

**Charakterisierung der MAP-Kinase LmxMPK7 und  
der Glykogensynthase-Kinasen GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$   
des humanpathogenen Parasiten *Leishmania mexicana***

DISSERTATION

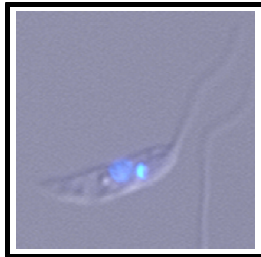
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Nadja M. Bleicher  
geboren in Crailsheim

Hamburg 2018

1. Gutachter der Dissertation:  
2. Gutachter der Dissertation:  
Vorsitzende der Prüfungskommission:  
Tag der Disputation:

Herr Prof. Dr. Tim-Wolf Gilberger  
Herr Priv.-Doz. Dr. Martin Wiese  
Frau Prof. Dr. Julia Kehr  
30. November 2018



**meiner Familie**



Liebe Leserin, lieber Leser,

vorab ein paar Informationen zum Aufbau der Dissertation. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung von Mitgliedern zweier verschiedener Kinasefamilien – einer MAP-Kinase und zweier Glykogensynthase-Kinasen. Die Kapitel zu der einen Kinasefamilie können auch unabhängig von den Kapiteln der anderen gelesen werden. Wenngleich auch methodisch viele Gemeinsamkeiten bestanden, bauen beide Teile nicht aufeinander auf und wiederholen sich inhaltlich in der Diskussion und im speziellen Teil der Einleitung kaum.

Die praktische Arbeit wurde durch den Umzug der Arbeitsgruppe an zwei verschiedenen Instituten durchgeführt. Sie wurde im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNI) am wunderschönen Hamburger Hafen begonnen und das letzte Drittel im Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences (SIPBS) der Strathclyde University in Glasgow im nicht weniger schönen Schottland beendet.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Martin Wiese für die Überlassung des vielseitigen Themas und der zur Durchführung der Arbeit benötigten Mittel sowie für die engagierte Betreuung und die stets wertvollen Ratschläge.

Bei Herrn Prof. Dr. Tim-Wolf Gilberger möchte ich mich für die Übernahme der Betreuung und Tätigkeit als Gutachter bedanken.

Frau Dr. Heidi Rosenqvist danke ich sehr für die Durchführung der MALDI-Analysen an der Süddänischen Universität in Odense. Bei Frau Christel Schmetz (BNI) bedanke ich mich für die elektronenmikroskopische Untersuchung und bei Frau Claudia Sander-Jülch (BNI) für die FACS-Analysen der Leishmanien. Danke an Herrn Prof. Dr. Jeremy Mottram, dass ich das Fluoreszenzmikroskop an der Glasgow University benutzen durfte. Ein Dankeschön geht auch an Frau Anne MacDonald für die Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit.

Allen Mitarbeitern aus Labor 3 am BNI danke ich sehr für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die konstruktiven Diskussionen. Ebenso ein Dankeschön an alle Mitarbeiter des SIPBS-Labors 3 in Schottland für die freundliche Aufnahme und die allzeitige Hilfsbereitschaft.

Abschließend möchte ich meiner gesamten Familie danken, die mir immer zur Seite steht.

Fragen und Anmerkungen dürfen gerne an mich über [nbleicher12@gmail.com](mailto:nbleicher12@gmail.com) gerichtet werden.

Nadja M. Bleicher

Hamburg, 2018



I Inhaltsverzeichnis

## II Abkürzungsverzeichnis.....VII

<b>1.</b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b>1</b>
1.1	Leishmanien und Leishmaniosen.....	1
1.1.1	Verbreitung.....	1
1.1.2	Taxonomie des Erregers.....	2
1.1.3	Vektor und Reservoir.....	3
1.1.4	Lebenszyklus des Parasiten.....	4
1.1.5	Krankheitsbilder, Diagnostik, Therapie und Prävention.....	9
1.1.6	Genomische Organisation und Genexpression.....	14
1.1.7	Zellzyklus und Cytokinese – Morphologische Aspekte.....	17
1.2	Signaltransduktion in höheren Eukaryonten.....	18
1.2.1	Proteinkinasen.....	20
1.2.2	CMGC-Proteinkinasen.....	23
1.2.2.1	Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen.....	23
1.2.2.2	Glykogensynthase-Kinasen.....	25
1.3	Signaltransduktion in Trypanosomatiden.....	30
1.3.1	Mitogen-aktivierte Protein Kinasen in Trypanosomatiden.....	35
1.4	LmxMPK7 – Aufgabenstellung.....	39
1.5	LmxGSK3 – Aufgabenstellung.....	39
<b>2.</b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>	<b>40</b>
<b>2.1</b>	<b><u>Material</u></b> .....	<b>40</b>
2.1.1	Geräte.....	40
2.1.2	Verbrauchsmaterialien und Glaswaren.....	41
2.1.3	Chemikalien, Medien und Säulenmaterialien.....	42
2.1.4	Molekularbiologische Kits.....	45
2.1.5	Größenstandards.....	45
2.1.6	Enzyme und Proteine.....	45
2.1.7	Antikörper.....	46
2.1.8	Lösungen und Puffer.....	47
2.1.9	Kulturmedien.....	51
2.1.9.1	Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien.....	51
2.1.9.2	Nährmedien und Lösungen für die Leishmanienkultur.....	51
2.1.10	<i>E. coli</i> Bakterienstämme.....	52
2.1.11	Phagenbank.....	52
2.1.12	Leishmanien.....	52
2.1.13	Versuchstiere.....	52
2.1.14	Plasmide und Plasmidkonstrukte.....	53
2.1.15	Oligonukleotide.....	53
<b>2.2</b>	<b><u>Methoden</u></b> .....	<b>55</b>
	<b>ZELLBIOLOGISCHE METHODEN</b>	
2.2.1	<u>Arbeiten mit Leishmanien</u> .....	55
2.2.1.1	Kultivierung von <i>Leishmania mexicana</i> Promastigoten.....	55
2.2.1.2	<i>In vitro</i> -Differenzierung zu Amastigoten und Amastigotenkultivierung.....	55
2.2.1.3	<i>In vitro</i> -Differenzierung zu Promastigoten.....	56
2.2.1.4	Leishmanien-Stabilate.....	56

2.2.1.5	Transfektion von Leishmanien über Elektroporation.....	56
2.2.1.6	Wachstumsversuche in Gegenwart von Inhibitoren.....	57
2.2.1.7	Zellzählung und Bestimmung der Anzahl an Zellen mit Zellteilungsphänotyp.....	57
2.2.1.8	Gewinnung und Infektion von Peritonealmakrophagen.....	58
2.2.1.9	Infektion von BALB/c-Mäusen mit Promastigoten.....	58
2.2.1.10	Transmissionselektronenmikroskopie von infizierten Gewebsmakrophagen.....	59
2.2.1.11	Präparation von Amastigoten aus Mausfußläsionen.....	59
2.2.1.12	Punktion von Mausfußläsionen zur Gewinnung von Amastigoten.....	59
2.2.1.13	SYTO 16-Färbung und Sortierung von Läsionsamastigoten mittels Durchflusszytometrie (FACS).....	60
2.2.1.14	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	60
2.2.1.15	Flagellenlängenmessung.....	61
2.2.2	<u>Kultur von Bakterienstämmen</u> .....	61
2.2.2.1	Kultivierung auf Festmediumplatten.....	61
2.2.2.2	Zellanzucht in Flüssigkultur.....	61
2.2.2.3	Anlegen von Dauerkulturen.....	62
	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>	
	<b>ARBEITEN MIT DNA</b>	
2.2.3	<u>Klonierung von Plasmiden</u> .....	62
2.2.3.1	Herstellung von kompetenten Zellen nach Hanahan, 1983.....	62
2.2.3.2	Transformation von <i>E. coli</i> mittels Hitzeschock.....	63
2.2.4	<u>Gewinnung von DNA</u> .....	63
2.2.4.1	Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen.....	63
2.2.4.1.1	Minipräparation von Plasmid-DNA (Zhou et al., 1990).....	63
2.2.4.1.2	Minipräparation von Plasmid-DNA mit dem M & N NucleoSpin Plasmid Kit.....	64
2.2.4.1.3	Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab mit dem Midi Kit von Macherey & Nagel bzw. Invitrogen.....	64
2.2.4.2	Isolierung von genomischer DNA aus Leishmanien.....	64
2.2.4.3	Isolierung von Phagen-DNA mit dem Qiagen Lambda Kt.....	64
2.2.5	<u>Reinigen und Fällern von DNA</u> .....	65
2.2.5.1	Phenol-Chloroform Extraktion.....	65
2.2.5.2	Ethanol-Fällung.....	65
2.2.6	<u>Analyse und Modifikation von DNA</u> .....	65
2.2.6.1	DNA-Konzentrationsbestimmung durch Absorptionsspektrometrie.....	65
2.2.6.2	Sequenzierung.....	66
2.2.6.3	Reaktionen mit DNA-modifizierenden Enzymen.....	66
2.2.6.3.1	Spezifische Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	66
2.2.6.3.1.1	Restriktionsspaltung von Plasmid-, Phagen-DNA bzw. PCR-Fragmenten.....	66
2.2.6.3.1.2	Restriktionsspaltung von genomischer DNA.....	66
2.2.6.3.2	Auffüllreaktion mit Klenow-Fragment.....	67
2.2.6.3.3	Dephosphorylierung am 5'Ende von DNA-Fragmenten.....	67
2.2.6.3.4	Ligation von DNA-Fragmenten.....	67
2.2.6.4	Konventionelle Agarose-Gelelektrophorese.....	67
2.2.6.5	DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen mit dem Kit von Qiagen und M & N.....	68
2.2.6.6	Annealing von phosphorylierten Oligonukleotiden zum Einbringen von DNA-Sequenzen.....	68
2.2.6.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	68
2.2.6.7.1	Klonierung eines PCR-Produkts mit TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen.....	69
2.2.6.7.2	PCR auf kruden Leishmanienlysaten.....	69
2.2.6.7.3	Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem M&N NucleoSpin Extrakt II Kit.....	69



2.2.6.7.4	Einzelzell-PCR.....	69
2.2.6.7.5	Digoxigenin-Markierung zur Herstellung einer DNA-Gen-Sonde.....	70
2.2.6.8	Southern-Blot.....	70
2.2.6.8.1	DNA-Auftrennung und -Transfer auf die Membran.....	70
2.2.6.8.2	Hybridisierung mit der spezifischen DIG-markierten DNA-Sonde.....	71
2.2.6.8.3	Nachweis der Digoxigenin-Markierung.....	71
2.2.6.8.4	Entfernung der gebundenen Sonde – Stripping des Blots.....	71
2.2.7	<u>Durchsuchen einer <math>\lambda</math> DASH II-Phagenbank</u> .....	72
2.2.7.1	Vorbereitung der Wirtsbakterien.....	72
2.2.7.2	Phagenplattierung.....	72
2.2.7.3	Identifikation der getragenden Phagenklone.....	72
2.2.7.4	Vereinzelung der positiven Phagenklone.....	73
2.2.7.5	Phagengewinnung und Bestimmung des Phagentiters.....	73
	<b>ARBEITEN MIT RNA</b>	
2.2.8.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Leishmanien mit dem M&N NucleoSpin RNA II Kit.....	74
2.2.8.2	Reverse Transkription (RT-PCR).....	74
	<b>ARBEITEN MIT PROTEINEN</b>	
2.2.9	<u>Protein- und Immunochemische Methoden</u> .....	74
2.2.9.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford, 1976.....	74
2.2.9.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	75
2.2.9.3	Färbung von SDS-PA-Gelen mit Coomassie Blue.....	75
2.2.9.4	Trocknen von Gelen.....	75
2.2.9.5	Immunoblot.....	75
2.2.9.5.1	Elektrophoretischer Transfer von Proteinen im Semi-Dry-Verfahren.....	75
2.2.9.5.2	Nachweis mittels Antikörperreaktion.....	76
2.2.9.5.3	Entfernung des gebundenen Antikörpers – Stripping des Blots.....	76
2.2.9.6	Bestimmung von Phosphorylierungsstellen durch MALDI-TOF-MS und MS/MS.....	77
2.2.10	<u>Proteingewinnung</u> .....	77
2.2.10.1	Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Leishmanien.....	77
2.2.10.1.1	Herstellung von Leishmanienlysaten für Immunoblot-Analyse.....	77
2.2.10.1.2	Herstellung von Leishmanienlysaten für Kinase-Aktivitätstest.....	77
2.2.10.2	Expression und Synthese von rekombinantem Protein in <i>E. coli</i> , Ernte, Aufschluss und Affinitätsaufreinigung.....	78
2.2.10.2.1	Herstellung von Proben für SDS-PAGE von Gesamtzelllysat, Überstand und Pellet des Aufschlusses.....	79
2.2.10.2.2	Aufreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen.....	79
2.2.10.2.3	Aufreinigung von MalBP-Tag-Fusionsproteinen.....	80
2.2.10.2.4	Aufreinigung von GST-Tag-Fusionsproteinen.....	80
2.2.10.2.5	Thrombin-Spaltung zur Entfernung des GST-Tags.....	80
2.2.11	<u>In vitro Kinase-Aktivitätstest</u> .....	80
2.2.11.1	Kinase-Aktivitätstest mit Leishmanienlysaten.....	81
2.2.12	<u>Bioinformatische Analyse</u> .....	81
2.2.12.1	Datenbank-Zugangsnummern von homologen Proteinen.....	82
<b>3.</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	<b>83</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchung des MAP-Kinase Homologs LmxMPK7 aus <i>Leishmania mexicana</i></b> .....	<b>83</b>
3.1.1	<b><i>In vitro</i>-Untersuchungen</b> .....	<b>83</b>

3.1.1.1	<u>Rekombinante Expression von <i>LmxMPK7</i></u> .....	83
3.1.1.1.1	Herstellung der Expressionskonstrukte.....	83
3.1.1.1.2	Testexpression und Aktivitätstest der Fusionsproteine.....	84
3.1.1.2	<u>Herstellung einer um den „lip-loop“ verkürzten Form von <i>LmxMPK7</i></u> .....	87
3.1.1.2.1	Klonierungsstrategie zur Entfernung des lip-loops.....	87
3.1.1.2.2	Expression und Aktivitätstest von <i>LmxMPK7</i> -lip-loop.....	88
3.1.1.3	<u><i>LmxMPK7</i> im Kinase-Aktivitätstest zusammen mit anderen rekombinant exprimierten Leishmanien-Kinasen</u> .....	89
3.1.2	<b><i>In vivo</i>-Untersuchungen</b> .....	<b>90</b>
3.1.2.1	<u>Versuch der Deletion von <i>LmxMPK7</i> in <i>Leishmania mexicana</i></u> .....	90
3.1.2.2	<u>Episomale Expression von <i>LmxMPK7</i> in <i>Leishmania mexicana</i></u> .....	91
3.1.2.2.1	Herstellung von Plasmiden zur episomalen Expression.....	91
3.1.2.2.2	In der Southern Blot-Analyse eingesetzte spezifische Sonden.....	93
3.1.2.2.3	Transfektion von <i>L. mexicana</i> und Überprüfung durch Southern Blot- und Immunoblot-Analyse.....	94
3.1.2.2.4	Abnahme der nachgewiesenen Proteinmenge im Kulturverlauf.....	96
3.1.2.3	<u>Genomische Deletion von <i>LmxMPK7</i> bei gleichzeitiger episomaler Expression</u> .....	97
3.1.2.4	<u>Verlust der alleinigen, extrachromosomalen Kopie von <i>LmxMPK7</i> in Pro- und Amastigoten der Mutante <math>\Delta LmxMPK7(-/-)hyg/phleo + pX6MPK7TYC</math>-ds</u> .....	99
3.1.2.4.1	Mausinfektionsexperiment.....	99
3.1.2.4.2	Kultivierung von Läsionsamastigoten und Plasmidnachweis mittels Einzelzell-PCR.....	101
3.1.2.4.3	Plasmidnachweis in vereinzelt Promastigoten nach Kultivierung ohne Selektionsantibiotikum.....	103
3.1.2.5	<u>Antikörperherstellung und Nachweis von <i>LmxMPK7</i> in Promastigoten und Amastigoten</u> .....	105
3.1.2.6	<u>Charakterisierung der Deletionsmutante <math>\Delta LmxMPK7</math></u> .....	106
3.1.2.6.1	Beurteilung der Morphologie durch mikroskopische Verfahren.....	106
3.1.2.6.2	Wachstumsverhalten.....	109
3.1.2.6.3	Mausinfektionsexperimente.....	111
3.1.2.6.4	Infektion von Peritonealmakrophagen.....	113
3.1.2.7	<u>Genomische Komplementation der Mutante <math>\Delta LmxMPK7</math></u> .....	115
3.1.2.7.1	Herstellung des Konstrukts zur genomischen Reintegration v. <i>LmxMPK7</i> .....	116
3.1.2.7.2	Herstellung der $\Delta LmxMPK7(+/-)$ -„add-back“-Mutante.....	117
3.1.2.8	<u>Nachweis von <i>LmxMPK7</i>-TY in unterschiedlichen Mutanten</u> .....	119
3.1.2.9	<u>Wachstumsverhalten unterschiedlicher Mutanten im Vergleich</u> .....	123
3.2	<b>Charakterisierung der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) aus <i>Leishmania mexicana</i></b> .....	<b>127</b>
3.2.1	<u>Isolierung aus einer gDNA-Phagenbank und Sequenzierung der Gene mit flankierenden Regionen</u> .....	127
3.2.1.1	<i>LmxGSK3<math>\alpha</math></i> .....	127
3.2.1.2	<i>LmxGSK3<math>\beta</math></i> .....	128
3.2.2	<u><i>In silico</i>-Untersuchung von <i>LmxGSK3</i></u> .....	129
3.2.3	<u>Rekombinante Expression von <i>LmxGSK3<math>\alpha</math></i> und <i>LmxGSK3<math>\beta</math></i></u> .....	137
3.2.3.1	Herstellung der Expressionskonstrukte.....	137
3.2.3.2	Testexpression der Fusionsproteine.....	137
3.2.3.3	<i>LmxGSK3<math>\alpha</math></i> im Kinase-Aktivitätstest.....	139
3.2.3.4	<i>LmxGSK3<math>\alpha</math></i> im Kinase-Aktivitätstest zusammen mit unterschiedlichen Kinasen der CMGC-Familie von <i>L. mexicana</i> .....	140

3.2.3.5	LmxGSK3 $\beta$ : Bestimmung der Optima der Enzymaktivität im Kinase-Aktivitätstest.....	142
3.2.3.6	Aktivität von LmxGSK3 $\beta$ gegenüber artifiziellen Substraten.....	143
3.2.4	<u>LmxGSK3<math>\beta</math>: Untersuchungen zur Kinase-Aktivität und Regulation durch Autophosphorylierung</u> .....	144
3.2.4.1	Herstellung einer inaktiven K $\rightarrow$ M Mutante von LmxGSK3 $\beta$ .....	144
3.2.4.2	Autophosphorylierung an Tyrosin.....	146
3.2.4.3	Phosphorylierungsprofil von His-LmxGSK3 $\beta$ .....	147
3.2.4.4	Herstellung einer Y $\rightarrow$ F-Mutante.....	147
3.2.4.5	Mechanismus der Autophosphorylierung von reifem LmxGSK3 $\beta$ -Protein....	149
3.2.5	<u>Nachweis von LmxGSK3<math>\beta</math> in Promastigoten und Amastigoten</u> .....	150
3.2.6	<u>Effekt von LiCl auf <i>Leishmania mexicana</i> und auf LmxGSK3<math>\beta</math> <i>in vitro</i></u> .....	151
3.2.6.1	Inhibition von LmxGSK3 $\beta$ durch LiCl <i>in vitro</i> .....	151
3.2.6.2	Axenische Kultivierung von Leishmanien in Gegenwart von Lithium-Ionen..	153
3.2.6.2.1	Mikroskopie von Promastigoten.....	153
3.2.6.2.2	Wachstumsverhalten von Promastigoten und Lithium induzierter Zellteilungsphänotyp.....	157
3.2.6.2.3	Zunahme der Flagellenlänge.....	162
3.2.6.2.4	Mikroskopie und Wachstumsverhalten von axenischen Amastigoten.....	164
3.2.7	<u>LmxGSK3<math>\beta</math> im Kinase-Aktivitätstest zusammen mit anderen rekombinant exprimierten Leishmanien-Kinasen</u> .....	166
3.2.7.1	LmxGSK3 $\beta$ und LmxMPK1.....	167
3.2.7.2	LmxGSK3 $\beta$ und LmxMPK3.....	167
3.2.7.3	LmxGSK3 $\beta$ und LmxMKK.....	168
3.2.7.4	LmxGSK3 $\beta$ und LmxMKK4.....	169
3.2.7.4.1	Co-Expression von LmxGSK3 $\beta$ mit LmxMKK4 in <i>E. coli</i> .....	170
3.2.7.5	Studium der von LmxMKK4 und LmxMKK phosphorylierten Reste von LmxGSK3 $\beta$ .....	172
3.2.8	<u>Die Suche nach Substraten von LmxGSK3<math>\beta</math></u> .....	173
3.2.8.1	Phosphorylierung von Leishmanienlysaten durch LmxGSK3 $\beta$ .....	174
3.2.8.2	<i>In silico</i> Substratsuche mit Hilfe von PREDIKIN.....	175
3.2.9	<u>Deletion von LmxGSK3<math>\beta</math> in <i>Leishmania mexicana</i></u> .....	177
3.2.9.1	Herstellung der Deletionskonstrukte.....	178
3.2.9.2	Transfektion in <i>L. mexicana</i> und Überprüfung durch PCR bzw. Southern Blot-Analyse.....	179
3.2.10	<u>Extrachromosomale Expression von LmxGSK3<math>\beta</math> in <i>L. mexicana</i> als PTP-Fusionsprotein</u> .....	181
3.2.10.1	Episomale Expression und Herstellung einer genomischen Nullmutante....	183
3.2.10.2	Herstellung einer überexprimierenden Mutante.....	185
3.2.10.3	Nachweis der Expression von PTP-LmxGSK3 $\beta$ im Immunoblot.....	186
3.2.11	<u>Mausinfektionsexperiment mit Klon H4PPAC der Mutante <math>\Delta</math>LmxGSK3<math>\beta</math>(-/-)hyg/phleo + pXPACLmxGSK3<math>\beta</math>PTPNterm</u> .....	188
3.2.12	<u>Herstellung einer inhibitorsensitiven Mutante LmxGSK3<math>\beta</math>-IS</u> .....	189
3.2.12.1	Generierung von LmxGSK3 $\beta$ -IS und Klonierung der Konstrukte.....	189
3.2.12.2	Einsatz von rekombinantem LmxGSK3 $\beta$ -IS im Kinase-Aktivitätstest und Inhibortestung.....	191
3.2.12.3	Transfektion der inhibitorsensitiven Mutante $\Delta$ LmxGSK3 $\beta$ -IS in <i>L. mexicana</i> .....	192
3.2.12.4	Erster Inhibortest mit Promastigoten von $\Delta$ LmxGSK3 $\beta$ -IS.....	194

