger *Plasmodium* parasitiert in der primären, exo-erythrozytären Phase der Infektion in Hepatozyten. Die intrazelluläre Lebensweise erfordert vom Parasiten die Interaktion mit seiner Wirtszelle, die in gezielter Aktivierung oder Reprimierung der Signaltransduktionsmaschinerie der Leberzelle und des Parasiten resultieren kann. Die Aufklärung dieser molekularen Vorgänge ist ein wichtiges Ziel im Kampf gegen die Malaria, um auf diese Weise Angriffspunkte für spezifische Inhibitoren oder Impfstoffe zu identifizieren.

In dieser Arbeit sollten Parasiten-induzierte Signaltransduktionssereignisse untersucht werden, die im Leberstadium der Plasmodien-Infektion bisher kaum erforscht sind. In Immunfluoreszenzanalysen wurden in Plasmodien-infizierten Zellen intensive Tyrosin-Phosphorylierungen detektiert, die sich auf die parasitophore Vakuolenmembran (PVM) konzentrierten. Mit Tyrosinkinaseinhibitoren konnte die Anzahl dieser α -P-Tyrosin-positiven Zellen erheblich reduziert werden. Zudem wurde durch die Drogen die Parasitenproliferation deutlich blockiert.

Da es sich bei den Phosphorylierungen um für die Parasitenentwicklung essentielle Signaltransduktionereignisse zu handeln schien, sollte die Identität der phosphorylierten Proteine geklärt werden. Kinasen, die im Zuge ihrer Aktivierung Phosphorylierungen an Tyrosin- und auch an Threonin-Resten erfahren, sind Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK). In Immunfluoreszenzanalysen von *P.berghei*-infizierten Hepatozyten mit Antikörpern gegen die zweifach phosphorylierte Form der Kinasen konnten tatsächlich aktivierte MAPK in der PVM nachgewiesen werden. Da es sich bei den nachgewiesenen Proteinen um Wirtszell- und/oder Parasitenkinasen handeln konnte, sollte folgend der Ursprung der membranständigen MAPK bestimmt werden. Die rekombinante Expression von Wirtszell-MAPK in *P.berghei*-infizierten Zellen ließ keine eindeutige Aussage hinsichtlich einer Integration von Wirtszellproteinen in die PVM zu. Durch den Einsatz von siRNA sollte die Expression von Wirtszellkinasen manipuliert werden. Im Gegensatz zu Cervixkarzinomzellen konnte in Hepatomazellen mit synthetischer siRNA jedoch keine effiziente Verminderung der Proteinexpression erreicht werden. Eine direkte Blockierung von Wirtszell-MAPK mit Inhibitoren hatte jedoch keinen Effekt auf die Phosphorylierungen oder die Parasitenproliferation.

Immunfluoreszenzanalysen mit Antikörpern gegen die MAPK1 des verwandten Parasiten *P.falciparum* gaben erste Hinweise darauf, dass eventuell Parasiten-MAPK in die PVM

integriert werden. In Datenbankanalysen konnten im Kinom von *P.berghei* zwei putative MAPK, PbMAPK1 und PbMAPK2, identifiziert werden. In RT-PCR-Analysen wurden in der exo-erythrozytären Phase der Infektion jedoch nur Transkripte der PbMAPK1 nachgewiesen. Die annotierte Sequenz der Parasiten-MAPK1 wurde kloniert, mit verschiedenen, bakteriellen Expressionssystemen in *E.coli* rekombinant exprimiert und aufgereinigt. Mit Antisera gegen die rekombinante PbMAPK1 wurde in Immunfluoreszenzfärbungen die membranständige Lokalisation der Parasiten-MAPK1 in der exo-erythrozytären Phase bestätigt.