<b>4.</b>	<b><u>Diskussion</u></b>	<b>196</b>
<b>4.1</b>	<b>LmxMPK7</b>	<b>196</b>
4.1.1	Rekombinante Expression von LmxMPK7 und Aktivitätstest	196
4.1.2	Deletion von LmxMPK7 in <i>Leishmania</i> – die Erste	202
4.1.3	Proteinnachweis von LmxMPK7 in Pro- und Amastigoten von Wildtyp-Leishmanien und Proteinniveau unterschiedlicher Mutanten	204
4.1.4	Episomale Expression von LmxMPK7-TY und ihre Folgen – Potentielle Bedeutung der Kinasemenge	207
4.1.5	Retention versus Verlust der episomalen Kopie von <i>LmxMPK7</i> und Erzeugung einer Nullmutante – die Zweite	215
4.1.6	Phänotypische Charakterisierung der Nullmutante $\Delta$ <i>LmxMPK7</i>	220
4.1.7	Gegenüberstellung des Wachstumsverhaltens der „add-back“-Mutante und weiterer Mutanten	230
4.1.8	Ist LmxMPK7 für Leishmanien essentiell und ein potentielles „Drug Target“? – Ein Fazit	235
<b>4.2</b>	<b>LmxGSK3</b>	<b>238</b>
4.2.1	Charakterisierung von GSK3 – Strukturelle und Proteinbiochemische Besonderheiten	238
4.2.1.1	LmxGSK3 $\alpha$	238
4.2.1.2	LmxGSK3 $\beta$	243
4.2.1.2.1	Phosphorylierung von LmxGSK3 $\beta$ und die Bedeutung für die Kinase-Aktivität	244
4.2.2	Aufklärung der Funktion von LmxGSK3 $\beta$	249
4.2.2.1	Substratsuche	249
4.2.2.2	Lithium hemmt die Aktivität von LmxGSK3 $\beta$ <i>in vitro</i> und führt zu einer Beeinträchtigung von Leishmanien	250
4.2.2.2.1	Hemmung der Kinase-Aktivität durch LiCl <i>in vitro</i>	250
4.2.2.2.2	Lithium-Effekte in Leishmanien	251
4.2.2.3	Cytokinesedefekt in $\Delta$ LmxGSK3 $\beta$ -IS	270
4.2.3	LmxGSK3 $\beta$ ist essentiell für Leishmanien und ein potentielles Drug-Target	271
<b>5.</b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b>274</b>
<b>6.</b>	<b><u>Summary</u></b>	<b>276</b>
<b>7.</b>	<b><u>Anhang</u></b>	<b>278</b>
7.1	Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	278
7.1.1	LmxMPK7 mit flankierenden Regionen	278
7.1.2	Vergleich der Aminosäuresequenz von LmxMPK7 und Homologen	280
7.1.3	LmxGSK3 $\alpha$ mit flankierenden Regionen	281
7.1.4	LmxGSK3 $\beta$ mit flankierenden Regionen	283
7.1.5	LmxM.36.0430 – Hypothetisches Protein	284
7.2	Plasmidkarten	284
7.3	FACS-Analyse SYTO 16-gefärbter Amastigoten – Auswahlfenster	289
7.4	MALDI-TOF-MS und MS/MS-Spektren	290
<b>III</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>XI</b>

## II Abkürzungsverzeichnis

-/-	Doppelalleldeletion
+/-	Einzelalleldeletion
ab	add back
Abb.	Abbildung
$A_{\max}$	Anregungsmaximum
AP	Alkalische Phosphatase
aPK	atypische Proteinkinase
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BF	Blutbahnform
BNI	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CD-Domäne	„common-docking“-Domäne
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
Crei/ <i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CSPD	Dinatrium-3-[4-methoxyspiro(1,2-dioxethan-3,2'-(5'chloro)tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decan)-4-yl]-Phenylphosphat
C-terminus (Cterm)	Carboxy-Terminus
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppeldestilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleotid
DHFR-TS	Dihydrofolatreduktase Thymidylatsynthase
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	stromab
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
$E_{\max}$	Emissionsmaximum
ePK	eukaryontische Proteinkinase
et al.	et alii; und andere

ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
FACS	„fluorescence-activated cell sorting“ (Durchflusszytometrie)
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
x g	multipliziert mit der Erdbeschleunigung
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
GSK	Glykogensynthase-Kinase
GST	Glutathion S-Transferase
GZ	Gesamtzell
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
His (6xHis)	Hexahistidin
HPLC	high-pressure liquid chromatography
HRP	Meerrettichperoxidase
hs/Hsap	<i>Homo sapiens</i>
Hsp	Hitzeschockprotein
hyg	Gen der Hygromycin B-Phosphotransferase
FAZ	flagellare Anheftungszone
iFCS	hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum
IFN	Interferon
IFT	Intraflagellarer Transport
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
InsP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IR	Intergene Region
IS	Inhibitorsensitiv
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
K	Kinetoplast
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton = 1000 Dalton
kDNA	Kinetoplasten-DNA
l	Liter
L.	<i>Leishmania</i>
LB	Luria Bertani
Lbr	<i>Leishmania braziliensis</i>
Ld	<i>Leishmania donovani</i>
LiCl	Lithiumchlorid
Lin	<i>Leishmania infantum</i>
Lmj	<i>Leishmania major</i>
Lmx	<i>Leishmania mexicana</i>
LPG	Lipophosphoglykan
M	molar (mol/l)
MalBP	Maltose-bindendes Protein
MALDI-TOF	„matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight“ MS

MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MAPK	MAP-Kinase
MAPKK	MAP-Kinase-Kinase
MAPKKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
MBP	Myelin Basisches Protein
MCS	Multiple Klonierungsstelle, Polylinker
MES	Morpholinoethansulfonsäure
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Kation
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
mA	Milliampère
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmol	Millimol
min	Minute
MKK	MAP-Kinase-Kinase
Mn <sup>2+</sup>	Mangan-Kation
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	„messenger“-RNA
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-MS
Mt	Mikrotubuli
MW	Molekulargewicht
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
N	Nukleus
1-NA	1-Naphthyl-pyrazolo(3,4 <i>d</i> )pyrimidine
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NDR	„nuclear dbf2-related“
<i>neo</i>	Gen der Neomycin Phosphotransferase
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
N-Terminus (Nterm)	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen
P	Pellet
<i>pac</i>	Gen der Puromycin-N-Acetyltransferase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PH	Pleckstrin-Homologie
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
<i>phleo</i>	Gen des Phleomycin-bindenden Proteins
p. i.	post infectionem, nach Infektion

pl	Isoelektrischer Punkt
PK	Proteinasekinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSG	„promastigote secretory gel“
PTB	Phosphotyrosin-bindend
PV	Parasitäre Vakuole
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAP	Alkaline Phosphatase aus Shrimp
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PA	SDS-Polyacrylamid
SDS-PAGE	SDS-PA-Gelelektrophorese
SH2/SH3	Src-Homologie-Region 2/3
SL	„spliced leader“
SSC	Natriumcitrat-Salzlösung
<i>T.</i>	<i>Trypanosoma</i>
Tab.	Tabelle
Tb	<i>Trypanosoma brucei</i>
Tc	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLCK	N $\alpha$ -p-Tosyl-L-Lysin-Chlormethylketon-Hydrochlorid
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Triton X-100	Tertiärbutylphenylpolyoxyethylen
Tween-20	Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaureat
ÜS	Überstand
ü. N.	über Nacht
U	Unit
us	stromauf
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galacto-pyranosid
Zk	Zellkern



## 1. Einleitung

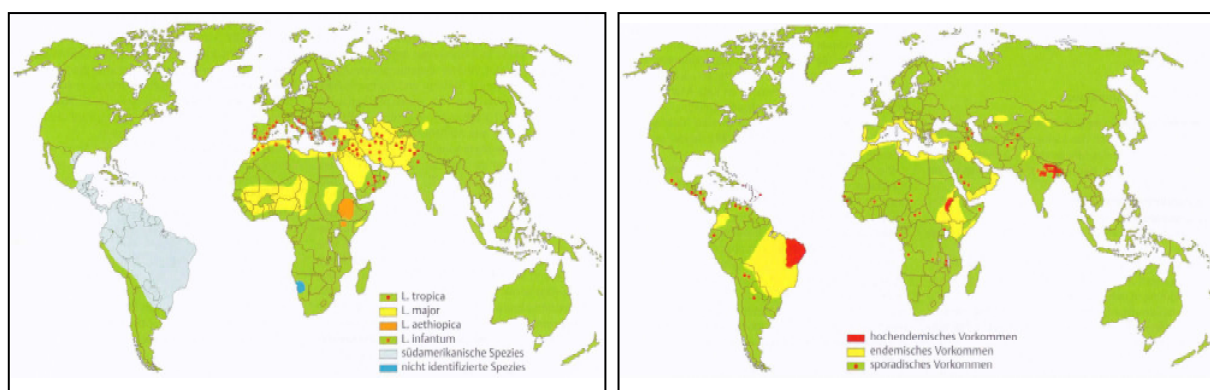
### 1.1 Leishmanien und Leishmaniosen

Leishmaniose ist eine von Sandmücken übertragene parasitäre Erkrankung verursacht von Protozoen der Gattung *Leishmania*. Leishmaniosen werden zu den vernachlässigten tropischen Erkrankungen „Neglected Tropical Diseases“ (NTDs) gezählt. NTDs stellen eine Gruppe von schwerwiegenden parasitären, bakteriellen und viralen Erkrankungen dar, welche zusammengenommen global mehr als eine Billion Menschen betreffen. An ihnen erkrankt die ärmste Bevölkerung. NTDs beeinträchtigen die körperliche und kognitive Entwicklung und führen zu einer erhöhten Rate von Mutter-und-Kind-Erkrankungen und -Sterblichkeit. Sie erschweren es dem Betroffenen maßgeblich seinem Lebenserwerb, wie z. B. der Landwirtschaft, nachzukommen. Die Folge ist ein Kreislauf von Armut und Krankheit (WHO, 2018b; CDC, 2017).

#### 1.1.1 Verbreitung

Weltweit wird von 12 Millionen mit Leishmaniosen Infizierten ausgegangen. Jedes Jahr versterben 70 000 Menschen an der Erkrankung. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen wird auf zwei Millionen geschätzt, bei 75 % der Fälle handelt es sich um kutane Leishmaniose und bei 25 % um viszerale Leishmaniose (WHO, 2018a). Die Hälfte der Leishmaniose-Patienten sind Kinder (Palumbo, 2010).

350 Millionen Menschen leben weltweit in Risikogebieten der 88 von Leishmaniosen betroffenen Länder (WHO, 2013). Anzutreffen ist die Erkrankung in den tropischen und subtropischen Gebieten Mittel- und Südamerikas, in Teilen Afrikas, vor allem in Ost- und Nordafrika, in Südeuropa, dem Mittleren Osten und in Teilen Asiens, hier ist der indische Subkontinent verstärkt betroffen (Abb. 1).



**Abb. 1:** Geographische Verteilung der kutanen und mukokutanen (linke Karte) sowie viszeralen (rechte Karte) Leishmaniosen. Modifiziert nach Löscher und Burchard, 2010: Kapitel von Harns-Zwingenberger.

Auch reisemedizinisch gewinnt die Leishmaniose an Bedeutung. In den letzten zehn Jahren war eine Zunahme der Fälle importierter Leishmaniosen in Industrieländern und Ländern mit nicht-endemischem Vorkommen der Erkrankung festzustellen (Pavli und Maltezos, 2010). Neben dem internationalen Tourismus waren militärische Auslandseinsätze und Einwanderung aus Risikogebieten dafür ausschlaggebend. Für Deutschland wurde der Großteil an importierten Leishmaniosen von Reisenden in Südeuropa erworben (Harms-Zwingerberger und Bienzele, 2007).

### 1.1.2 Taxonomie des Erregers

Protozoen sind einzellige, dem Tierreich zuzuordnende Eukaryonten. In das Unterreich der *Protozoa* wird der Stamm der *Flagellata* mit der Ordnung *Kinetoplastida* systematisch eingeordnet. Namensgebend für diese Ordnung ist der Kinetoplast, welcher die mitochondriale DNA enthält. Ein wesentliches Kennzeichen der Kinetoplastiden ist der Polymorphismus. Eine evolutionär sehr erfolgreiche Familie der Kinetoplastiden sind die *Trypanosomatidae*. Alle Mitglieder dieser Familie leben parasitär. Trypanosomatiden rufen eine Reihe von Krankheiten in Menschen, Tieren und auch Pflanzen hervor. Die wichtigsten humanpathogenen Erreger gehören zur Gattung *Leishmania* und *Trypanosoma*. *Trypanosoma brucei* ist der Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit und sein Verwandter *Trypanosoma cruzi* verursacht in Zentral- und Südamerika die Chagas-Krankheit.

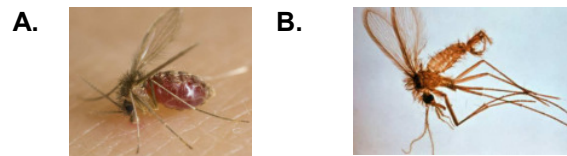
Erstmals als Organismus wurden Leishmanien 1903 vom schottischen Tropenarzt W. Leishman und unabhängig davon von C. Donovan beschrieben. Beide haben histologische Proben von an Fieber erkrankten Patienten in Indien untersucht. Die verschiedenen Formen der humanen Erkrankung können von 21 der 30 Leishmanien Spezies, welche Säugetiere infizieren, verursacht werden (CDC, 2013). Die humanpathogenen Arten werden epidemiologisch in die Gruppen der „Alten Welt“ (Europa, Asien und Afrika) und der „Neuen Welt“ (Amerika) unterteilt. Die Divergenzzeit beider Gruppen wird auf ~46 Mio Jahre geschätzt (Lukes et al., 2007). Außerdem findet eine Unterteilung in die Subgenera *Leishmania* (L.) und *Viannia* (V.) statt. Kennzeichnend für *Viannia* ist, dass die Mehrzahl der Promastigoten im Enddarm der Sandfliege anzutreffen ist, bei *Leishmania* vermehren sich die Promastigoten im Bereich des Fliegenvorder- und Mitteldarms (Lainson et al., 1977). Die wichtigsten Leishmanioseformen des Menschen und die verursachenden Leishmanien-spezies sowie deren Vorkommen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die genannten Krankheitsbilder werden unter 1.1.5 noch genauer beschrieben.

Spezies	Klinik	Vorkommen
<b>Alte Welt:</b>		
<i>L. donovani</i>	VL, PKDL	Südasiens, China, (Ost-)Afrika
<i>L. infantum</i>	VL, KL, (MKL)	Südeuropa, Nordafrika, Mittlerer Osten, Zentralasien
<i>L. tropica</i>	KL, LR, (VL)	Mittlerer Osten, Nordafrika, Südwestasien, Indien
<i>L. major</i>	KL, (DKL)	Mittlerer Osten, Südwestasien, Nordafrika, Sub-Sahara
<i>L. aethiopica</i>	KL, DKL	Äthiopien, Kenia
<b>Neue Welt:</b>		
<i>L. chagasi</i> *	VL, (KL)	Mittel- und Südamerika
<u><i>L. mexicana</i>-Komplex:</u>		
<i>L. mexicana</i>	KL, DKL	Mittelamerika, Mexiko, Texas
<i>L. amazonensis</i>	KL, DKL	Südamerika
<i>L. venezuelensis</i>	KL	Nördliches Südamerika
<i>L. pifanoi</i>	KL, DKL	Südamerika
<i>L. garnhami</i>	KL	Südamerika
<u>Subgenus <i>Viannia</i>:</u>		
<i>L. braziliensis</i>	KL, MKL, (LR)	Mittel- und Südamerika
<i>L. guyanensis</i>	KL, MKL	Südamerika
<i>L. panamensis</i>	KL, MKL	Panama und Nachbarstaaten
<i>L. peruviana</i>	KL, (MKL)	Peru

**Tab. 1: Vorkommen und Krankheitsbilder der wichtigsten humanpathogenen Leishmanien-spezies.** VL = viszerale Leishmaniose; KL = kutane Leishmaniose; MKL = mukokutane Leishmaniose; DKL = diffuse kutane Leishmaniose; LR = rezidivierende Leishmaniose; PKDL = Post-Kala-Azar dermales Leishmanoid. \**L. chagasi* und *L. infantum* sind genetisch identisch und werden von vielen Autoren als eine Spezies behandelt. Daten entnommen aus: Löscher und Burchard, 2010: Kapitel von Harms-Zwingenberger; Boecken et al., 2011.

### 1.1.3 Vektor und Reservoir

Der Überträger (Vektor) der Leishmaniose sind die Weibchen der Schmetterlingsmücke (Englisch: „sandfly“). In der Alten Welt handelt es sich um die Gattung *Phlebotomus* und in der Neuen Welt um die Gattung *Lutzomyia* (Abb. 2). Die 1,5-2 mm kleinen, behaarten Sandmücken sind vorwiegend in der Dämmerung aktiv. Sie bevorzugen feuchte, jedoch nicht aquatische, schattige Brutplätze die reich an organischem Material sind. Da das Insekt nur kurze Flugstrecken bewältigen kann, befinden sich seine Brutstätten zumeist in der Nähe der Säugetiere an denen es die Blutmahlzeiten nimmt, in Baumstämmen, Tierhöhlen, Küchenabfällen und auch in Wandverkleidungen (Kuhdung, Indien) menschlicher Behausungen (Löscher und Burchard 2010: Kapitel von Harms-Zwingenberger). In den Tropen und Subtropen ist die Sandmücke ganzjährig, in den warmen Gebieten Europas und Teilen Asiens in den Sommermonaten anzutreffen.



**Abb. 2:** A. *Lutzomyia longipalpis* (Foto: Rai Wilson) B. *Phlebotomus papatasi* (Quelle: CDC, 2013)

Es existieren neben dem natürlichen auch andere Übertragungswege. So kann der Erreger auch direkt auf dem Blutweg übertragen werden, z. B. durch infizierte Bluttransfusionen oder gemeinsamen Nadelgebrauch bei intravenösem Drogenkonsum. Auch Organ- und Gewebetransplantate können Leishmanien enthalten. Selten werden kongenitale Infektionen beobachtet.

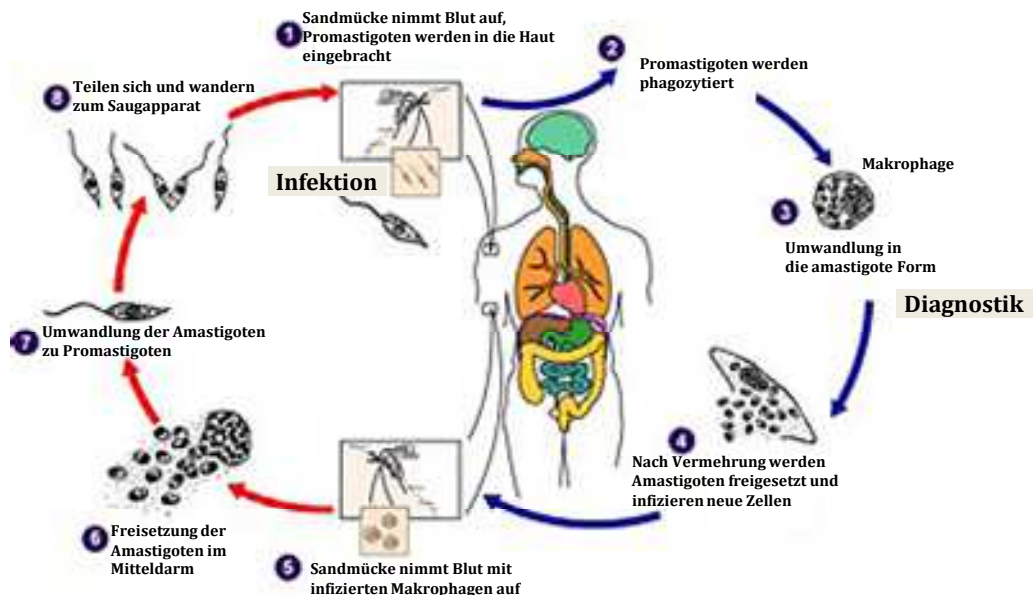
Verschiedene Klassen von Säugetieren bilden das natürliche Infektionsreservoir für Leishmanien. Blutmahlzeiten können von infizierten Sandmücken an verschiedenen Wirten aufgenommen und dabei Leishmanien übertragen werden. Für die meisten Leishmanienarten bestehen zoonotische Übertragungswege (Wirbeltier ↔ Sandmücke ↔ Mensch). Tierische Infektionsreservoir für *L. infantum* / *L. chagasi* stellen Hunde und wilde Kaniden dar, für *L. aethiopica* Felsenklippschliefer und Klippspringer und *L. major* wurde in Nagetieren, wie dem Gerbil und in verschiedenen Rattenarten nachgewiesen. Für die in Mittel- und Südamerika vorkommenden Leishmanienspezies wurden neben Waldnagetieren, Faultiere, Gürteltiere, Tamandua und das Opossum als Reservoir identifiziert. Der Erreger konnte auch in Katzen und Pferden nachgewiesen werden (Löscher und Burchard 2010: Kapitel von Harms-Zwingenberger). Ausschließlich anthroponotisch (Mensch ↔ Sandmücke ↔ Mensch) scheint *L. donovani* übertragen zu werden. Für *L. tropica* konnten neben dem Hauptreservoir Mensch auch Erreger im afrikanischen Gundi (Kammfinger) nachgewiesen werden (Bousslimi et al., 2012). Mit Ausnahme von Menschen und Hunden bilden die meisten Wirte keine Symptome der Erkrankung aus.

### 1.1.4 Lebenszyklus des Parasiten

Innerhalb des Lebenszyklus von Leishmanien werden morphologisch zwei Formen unterschieden (Abb. 3). Die 10-25 µm langen, annähernd spindelförmigen Promastigoten sind extrazellulär in der Überträgermücke anzutreffen. Ein einzelnes, bis zu 20 µm langes Flagellum am anterioren Ende befähigt Promastigoten zur Fortbewegung. Seinem Axonem liegt die klassische 9+2 Mikrotubuli-Struktur zugrunde. Die ovoiden, 2-5 µm großen Amastigoten kommen intrazellulär in den Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems des Säugetierwirts vor. Amastigoten sind unbeweglich. Ihr rudimentäres Flagellum liegt innerhalb einer Einstülpung der Plasmamembran, der Flagellartasche, verborgen. Das Flagellum des Parasiten ist über den Basalkörper in der Flagellartaschenmembran verankert. Die Flagellartasche ist der einzige Ort der Zelloberfläche an dem Endo- und Exozytose stattfinden

(Overath et al., 1997). Promastigoten und Amastigoten teilen sich durch binäre Zellteilung. In den meisten Trypanosomatiden existiert als parallel zum Axonem verlaufende, zusätzliche Struktur der Paraxialstab (PFR), dieser setzt sich aus gitterartig angeordneten Proteinfilamenten zusammen (Hughes et al., 2012; Gadelha et al., 2005).

### Entwicklungsstadien in der Sandmücke      Entwicklungsstadien im Menschen



**Abb. 3:** Übertragungszyklus von *Leishmania*. Modifiziert nach CDC, 2013.

Die Sandmücke nimmt bei ihrer Blutmahlzeit mit Amastigoten infizierte Makrophagen und/oder freie Amastigoten auf. Die Umgebungsbedingungen im Mitteldarm der Mücke unterscheiden sich wesentlich von denen im Säugetierwirt, so ist die Temperatur im Insekt geringer und der pH-Wert höher. Als Reaktion wandelt sich der Parasit zu Promastigoten um. Diese durchlaufen im Vektor eine Reihe von Entwicklungsschritten bis nach durchschnittlich 4-5 Tagen die für Säugetiere infektiöse Form der metazyklischen Promastigoten hervorgeht (Sacks und Perkins, 1984; Ramalho-Ortigao et al., 2010).

Noch im Blutbolus, eingeschlossen in einer vom Mitteldarmepithel gebildeten peritrophe Matrix aus Proteinen und Chitin, replizieren als erstes Stadium, die wenig beweglichen prozyklischen Promastigoten (Dostálová und Volf, 2012). Nach zwei bis drei Tagen verlangsamt sich die Replikation und es entwickeln sich ausgesprochen bewegliche, längliche nektomonade Promastigoten (nektos = schwimmend). Die Nektomonaden durchbrechen die peritrophe Matrix und wandern vom Mitteldarm in Richtung Vorderdarm. Durch Anheftung an das Darmepithel verhindert der Parasit die Ausstoßung aus dem Darm bei der Defäkation, das Flagellum lagert sich hierbei zwischen die Mikrovilli. Für die Adaption von *L. major* scheint Lipophosphoglykan (LPG) wichtig zu sein, dieses bedeckt die gesamte Zelloberfläche einschließlich des Flagellums. Auf den Darmepithelzellen des spezifischen Vektors *Phlebotomus papatasi* wurde ein Galektinmolekül als Rezeptor für die Bindung des LPGs

identifiziert (Kamhawi et al., 2004). Die LPG-defiziente Linie von *L. major* *lpg1<sup>-</sup>* zeigte hingegen eine LPG-unabhängige, unbeeinträchtigte Entwicklung in vier permissiven Vektoren. Myskova et al. (2007) stellten hierzu die Hypothese auf, dass in spezifischen Vektoren, welche die Entwicklung lediglich einer Leishmanienspezies zulassen, eine Bindung über LPG zu Grunde liegt, während in permissiven Vektoren, welche in der Lage sind verschiedene Leishmanienarten zu übertragen, die Anlagerung an das Darmepithel über einen LPG-unabhängigen Mechanismus erfolgt. Im anterioren Mitteldarm angekommen, geht aus den Nektomonaden eine Form mit kürzerem Zellkörper, die der leptomonaden Promastigoten (*leptos* = klein) hervor. Die Leptomonaden nehmen die Zellproliferation wieder auf. Aus den Leptomonaden gehen wiederum nicht-replizierende metazyklische Promastigoten hervor. Diese besitzen ein längeres Flagellum, sind klein und ausgezeichnete Schwimmer (Gossage et al., 2003). Die infektiösen Metazyklischen stellen die beim Stich durch die Sandmücke überwiegend übertragene Form dar. An der zwischen Mitteldarm und Vorderdarm lokalisierten Verschlussklappe differenziert eine Population von Promastigoten zu der blattförmigen haptomonaden Form (*haptos* = berührend) (Killick-Kendrick et al., 1974). Diese heften sich mit dem aufgeweiteten Ende des Flagellums über Hemidesmosomen-ähnliche Strukturen an die Oberfläche der Klappe und bilden eine Formation bestehend aus Parasiten aus (Wakid und Bates, 2004). Zusätzlich konnte eine Zerstörung der Klappenstruktur durch von Promastigoten sekretierte Chitinase festgestellt werden (Schlein et al., 1992; Volf et al., 2004; Rogers et al., 2008). Daneben wird die Transmission auch durch die sekretierte gelartige Substanz PSG erleichtert. Diese besteht zum größten Teil aus filamentösem Proteoglykan (fPPG) und wird vermutlich von den Leptomonaden sekretiert (Ilg et al., 1996; Rogers et al., 2002). Das PSG bildet eine Art Pfropf im vorderen Mitteldarm aus und führt zu dessen Erweiterung sowie zur mechanischen Beeinträchtigung der Klappenfunktion. Bei der Blutaufnahme des Insekts gelangt der blockierende PSG-Pfropfen zusammen mit den sich darin und im vorderen Mitteldarm bzw. Vorderdarm angesammelten metazyklischen Promastigoten sowie Speichel in die mit den Mundwerkzeugen geschaffene Wunde (Bates, 2007). Interessanterweise handelt es sich bei Sandmücken-Speichel und PSG um immunmodulierende Faktoren, welche bei der Transmission von Leishmanien eine Exazerbation der Erkrankung begünstigen (Titus und Ribeiro, 1988; Rogers et al., 2004).

Im Säugetierwirt infiziert der Parasit bevorzugt phagozytierende Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems. Daneben existieren Nachweise für Infektionen von Neutrophilen, Fibroblasten und Zellen anderer Typen innerhalb von Läsionen und in der Haut (Bogdan et al., 2000). Angekommen in der Haut gilt es für die Metazyklischen bis zur Aufnahme durch einen Makrophagen, eine Komplement-bedingte Lyse abzuwehren. Das LPG auf der Zelloberfläche verhindert dabei die Anlagerung der Faktoren C5b-C9 und die Ausbildung des Zelllysekomplexes (Puentes et al., 1990). Außerdem wurde für *L. major* Promastigoten eine

membrangebundene Proteinkinase auf der Zelloberfläche beschrieben, welche durch Serin-Phosphorylierung von Komplementfaktoren zur Inaktivierung der Komplementkaskade führt (Hermoso et al., 1991). Zugleich nutzt der Parasit jedoch die Opsonisierung durch die Komplementfaktoren C3b und C3bi um die Phagozytose nach Bindung an die jeweiligen Komplementrezeptoren CR1 bzw. CR3 des Makrophagen herbeizuführen. C3b wird von der auf der Promastigoten Oberfläche vorhandenen Metalloprotease gp63 zu C3bi konvertiert, daher scheint die Bindung vorrangig über den CR3-Rezeptor zu erfolgen. Da C3b auch als Initiator des Lysekomplex dient, hat die Konversion zu C3bi auch einen protektiven Effekt (Mosser und Brittingham, 1997; Kane und Mosser, 2000). Für die Bindung von infektiösen Promastigoten wurden weitere Makrophagen-Rezeptoren beschrieben (Culley et al., 1996; Mosser und Miles, 2007), u. a. der Mannose-Fucose-Rezeptor der LPG bindet, der Fibronektin-Rezeptor, welcher mit gp63 wechselwirkt oder der CRP-Rezeptor, der das Entzündungsprotein CRP (C-reaktives Protein) bindet. CRP kann mit LPG interagieren. Die Bindung des Parasiten erfolgt je nach Rezeptor mit unterschiedlicher Affinität und ist nicht von gleichrangiger Bedeutung für die Internalisierung.

Angekommen im Phagosomen der Wirtszelle transformieren Promastigoten innerhalb von 24 bis 72 Stunden zu Amastigoten. Eine wirtszellfreie *in vitro* Kultivierung von Promastigoten unter ähnlich Umgebungsbedingungen wie sie in Lysosomen vorherrschen, einem pH von 5,5 und einer Temperatur von 37 °C, induziert eine Differenzierung zur amastigoten Form (Zilberstein und Shapira, 1994). Neben den beiden Reizen, Temperaturerhöhung nach Übergang vom Insekt in das Säugetier und pH-Wert-Erniedrigung bei Ansäuerung des Phagosoms, ist möglicherweise auch die Bindung der Serumkomponente CRP ein positiver Faktor für eine amastigote Transformation (Bee et al., 2000). Es ist darüber hinaus bekannt, dass Hitzeschockproteinen eine tragende Rolle bei der Umsetzung des Differenzierungssignals zukommt (Wiesgigl und Clos, 2001; Barak et al., 2005). In *L. donovani* Kulturen scheint es bei der Differenzierung zu einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus zu kommen. Während diesem Arrest setzt die morphologische Transformation zu Amastigoten ein (Barak et al., 2005). Im Gegensatz zu Amastigoten reagieren Promastigoten sehr empfindlich auf das in Phagolysosomen vorherrschende saure und hydrophile Milieu. Um einer Degradierung bis zur Etablierung einer Infektion zu entgehen, verzögert der Parasit vorübergehend die Reifung des Endosoms zum Phagolysosom. Dieser Mechanismus ist LPG-abhängig und verschafft den Promastigoten die zur Umwandlung benötigte Zeit (Desjardins und Descoteaux, 1997). In den Amastigoten ist die LPG-Expression vollständig herunterreguliert. Eine weitere Überlebensstrategie der aufgenommenen Parasiten basiert auf der Hemmung der Synthese von mikrobiziden Molekülen, wie reaktiven Sauerstoffzwischenprodukten (ROI) und Stickstoffmonoxid (NO), die normalerweise in die Phagolysosomen abgegeben werden (Olivier et al., 2005). Je nach Spezies erfolgt die Vermehrung der Amastigoten nun entweder

in einer, zunehmend größer werdenden, gemeinsamen Parasitären Vakuole (PV), wie z. B. für Spezies des *L. mexicana*-Komplexes der Fall oder die Amastigoten liegen in lauter einzelnen PVs verpackt vor, so die von *L. donovani* oder *L. infantum*. Nach Multiplikation kommt es zur Freisetzung der Amastigoten und zum Befall neuer Zellen. Die Aufnahme in Phagozyten wird hierbei, nach Opsonisierung der Gewebesamastigoten mit Antikörpern bzw. Komplement, durch den Fc-Rezeptor bzw. Komplement-Rezeptoren vermittelt (Kima, 2007). Alternativ wurde für *L. amazonensis* eine Aufnahme unabhängig von opsonisierenden Molekülen über den PS-Rezeptor von Makrophagen beschrieben, nachdem nachgewiesen wurde, dass Amastigoten Phosphatidylserin (PS), einen Marker für apoptotische Zellen, auf ihrer Oberfläche exprimieren (Wanderley et al., 2006). Die Aufnahme über PS führt, wie die Aufnahme über den Fc-Rezeptor auch, zu einer Freisetzung von Interleukin(IL)-10 und zur Ausschüttung von „transforming growth factor“ (TGF)- $\beta$ . IL-10 und TGF- $\beta$  sind anti-inflammatorische Zytokine, die die antimikrobielle Aktivität der Makrophagen hemmen und somit die Etablierung der Infektion begünstigen.

Makrophagen sind darauf ausgerichtet aufgenommene Pathogene zu eliminieren und legen durch Antigenpräsentation und Freisetzung von Zytokinen den Grundstein für die Einleitung einer spezifischen Immunantwort und die weitere Aktivierung des Immunsystems. Hierzu gilt es zu wissen, dass der Infektionsverlauf der Leishmaniose abhängig ist von der die Immunantwort dominierenden Subpopulation an CD4+-Helferzellen, TH1 und TH2, und den jeweilig assoziierten Zytokinen. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass eine Heilung auf eine starke TH1-Antwort unter Wirkung der Zytokine Interferon(IFN)- $\gamma$ , IL-2 und IL-12 in Abwesenheit der klassischen TH2-Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 zurückzuführen ist (Roberts, 2006). Im Menschen geht eine fehlende Heilung von kutanen Läsionen mit einem erhöhten Spiegel an IL-4 und vermindertem IFN- $\gamma$  einher (Ajdary et al., 2000). Eine Erhöhung des IL-10 wurde im Falle von progredienten, kutanen Läsionen bei *L. major* Infektion (Louzir et al., 1998) und bei akuter viszeraler Leishmaniose verursacht durch *L. donovani* (Ghalib et al., 1993) gefunden. Welche Überlebensvorteile ergeben sich für den Parasiten durch Verschiebung der Balance von TH1- zu TH2-Antwort? Die TH1-Zytokine wie IFN- $\gamma$  führen u. a. zur klassischen Aktivierung von Makrophagen, welche mit einer erhöhten Expression von induzierbarer NO-Synthetase (iNOS) einhergeht. iNOS wandelt L-Arginin in das für den intrazellulären Parasiten tödliche NO um. TH2-Zytokine führen zur alternativen Aktivierung von Makrophagen und induzieren die Arginase-1, welche das Substrat für die NO-Produktion L-Arginin abbaut. Durch diesen Abbau werden in nachfolgenden Syntheseschritten Polyamine als Nährstoffe für die Amastigoten bereitgestellt (Rogers, 2012; Bansal und Ochoa, 2003). Leishmanien manipulieren die Immunantwort auf verschiedene Weise. In mehreren Studien wurde nachgewiesen, dass mit Leishmanien infizierte Makrophagen auf eine Stimulation mit IFN- $\gamma$  nicht mit einer Produktion von NO zu reagieren vermögen. Leishmanien scheinen auf mehreren



Ebenen störend in die IFN- $\gamma$ -Signalkaskade eingreifen. Für die Ausbildung einer funktionierenden TH1-Reaktion besonders kritisch, scheint das von Makrophagen und dendritischen Zellen gebildete IL-12 zu sein. Es wurde gezeigt, dass Leishmanien die Bildung von IL-12 unterbinden (Kima, 2007). Das parasitäre LACK-Antigen (Leishmania Homolog des Rezeptors für aktivierte C-Kinase) gilt als Virulenzfaktor, der die Ausbildung einer TH2-Antwort durch konsekutive Erhöhung der IL-4-Produktion fördert (Julia und Glaichenhaus, 1999). Aufgrund der Diversität der von Leishmanien verursachten Pathologien wird allgemein hin davon ausgegangen, dass abhängig von der Leishmanienspezies Unterschiede in der Parasit-Wirtszell-Interaktion bestehen (McMahon-Pratt und Alexander, 2004).

### 1.1.5 Krankheitsbilder, Diagnostik, Therapie und Prävention

Die Leishmaniosen umfassen verschiedene Krankheitsbilder (Abb. 4). Das klinische Bild wird bestimmt von der verursachenden Leishmanienspezies, genetischen Faktoren des Wirts und dessen Immunkompetenz. Das klinische Spektrum umfasst inapparente, lokalisierte (Haut) und disseminierte Infektionen (Haut, Schleimhäute, innere Organe). Neben der akuten symptomatischen Erkrankung werden selten chronische Verläufe beobachtet. Das gleichzeitige Vorliegen von Zuständen, die mit einer verminderten zellulären Immunität einhergehen, wie HIV-Infektion, immunsuppressive Therapie oder Mangelernährung kann abhängig von der Leishmanienspezies zur Disseminierung einer lokalen kutanen Infektion führen, auch in andere Organe (Viszeralisierung). Eine Beeinträchtigung der Immunlage kann auch zur Folge haben, dass eine latente Infektion mit Leishmanien in eine klinisch manifeste übergeht. Nachfolgend werden die verschiedenen Leishmaniose-Formen im Einzelnen besprochen.

#### Kutane Leishmaniose

Leitsymptom ist das zumeist schmerzlose Hautgeschwür, auch Orientbeule oder Aleppobeule genannt, das nach Wochen bis Monaten an der Stelle des Bisses entsteht. Es entwickelt sich meist aus einer erythromatösen Papel, die sich zu einem Knoten vergrößert, der letztendlich ulzeriert. Eine Vergrößerung der regionalen Lymphknoten kann begleitend auftreten. Im Großteil der Fälle heilt das Ulkus spätestens nach zwei Jahren unter Narbenbildung ab, eine mehrjährige Immunität gegen die gleiche Spezies bildet sich aus.

#### Mukokutane Leishmaniose

Die mukokutane Form, im dortigen Sprachgebrauch Espundia genannt, wird von südamerikanischen Leishmanienspezies des Subgenus *Viannia* verursacht und ist durch ihren invasiv-destruktiven Charakter gekennzeichnet. Zumeist von einer primären Hautläsion ausgehend, kommt es bei dieser Form zur Streuung des Erregers in die Schleimhäute des Nasen-Rachenraums. Sehr selten können auch die genitalen Schleimhäute betroffen sein. Durch die rasch fortschreitende Gewebnekrose können das Nasenskelett und -septum, die

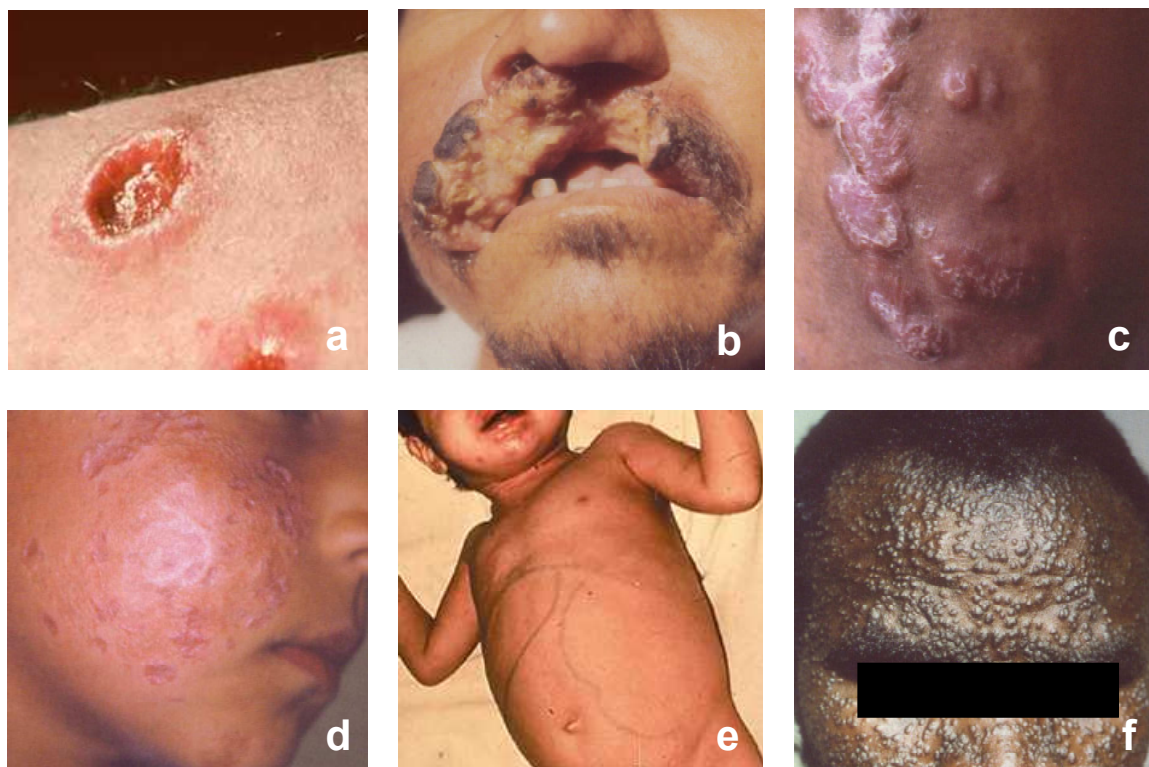
Zunge, der Gaumen, der Rachen, der Kehlkopf und die Luftröhre zerstört werden. Unbehandelt kommt es häufig durch Schluckunfähigkeit, zur Aspiration und Kachexie mit Todesfolge. Sehr selten kann eine Disseminierung in die Schleimhäute auch bei anderen Leishmanienspezies beobachtet werden (*L. infantum*, *L. donovani*).

#### Diffuse kutane Leishmaniose

Diese Form ist auf eine defiziente Immunantwort zurückzuführen. Durch unkontrollierte Ausbreitung der Parasiten kommt es zu nicht-ulzerierenden Knoten, die sich über das gesamte Tegument mit Ausnahme der Handinnenflächen, Fußsohlen und Kopfhaut ausbreiten. Es findet sich keine spezifische T-Zellantwort gegen Leishmanien.

#### Rezidivierende Leishmaniose

In 6 % der Fälle einer Infektion mit *L. tropica* (gelegentlich *L. braziliensis*) kommt es innerhalb von 1-15 Jahren zur Ausbildung von rötlich-bräunlichen Papeln um die abgeheilte Primärläsion.



**Abb. 4: Klinische Formen der Leishmaniose.** a: kutane Leishmaniose; b: mukokutane Leishmaniose; c: diffuse kutane Leishmaniose; d: Leishmaniosis recidivans; e: viszerale Leishmaniose; f: post-Kala-Azar dermales Leishmanoid. Quellen: a: Stanford University, 2007, ParaSite-Website; e: Harms-Zwingenberger und Bienzle, 2007. b-d, f: modifiziert nach Löscher und Burchard 2010: Kapitel von Harms-Zwingenberger.

#### Viszerale Leishmaniose

Bei der viszeralen Leishmaniose sind besonders makrophagenreiche Organe wie Milz, Leber, Lymphknoten und das Knochenmark Ziele des Parasiten. Typische Symptome sind: Fieber, Nachtschweiß, Schwächegefühl, Gewichtsverlust, im Verlauf entwickelt sich eine

massive Milzvergrößerung bei mäßiger Lebervergrößerung. Die Panzytopenie (Anämie, Thrombopenie, Leukopenie) ist auf den Befall der Milz und des Knochenmarks zurückzuführen. In der Serumelektrophorese zeigt sich eine Hypergammaglobulinämie bei vermindertem Albumin. Bei Kindern kann es zu Diarrhö und Wachstumsretardierung kommen. Eine zunehmende dunkle Hautfärbung bei der auch als Kala Azar (Hindi für schwarzes Fieber) bezeichneten Krankheit wird eher selten beobachtet. Klinisch manifeste Infektionen verlaufen unbehandelt tödlich, der Großteil der Infektionen verläuft jedoch inapparent. Starke Abweichungen von der mittleren Inkubationszeit von 3-6 Monaten sind möglich. Immunkompetente entwickeln nach Infektion eine lebenslange Immunität.

Eine Leishmaniose bei HIV-Infektion geht zumeist aus der Reaktivierung einer primären Infektion (auch nach subklinischen Verläufen) hervor. Bei einer Co-Infektion mit HIV können zusätzlich zu den besprochenen Symptomen auch Symptome opportunistischer Infektionen, ein Befall von atypischen Organen, eine verminderte Ansprache auf Medikamente, eine geringere Heilungsrate, eine höhere Rückfallrate und Letalität beobachtet werden (Sinha et al., 2005).

#### Post-Kala-Azar dermales-Leishmanoid (PKDL)

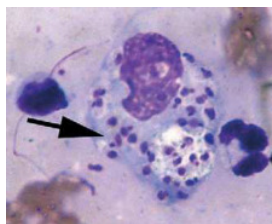
Ein PKDL entsteht nach viszeraler Leishmaniose mit *L. donovani* bei 10-20 % der indischen Patienten 1-20 Jahre nach Behandlung. Im Sudan sind 50 % der Patienten betroffen und das PKDL entwickelt sich während oder innerhalb von Monaten nach der Therapie. Ein makulopapulärer bis nodulärer Ausschlag, beginnend um den Mund breitet sich über das Gesicht und andere Körperteile aus. Eine erhöhte IL-10-Produktion ist wahrscheinlich für die Ausbildung eines PKDL entscheidend (Ghalib et al., 1993).

## Diagnostik

Die Diagnose der kutanen und mukokutanen Leishmaniose erfolgt zumeist durch den Nachweis von Gewebsamastigoten (Abb. 5). Proben werden durch Biopsie vom Rand einer Läsion oder mit einem Skalpell durch „Skin scraping“ oder „Slit skin smear“ aus dem Zentrum und Rand einer Läsion gewonnen. Eine Kombination von mikroskopischem Verfahren und Kultur erhöht die Sensitivität auf über 85 %. Die höchste Sensitivität und Spezifität besitzt der molekularbiologische Nachweis mittels PCR plus Sequenzierung oder multiplen Restriktionsenzymsspaltung, jedoch ist die benötigte Technik in Entwicklungsländern zumeist nicht vorhanden. Darüber hinaus erlaubt die PCR eine Speziesdifferenzierung, diese ist im Hinblick auf die unterschiedliche Medikamentenempfindlichkeit der Spezies anzustreben. Ein serologischer Nachweis von Anti-Leishmanien-Antikörpern ist bei multiplen Läsionen und bei der mukokutanen Form sinnvoll.

Der Goldstandard zur Diagnose der viszeralen Leishmaniose stellt ebenfalls der direkte Erregernachweis in Gewebeproben der Milz, des Knochenmarks und der Lymphknoten dar.

Bei Co-Infektion mit HIV kann auch ein direkter Nachweis im Blut versucht werden. Die Proben werden mittels Mikroskopie und PCR ausgewertet, der Ansatz einer Leishmanienkultur kann hilfreich sein. Serologische Untersuchungen werden hierzulande wegen ihrer limitierten Spezifität lediglich ergänzend durchgeführt, auch liefern sie falsch-negative Resultate bei HIV-Infizierten. In endemischen Regionen, in denen zur Biopsatentnahme die technischen Voraussetzungen fehlen, kommt überwiegend der Nachweis von Serum-Anti-*Leishmania*-Immunglobulin G zum Einsatz. In der Felddiagnostik wird auch ein immunochromatographischer Schnelltest zum Nachweis von Anti-K39-Antikörper im Fingerbeerenblut von symptomatischen Patienten mit viszeraler Leishmaniose oder PKDL erfolgreich eingesetzt. Ein Test zum Nachweis von Leishmanien-Antigen im Urin befindet sich in Erprobung.