Da im *Plasmodium*-Kinom bisher keine typischen MAPKK identifiziert wurde, stellte sich die Frage nach der Initiator kinase, die die Aktivierung der Parasiten-MAPK1 katalysierte. Der MEK-Inhibitor U0126 hatte einen deutlichen, reprimierenden Effekt auf die Parasitenproliferation. Weder in PullDown-Experimenten noch mittels *in vitro* Kinase-Assays konnte jedoch der Nachweis einer Interaktion zwischen der Parasiten-MAPK1 und der Wirtszell-MEK erbracht werden. Zudem mußte festgestellt werden, dass die in GeneDB annotierte Sequenz nicht der vollständigen PbMAPK1 entsprach, sondern eine C-terminale Verlängerung vermutlich aufgrund fehlender Homologien zu bisher beschriebenen Proteinen nicht angegeben wurde. In RT-PCR-Analysen konnten Transkripte der kompletten kodierenden Sequenz in Blut- und in Leberstadium des Parasiten nachgewiesen werden. Die Bedeutung der C-terminalen Verlängerung für die Aktivität und die Lokalisation der Parasitenkinase konnte jedoch nicht mehr geklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich in der exo-erythrozytären Phase der Plasmodien-Infektion Phosphorylierungsereignisse auf die PVM konzentrieren, die vermutlich in der Funktion einer „Signaltransduktionsplattform“ gezielt Stimuli ins Wirtszellzytosol sendet oder aus diesem empfängt. Teil dieser Signaltransduktionsmaschinerie des Parasiten ist die PbMAPK1, für die je nach Lokalisation verschiedene Arten der Aktivierung und Funktion postuliert werden konnten.

Abkürzungsverzeichnis

α	anti, gegen
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine (Rinderserum –Albumin)
bzw.	beziehungsweise
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	copy DNA
CO_2	Kohlenstoffdioxid
dH_2O	destilliertes Wasser
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HRP	horseradish peroxidase
HSP	heat shock protein
IF	Immunfluoreszenz
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria broth
μ	Mikro-, 10^{-6}
m	Milli-, 10^{-3}
M	Molar
MCS	multiple cloning site
MgCl_2	Magnesiumchlorid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
mM	Millimolar
mRNA	Messenger-RNA
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pb	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>P.berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
PBS	Phosphat buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>

<i>P.falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
p.I.	post infection
PV	parasitophore Vakuole
PVM	parasitophore Vakuole
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris Borat EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylaminomethan
U	Unit
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
vgl.	vergleiche
WB	Western Immunoblot
xg	x-faches der Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
z.T.	Zum Teil

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. Volker T. Heussler für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Überlassung des Themas.

Frau Dr. Iris Bruchhaus danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Besonderer Dank gilt den anderen beiden Erstbesiedlern von Labor 2: Claudi und Ulli. Was haben wir in den letzten Jahren zusammen gelacht, gefühlt, gelitten, gestritten, gegessen, getrunken, gemeckert, geschnackt...kurzum kann ich nur sagen, dass es sehr intensive vier Jahre waren, in denen sich zudem die ein oder andere Gestalt ins Lab verirrte:

Einige besuchten uns nur kurzfristig und wurden trotzdem unvergessen: PattaPatta-Tommy, der Ösi-Peter, die Grafschaft und unser Quoten-Mediziner Gunnar (Dicksten Drücker to my Personal Doctor). Andere entschlossen sich dann doch, länger zu bleiben und den Laborplaneten zu besiedeln, so dass für die Ureinwohner bald kein Platz mehr war und die Reise weitergeht...Ein dickes DANKE geht an alle Laborschneekchen und unseren Hahn im Korb... vor allen Dingen aber an meine Angie, die die Welt versteht wie keine andere.

In all dem Trubel, dem Stress und dem Gefühlschaos der letzten Jahre war es eine wundervolle Beruhigung festzustellen, dass Ihr IMMER für mich da seid:

Meine lieben Eltern, Ulli und Berni, die mir jetzt schon seit fast 30 Jahren (Aaaahhh) eine unsagbare Stütze sind...ich weiß nicht, wo ich ohne Euch wäre!

Mein Bruderherz Gunni und "Schwägerin" Sandra, denen ich sooo viele absolut stressfreie (HAHA) Wochenenden verschafft habe und die mir Hamburg und vor allem meine Küche nähergebracht haben...

Meine Milka Ilka, das Marburger Urgestein, die einfach nicht aufgibt, an das Gute im Menschen zu glauben...

Meine Sandra, die ich immer in ihrem Loft in Manhattan besuchen kann, wenn mir malwieder auf meiner Farm in Neuseeland die Decke auf den Kopf fällt...

"Muddi" Uta und Lars, die es sich einfach nicht verkneifen konnten, mich letztes Jahr zur Patentante zu machen...

Dat Tänsche und der Tobbe, die auch von der Lahn an die Elbe zogen und nun auf Planet-Borstel Ähnliches erleiden müssen...

Dat Sabinschen hatte mich ja schon gewarnt, dass es eine harte Zeit wird, aber sowas konnte ja keiner ahnen...