**Abb. 5: Histologische Diagnosestellung anhand eines Giemsa gefärbten Läsionsabstrich.** Pfeil: Amastigoten in einem Makrophagen. Charakteristisch für Amastigoten ist ihr runder Zellkern und stabförmiger Kinetoplast. Quelle: modifiziert nach Murray et al., 2005.

## Therapie

Der momentan wichtigste Pfeiler bei der Bekämpfung der Leishmaniosen ist die Chemotherapie. Bei der systemischen Therapie zur Behandlung der manifesten viszeralen Leishmaniose kommen verschiedene Medikamente zum Einsatz. Die längste Erfahrung existiert für fünfwertige Antimonpräparate (zum Beispiel Pentostam<sup>®</sup> und Glucantime<sup>®</sup>). Diese sind in vielen tropischen Ländern aufgrund des vergleichsweise günstigen Preises das Therapeutikum der ersten Wahl, ausgenommen sind der indische Bundesstaat Bihar und angrenzende Regionen in Nepal aufgrund der dort bekannten Antimonresistenz. Mögliche schwere Nebenwirkungen wie Pankreatitis, Herzrhythmusstörungen sowie Myalgien, Arthralgien, Übelkeit und Diarrhoe sind abhängig von der Behandlungsdauer und Dosis. Das auch als Breitspektrumantimykotikum eingesetzte Amphotericin B wirkt sehr effektiv, kann aber ebenso schwere Nebenwirkungen hervorrufen und erfordert eine engmaschige Kontrolle. Das liposomale Amphotericin B (AmBiosome<sup>®</sup>) besitzt im Vergleich zum herkömmlichen Amphotericin B eine deutlich gesenkte Toxizität und eine verbesserte Gewebspenetration. Es ist in Europa das Mittel der 1. Wahl bei der Therapie der viszeralen Leishmaniose – auch bei Co-Infektion mit HIV. Während für alle anderen Therapeutika eine Behandlungsdauer von 20-30 Tage angestrebt wird, ist mit liposomalem Amphotericin ein Kurzzeitregime von fünf Tagen (+ 1x an Tag 10) bereits hocheffektiv. Bisher stand sein hoher Preis einem breit angelegtem Einsatz in Entwicklungsländern im Weg, jedoch durch neue Studien, die eine

Heilungsrate von über 90 % bei einmaliger Gabe von liposomalen Amphotericin B in Indien belegen (Sundar und Chakravarty, 2010) und eine Preissenkung im Jahre 2010 eröffnen sich neue Perspektiven. Mittel der 2. Wahl in Europa ist Miltefosin (Impavido®). Sehr häufig treten unter Therapie gastrointestinale Nebenwirkungen und eine Erhöhung der Leberenzyme und des Kreatinins auf. Miltefosin ist im Tierversuch teratogen und daher in Schwangerschaft und Stillzeit absolut kontraindiziert. Im Gegensatz zur intravenösen Infusionstherapie der zuvor genannten Therapeutika besitzt Miltefosin den großen Vorteil, dass es in Tablettenform verabreicht werden kann (3x täglich). In der Fachwelt werden Bedenken hinsichtlich von Resistenzentwicklungen laut, als problematisch werden mögliche Compliance Probleme beim ambulanten Einsatz des Medikaments und seine Halbwertszeit von einer Woche angesehen. Als sehr effektiv und gut verträglich hat sich das intramuskulär verabreichte Aminoglykosid Paromomycin (Humatin®) erwiesen. Da es kostengünstig hergestellt werden kann, vereint es viele Vorteile für einen Einsatz in tropischen Ländern mit niedrigem Einkommen. Für die Behandlung der afrikanischen *L. donovani*-Infektion hat sich eine Kombinationstherapie von fünfwertigen Antimonpräparaten plus Paromomycin als sehr effektiv erwiesen (Sundar und Chakravarty, 2013). Generell gewinnen Kombinationstherapien, bestehend aus Medikamenten verschiedener Wirkstoffgruppen, zur Verhinderung von Resistenzen zunehmend an Bedeutung.

Die Läsionen der unkomplizierten kutanen Leishmaniose heilen in der Regel innerhalb von 2-4 Monaten (*L. major*) bzw. 6-15 Monaten (*L. tropica*) unter Narbenbildung ab. Eine Therapie ist nicht zwingend notwendig. Unter dem Aspekt durch eine beschleunigte Heilung die Narbenbildung zu reduzieren und das Risiko für Sekundärinfektion und Disseminierung zu senken, kann eine Therapie jedoch als sinnvoll erachtet werden. Unkomplizierte Läsionen der kutanen Leishmaniose der Alten Welt sowie des *L. mexicana*-Komplexes werden lokal behandelt, je nach Spezies können fünfwertige Antimonpräparate periläsional injiziert oder eine Paromycin/Methylbenzethoniumchlorid-haltige Salbe angewendet werden. Eine systemische Therapie ist erforderlich bei der mukokutanen Leishmaniose oder zur Vermeidung dieser bei kutanem Verlauf und Nachweis des Subgenus *Viannia*. Ebenso bei komplexen Läsionen (persistierende Läsionen; multiple Läsionen; Ø > 4 cm; bei begleitender Lymphangitis, -adenitis; kosmetisch oder funktionell ungünstige Lokalisation) und der rezidivierenden und diffus-kutanen Verlaufsform sollte eine systemische Therapie eingeleitet werden.

## Prävention

Grundsätzliche Präventionsmaßnahmen bestehen in der Verminderung des Risikos eines Mückenstichs, der Kontrolle der Vektorvermehrung und der Ausschaltung möglicher tierischer Reservoirs. So können feinmaschige, Pyrethroid behandelte Bettnetze vor nächtlichen Insektenbissen schützen. Ebenso können die inneren Häuserwände mit Insektiziden

behandelt werden. Potentielle Brutstätten der Sandmücken, wie organischer Hausmüll in Hausnähe, sollten beseitigt werden. Durch Tötung streunender Hunde oder Ausstattung dieser mit einem Deltamethrin-imprägniertem Halsband, wird versucht diese als Leishmanien-Reservoir auszuschalten. Zurzeit existiert keine Impfung gegen Leishmaniose. Verschiedene Vakzine befinden sich in unterschiedlichen Phasen der Erforschung und Erprobung.

Die Informationen des Kapitels 1.1.5 wurden, falls nicht anders angegeben, folgenden Medien entnommen: Löscher und Burchard, 2010: Kapitel Leishmaniosen von Harms-Zwingenberger; Murray et al., 2005; Boecken et al., 2011; Sudeck, 2006.

### 1.1.6 Genomische Organisation und Genexpression

Das Genom der Spezies der „Alten Welt“ *L. major*, *L. infantum* und *L. donovani* ist in 36 Chromosomen organisiert. Das Genom der Spezies der „Neuen Welt“ hingegen sieht im Fall von *L. braziliensis* 35 und im Fall von *L. mexicana* 34 Chromosomen vor (Britto et al., 1998). Die meisten Chromosomen sind zwischen 0,3 und 10 Mb groß (Clayton, 2002) und kondensieren interessanterweise während der Mitose nicht. Leishmanien besitzen im Wesentlichen ein diploides Genom. Ausgenommen von *L. braziliensis*, bei dieser Spezies gibt es Anhaltspunkte für ein essentiell triploides Genom (Rogers et al., 2011). Leishmanien besitzen ein hohes Maß an genomischer Plastizität: Aneuploidie, sprich das Vorliegen einer abweichenden Anzahl von Chromosomen (Monosomien, Trisomien, Tetrasomien) ist in natürlichen Populationen weitverbreitet (Rogers et al., 2011; Sterkers et al., 2012). Sie findet sich auch als Anpassungsreaktion auf veränderte äußere Bedingungen z. B. nach *in vitro* Kultivierung, im Rahmen von Medikamentenresistenzen (Ubeda et al., 2008) oder als Reaktion auf den Deletionsversuch eines essentiellen Gens (Cruz et al., 1993). Zudem wurde ein (sexueller) Austausch von Chromosomen, auch zwischen unterschiedlichen Leishmanienspezies, beschrieben (Ravel et al., 2006; Odiwuor et al., 2011, Akopyants et al., 2009). Homologe Chromosomen können Größenunterschiede aufweisen. Dies ist auf eine unterschiedliche Anzahl von Wiederholungen hintereinandergeschalteter Gene oder von nicht-codierenden, repetitiven Elementen, vor allem in subtelomeren Bereichen zurückzuführen (Clayton, 2002). In Leishmanien finden sich häufig auch zirkuläre (30 bis >200 kb groß) wie auch lineare extrachromosomale Elemente (< 250 kb groß), welchen amplifizierte DNA-Bereiche zugrunde liegen (Beverley 1991). Diese können 5-10 % der zellulären Gesamt-DNA ausmachen und als Antwort auf nutritiven Stress (Rovai et al., 1992) oder Selektionsdruck auftreten (Grondin et al., 1993). Zustande kommt die amplifizierte DNA höchstwahrscheinlich durch intramolekulare homologe Rekombination von repetitiven Elementen, welche den zu amplifizierenden Bereich flankieren (Ouellette et al., 1991).

Die Sequenzierung des *L. mexicana* MHOM/GT/2001/U1103 Genoms wurde 2011 abgeschlossen (The Wellcome Trust Sanger Institute). Die Größe des haploiden Genoms liegt bei etwas mehr als 32 Mb. Es wurden 8250 Protein-codierende Gene für *L. mexicana* vorhergesagt (Rogers et al., 2011). Ebenso wurden die Genomsequenzen der Spezies *L. major* Friedlin (Ivens et al., 2005), *L. infantum* JPCM5, *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (Peacock et al., 2007), *L. donovani* BPK282 (Downing et al., 2011) und *L. amazonensis* MHOM/BR/71973/M2269 (Real et al., 2013) publiziert. Der Genomvergleich der verschiedenen Spezies zeigte, dass die Anordnung der proteincodierenden Gene hochkonserviert ist und dass lediglich eine geringe Anzahl von speziesspezifischen Genen existiert, nämlich für *L. mexicana* zwei, für *L. major* 14, für *L. infantum* 19 und für *L. braziliensis* 67 an der Zahl (Peacock et al., 2007; Rogers et al., 2011). Die meisten Gene liegen in einfacher Kopie vor. In allen vier Spezies wurden zusammengekommen 56 Protein-codierende Gene gefunden, die in mehr als nur einer Kopie vorhanden sind (Rogers et al., 2011). Das Leishmanien-Genom ist reich an den Basen Guanin und Cytosin. Knapp 60 Prozent der Basenpositionen im Genom von *L. mexicana* sind mit G bzw. C besetzt (Rogers et al., 2011). Das Genom von Vertebraten besteht im Vergleich zu nur 40 bis 45 Prozent aus G und C (Alonso et al., 1992). Wie in anderen Organismen stellen auch in Trypanosomatiden Nukleosomen die basale Organisationseinheit des Chromatins dar. Auf Ebene der Genomorganisation und Transkription beschreiten Trypanosomatiden ihren eigenen Weg, der sich von dem anderer Eukaryonten unterscheidet. In Trypanosomatiden sind die proteincodierenden Gene in Einheiten von weniger als zehn bis zu mehreren hundert hintereinandergeschalteten Genen angeordnet. Zwei und mehr dieser polycistronischen Cluster sind auf einem Chromosom so angeordnet, dass sie mit ihren 5'-Enden (divergent), 3'-Enden (konvergent) oder ihrem 3'- und 5'-Ende aufeinander zustreben. In den Bereichen zwischen den proteincodierenden Geneinheiten finden sich Gene, welche für tRNA, rRNA bzw. snRNA codieren (Martínez-Calvillo et al., 2010). Auf dem erstmals charakterisierten Chromosom 1 von *L. major* finden sich zwei polycistronische Gencluster, eines auf jedem der beiden DNA-Stränge. In „Run-on“-Analysen wurde beobachtet, dass die RNA-Polymerase II das Chromosom 1 ausgehend von der „strand-switch“-Region zwischen den beiden divergenten Clustern, bidirektional in Richtung der Telomere transkribiert (Martínez-Calvillo et al., 2003). Die RNA-Polymerase III der Trypanosomatiden ist wie in anderen Eukaryonten für die Synthese der kleinen RNA-Moleküle: snRNAs, 5s rRNA, 7SL RNA und tRNAs zuständig. Die RNA-Polymerase I synthetisiert rRNA. Interessanterweise ist die RNA-Polymerase I in *T. brucei* zudem für die Transkription zweier proteincodierender Gene verantwortlich – so werden die mRNAs der wichtigen Oberflächenantigene „variant surface glycoprotein“ (VSG) und EP/GPEEt Procyclin von ihr produziert (Günzl et al., 2003). Für die RNA-Polymerase I wurden Promotoren gefunden. Die Transkription in Trypanosomatiden erfolgt polycistronisch, d. h. alle in einem Cluster

zusammengefassten Gene werden co-transkribiert. Die Gene in einem Cluster sind häufig funktionell nicht miteinander verwandt. Das entstandene Primärtranskript wird anschließend durch Trans-Spleißreaktion am 5'-Ende, gekoppelt mit Polyadenylierung und Spaltung am 3'-Ende, in einzelne reife mRNAs überführt (Martínez-Calvillo et al., 2010). Bei der Trans-Spleißreaktion wird eine 39 Nukleotide lange Miniexonsequenz, auch als „spliced leader“ (SL) bezeichnet, am 5'-Ende der prä-mRNA angefügt und mit 7-Methylguanosin versehen (Parsons et al., 1984). Als Erkennungssequenz für das Trans-Spleißen gilt ein AG-Dinukleotid, welches einer Polypyrimidin-Abfolge nachfolgt und sich 50-100 Nukleotide stromauf vom Start-Codon befindet (Matthews et al., 1994; Hummel et al., 2000). Die Polyadenylierung ist nicht von einer poly(A)-Konsensussequenz abhängig, sondern erfolgt abhängig von der Spezies 100 bis 400 Nukleotide stromauf der Spleißerkennungssequenz des nachfolgenden Gens (Clayton 2002). Das Genom von Trypanosomatiden ist beinahe frei von Introns. Bis dato wurden Introns und eine Cis-Spleißreaktion, wie sie in höheren Eukaryonten zum Entfernen von Introns zu finden ist, lediglich für das Gen der Poly(A)-Polymerase von Trypanosomen beschrieben (Mair et al., 2000). Viele der klassischen eukaryontischen Transkriptionsfaktoren (TF) fehlen in Trypanosomatiden oder präsentieren sich, wie im Falle von „TATA binding protein“ (TBP) oder von TFIIB in sehr divergenter Form (Ruan et al., 2004; Cribb und Serra 2009; Palenchar et al., 2006). Divergente Homologe von TFIIB, TFIIA, TFIIH, TBP (TRF4) und „snRNA-activating protein complex“ wurden als essentielle Bestandteile der Transkription von SL-RNA beschrieben (Lee et al., 2007). Promotor-typische Elemente der RNA-Polymerase II konnten bis dato einzig und allein für die SL-Sequenz identifiziert werden (Gilinger et al., 2001). Auch Histonvarianten und Histonmodifikationen scheinen bei der Initiation der Transkription eine Rolle zu spielen (Martínez-Calvillo et al., 2010).

Microarray Studien von Leishmanien legten offen, dass nur eine relativ begrenzte Anzahl der Gene, nämlich 0,2 bis 9 Prozent stadienspezifisch in Pro- bzw. Amastigoten exprimiert wird (Gomez et al., 2010). Quantitative Analysen des Leishmanien-Proteoms haben gezeigt, dass die relative Proteinexpression nicht immer mit der Genexpression korreliert (Cohen-Freue et al., 2007). Dies ist nur einer der Standpfeiler für die Annahme, dass die Kontrolle der Genexpression in Trypanosomatiden überwiegend auf post-transkriptionaler Ebene erfolgt: Regulative Mechanismen greifen bei der prä-mRNA Prozessierung; Unterschiede in der mRNA Stabilität und der Translation beeinflussen die Proteinmenge und darüber hinaus können Proteine post-translationalen Modifikationen unterliegen und einen unterschiedlichen turnover aufweisen (Clayton und Shapira 2007). Möglicherweise spielen Sequenzen innerhalb der 3'-untranslatierten Region für die RNA-Stabilität und bei der Translation eine Rolle.

Das zweite zur Transkription befähigte Organell ist das einzelne Mitochondrium mit dem Kinetoplasten. Dieser umfasst ein geordnetes Netzwerk bestehend aus zwei Klassen von



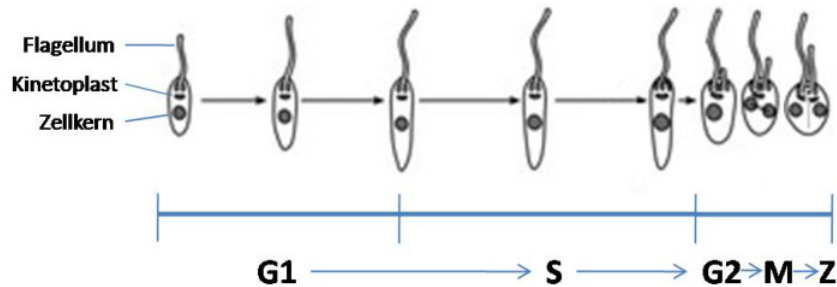
zirkulären DNA-Molekülen: Die Maxizirkel, welche zwischen 35 und 50 kb groß sind, in 10-30-facher Kopie pro Kinetoplast vorliegen und für mitochondriale Proteine und rRNAs codieren und die Minizirkel welche speziesspezifisch zwischen 0,8 bis 1,6 kb groß sind und in 30 000 bis 50 000-facher Kopie vorhanden sind (Campbell et al., 2003). Die Minizirkel sind nicht sequenzidentisch und codieren für sogenannte guide-RNAs, diese leisten einen Beitrag zum Editing mitochondrialer (mt) mRNAs (Lukes et al., 2005). In *T. brucei* ist eine nukleär-codierte mtRNA-Polymerase für die Transkription von Maxizirkel-DNA zuständig (Grams et al., 2002). Eine weitere Besonderheit ist, dass alle tRNAs im Zellkern von Kinetoplastiden produziert und dann in das Mitochondrium importiert werden (Campbell et al., 2003).

Die Methode RNA-Interferenz (RNAi) wird in *T. brucei* für die Herunterregulation von Genen genutzt, ist jedoch in Leishmanien mit der Ausnahme von *L. braziliensis* nicht möglich (Lye et al., 2010). In den übrigen Leishmanienspezies können Nullmutanten erzeugt werden, indem beide Allele eines Genes mittels homologer Rekombination gegen Selektionsmarkergene ausgetauscht werden (Cruz und Beverley, 1990).

### 1.1.7 Zellzyklus und Cytokinese - Morphologische Aspekte

Im Rahmen der Zellteilung müssen Zellorganellen, welche in der Zelle in einfacher Kopie vorliegen – Zellkern, Kinetoplast, Golgi Apparat, Basalkörper und Flagellum – verdoppelt und auf die beiden Tochterzellen verteilt werden (Hamarton et al., 2007b). Die hoch kondensierte DNA des „bohnenförmigen“ Kinetoplasten ist in Leishmanien-Promastigoten zwischen Zellkern und anteriorem, flagellentragendem Zellpol lokalisiert. In *T. brucei*-Prozyklischen liegen singuläre Organellen, wie der Kinetoplast, hingegen zwischen Zellkern und posteriorem Pol. Nach der Zellteilung kommt es zuerst zum Längenwachstum der Zelle, der DNA-Gehalt bleibt gleich (G1-Phase). Dann kommt es zur Verdopplung der DNA von Zellkern und Kinetoplast, während die Zelllänge unverändert bleibt (S-Phase). Nahe dem Ende der S-Phase kann ein zweites, kürzeres Flagellum am anterioren Pol beobachtet werden. Die Basalkörperduplikation ist zu diesem Zeitpunkt bereits abgeschlossen. Während G2-Phase und Mitose (M) verkürzt sich der Zelleib zunehmend und die Zelle rundet sich ab (Abb. 6). Basierend auf mikroskopischen Untersuchungen von DAPI-gefärbten Promastigoten von *L. mexicana* scheint die Trennung der beiden Kinetoplasten hauptsächlich, nachdem die Trennung der Zellkerne eingesetzt hat, zu erfolgen (Wheeler et al., 2011). Dementgegen wurde für Promastigoten von *L. major* beschrieben, dass die Kinetoplasten-Segregation früher, bereits vor Beendigung der Mitose abgeschlossen ist. Bei der hier zugrundeliegenden Untersuchung war zur besseren Beurteilung des Fortschreitens der nukleären Mitose, zusätzlich die mitotische Spindel mittels anti- $\beta$ -Tubulin-Antikörper visualisiert worden (Ambit et al., 2011). Die Cytokinese überführt die Zelle schließlich wieder

an den Start des Zellzyklus. Bei der Cytokinese setzt sich eine Teilungsfurche vom anterioren zum posterioren Pol der Zelle, entlang ihrer longitudinalen Achse fort und führt schließlich zur Abtrennung der beiden Tochterzellen voneinander. Zum Zeitpunkt der Zellteilung von *L. mexicana* Promastigoten ist das neue Flagellum kürzer (4-5  $\mu\text{m}$ ) als das alte. Letzteres besitzt eine sehr variable Länge (5-15  $\mu\text{m}$ ) (Wheeler et al., 2011).



**Abb. 6: Zellzyklus von *L. mexicana*.** Modifiziert nach: Wheeler et al., 2011.

## 1.2 Signaltransduktion in höheren Eukaryonten

Zellen reagieren auf Veränderungen in ihrer Umgebung. Von außen kommende physikalische (Licht, Schall, mechanische Kräfte) oder chemische Reize (Hormone, Neurotransmitter, Membranmoleküle anderer Zellen, lösliche Faktoren, Bestandteile der extrazellulären Matrix, Pharmaka usw.) werden mit Hilfe von Rezeptoren wahrgenommen und an intrazelluläre Effektorsysteme weitergeleitet. Für die intrazelluläre Weiterleitung eines aufgenommenen Signals spielen Botenstoffe und Proteinphosphorylierungsvorgänge eine entscheidende Rolle. Rezeptoren finden sich in der Zellmembran, im Cytoplasma oder im Zellkern. Das Rezeptorprotein ändert nach Bindung eines Signalmoleküls seine Konformation, dies wird von nachgeschalteten Elementen der Signaltransduktion wahrgenommen und das Signal in die Zelle weitergeleitet. Die Endstrecke stellt die Reaktion der Zelle dar. Viele zentrale Vorgänge wie das Zellwachstum, die Zellproliferation und -differenzierung und der Stoffwechsel werden so gesteuert.

Hydrophobe, extrazelluläre Signalmoleküle, wie Steroid- und Schilddrüsenhormone, können die Zellmembran durchdringen und an intrazelluläre Rezeptoren binden. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um ligandengesteuerte Transkriptionsfaktoren. Diese lagern sich nach Bindung ihres Liganden an Hormone-Response-Elemente der DNA und verändern so die Expression spezifischer Gene. Hydrophile Signalstoffe hingegen binden an Membranrezeptoren. Man unterscheidet drei Rezeptortypen: Rezeptoren mit intrinsischer Enzymaktivität oder mit der Fähigkeit, assoziierte Enzyme auf der Membranninnenseite direkt zu aktivieren. Hierzu gehören Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren, Guanylatcyclase-Rezeptoren, Zytokin-Rezeptoren (JAK/STAT-gekoppelte Rezeptoren) und Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Rezeptoren mit intrazellulärer Serin/Threonin-Kinase-Aktivität bilden eine große Rezeptorfamilie in Pflanzen. Im Tierreich spielen sie nur zur Aufnahme von

Reizen im transformierendem Wachstumsfaktor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )-Signalweg eine Rolle (Afzal et al., 2008). Tyrosin-Kinase-Rezeptoren kommen hingegen in Pflanzen nicht vor. Der Tyrosin-Kinase-Rezeptor besitzt eine, die Membran durchspannende Helix. Die Bindung eines extrazellulären Liganden, wie z. B. Insulin, epidermale Wachstumsfaktor (EGF) oder Plättchen-Wachstumsfaktor (PDGF), führt zur Dimerisierung des Rezeptors. Dadurch kommen sich die Kinase-Domänen der beiden Rezeptormoleküle so nahe, dass sie sich gegenseitig phosphorylieren (Autophosphorylierung). An die Phosphotyrosin-Reste des Rezeptors können Proteine mit SH2 und PTB Kopplungsdomäne andocken. Angelagerte Proteine werden ebenfalls phosphoryliert. Sie leiten anschließend das Signal ins Zellinnere weiter. Die zweite Gruppe umfasst liganden- und spannungsgesteuerte Ionenkanäle. Diese integralen Membranproteine ermöglichen den Durchfluss von  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen. Spannungsgesteuerte Ionenkanäle reagieren auf eine Änderung des Membranpotentials. Aktionspotentiale in Nerven- und Muskelzellen werden so weitergeleitet. Neurotransmitter wie z. B. Acetylcholin, Glutamat, GABA und Glycin binden an ligandengesteuerte Ionenkanäle und verändern so den Ionenfluss. Second Messenger, G-Proteine und Proteinkinasen können ebenfalls Einfluss auf den Öffnungszustand von Ionenkanälen nehmen. Zur letzten Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören die 7-Transmembranhelix-Rezeptoren (7-TM-Rezeptor). Nach Bindung des Signalmoleküls ändert der 7-TM-Rezeptor seine Konformation, dadurch wird die Anlagerung eines G-Proteins auf der Membraninnenseite ermöglicht. Vertreter der 7-TM-Rezeptoren sind der Sehfärbstoff Rhodopsin, Rezeptoren für Catecholamine und für eine Vielzahl anderer hydrophiler Hormone wie Glucagon, Calcitonin, Parathormon u. a. sowie Geruchs- und Geschmacksrezeptoren. Die beteiligten G-Proteine gehören zur Familie der großen heterotrimeren G-Proteine, welche aus den drei Komponenten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bestehen. Die Aktivierung des G-Proteins durch den Rezeptor führt zu einem Austausch von GDP gegen GTP an der  $\alpha$ -Untereinheit und bewirkt den Zerfall des G-Proteins in die  $\alpha$ - und die zusammengelagerte  $\beta\gamma$ -Untereinheit, welche beide unabhängig voneinander das Signal an nachgeschaltete Effektorproteine wie z. B. Phospholipase C und  $\text{A}_2$ , cGMP-Phosphodiesterase und Ionenkanäle weiterleiten. Die langsame Hydrolyse von GTP zu GDP überführt die  $\alpha$ -Untereinheit wieder in den inaktiven Zustand und sie verbindet sich mit der  $\beta\gamma$ -Untereinheit. Weitere an Signaltransduktionsprozessen beteiligte G-Proteine sind die mittelgroßen G-Proteine, wie die Elongationsfaktoren Tu und G und die kleinen monomeren G-Proteine, wie Ras.

G-Proteine wirken auf primäre Effektorsysteme, welche dann kurzlebige Second Messenger erzeugen. Die wichtigsten Second Messenger sind cAMP (3'-5'-Adenosinmonophosphat), cGMP (zyklisches 3'-5'-Guanosinmonophosphat),  $\text{Ca}^{2+}$ , Inositoltriphosphat ( $\text{InsP}_3$ ), Diacylglycerol (DAG) und Stickstoffmonoxid (NO). cAMP wird von der Adenylatcyclase aus ATP gebildet und durch eine cAMP-Phosphodiesterase wieder abgebaut. Die Aktivität der

membrangebundenen Adenylatcyclasen steht unter der Kontrolle von G-Proteinen. Die meisten G-Proteine aktivieren sie (Typ  $G_s$ ), andere inaktivieren sie (Typ  $G_i$ ). cAMP kontrolliert den Öffnungszustand von Ionenkanälen und führt zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Diese Serin/Threonin-Kinase besitzt eine Vielzahl von Substraten, dazu gehören Transkriptionsfaktoren und Enzyme des Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels. Der kurzfristige Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Cytoplasma wird durch die Öffnung von Ionenkanälen in der Plasmamembran oder intrazellulärer Speicher wie dem ER erreicht. Die Wirkung von  $Ca^{2+}$  wird von Calcium-bindenden Proteinen wie dem Calmodulin und in Folge von Calmodulin-abhängigen Kinasen vermittelt.  $InsP_3$  und das hydrophobe Messenger-Molekül DAG gehen aus der Spaltung eines Membranlipids durch die Phospholipase C hervor.  $InsP_3$  führt zur Öffnung von intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Kanälen, während DAG zusammen mit  $Ca^{2+}$  die Proteinkinase C (PKC) aktiviert.

Proteine der Signaltransduktion sind häufig modular aufgebaut und besitzen typische Kopplungselemente, welche sie zur Interaktion befähigen. Zu den Kopplungselementen gehören neben der SH2- und der PTB-Domäne, die PDZ-Domäne, welche kurze Peptidsequenzen am C-Terminus von Proteinen erkennt, die PH-Domäne, welche an Phosphoinositide bindet und die SH3- und die WW-Domäne, welche an prolinreiche Sequenzen koppeln. SH3-Domänen sind u. a. an der Signaltransduktion von Ras beteiligt und vermitteln Proteininteraktionen im Bereich des Cytoskeletts. WW-Domänen spielen u. a. bei der Erkennung von Proteinsubstraten von Kinasen und bei Interaktionen beim Ubiquitin-abhängigen Proteinabbau eine Rolle. Adapterproteine, welche sich ausschließlich aus Kopplungsdomänen zusammensetzen, können unterschiedliche Signalwege miteinander verbinden.

Die Informationen des Kapitels 1.2 entstammen, falls nicht anders angegeben, aus: Karlsons Biochemie und Pathobiochemie von Doenecke et al., 2005.

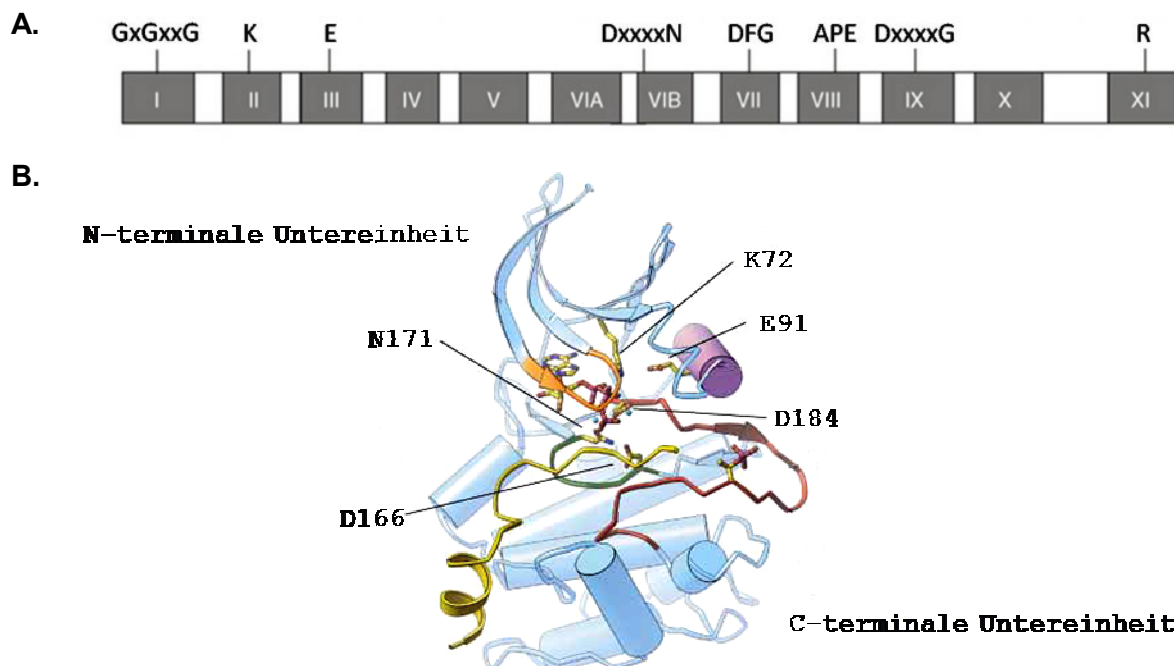
### 1.2.1 Proteinkinasen

Proteinkinasen und ihre Gegenspieler die Phosphatasen sind bei der Regulation einer Vielzahl von zellulären Vorgängen anzutreffen. Sie beeinflussen Wachstum, Differenzierung und Teilung, Zellmotilität, Genexpression und Stoffwechselforgänge. Phosphorylierung stellt die posttranslational häufigste kovalente Modifikation von Proteinen dar. Durch ihre Reversibilität besitzt sie eine wichtige Schalterfunktion bei der Weitergabe von Signalen. Die Phosphorylierung eines Zielproteins kann zur Änderung seines Aktivitätszustands oder seiner Lokalisation führen. Sie kann seine Stabilität oder die Zugänglichkeit von Bindungsstellen beeinflussen.

Rund 2 % aller eukaryontischen Gene codieren für Proteine mit Proteinkinase Domäne (Rubin et al., 2000). Alle Proteinkinasen katalysieren dieselbe Reaktion, die Übertragung des

$\gamma$ -Phosphats von ATP auf die Hydroxyl-Gruppe von Serin, Threonin oder Tyrosin. Hinsichtlich des phosphorylierten Rests lässt sich eine Unterteilung vornehmen in Serin-/Threonin-Kinasen, Tyrosin-Kinasen und dual-spezifische Kinasen, welche sowohl Serin-, Threonin- als auch Tyrosin-Reste als Substrat akzeptieren. Zu letzteren gehören neben den MAP-Kinasen die LAMMER-Kinasen (Hanks et al., 1988, Lee et al., 1996). Untersuchungen der katalytischen Domäne verschiedener eukaryontischer Proteinkinasen mittels Röntgenkristallographie haben gezeigt, dass ihnen eine dreidimensionale Struktur gemeinsam ist. Die katalytische Domäne der Proteinkinasen (Kinase-Domäne) ist zwischen 250-300 Aminosäuren lang und lässt sich in 12 konservierte Subdomänen unterteilen. Sie besteht aus zwei Untereinheiten (Abb. 7, exemplarisch für Proteinkinase A). Die kleinere N-terminale Untereinheit setzt sich aus einer fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblattstruktur und einer konservierten  $\alpha$ -Helix, der  $\alpha$ C-Helix, zusammen. Sie umfasst die Subdomänen I-IV. Die C-terminale Untereinheit umfasst die Subdomänen VIa-XI, ist größer und besteht überwiegend aus helikalen Bereichen. Die Subdomäne V stellt das Verbindungsstück zwischen kleiner und großer Untereinheit dar. (Hanks und Hunter, 1995). Die Bindungsstelle für den Phosphatgruppen-donor ATP (oder GTP) und die für das Peptidsubstrat befinden sich in einer Furche zwischen den beiden Untereinheiten. Hier ist der Ort der Katalyse. Die Kinase-Domäne beginnt sieben Aminosäuren stromaufwärts des ersten Glycins des Konsensusmotivs G-x-G-x-x-G (x entspricht jeder beliebigen Aminosäure) und endet 9-13 Reste stromab des beinahe invarianten Arginins in Subdomäne XI. Das genannte glycinreiche Sequenzmotiv ist Teil der Phosphatbindungsschleife (P-Schleife) in Subdomäne I. Die geringe Größe der Glycin-Reste ermöglicht ein ungehindertes Annähern der Phosphatgruppen des ATPs. Darüber hinaus werden die Phosphatgruppen durch die Interaktion mit  $Mg^{2+}$  bzw.  $Mn^{2+}$  und einem Lysin-Rest in Subdomäne II korrekt positioniert. Dieser Lysin-Rest erfährt wiederum Stabilisierung durch Bildung eines Ionenpaars mit einem in Subdomäne III befindlichem Glutamat (K72 und E91 der PKA) der  $\alpha$ C-Helix. Die Bindung der divalenten Metallionen wird durch ein konserviertes Asparagin (N171 der PKA) in Subdomäne VIa und ein Aspartat (D184 der PKA) in Subdomäne VII vermittelt. Der Aspartat-Rest ist Teil des hochkonservierten Aspartat-Phenylalanin-Glycin (DFG) Motivs. (Hanks und Hunter 1995; Krupa et al., 2004). Die Bindung des Peptidsubstrats erfolgt in der Nähe des  $\gamma$ -Phosphats, die zentral liegende Aktivierungsschleife (T-Schleife) bildet hierfür eine Art Plattform. Die Aktivierungsschleife ist typischerweise 20-30 Aminosäuren lang, beginnt mit dem konservierten DFG-Motiv in Subdomäne VII und endet mit dem konservierten APE-Motiv (Alanin-Prolin-Glutamat) in Subdomäne VIII. Sie ist großen Konformationsänderungen unterworfen (Johnson et al., 1996). In vielen Kinasen ist die Aktivierungsschleife im aktiven Zustand phosphoryliert, wobei Position und Anzahl der Phosphorylierungsstellen von Kinase zu Kinase variieren können. Durch die Phosphorylierung wird die Aktivierungsschleife in einer räumlich erweiterten Konformation stabilisiert,

was die Anlagerung des Substrats und die Katalyse ermöglicht. Einer dieser phosphorylierten Reste bildet ein Ionenpaar aus mit einem konservierten Arginin-Rest (R165 der PKA), der dem katalytischen Aspartat in der katalytischen Schleife vorangeht (Johnson et al., 1996). Diese Interaktion unterstützt die korrekte Ausrichtung des DFG-Motivs und anderer für den Phosphotransfer notwendiger Reste (Krupa et al., 2004). Am Boden des aktiven Zentrums befindet sich die katalytische Schleife. Sie ist Teil der Subdomäne VIb und enthält das Konsensusmotiv HRDLKxxN (Histidin-Arginin-Aspartat-Leucin-Lysin-x-x-Asparagin), wobei D und N invariant sind. Das invariante Aspartat (D166 der PKA), auch katalytische Base genannt, akzeptiert ein Proton der angreifenden Hydroxyl-Gruppe des Peptidsubstrats während des Phosphotransfers. Die Orientierung des Aspartat-Rests wird durch das bereits vorgestellte konservierte Asparagin in Subdomäne VIa über Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert (Huse und Kuriyan 2002). Das APE-Motiv in Subdomäne VIII und das D-x-x-x-G-Motiv in Subdomäne IX tragen zur Stabilisierung der großen Untereinheit bei.



**Abb. 7: Struktur eukaryontischer Proteinkinasen.** **A.** Hoch konservierte Aminosäurereste der katalytischen Domäne. Quelle: Hanks, 2003. **B.** Modell einer Proteinkinase-Domäne. Struktureller Aufbau am Beispiel von PKA im katalytisch aktiven Zustand.  $\beta$ -Faltblattstrukturen sind als Pfeile,  $\alpha$ -Helices als Zylinder dargestellt. Hervorgehoben sind folgende Strukturelemente: Aktivierungsschleife in rot;  $\alpha$ C-Helix in lila; P-Schleife in orange; katalytische Schleife in grün; Peptidinhibitor der PKA in gelb. Darüber hinaus sind das gebundene Nukleotid und zentrale konservierte Reste gezeigt. Quelle: modifiziert nach Huse und Kuriyan, 2002.

Sequenzalignments der Kinase-Domänen lassen Rückschlüsse auf Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Superfamilie der eukaryontischen Proteinkinasen (ePKs) zu und ermöglichen es eine phylogenetische Einordnung vorzunehmen (Hanks et al., 1988). Eine Einteilung der ePKs in folgende Gruppen findet Anwendung: Zyklische Nukleotid-abhängige Kinasen (PKA und PKG) und Calcium-Phospholipid-abhängige Kinasen (PKC) als Mitglieder

der AGC-Gruppe, Calcium/Calmodulin-abhängige Kinasen (CAMK), CMGC-Gruppe, Homologe der Hefe Sterile Kinasen (STE), Tyrosin-Kinase-ähnliche Kinasen (TKL), Homologe der Casein-Kinase 1 (CK1), Tyrosin-Kinasen (TK) und „Andere“ eukaryontische Proteinkinasen, welche nicht unter die genannten Hauptgruppen fallen (Manning et al., 2002). Neben den eukaryontischen Proteinkinasen sind die atypischen Proteinkinasen (aPKs) zu nennen. Vertreter dieser Gruppe weisen keine starke Sequenzhomologie zu der klassischen Kinase-Domäne auf, experimentell ist ihnen jedoch eine Kinase-Aktivität nachzuweisen.

## 1.2.2 CMGC-Proteinkinasen

Diese Gruppe umfasst die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), Glykogensynthase-Kinasen (GSK), CDK-ähnlichen Kinasen (CLK), dual-spezifische Tyrosin-phosphorylierten und regulierten Kinasen (DYRK) und Serin-Arginin-Protein-Kinasen (SRPK) (Hanks, 2003).

### 1.2.2.1 Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen

Die Proteine der Signalweiterleitung sind häufig als Kaskaden organisiert. Diese Organisationsform ermöglicht eine Verstärkung des Signals, eine Vernetzung verschiedener Signalwege untereinander und eröffnet nach Rückkopplung mit anderen Signalen die Möglichkeit der Selbstregulation. Der Mitogen-aktivierte Protein-(MAP-)Kinase-Signalweg besteht aus einer Kaskade hintereinander geschalteter Proteinkinasen. Zuerst steht die aktivierte MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK, MAP3K, MEKK oder MKKK), die eine MAP-Kinase-Kinase (MAPKK, MAP2K, MEK oder MKK) phosphoryliert, welche schlussendlich die MAP-Kinase (MAPK) phosphoryliert und dadurch aktiviert. Zu den Zielmolekülen von MAPKs gehören andere Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren und Proteine des Cytoskeletts (Qi und Elion, 2005). Möglich ist auch, dass MAPKs über Modifikation von Histonen eine epigenetische Rolle zukommt (Suganuma und Workman, 2012). Ziel ist es, Prozesse wie die Differenzierung und Proliferation der Zelle und auch ihren Tod zu steuern (Morrison, 2012). Die MAPKKK wird typischerweise durch Interaktion mit einem kleinen G-Protein der Ras/Rho-Familie und/oder durch Phosphorylierung durch Proteinkinasen stromab von Membranrezeptoren in den aktiven Zustand überführt. Zu den MAPKKKs gehören Raf-Isoformen, Ste11-ähnliche Kinasen, MEKK1-MEKK4, MLKs (mixed lineage kinases), Mos und Tao-Proteine. MAPKKs (Ste7-ähnliche Kinasen) werden durch Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten in ihrer Aktivierungsschleife aktiviert. Eine MAPKK kann von verschiedenen MAPKKKs aktiviert werden, besitzt selbst jedoch eine hohe Spezifität für ihr Substrat (Qi und Elion, 2005). MAPKKs sind dual-spezifische Kinase. Die Phosphorylierung am Threonin- und Tyrosin-Rest des konservierten T-x-Y-Motivs in der Aktivierungsschleife von MAPKs ist

essentiell für deren enzymatische Aktivität. Dies wurde erstmals für ERK2 demonstriert (Robbins et al., 1993). Eine Dephosphorylierung dieser beiden Reste führt zur Inaktivierung der Kinase. Hierfür sind Serin/Threonin-Phosphatasen, Protein-Tyrosin-Phosphatasen und Dual-spezifische (Thr/Tyr) Protein-Phosphatasen verantwortlich (Keyse, 2000).

In Säugetierzellen wurden bis dato fünf MAP-Kinase-Familien identifiziert: ERK1/ERK2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2); JNK (Jun N-terminale Kinase): JNK1, JNK2 und JNK3; p38-Kinase mit den Isoenzymen p38 $\alpha$ - $\delta$ ; ERK3/ERK4 und ERK5. ERK-Kinasen besitzen ein TEY-Motiv in ihrem Aktivierungssegment (mit Ausnahme der atypischen MAPK ERK3). Eine Aktivierung des Signalwegs von ERK1 und ERK2 durch Mitogene wie Wachstumsfaktoren führt zum Wachstum und Differenzierung der Zelle. Der aktivierte Tyrosin-Kinase-Rezeptor aktiviert in Verbindung mit dem Adaptorprotein SOS (son of sevenless) Ras. Ras-GTP führt zur Aktivierung von Raf, gefolgt von der Phosphorylierung der MAPKK MEK1/MEK2 und dann ERK1 und ERK2. Wachstumsfaktoren führen auch zur Phosphorylierung der großen ERK5 durch MEK5. JNK und p38 vermitteln den Einfluss von Stressfaktoren (= Stress-aktivierte Protein-Kinasen, SAPKs). Die Mitglieder der JNK-Familie tragen ein TPY-Motiv im Aktivierungssegment, p38-Kinasen hingegen ein TGY-Motiv. Eine größere Zahl von MAPKKs führt zur Aktivierung der MAPKKs MEK4 und MEK7 bzw. MEK3 und MEK6 im JNK- bzw. p38-Signalweg (Qi und Elion, 2005; Morrison 2012).

MAPKs phosphorylieren Serin- und Threonin-Reste denen ein Prolin-Rest (P+1 Position) nachfolgt. Vornehmlich Substrate von ERK1/2 besitzen zwei Reste vor der Phosphorylierungsstelle einen zusätzlichen Prolin-Rest, das Konsensusmotiv lautet hier P-x-S/T-P (Pearson et al., 2001). MAPKs besitzen verschiedene Bindungsstellen, die eine hochaffine Interaktion mit ihrem Substrat, ihrem Aktivator und Wechselwirkungen mit Gerüstproteinen erlauben. Spezifische Gerüstproteine, wie KSR und MP-1 des ERK-Signalwegs, binden verschiedene Komponenten der MAP-Kinase-Kaskade, konzentrieren diese räumlich und tragen im Wesentlichen zur Signalweiterleitung bei (Scott und Pawson, 2009). Die „common docking“ (CD)-Domäne im C-Terminus von ERK, p38 und JNK dient zur Interaktion mit D-Domänen von MAPKKs, Substraten und Phosphatasen (Tanoue et al., 2000). D-Domänen bestehen aus einer Einheit von basischen Aminosäureresten, welcher nach wenigen Resten hydrophobe Reste nachfolgen: K/R-K/R-x<sub>2-6</sub>-L/I/V-x-L/I/V.

Störungen des ERK1/2-, p38- und JNK-Signalwegs sind für verschiedene humane Krankheiten verantwortlich. Kinasen der MAP-Signalkaskade sind daher potentielle Zielstrukturen für die Medikamentenentwicklung. ERKs werden derzeit als Angriffspunkt für anti-Krebs-Medikamente getestet. Den Mitgliedern der p38-Kinasefamilie scheint eine Rolle bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie Asthma und Autoimmunreaktionen zuzukommen. Inhibitoren des JNK-Signalwegs werden zurzeit für die Behandlung von Rheumatoider Arthritis und neurodegenerativen Erkrankungen getestet (Johnson und Lapadat, 2002; Johnson



und Nakamura, 2007). Insgesamt haben bis 2009 klinische Inhibitorstudien von etwa 30 verschiedenen PKs die Phase I erreicht (Zhang et al., 2009) und 10 Proteinkinase-Inhibitoren haben eine Zulassung für den Einsatz in der Krebstherapie erhalten (Cohen, 2009).

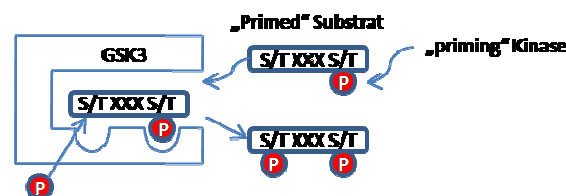
### 1.2.2.2 Glykogensynthase-Kinasen

Ihren Namen verdankt die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) ihrer Erstbeschreibung als Enzym, welches die Glykogensynthase phosphoryliert und dadurch inhibiert. Sie wurde erstmals aus Skelettmuskel isoliert (Embi et al., 1980; Rylatt et al., 1980; Woodgett und Cohen, 1984). Ihr Name sollte jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, dass GSK3 bei einer Vielzahl von zellulären Vorgängen eine wichtige regulatorische Rolle übernimmt. Neben ihrer Funktion im Glykogenstoffwechsel und Insulinsignalweg kommen ihr Aufgaben bei der Zellproliferation, dem Zellzyklus, der Apoptose und der Zellmotilität zu. Sie spielt eine Rolle bei Entzündungsprozessen, bei der Embryonalentwicklung und beim Funktionserhalt von Nervenzellen (Frame und Cohen 2001; Doble und Woodgett 2003; Jope und Johnson, 2004). Eine Fehlregulation auf Ebene von GSK3 scheint von Bedeutung zu sein bei der Ausbildung oder Progression unterschiedlicher Erkrankungen, wie Diabetes mellitus Typ II (Eldar-Finkelman et al., 1999), Alzheimer Krankheit (De Ferrari und Inestrosa, 2000; Maccioni et al., 2001), bipolaren Störungen (Chen et al., 1999; Gould et al., 2004) und einer Reihe von Krebsentitäten (Manoukian und Woodgett, 2002) unter anderem.

GSK3 ist eine evolutionär hochkonservierte Proteinkinase. Homologe finden sich in Wirbeltieren, Pflanzen, Pilzen, Würmern, Fliegen, Seescheiden (Ali et al., 2001) und in daraufhin untersuchten Protozoen. In Säugetieren besteht die GSK3-Familie aus zwei, von verschiedenen Genen codierten Isoformen – alpha und beta. Beide Genprodukte werden ubiquitär in allen Säugetiergeweben exprimiert, wenn sich auch ihr Expressionsniveau von Gewebe zu Gewebe unterscheidet. Das Molekulargewicht von humaner (hs) GSK3 $\alpha$  beträgt 51 kDa, das von GSK3 $\beta$  47 kDa. Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz innerhalb der Kinase-Domäne beider beträgt 97 %. Die hsGSK3 $\alpha$  besitzt als wesentlichen Unterschied zur hsGSK3 $\beta$  einen längeren, glycinreichen der katalytischen Domäne vorangehenden N-terminalen Bereich (Frame und Cohen, 2001).

Beide Isoformen weisen ähnliche biochemische- und Substrat-Eigenschaften auf. In ihrer Funktion scheinen sich GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$  im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg vollständig redundant zu verhalten (Doble et al., 2007), und sie übernehmen eine wichtige, wenn auch nicht vollständig deckungsgleiche Funktion bei der Regulation von Stoffwechselfvorgängen (Force und Woodgett, 2008). Doppeldeletionsstudien in Mäusen haben gezeigt, dass GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$  in ihrer Funktion nicht als äquivalent zu betrachten sind. Eine fehlende Expression von GSK3 $\beta$  verhält sich in Mäusen bereits während der Embryogenese letal. Neben einer

schweren Zellschädigung der Leber durch Apoptose finden sich Herzanomalien (Hoefflich et al., 2000; Kerkela et al., 2008). Daneben überleben GSK3 $\alpha$ -knock-out-Mäuse und sind zur Fortpflanzung fähig, zeigen jedoch eine erhöhte Insulinsensitivität und Glukosetoleranz, begleitet von einer gesteigerten Glykogeneinlagerung in der Leber (MacAulay et al., 2007). Eine Besonderheit weist GSK3 bei ihrer Substratwahl auf. Bei der Mehrheit der Substrate geht der Phosphorylierung durch GSK3 eine Phosphorylierung des Substrats durch eine andere Kinase voran, dies wird als „priming“ bezeichnet (Fiol et al., 1987). Durch diese prä-Phosphorylierung wird die Effizienz der Substratphosphorylierung durch GSK3 um das 100-1000fache gesteigert (Thomas et al., 1999). Der von GSK3 phosphorylierte Serin- bzw. Threonin-Rest (pS/T<sub>2</sub>) liegt vier (Fiol et al., 1990) bzw. fünf (Cole et al., 2006) Aminosäurereste N-terminal des durch die „priming“ Kinase phosphorylierten Serin- bzw. Threonin-Rests (pS/T<sub>1</sub>): pS/T<sub>2</sub>xxxpS/T<sub>1</sub> (x entspricht jeder beliebigen Aminosäure, ist aber häufig Prolin). Gut etablierte Beispiele für GSK3-Substrate für die ein „priming“ Mechanismus belegt ist, ist die Glykogensynthase mit der Caseinkinase 2 als „priming“ Kinase (Fiol et al., 1987), der Eukaryonten Translations-Initiationsfaktor 2B (eIF2b) nach Phosphorylierung durch DYRK1A (Woods et al., 2001) und Phosphorylierung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau (Sengupta et al., 1997; Noble et al., 2003) als auch CRMP2 (collapsin response mediator protein) (Cole et al., 2006) durch CDK-5, mit nachfolgender Hyperphosphorylierung durch GSK3 als möglicher Bestandteil des Pathomechanismus von neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer.



**Abb. 8:** Schematische Darstellung des „priming“ Vorgangs.

Daneben wurde eine kleinere Anzahl an GSK3-Substraten charakterisiert, bei welchen keine prä-Phosphorylierung stattfindet, sie werden auch als „nonprimed“-Substrate bezeichnet. Beispiele sind c-Myc (Saksela et al., 1992) und Histon H1.5 (Happel et al., 2009). Für das Mikrotubuli-assoziierte Phosphoprotein MAP1B konnten beides, „nonprimed“- und DYRK1A-„primed“-Phosphorylierungsstellen von GSK3 identifiziert werden (Scales et al., 2009). Bis dato wurden für GSK3 über 100 Substrate identifiziert. Zu ihnen gehören Stoffwechsell-enzyme, Signalmoleküle, Strukturproteine und Transkriptionsfaktoren. Ob es sich bei *in vitro* identifizierten Substraten tatsächlich um physiologische Substrate von GSK3 *in vivo* handelt, sollte anhand der Erfüllung bestimmter Kriterien festgelegt werden (Frame und Cohen, 2001). Es wird gefordert, dass *in vivo* gefundene phosphorylierte Reste auch *in vitro* von GSK3 phosphoryliert werden und eine Inhibition von GSK3 sollte zur Verminderung der Substratphosphorylierung in der Zelle führen.

Die große Zahl an Zielproteinen und die Teilnahme der Glykogensynthase-Kinase 3 an mehr als nur einem zellulären Prozess machen das Vorhandensein von Kontrollinstanzen notwendig. Es konnten bereits vier maßgebliche Mechanismen identifiziert werden, welche einen Beitrag zur Regulation der GSK3-Funktion leisten: Positive und negative Regulation durch Phosphorylierung von GSK3, das bereits besprochene „priming“ des Substrats, Wechselwirkung mit Bindungsproteinen und Ausbildung von Proteinkomplexen sowie Unterschiede in der zellulären Lokalisation. In unstimulierten, ruhenden Zellen liegt GSK3 im aktiven Zustand vor. Eine Stimulation der Zellen durch beispielsweise Insulin oder Wachstumsfaktoren führt zu einer signifikanten Verminderung der Kinase-Aktivität (Sutherland et al., 1993).

GSK3 wird sowohl durch Tyrosin- als auch durch Serin/Threonin-Phosphorylierung in unterschiedlicher Weise reguliert (Wang et al., 1994). Die Kinase-Aktivität wird negativ reguliert durch Phosphorylierung an einem Serin-Rest im N-Terminus des Enzyms, dem Serin-21 der humanen GSK3 $\alpha$  bzw. Serin-9 der humanen GSK3 $\beta$  (Sutherland und Cohen, 1994; Sutherland et al., 1993). Insulin führt über den Akt-(Proteinkinase B-)Signalweg zu einer Inaktivierung von GSK3 $\beta$ , was zu einer Aktivierung der Glykogensynthase und somit Aufbau von Glykogen führt. In diesem Signalweg inhibiert Akt GSK3 $\beta$  durch Phosphorylierung an S9 (Cross et al., 1995). Weitere Kinasen, die durch Modifikation an den genannten Serin-Resten zu einer Verminderung der GSK3-Aktivität führen sind u. a. PKA, PKC und p90RSK (90 kDa ribosomale S6 Kinase) (Jope und Johnson, 2004). Eine Aktivierung von GSK3 wird durch Dephosphorylierung des N-terminalen Phosphoserin-Rests durch die Proteinphosphatase 1 (PP1) (Zhang et al., 2003; Morfini et al., 2004, King et al., 2006) und Proteinphosphatase 2A (PP2A) (Sutherland et al., 1993; Welsh und Proud, 1993; Qian et al., 2010) erreicht. Dajani et al. führten 2001 Untersuchungen zur Aufklärung der strukturellen Grundlage der Inhibition durch Serin-9-Phosphorylierung durch. Als Mechanismus wird eine Autoinhibition vorgeschlagen, bei welcher der phosphorylierte N-Terminus kompetitiv die Substratbindungsstelle blockiert. Das Phosphoserin belegt hierbei die Bindungsstelle des üblicherweise nach „priming“ phosphorylierten Serin-/Threonin-Rests (pS/T<sub>1</sub>) des Substrats.

Es wurde gezeigt, dass die MAP-Kinase p38 ebenfalls zur Phosphorylierung und dadurch Inaktivierung von GSK3 $\beta$  fähig ist. Hier liegt die Phosphorylierungsstelle jedoch im C-terminalen Bereich von GSK3 $\beta$  (T390). Diese Art der Modifikation wurde primär im Gehirn und in Thymozyten nachgewiesen und scheint auf den  $\beta$ -Catenin-Signalweg Einfluss zu nehmen. GSK3 $\alpha$  wurde interessanterweise *in vitro* nicht von p38 phosphoryliert (Thornton et al., 2008). Auch gibt es Hinweise, dass Threonin-43 in der N-terminalen Domäne der humanen Kinase von Erk phosphoryliert und GSK3 $\beta$  dadurch inhibiert wird (Ding et al., 2005).

GSK3 ist eine dual-spezifische Kinase. Ihre enzymatische Aktivität wird durch Phosphorylierung an Tyrosin innerhalb der T-Schleife, in der Subdomäne VIII gesteigert. Diese positive Regulation findet für die humane GSK3 $\alpha$  an Tyrosin-279 und die humane GSK3 $\beta$  an

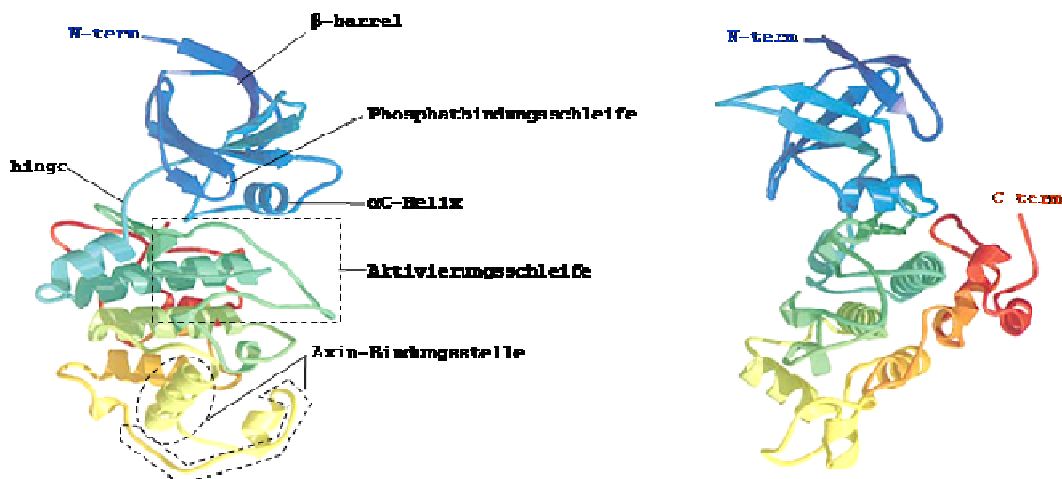
Tyrosin-216 statt (Hughes et al., 1993). Es ist nicht vollständig geklärt, ob diese Phosphorylierung von GSK3 selbst (Autophosphorylierung) oder von einer anderen Tyrosin-Kinase vorgenommen wird (Kaidanovich-Beilin und Woodgett, 2011). Zumindest in Säugetieren gibt es Anhaltspunkte, dass die genannte Tyrosin-Phosphorylierung auf einer intramolekularen Autophosphorylierung (Cole et al., 2004) der neu synthetisierten GSK3 während der Proteinfaltung beruht (Lochhead et al., 2006).

Im Wnt-Signalweg kommt eine andere Art der Regulation zum Tragen, hier ist die Ausbildung eines Multiproteinkomplexes der zentrale Bestandteil. Der Wnt-Signalweg spielt bei einer Vielzahl von Entwicklungsprozessen eine Rolle und Dysregulation kann zur malignen Entartung der Zelle und somit Krebs führen (Polakis, 2000). Die Endstrecke des Signalwegs besteht aus der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch  $\beta$ -Catenin und dadurch Änderung des Proteinexpressionsmusters (Cadigan und Nusse, 1997). Ein kleiner Teil (< 5-10 %) der zellulären GSK3 organisiert sich zusammen mit dem Gerüstprotein Axin, dem Adenomatosis polyposis coli (APC)-Protein, der Caseinkinase-1 (CK1) und  $\beta$ -Catenin in einem Multiproteinkomplex. In diesem Komplex wird  $\beta$ -Catenin nach „priming“ durch CK1 von GSK3 phosphoryliert und dadurch für den Abbau durch Ubiquitin-abhängige Proteolyse markiert. Axin und APC werden ebenfalls von GSK3 phosphoryliert wodurch eine Stabilisierung des Proteinkomplexes erreicht wird. Die Bindung der Wnt-Liganden an den Rezeptor führen zur Rekrutierung von Axin und dadurch zum Zerfall des Multiproteinkomplexes.  $\beta$ -Catenin erfährt durch GSK3 keine Phosphorylierung mehr und akkumuliert, was letztendlich zur Proliferation der Zelle führt (Kaidanovich-Beilin und Woodgett, 2011).

Neben den drei genannten Mechanismen wird die Funktion von GSK3 durch Vorgänge reguliert, die sich auf ihre intrazelluläre Verteilung und somit auf die Zugänglichkeit ihrer Substrate auswirken – zum Beispiel auf den Zugang zu Transkriptionsfaktoren im Zellkern. GSK3 ist überwiegend im Cytosol lokalisiert. Im Zellkern und den Mitochondrien findet sich vergleichsweise viel weniger GSK3, jedoch ist dort der Anteil an aktivierter Kinase verhältnismäßig höher als im Cytosol (Bijur und Jope, 2003). Die Menge an GSK3 im Zellkern ist nicht statisch. Eine erhöhte Menge an nukleärer GSK3 findet sich während der S-Phase des Zellzyklus (Diehl et al., 1998) und eine schnelle Zunahme des nukleären GSK3-Niveaus ist während früher Prozesse der Apoptose zu beobachten (Bijur und Jope, 2001).

Die mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmte dreidimensionale Struktur der humanen GSK3 $\beta$  wurde 2001 veröffentlicht (Bax et al.; Dajani et al.; ter Haar et al.). GSK3 $\beta$  teilt die gemeinsame Grundstruktur eukaryontischer Proteinkinasen. Die kleinere N-terminale Unter-einheit (Aminosäure 25-138) umfasst eine siebensträngige, antiparallele  $\beta$ -Falltblattstruktur. Strang zwei bis sechs bilden räumlich die Form eines Fasses ( $\beta$ -barrel) aus (Abb. 9). Hierin unterscheidet sich die Struktur von GSK3 $\beta$  von der verwandter Serin-/Threonin-Kinasen und

ähnelt mehr derer von Tyrosin-Kinasen wie Src und Abl, welche N-terminal ebenso ein „ $\beta$ -barrel“ aufweisen. Der vierte und fünfte Strang des „Fasses“ wird durch eine, mit zwei Windungen kurz ausfallende,  $\alpha$ -Helix verbunden (Aminosäure 94-104) – dem Äquivalent der  $\alpha$ C-Helix (Dajani et al., 2001; ter Haar et al., 2001). Das Kernstück der  $\alpha$ -helikalen Domäne von GSK3 $\beta$  (Aminosäure 152-342) weist eine ähnliche räumliche Anordnung auf, wie sie bei MAP-Kinasen zu finden ist. Die Aktivierungsschleife umfasst die Aminosäuren 200-226. Der sich an den Aminosäurerest 342 anschließende Bereich der C-terminalen Domäne weist eine einzigartige Konformation auf. Er besteht aus einer Serie von kurzen Helices und Schleifen. Diese bilden eine Einheit aus, welche an die lange  $\alpha$ -Helix (Aminosäure 155-175) der großen Untereinheit angrenzt. Hier besteht einer der Unterschiede zur räumlichen Anordnung von MAPKs, bei denen sich die C-terminale Untereinheit im Verlauf mit ihrem Ende wieder der N-terminalen Untereinheit anschließt (Dajani et al., 2001).



**Abb. 9: Strukturmodell der humanen GSK3 $\beta$ .** Dargestellt ist ein Molekül von Aminosäure 35-384. Die rechte Ansicht ist zur linken um 90° in der Vertikalen gedreht. Quelle: modifiziert nach Dajani et al., 2001.

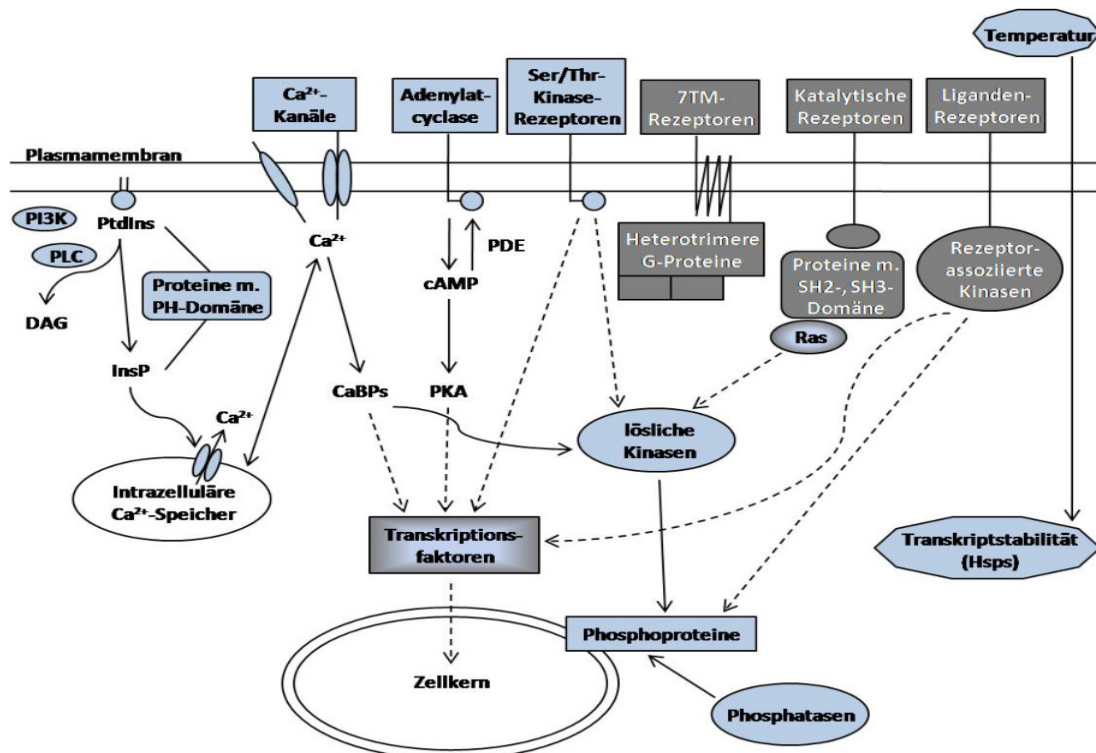
Zur GSK3 verwandte Serin-/Threonin-Kinasen, wie CDK2, ERK2 und p38 $\gamma$ , werden durch die Phosphorylierung von Resten innerhalb ihrer Aktivierungsschleife in den aktiven Zustand überführt (Brown et al., 1999; Canagarajah et al., 1997; Raingeaud et al., 1995): Die Phosphorylierung an einem Threonin-Rest bewerkstelligt die richtige Positionierung beider Kinase-Untereinheiten zueinander. Für p38 $\gamma$  und ERK2 erfolgt zusätzlich eine Phosphorylierung an einem Tyrosin-Rest. hsGSK3 weist in seiner Aktivierungsschleife eine Phosphorylierung an einem Tyrosin- ( $\alpha$ : Y279 und  $\beta$ : Y216), jedoch an keinem Threonin-Rest auf. Die Abbildung der räumlichen Struktur der Aktivierungsschleife von GSK3 $\beta$  auf der verwandter Proteinkinasen zeigt, dass pY216 dieselbe Position belegt, wie das Phosphotyrosin pY185 von p38 $\gamma$  (ter Haar et al., 2001) oder pY185 von ERK2 (Bax et al., 2001). Der Phosphat-Rest von pY216 interagiert mit R220 und R223, dadurch wird die Aktivierungsschleife stabilisiert, der Zugang für das Substrat erleichtert (Buch et al., 2010) und somit die enzymatische Aktivität der Kinase gesteigert. Es wird angenommen, dass die Funktion des in der Akti-

vierungsschleife von GSK3 nicht vorhandenen Phosphothreonin-Rests vom prä-phosphorylierten Rest des „primed“-Substrats übernommen wird. Dieser phosphorylierte Serin- bzw. Threonin-Rest wird in einer positiv geladenen Tasche, bestehend aus R96, R180 und K205 aufgenommen und führt so zur korrekten Orientierung des Substrats im katalytischen Zentrum und der beiden Kinasedomänen zueinander. Substrate für deren Phosphorylierung kein vorangehendes „priming“ notwendig erscheint, weisen häufig negativ geladene Reste an oder in der Nähe der „priming“ Position auf. Diese imitieren möglicherweise den phosphorylierten Rest (Doble und Woodgett, 2003).

### 1.3 Signaltransduktion in Trypanosomatiden

Die äußeren Bedingungen, denen Trypanosomatiden im Insekt und Warmblüter ausgesetzt sind, sind extrem unterschiedlich. Das Wissen über die Signaltransduktionsprozesse, welche die notwendigen Anpassungsreaktionen des Parasiten steuern, ist unvollständig (Parsons, 2005). Veränderungen der Temperatur, des äußeren pH-Werts und des Nährstoffangebots lösen Differenzierungsvorgänge in Leishmanien aus (Kapitel 1.1.4). Über die Mechanismen der Signalaufnahme ist wenig bekannt, bisher wurden nur wenige, zu den Rezeptorproteinen in höheren Eukaryonten ähnliche, Initiatoren der Signaltransduktion identifiziert. Während des intrazellulären Lebensstadiums von Leishmanien ist die *de novo* Synthese von Hitzeschockproteinen (HSPs) erhöht. HSPs kommen in Kinetoplastiden in großer Zahl vor. Es gibt Anhaltspunkte, dass der Reiz der Temperaturerhöhung beim Übergang von Leishmanien in den Säugetierwirt zu einer Erhöhung der Transkriptstabilität und Steigerung der Translation von Hsp70 und Hsp83 führt (Zilka et al., 2001). Für Hsp70 und Hsp83 konnte ein Sequenzbereich in der 3'UTR mit der Wahrnehmung der Temperaturveränderung in Zusammenhang gebracht werden (Quijada et al., 2000; David et al., 2010). Für Hsp83 (Hsp90) konnte durch chemische Inhibition ein Bezug zum Differenzierungsprozess hergestellt werden (Wiesgigl und Clos, 2001). Es gibt in Trypanosomatiden keinen Hinweis auf die Existenz von 7-TM-Rezeptoren und Rezeptoren mit Tyrosin-Kinase-Aktivität. Für *T. brucei* konnten zehn Gene mit Serin-/Threonin-Kinase- und gleichzeitig einer Transmembrandomäne identifiziert werden. Darüber hinaus wies die Hälfte dieser potentiellen Membranproteine Merkmale von STE11-Kinasen auf (Parsons et al., 2005). Zu den wenigen, bekannten Rezeptorproteinen gehören Adenylatcyclasen (AC) (Laxman und Beavo, 2007; Parsons und Ruben, 2000). Diese Adenylatcyclasen besitzen eine lange, potentiell ligandengesteuerte, extrazelluläre Domäne, einen einzelnen membrandurchspannenden Bereich und eine intrazelluläre Domäne mit Zyklase-Aktivität. Die in Leishmanien und Trypanosomen identifizierten multiplen Gene codieren für ACs, welche sich wesentlich in ihrem extrazellulären Anteil unterscheiden. Die Identität der natürlichen, extrazellulären Liganden ist bis heute unbekannt. Einige trypanosomale ACs scheinen auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen oder Calmodulin zu reagieren (Vorheis

und Martin, 1981). Im Vergleich zu ACs von Säugetieren fehlt die intrazelluläre Domäne zur Bindung und Aktivierung durch G-Proteine. Interessanterweise konnten in Trypanosomatiden keine Gene gefunden werden, welche für heterotrimere G-Protein codieren. Das von den ACs produzierte cAMP wird, wie in höheren Eukaryonten auch, von Phosphodiesterasen wieder abgebaut. Der second messenger cAMP scheint für Differenzierungsprozesse von Trypanosomen von Bedeutung zu sein, so wurde beispielsweise in *T. brucei* ein Anstieg der AC-Aktivität bei der Umwandlung der Blutbahn-Form in die prozyklische Form registriert (Rolin et al., 1993). Auch für die Osmoregulation scheint cAMP von Bedeutung zu sein (Gould und de Koning, 2011). cAMP-abhängige Effekte werden in höheren Eukaryonten häufig von der Proteinkinase A vermittelt. Putative katalytische Untereinheiten der PKA konnten in Trypanosomen und Leishmanien identifiziert werden. Für *T. cruzi* konnte der Nachweis erbracht werden, dass cAMP über Bindung an eine regulatorische Untereinheit zu einer Steigerung der Aktivität von PKA führt (Huang et al., 2006). Guanylatcyclasen und das zugehörige cGMP scheinen in Trypanosomatiden keine Rolle zu spielen.



**Abb. 10: Signaltransduktion in Trypanosomatiden und höheren Eukaryonten.** Blaue Hinterlegung und durchgezogene Pfeile: Auch in Trypanosomatiden vorhandene Elemente und Wege. Graue Hinterlegung und gestrichelte Pfeile: In Trypanosomatiden fehlende Komponenten und Wege. Blau/Graue Hinterlegung: In Trypanosomatiden fehlend oder nur in sehr abweichender Form repräsentiert. Modifiziert nach Parsons und Ruben, 2000.

Ein weiteres wichtiges Signalmolekül in Eukaryonten ist Calcium. Der intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Spiegel wird von Transportproteinen kontrolliert. Diese sind in der Plasmamembran, dem Mitochondrium, dem ER und dem sauren, Polyphosphat, Calcium und andere Kationen anreichernden Acidocalcisom lokalisiert. Eine wichtige Rolle für die Ca<sup>2+</sup>-Homöostase scheint Acidocalcisomen zuzukommen. Sie sind auch für die Osmoregulation und Aufrecht-

erhaltung des  $\text{pH}_i$ -Werts von Bedeutung (Docampo und Moreno, 2011). Welche natürlichen, extrazellulären Auslöser zu einer Veränderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Parasiten führen, ist noch nicht bekannt. Es wurde gezeigt, dass eine Abnahme der Aktivität von Phospholipase  $A_2$  und damit der Konzentration der von ihr produzierten Arachidonsäure, zu einer Verminderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in *T. brucei* führt (Eintracht et al., 1998). Beweise für das Vorliegen eines  $\text{InsP}_3$ -abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals, welcher  $\text{Ca}^{2+}$  aus Acidocalcisomen freisetzt, wurden erstmals von Huang et al. (2013) vorgelegt. Eine Hemmung dieses  $\text{InsP}_3$ -Rezeptors war mit einer verminderten Infektiosität und einem geringerem Wachstum von *T. brucei* verbunden. Die Invasion von *T. cruzi* in die Wirtszelle geht mit einer Erhöhung des cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels einher. Eine Behandlung mit intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatoren verhindert den Invasionsprozess (Moreno et al., 1994). Das Speicher- $\text{Ca}^{2+}$  des intrazellulären Stadiums von *T. cruzi* und *L. donovani* (axenische Kultur) ist höher als das des extrazellulären Stadiums (Lu et al., 1998; Prasad et al., 2001). Auch während Entwicklungsprozessen von *T. brucei* und *L. donovani* wurde eine Veränderung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beschrieben (Stojdl und Clarke, 1996; Prasad et al., 2001). Der Effekt von  $\text{Ca}^{2+}$  wird auch in Trypanosomatiden durch eine Vielfalt von  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteinen (CaBPs), zu welchen auch Calmodulin (CaM) gehört, vermittelt. Calmodulin wurde in *T. brucei* als Bestandteil des Paraxialstab-Komplexes (PFR) identifiziert (Ridgley et al., 2000). Es wird vermutet, dass sowohl  $\text{Ca}^{2+}$ - als auch cAMP-abhängige Signalwege an der Regulation der Flagellenfunktion beteiligt sind (Portman et al., 2009). Weitere in höheren Eukaryonten zentrale second messenger wie Inositolphosphate und Diacylglycerin (DAG) existieren auch in Trypanosomatiden (Docampo und Pignataro 1991). DAG stimuliert, möglicherweise durch Bindung an eine Tyrosin-Kinase, die Endozytose von Transferrin in *T. brucei* und *L. major* (Subramanya und Mensa-Wilmot, 2009). Folgende Komponenten des Phosphoinositol-Signalwegs wurden in Trypanosomatiden identifiziert: die Phospholipase C, welche Inositolphosphate ( $\text{InsPs}$ ) durch Spaltung von Phosphatidylinositolphosphaten ( $\text{PtdInsPs}$ ) freisetzt; Phosphatidylinositol 3-Kinasen ( $\text{PI3Ks}$ ), die membrangebundene Phosphatidylinositole ( $\text{PtdIns}$ ) phosphorylieren und Proteine, die durch ihre PH-(Pleckstrin-Homologie-)Domäne mit  $\text{PtdInsPs}$  und  $\text{InsPs}$  interagieren (Nozaki et al., 1999; Bahia et al., 2009; Parsons und Ruben, 2000). Eine ausschließlich in Trypanosomatiden gefundene Besonderheit, stellt das Vorkommen einer C-terminalen PH-Domäne in verschiedenen Mitgliedern der NEK-(NIMA(never in Mitosis gene a)-related kinase)-Kinase-Familie dar. Vertreter der NEK-Familie scheinen für die Differenzierung und die Basalkörperteilung von *T. brucei* von Bedeutung zu sein (Jones et al., 2014; Pradel et al., 2006). In höheren Eukaryonten führt  $\text{PI3K}$  zur Aktivierung von Akt und nachgeschaltet zur Zellproliferation. In *T. cruzi* gibt es Anhaltspunkte, dass  $\text{PI3Ks}$  essentiell für die Zellinvasion sind (Braga und de Souza, 2006). Die kleinen GTPasen Ras und Rho übernehmen Aufgaben in der Signal-



transduktion von höheren Eukaryonten. Diesem Signalsystem scheint in Trypanosomatiden jedoch eine eher untergeordnete Rolle zuzukommen. In Trypanosomatiden wurde im Vergleich nur eine geringe Anzahl von Genen identifiziert, deren Produkte Ähnlichkeiten zu Ras-/Rho-Familienmitgliedern von höheren Eukaryonten aufweisen. In *T. cruzi* existiert eine Rho-ähnliche GTPase, jedoch ohne Ortholog in *T. brucei* oder *L. major*. Ein divergentes Rho-ähnliches Protein liegt in allen Kinetoplastiden vor und zwei divergente Ras-ähnliche Proteine wurden in Trypanosomen identifiziert (Field und O'Reilly, 2008). Eine erstmals in *T. brucei* identifizierte Ras-ähnliche GTPase, TbFRP, mit ausschließlich Homologen in Euglenozoen, umfasst eine Phosphatidyl-inositol-3-phosphat-(FYVE-)Bindedomäne sowie eine GTPase Domäne und ist mit dem Endosom assoziiert (Adung'a und Field, 2013).

Da klassische Transkriptionsfaktoren als Ansprechpartner auf der Endstrecke der Signaltransduktion fehlen und die Transkription in Trypanosomatiden mehr oder minder konstitutiv erfolgt, ist davon auszugehen, dass die Regulation der Genexpression weitgehend auf posttranskriptionaler Ebene von statten geht. In diesem Zusammenhang sind posttranslationale Proteinmodifikationen, wie Phosphorylierung, Methylierung, Acetylierung und Glycosylierung von großer Relevanz. Diese können die Proteinfunktion, -stabilität und den Proteinabbau beeinflussen (Rosenzweig et al., 2008a). Für Differenzierungsprozesse in Trypanosomatiden und das Fortschreiten des Zellzyklus ist die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen entscheidend. Ein dynamisches Netzwerk von Kinasen und Phosphatasen ist hierfür verantwortlich. Bei Untersuchungen des Phosphoproteoms wurden hunderte von potentiellen Phosphorylierungsstellen katalogisiert. So wurden mittels quantitativer 2D-DIGE Analyse 171 Phosphoproteine in *L. donovani* identifiziert. 38 % der Phosphoproteine besitzen eine signifikant unterschiedliche Expression in axenischen Pro- und Amastigoten und 10 % zeigen eine Zunahme im amastigoten Lebensstadium um mehr als das Doppelte. Zu diesen gehören vor allem Isoformen der Chaperone Hsp70 und Hsp90 und auch das Co-Chaperon stressinduziertes Protein STI1/HOP (Morales et al., 2010b). Untersuchungen mittels Massenspektrometrie ergaben: für Phosphoproteine aus axenischen *L. donovani* Amastigoten eine Phosphorylierung zu 86 % an Serin, 12 % an Threonin und 2 % an Tyrosin (Hem et al., 2010); für Phosphoproteine aus der Säugetierform von *T. brucei* eine Phosphorylierung zu 75 % an Serin, 21,5 % Threonin und 3,5 % Tyrosin (Nett et al., 2009b) und für Phosphoproteine aus *T. cruzi* Epimastigoten eine Phosphorylierung zu ca. 69 % an Serin, 26,7 % Threonin und 3,8 % Tyrosin (Nakayasu et al., 2009). Der bevorzugt in Trypanosomatiden phosphorylierte Aminosäurerest ist somit Serin, gefolgt von Threonin. Eine Phosphorylierung an Tyrosin findet viel seltener statt. Diese Verteilung spiegelt die, in Trypanosomatiden im Vergleich zum Säugetierwirt bestehende, relative Expansion von Serin-/Threonin-Kinasen und -Phosphatasen bei gleichzeitigem Fehlen von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und cytoplasmatischen Tyrosin-Kinasen wider. Es wird vermutet, dass die in Trypanosomatiden

gefundene Phosphorylierung an Tyrosin auf die Aktivität von atypischen Tyrosin-Kinasen wie Wee1 und dual-spezifischen Kinasen wie DYRKs und CLKs (Nakayasu et al., 2009) sowie korrespondierende Dephosphorylierung auf die Aktivität der wenigen, existierenden Tyrosin-Phosphatasen bzw. dual-spezifischen Phosphatasen zurückzuführen ist (Brenchley et al., 2007).

Nach Abschluss der Genomprojekte der Pathogene *T. brucei*, *T. cruzi* und *L. major* wurden mit Hilfe von bioinformatischen Analysen Proteine mit Kinasedomäne identifiziert. In *L. major* sind dies 199, davon 179 ePKs und 20 aPKs (Parsons et al., 2005). Proteine mit Phosphatasedomäne sind 88 in *L. major* vorhanden (Brenchley et al., 2007). Für *T. brucei* bzw. *T. cruzi* wurden 156 (170 lt. Nett et al., 2009b) bzw. 171 ePKs und 20 (12) bzw. 19 aPKs erfasst (Parsons et al., 2005). Proteinkinasen machen durchschnittlich zwei Prozent des Genoms von Trypanosomatiden aus. Die Zuordnung zu den unterschiedlichen Kinase-Familien ergab, dass in Trypanosomatiden die CAMK- und AGC-Gruppe schwächer als im humanen Genom repräsentiert ist, während eine relative Expansion der CMGC-, STE- und NEK-Familie existiert. Es wurden keine Gene von Tyrosin-Kinase-ähnlichen Kinasen (TKL), wie man sie gehäuft in Landpflanzen findet, gefunden (Parsons et al., 2005). Ein wesentlicher Teil der parasitären ePKs konnte keiner der bekannten Familien zugeordnet werden und scheint sich, da nicht immer ein Homolog in allen drei der untersuchten Trypanosomatiden vorhanden ist, evolutionär speziesspezifisch entwickelt zu haben (Parsons et al., 2005). Zudem wurden für *L. major* 17 atypische Kinasen anhand ihrer Sequenz der RIO (right open reading frame)-, Alpha-, PDHK(Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase)- und der bereits besprochenen PI3K-Gruppe zugeordnet. Zusätzliche Pfam-Domänen, welche in den meisten der humanen Proteinkinasen zu finden sind, kommen im Kinom von Trypanosomatiden weitaus seltener vor und die häufigen Pfam-Domänen: SH2 (Src homology 2) – zur Interaktion mit Phosphotyrosinresten, SH3 (Src homology 3) – zur Bindung prolinreicher Sequenzen und die extrazellulären Domänen Ig (Immunglobulin-like) und fn3 (Fibronectin type 3) scheinen sogar ganz zu fehlen (Parsons et al., 2005). Die größte Anzahl an Familienmitglieder besitzt die Gruppe der CMGC-Kinasen, zu welchen u. a. die CDKs, MAPKs und GSKs gehören. Im Lebenszyklus von Trypanosomatiden kommen replikative aber auch im Zellzyklus ruhende Formen vor. Kinasen der CDK-Familie sind in höheren Eukaryonten wesentlich an der Kontrolle von Zellzyklusvorgängen beteiligt. Auch in Trypanosomatiden übernehmen sie diese Funktion. Die Aktivität von CDKs wird durch Bindung von Cyclinen (CYC) und durch Phosphorylierung von konservierten Resten reguliert. Bis heute wurden 11 verschiedene CDK-Homologe, genannt CRK (cdc2-related kinase), in *L. major* und *T. brucei* und 10 in *T. cruzi* und jeweils 10 Homologe von Cyclinen identifiziert. In *L. major* existiert ein zusätzliches, einzigartiges Cyclin (Naula et al., 2005). CRK1 und CRK3 sind essentiell für *L. mexicana*. CRK3, das funktionelle Homolog von CDK1 der Säugetiere,

wird in *T. brucei* im Komplex mit CYC6 für den Eintritt in die Mitose benötigt, während es in Zusammenarbeit mit CYC2 für den G1/S-Übergang von Bedeutung zu sein scheint (Hammarton et al., 2003). Durch spezielle MS-basierte Analysen von Phosphoproteinen wurde der Nachweis einer Phosphorylierung an Tyrosin im N-Terminus von CRK1, CRK2 und CRK3, sowohl in der untersuchten Blutbahn- als auch prozyklischen Form von *T. brucei* erbracht (Nett et al., 2009a; Nett et al., 2009b). Diesem Tyrosin-Rest geht jeweils ein Serin- bzw. Threonin-Rest voraus. Diese Reste korrespondieren möglicherweise mit den konservierten Resten Threonin-14 und Tyrosin-15 in der ATP-Bindetasche der humanen CDK1. Die Phosphorylierung an Tyrosin-15 durch die atypische Tyrosin-Kinase Wee1 führt zu einer Inaktivierung des CDK-Komplexes (Krupa et al., 2004). Das Genom von *T. brucei* codiert für ein Wee1-Homolog, in *L. major* und *T. cruzi* finden sich jeweils zwei. Die Wee1-ähnliche Proteinkinase scheint in Prozyklischen als auch in der Blutbahn-Form exprimiert zu werden und RNAi-Experimente geben Anhaltspunkte, dass die Kinase für das Fortschreiten des Zellzyklus und das Wachstum von *T. brucei* essentiell ist (Boynak et al., 2013).

### 1.3.1 Mitogen-aktivierte Protein Kinasen in Trypanosomatiden

Das Genom von *L. mexicana* (Lmx), *L. major* (Lmj), *L. infantum* und *L. braziliensis* codiert für 15 MAP-Kinase Homologe (Wiese, 2007). Diese konnten anhand der Aminosäureabfolge TxYxxxRxYRxPE (in Subdomäne VIII) identifiziert werden. Für 13 dieser MAPKs existieren Homologe in *T. brucei* und *T. cruzi*, lediglich LmxMPK7 und LmxMPK8 besitzen kein Homolog in Trypanosomen. Die Anzahl der in anderen Parasiten identifizierten MAPKs ist weitaus kleiner. In den extrazellulären Parasiten *Giardia lamblia* finden sich zwei und in *Trichomonas vaginalis* eine putative MAPK. In den Apikomplexen *Toxoplasma gondii* sind es drei und *Plasmodium falciparum* zwei potentielle MAPKs (Pfmmap-1 und -2) (Brumlik et al., 2011). Bis dato gibt es keine Anhaltspunkte für das Vorliegen einer klassischen MAPK-Aktivierungskaskade in Apikomplexa. In *P. falciparum* konnte bisher kein Gen anhand seiner Sequenz zweifellos als MAPKK eingestuft werden (Dorin et al., 2001). Anders in Trypanosomatiden, hier gibt es Anhaltspunkte für das Vorhandensein einer MAPK-Aktivierungskaskade. Alle MAPKs weisen das typische TxY-Motiv in ihrer Aktivierungsschleife auf, jedoch kann der Aminosäurerest x zwischen den unterschiedlichen Homologen von Trypanosomatiden variieren. Typischerweise werden MAPKs spezifisch von MAPKKs an T und Y des TxY-Motivs phosphoryliert und dadurch aktiviert. Anhand von Sequenzhomologie konnten im Leishmanien-Genom Gene von sieben zur STE-7-Familie gehörenden potentiellen MAPKKs, 23 potentiellen MAPKKKs der STE-11-Familie und eine potentielle MAPKKKK der STE-20-Familie identifiziert werden (Parsons et al., 2005; Genannotation Wiese et al.). Mit Hilfe einer Gel-freien, Peptid-basierten Analyse des Phosphoproteoms von *T. brucei* konnte eine vollständige Phosphorylierung des TxY-Motivs für das Homolog von LmxMPK2, LmxMPK10,

LmxMPK11 und LmxMPK14 in der prozyklischen Form; für das Homolog von LmxMPK6, LmxMPK9, LmxMPK12 und LmxMPK13 in der prozyklischen und Blutbahn-Form und für das Homolog von LmxMPK5 in der Blutbahn-Form nachgewiesen werden. Eine einfache Phosphorylierung am Tyrosin-Rest von TxY fand sich in *T. brucei* für das Homolog von LmxMPK1 in der prozyklischen und für das Homolog von LmxMPK4 in der prozyklischen und Blutbahn-Form (Nett et al., 2009a; Nett et al., 2009b). Ebenso wurden einige Mitglieder der STE-Familie in der Blutbahn-Form von *T. brucei* phosphoryliert vorgefunden, u. a. das Homolog von MRK1, einem STE-11-Familienmitglied, das in *L. major* Promastigoten essentiell zu sein scheint (Agron et al., 2005). Auch bei RDK1 (repressor of differentiation kinase) handelt es sich um eine STE11-ähnlichen Kinase. Eine Verminderung von RDK1 durch RNAi fördert die Umwandlung der Blutbahn-Form von *T. brucei* zur prozyklischen Form (Jones et al., 2014). In Phosphoproteinextrakten von *L. donovani* axenischen Amastigoten wurde das korrespondierende Peptid des Homologs von LmxMPK1 an TxY doppelt phosphoryliert, das von LmxMPK5 einfach an Threonin phosphoryliert gefunden (Hem et al., 2010). Auch für diverse MAPKs von *L. mexicana* konnte eine Phosphorylierung am TXY-Motiv nachgewiesen werden (Rosenqvist, PhD thesis). Alle Gene potentieller MAPKKs (LmxMKK und LmxMKK2-7) und MAPKs (LmxMPK1-15) von *L. mexicana* wurden kloniert und sequenziert und bis zu einem gewissen Grade in unserer Arbeitsgruppe untersucht und charakterisiert. Dabei war es möglich einzelnen MAPKs eine aktivierende MAPKK zuzuordnen. So konnte LmxMKK zweifelsohne *in vitro* und *in vivo* als Aktivator von LmxMPK3 bestätigt werden (Erdmann und Scholz et al., 2006). Dieser Paarung auf die Spur gekommen ist man anhand der Übereinstimmung des Phänotyps der jeweiligen Nullmutante, so weisen beide signifikant verkürzte Flagellen in Promastigoten auf. Das Protein beider Kinasen zeigt ein ähnliches Expressionsmuster und ist in Promastigoten anzutreffen. Promastigoten denen LmxMPK3 fehlt sind nicht in der Lage eine Infektion in Sandmücken zu etablieren. LmxMPK3 ist *in vitro* zur Autophosphorylierung am Tyrosin des TxY-Motivs fähig. Die maximale Kinase-Aktivität wird *in vivo* durch Phosphorylierung von T und Y erreicht. Ein wichtiges Betätigungsfeld von MAP-Kinasen scheint in Leishmanien die Regulation der Flagellenmorphogenese zu sein. Nullmutanten von LmxMPK9, LmxMPK13 und LmxMPK14 erzeugen Promastigoten mit längeren Flagellen als der Wildtyp (Bengts et al., 2005; Scholz, Dissertation 2008). Im *in vitro* Kinase-Aktivitätstest konnte eine Aktivierung von LmxMPK13 durch LmxMKK4 nachgewiesen werden (Scholz, Dissertation, 2008). Promastigoten der LmxMKK4-Nullmutante besitzen ebenfalls längere Flagellen (Kuhn, Dissertation 2005). Das Protein von LmxMKK4 (vormals LmxPK4) kann in Promastigoten und während der Differenzierung zu Amastigoten nachgewiesen werden. In Promastigoten scheint die Kinase nicht essentiell zu sein. Eine in diesem Stadium erzeugte Nullmutante ist nach Invasion von isolierten Peritonealmakrophagen nicht in der Lage zu proliferieren. In Mausinfektionsexperimenten macht sich

das Fehlen der Kinase in Form einer fehlenden oder verzögerten Läsionsentwicklung bemerkbar. LmxMKK4 erscheint für den Differenzierungsprozess zum intrazellulären Stadium von Bedeutung zu sein (Kuhn und Wiese, 2005). Um eine für das pro- und amastigote Lebensstadium von *L. mexicana* essentielle Kinase handelt es sich bei LmxMPK4 (Wang et al., 2005). Als stromauf-Aktivator von LmxMPK4 wurde LmxMKK5 identifiziert. Nach Co-Expression beider Kinasen in *E. coli* kann ein in seiner Aktivität stark gesteigertes LmxMPK4-Protein aufgereinigt werden, welches durch LmxMKK5 eine Phosphorylierung an beiden Resten des TxY-Motivs erfahren hat (John von Freyend et al., 2010). Eine in ihrer Aktivität beeinträchtigte Mutante von LmxMPK4 besitzt eine verminderte Zellteilung während der Differenzierung zu axenischen Amastigoten und führt zu keiner Läsionsentwicklung, jedoch Persistenz in Mausinfektionsexperimenten. Die spezifische Hemmung von LmxMPK4 in Promastigoten führt zu einem Wachstumsarrest, der scheinbar mit einer Veränderung des Profils verschiedener Stoffwechselprodukte einhergeht und eine Rolle der Kinase in der Stoffwechselkontrolle nahelegt (John von Freyend, Dissertation 2010). Das Homolog von LmxMPK4 in *T. brucei* TbMAPK2 scheint für die Differenzierung der Blutbahn zur prozyklischen Form und die anschließende Proliferation von Bedeutung zu sein (Müller et al., 2002). Die erste in Leishmanien identifizierte MAPK war LmxMPK1. Das Protein von LmxMPK1 ist in beiden Lebensstadien vorhanden. Die Nullmutante hat die Fähigkeit zur Proliferation im amastigoten Stadium verloren und kann sich weder in isolierten Peritonealmakrophagen vermehren noch in Balb/c-Mäusen eine progrediente Erkrankung hervorrufen (Wiese, 1998). Das Homolog von LmxMPK1 in *T. brucei* KFR1 scheint für die Proliferation der Blutbahn-Form von Bedeutung zu sein (Hua und Wang, 1997; Jones et al., 2014). Ebenfalls essentiell für die Etablierung einer Infektion in Balb/c-Mäusen ist LmxMPK2. Promastigoten einer Nullmutante präsentieren sich mit morphologischen Auffälligkeiten (Wiese, unpublizierte Daten). Es konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart von aktiver LmjMPK2 das Aquaglyceroporin LmjAQP1 *in vivo* phosphoryliert wird. Neben seinen physiologischen Aufgaben, dem Transport und der Volumenregulation (Figarella et al., 2007), erleichtert LmjAQP1 die Aufnahme von Antimonit [Sb(III)] aus Antimonpräparaten und ist bei Antimon-Resistenz herunterreguliert. Eine Phosphorylierung von AQP1 fehlt in der LmxMPK2-Nullmutante. Die Nullmutante zeigt eine verminderte Sb(III)-Aufnahme und eine langsamere Erholung von hypoosmotischem Stress als der Wildtyp (Mandal et al., 2012). Die RNAi-vermittelte Stilllegung von TbMAPK6, dem Homolog von LmxMPK2, führt in beiden Formen von *T. brucei* zu unterschiedlichen Defekten in der Cytokinese (Wei und Li, 2014). In der einzigen funktionellen Studie zu einer MAPK in *T. cruzi* wurde gezeigt, dass eine Überexpression von TcMAPK2, dem Homolog von LmxMPK2, zu einem verminderten Wachstum von Epimastigoten führt (Bao et al., 2010). Es bestehen Hinweise, dass auch LmjMPK10 eine Funktion im amastigoten Lebensstadium übernimmt, so zeigt LmjMPK10 eine erhöhte

Phosphorylierungsaktivität, wenn die Kinase aus unter amastigoten Bedingungen kultivierten Leishmanien isoliert wurde. Überdies wird LdMPK10 in der Phosphoproteinfraktion von axenischen Amastigoten vermehrt angetroffen (Morales et al., 2007). Einige MAPKs wie LmxMPK8, LmxMPK6 und LmxMPK15 fallen besonders groß aus. Dies ist Einschüben oder der Kinasedomäne vorangehenden oder sich anschließenden Extensionen anzulasten. Insbesondere carboxyterminale Verlängerungen sind in Leishmanien-MAPKs keine Seltenheit. Die längsten C-terminalen Extensionen besitzen LmxMPK8 und LmxMPK6 (Wiese, 2007). Bei LmxMPK6 handelt es sich um das Homolog von TbECK1. TbECK1 ist eine in allen untersuchten Lebensstadien von *T. brucei* essentielle Kinase. Anhand ihrer Sequenz wurden TbECK1 und LmxMPK6 als MAPKs klassifiziert, sie besitzen jedoch auch Eigenschaften von Cyclin-abhängigen Kinasen. Die C-terminale Verlängerung von TbECK1 scheint an der Regulation der Kinase-Aktivität in prozyklischen Trypanosomen beteiligt zu sein. Die Expression einer C-terminal verkürzten Form führt zu einer Wachstumsverlangsamung und Zunahme von Zellen mit aberranter Zellkern/Kinetoplast-Konfiguration sowie veränderter Morphologie (Ellis et al., 2004). Diese für TbECK1 beschriebene, negativ autoregulatorische Funktion des C-Terminus kann für LmxMPK6 bis dato nicht bestätigt werden. Das Volllängenprotein von LmxMPK6 ist *in vitro* aktiv. Eine *in vitro* aktive, C-terminal verkürzte Form von LmxMPK6 führt nach extrachromosomaler Expression in *L. mexicana* zu keiner Veränderung der Zellmorphologie und des Karyotyps (John von Freyend, Dissertation, 2010). Besonders lang fällt der N-Terminus von LmxMPK7 und LmxMPK5 aus. Ein Gen-Knockout von TbMAPK5, dem Homolog von LmxMPK5, hat eine verfrühte Differenzierung der „slender“- zur nicht mehr teilungsfähigen „stumpy“-Blutbahn-Form von *T. brucei* zur Folge und zeigt in Mausinfektionsexperimenten eine verminderte Parasitenlast (Domenicali Pfister et al., 2006). Nullmutanten von LmxMPK5 führen in Balb/c-Mäusen zu einer klinisch inapparenten Infektion und zur Persistenz (Wanders, Dissertation 2004). Das Sequenzalignment zeigt, dass LmxMPK7, LmxMPK8, LmxMPK12 und LmxMPK15 in ihrer Kinasedomäne Einschübe aufweisen (Wiese, 2007). LmxMPK12 und LmxMPK11 scheinen nicht essentiell zu sein. Eine in axenischen Promastigoten erzeugte homozygote Deletionsmutante der jeweiligen Kinase zeigt sich im Mausexperiment infektiös (Windelberg, Dissertation 2007). Die Nullmutante von TbMAPK4, dem Homolog von LmxMPK12 in *T. brucei*, differenziert und teilt sich, zeigt aber eine erhöhte Sensitivität gegenüber Temperaturerhöhung (Güttinger et al., 2007). Das Aufgabenspektrum der bis dato in Trypanosomatiden untersuchten MAPKs ist mannigfaltig und reicht von universellen Aufgaben bis hin zu stadienspezifischen und den Lebenszyklus des Parasiten bestimmenden Funktionen.

## 1.4 LmxMPK7 – Aufgabenstellung

Im ersten Teil der Arbeit soll die bereits klonierte und sequenzierte Kinase LmxMPK7 charakterisiert werden. Um etwas über die Funktion von LmxMPK7 in Leishmanien zu erfahren, soll der offene Leserahmen des Gens durch homologe Rekombination ersetzt werden. Die resultierende Deletionsmutante soll morphologisch durch Mikroskopie und auf ihr Infektionsverhalten gegenüber Makrophagen und Balb/c Mäusen untersucht werden. Darüber hinaus soll ihre Fähigkeit zur *in vitro* Differenzierung von Promastigoten zu Amastigoten analysiert werden. Ziel ist es, herauszufinden, ob die Kinase für das intrazelluläre Stadium des Parasiten im Säugewirt essentiell ist.

Außerdem soll LmxMPK7 als rekombinantes Protein aus einem bakteriellen Expressionssystem aufgereinigt und auf Wechselwirkung mit diversen Kinasen von *L. mexicana* im *in vitro* Phosphorylierungstest getestet werden. Versuche, LmxMPK7 in ausreichender Menge und als aktives Protein aus *E. coli* aufzureinigen waren in der Vergangenheit nicht erfolgreich. Aufgabe ist es, dies nun zu optimieren.

## 1.5 LmxGSK3 – Aufgabenstellung

Im zweiten Projekt sollen die Gene von LmxGSK3 $\alpha$  und LmxGSK3 $\beta$ , beides Glykogensynthase-Kinasen von *Leishmania mexicana*, aus einer genomischen DNA Bank im Phagen Lambda kloniert und sequenziert werden. Glykogensynthase-Kinasen spielen wichtige Rollen bei zentralen Regulationsvorgängen in der Zelle und nehmen vermutlich Einfluss auf die Differenzierung und die Ausbildung der Geißel. Dies konnte bereits für GSK3 $\beta$  in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* gezeigt werden. Darüber hinaus soll geklärt werden, ob LmxGSK3 $\alpha$  und/oder LmxGSK3 $\beta$  mit bereits beschriebenen Kinasen der Signalübertragungskaskaden der mitogen-aktivierten Proteinkinasen von *Leishmania* wechselwirkt. Zu diesem Zweck soll das jeweilige Gen in bakterielle Expressionsvektoren kloniert und das entsprechende Enzym exprimiert und aufgereinigt werden. Das so gewonnene Protein soll im Kinasetest enzymatisch charakterisiert werden. Wichtige Parameter sind hierbei die Temperatur, der pH-Wert, die Wahl der divalenten Kationen und ihrer Konzentration im Test. GSKs besitzt in Säugetieren eine Vielzahl von Substraten. Die Identifikation ihrer Substrate soll erste Hinweise über die Funktion von GSK3 in Trypanosomatiden liefern. Kinasen, deren Aktivität für das Überleben und die Vermehrung des Parasiten essentiell sind stellen potentielle Angriffspunkte für antiinfektive Medikamente dar. Die Frage, ob es sich bei LmxGSK3 $\beta$  um eine essentielle Kinase in Amastigoten bzw. Promastigoten handelt, soll durch Einsatz von potentiellen Inhibitoren *in vitro* und *in vivo* sowie durch Erzeugung einer Deletionsmutante beantwortet werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

##### Brutschränke und Inkubatoren

Begasungsbrutschrank mit Kühlung BBK 6220	(Heraeus) Kendro Laboratory Products, Hanau
Schüttelinkubator Innova 4230/4400	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA

##### Elektrophorese

Minigel(-Twin)	Biometra, Göttingen
Power Supply: Consort E734	Consort, Turnhout, Belgien
Labtech	Labtech International, Burkhardtsdorf
Power Supply: Gene Power Supply GPS 200/400	Amersham Biosciences, Freiburg

##### Elektroporationsgeräte

Gene Pulser 1652077	BIO RAD Laboratories, München
Pulse Controller	BIO RAD Laboratories, München
Capacitance Extender	BIO RAD Laboratories, München
Nucleofector II	Amaxa Biosystems, Gaithersburg, MD, USA

##### FACS Sorter

FACSAria I Flow Cytometer	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
---------------------------	-----------------------------------

##### Heizblock

Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
------------------	--------------------

##### Immunoblotkammer

Fastblot B33/34	Biometra, Göttingen
-----------------	---------------------

##### Mikroskope

Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Axioskop 2 plus	Carl Zeiss, Jena
mit Digitalkamera C4742-95	Hamamatsu Photonics, Herrsching am Ammersee
Axiostar plus	Carl Zeiss, Jena

##### PCR-Maschinen

Gene Amp PCR System 9700	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Gene Amp PCR System 2400	PE Applied Biosystems, Weiterstadt

##### pH-Meter

Digital-pH-Meter CG 820	Schott Geräte, Hofheim am Taunus
-------------------------	----------------------------------

##### Photometer

BioPhotometer 6131	Eppendorf, Hamburg
Pharmacia LKB Ultrospec III	Pharmacia, Milton Keynes, UK



Schüttelwasserbad

GFL 1083	GFL, Burgwedel
mgw LAUDA M3	Heidolph Electro, Kehlheim

Sicherheitswerkbank

HERAsafe HS15	(Heraeus) Kendro Laboratory Products, Hanau
---------------	---------------------------------------------

Sonifikator

Branson Sonifier 250	Branson, Danbury, CT, USA
----------------------	---------------------------

UV-Crosslinker

UV Stratalinker 1800	Stratagene, La Jolla, CA, USA
----------------------	-------------------------------

Vortex

IKA-VIBRO-FIX VF2	IKA-Labortechnik, Staufen
-------------------	---------------------------

Zentrifugen

Centrifuge 5415C/D/R	Eppendorf, Hamburg
GS-6KR Zentrifuge, GH3.8 Rotor	Beckman Instruments, München
HERMLE Z 400K	Hermle Labortechnik, Wehingen
Optima TL Ultracentrifuge, TLA 55-Rotor	Beckman Coulter, Krefeld
ProFuge 10K	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Sorvall RC-5B Refrigerated, SS-34- bzw. GSA-Rotor	Kendro Laboratory Products, Hanau

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Glaswaren

Plastikwaren	Sarstedt, Nümbrecht Eppendorf, Hamburg Nunc, Langenselbold Greiner Bio-One, Frickenhausen VWR International, Darmstadt VWR International, Darmstadt Amersham Biosciences, Freiburg Brand, Wertheim Sarstedt, Nümbrecht Carl Roth, Karlsruhe Whatman plc, Maidstone, UK
Neubauer-Zählkammern	
HiTrap-Desalting Sephadex G-25 Säule	
Parafilm M	
Spritzenvorsatzfilter Filtropur S 0,2 µm	
Geltrocknungsrahmen	
Whatman Cellulose Blotpapier 3MM CHR 58 cm x 68 cm	
Immobilon-P PVDF Membran	Millipore, Schwalbach am Taunus
Biodyne A Nylonmembran	Pall, Dreieich
CEA medical X-ray, Screenfilm blue, sensitive	CEA, Strängnäs, Schweden

Weitere verwendete Verbrauchsmittel sind an den betreffenden Stellen im Methodenteil angegeben.

### 2.1.3 Chemikalien, Medien und Säulenmaterialien

Acrylamid/Bisacrylamid 30/0,8 % (w/v) (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche Diagnostics, Mannheim
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP	Perkin Elmer, Rodgau
	Hartmann Analytic, Braunschweig
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose (Electrophoresis-Grade)	Amersham Biosciences, Freiburg
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Amylose-Resin	New England Biolabs, Frankfurt
APS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bacto-Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Blockierungsreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
Borsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chelating Sepharose Fast Flow	Amersham Biosciences, Freiburg
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Complete EDTA-free Protease-Inhibitor Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G250	Carl Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R250	Carl Roth, Karlsruhe
CSPD	Roche Diagnostics, Mannheim
DABCO	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAPI	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM (ohne Glutamin)	PAN Biotech, Aidenbach
DMF	Merck, Darmstadt
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogensulfat	Merck, Darmstadt
DTT	Biomol, Hamburg
dNTP-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
EGTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe

---

Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
FCS	Gibco BRL, Eggenstein/ PAN Biotech, Aidenbach/ Sigma-Aldrich, Steinheim
Fish sperm-DNA	Roche Diagnostics, Mannheim
Formaldehyd 37 % (Formalin)	Carl Roth, Karlsruhe
Formamid	Carl Roth, Karlsruhe
Glukose	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	PAN Biotech, Aidenbach
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt
Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutathione-Uniflow Resin	BD Biosciences, Heidelberg
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Hämin (bovines Häminchlorid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hefe-Extrakt	Carl-Roth, Karlsruhe
HEPES	Merck, Darmstadt
Hoechst 33258	Invitrogen Life Technol., Karlsruhe
Hygromycin B	Merck Biosciences, Schwalbach
Imidazol	Merck, Darmstadt
IPTG	Gerbu Biochemicals, Gaiberg
Isoamylalkohol	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin Sulfat	Gerbu Biochemicals, Gaiberg
N-Lauroylsarkosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Maltose	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
MES	Serva, Heidelberg

Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver (Blotting-Grade)	Carl Roth, Karlsruhe
MOPS	Gerbu Biochemicals, Gaiberg
Mowiol 4-88	Merck, Darmstadt
Natriumacetat Trihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
tri-Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumthiosulfat Pentahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Neomycin (G418)	Roche Diagnostics, Mannheim
NZ-Amin (Casein-Hydrolysat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Okadasäure	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penstrep (1000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	PAN Biotech, Aidenbach
ortho-Phenanthrolin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenol, TE-äquilibriert, pH 7,5-8,0	Carl Roth, Karlsruhe
Phleomycin (Bleocin)	Merck Biosciences, Schwalbach
ortho-Phosphorsäure (85 %ig)	Carl Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly-L-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Puromycin Dihydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Saponin	Carl Roth, Karlsruhe
Schneider's <i>Drosophila</i> Medium	Pan Biotech, Aidenbach
SDM-Medium	PAN Biotech, Aidenbach
SDS	Serva, Heidelberg
SYTO 16	Invitrogen, Heidelberg
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, Steinheim
TLCK	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe

Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Merck, Darmstadt
X-Gal	Roche Diagnostics, Mannheim
Xylencyanol	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

### 2.1.4 Molekularbiologische Kits

Human T Cell Nucleofactor Kit	Amaya Biosystems, Gaithersburg, MD, USA
M&N NucleoBond Xtra Midi Kit	Macherey & Nagel, Düren
M&N NucleoSpin Extract II Kit	Macherey & Nagel, Düren
M&N NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey & Nagel, Düren
M&N NucleoSpin RNA II Kit	Macherey & Nagel, Düren
PureLink HiPure Plasmid DNA Midiprep Kit	Invitrogen, Karlsruhe
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Qiagen Lambda Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit	Pierce/Perbio Science, Bonn
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.5 Größenstandards

1 kb DNA Ladder	Carl Roth, Karlsruhe
PCR Marker	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Prestained protein Marker, Broad Range	New England Biolabs, Frankfurt am Main

### 2.1.6 Enzyme und Proteine

AccuPrime <i>Taq</i> DNA Polymerase System	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Expand High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
Klenow Enzym	Roche Diagnostics, Mannheim
MBP (Myelin Basisches Protein; 5 mg/ml) Dephosphoryliert, bovine brain	Millipore (upstate), Schwalbach
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
RNase A (bovine pancreas)	Roche Diagnostics, Mannheim
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Roche Diagnostics, Mannheim
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Promega, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
Thrombin	Amersham Biosciences, Freiburg

### 2.1.7 Antikörper

Antigen/Name	Organismus	Verdünnung für Immunoblot (IB) bzw. Immunfluoreszenz- mikroskopie (IF)	Herkunft
<u>Primärantikörper</u>			
Digoxigenin (Fab-Fragmente Anti- körper, AP-konjugiert)	Schaf	1 : 10000	Roche Diagnostics, Mannheim
anti-LmxGSK3 $\beta$ -Peptid / 5466	Kaninchen	IB: 1 : 400; 1 : 100 (in 5 % MP/PBST)	Wiese, unpublizierte Daten
anti-LmxMPK7-Peptid / 5109	Kaninchen	IB: 1 : 1000; 1 : 500 (in 5 % MP/PBST)	Wiese, unpublizierte Daten
anti-LmxPK4-C-term (LmxMKK4)	Kaninchen	IB: 1 : 500 (in 5 % MP/PBST)	Kuhn und Wiese, 2005
anti-Phospho-Tyrosin / 4G10	Maus	IB: 1 : 1 (in 3 % BSA/TBST)	Bernhard Fleischer, BNI, Hamburg
anti-TY / BB2 (IgG1)	Maus	IB: 1 : 500 (in 5 % MP/PBST) IF: 1 : 10	Keith Gull, Oxford, UK
<u>Sekundärantikörper</u>			
anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert*	Ziege	1 : 5000	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	Schwein	1 : 1000	DAKO, Hamburg
anti-Maus IgG, HRP-konjugiert	Ziege	1 : 5000	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG, Alexa Fluor 488-konjugiert	Ziege	1 : 200	Invitrogen Life Tech., Karlsruhe

\* Falls nicht anders erwähnt, wurde dieser Antikörper zum Nachweis des aus Kaninchenstammenden Primärantikörpers benutzt.

## 2.1.8 Lösungen und Puffer

Agarose-Gelelektrophorese Auftragspuffer (10x)	0,5x TBE 50 % (v/v) Glycerin 0,1 M EDTA pH 8.0 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 0,1 % (w/v) Xylenblau
Äquilibrierungspuffer für Entscheidung mit HiTrap-Säule	40 mM Tris-HCl pH 7,0 0,1% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol 0,1 mM EGTA 0,1% Triton X-100
Bradford-Reagenz	5 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) $H_3PO_4$ (der 85 %igen Lösung) 0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250 Coomassie in Ethanol lösen, dann verdünnte Phosphorsäure zugeben, filtrieren, Lagerung: Dunkel bei 4 °C.
Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung	98 % (v/v) Chloroform 2 % (v/v) Isoamylalkohol
Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (25x)	1 Tablette in 2 ml PBS
Coomassie-Entfärberlösung	30 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250
DAPI Stammlösung	160 $\mu$ g/ml in Methanol
Elektroporationspuffer	21 mM HEPES pH 7,5 137 mM NaCl 5 mM KCl 0,7 mM $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$ 6 mM Glucose pH 7,5, steril filtriert
Fixierlösung für Leishmanien	1x PBS 10 % (v/v) Formaldehyd
Geltrocknungspuffer	20 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Glycerin
GST-Aufreinigung Elutionspuffer	10 mM reduziertes Glutathion 50 mM Tris-HCl pH 8,0
His-Aufreinigung Bindepuffer	50 mM Tris-HCl pH 8.0 1 M NaCl 10% (v/v) Glycerin 20 mM Imidazol

His-Aufreinigung Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 8.0 300 mM NaCl 10% (v/v) Glycerin 500 mM Imidazol 1 mM PMSF
His-Aufreinigung Waschpuffer	50 mM Tris-HCl pH 8.0 1 M NaCl 10% (v/v) Glycerin 10 mM Imidazol
Immunoblot Blockierungslösung 5 % MP/PBST	5 % (w/v) Magermilchpulver 20 mM Tris-HCl pH 7,5 in 1x PBST
Immunoblot Blockierungslösung 3 % BSA/TBST	3 % (w/v) BSA 20 mM Tris-HCl pH 7,5 in 1x TBST
Immunoblot Stripping-Lösung	62,5 mM Tris-HCl pH 6,7 2 % (w/v) SDS 0,78 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol
Immunoblot Transferpuffer	25 mM Tris 150 mM Glycin 10 % (v/v) Methanol
Kinase-Aktivitätstest Standardreaktionspuffer (10x)	1 M NaCl 500 mM MOPS, pH 7,2 bzw. 7,0 20 mM $MnCl_2$ 100 mM $MgCl_2$
Kinase-Aktivitätstest Reaktionspuffer für LmxGSK3 $\beta$ (10x)	1 M NaCl 500 mM MOPS, pH 7,2 50 mM $MgCl_2$
Leishmanienlysepuffer für Immunoblotting	1 $\times$ PBS 0,1 % (w/v) SDS 50 mM DTT 50 $\mu$ M Leupeptin 25 $\mu$ M TLCK 1 mM PMSF 10 mM ortho-Phenanthrolin 1 $\times$ SDS-PAGE Auftragspuffer
Leishmanienlysepuffer für Kinase-Aktivitätstest	50 mM MOPS pH 7,2 100 mM NaCl 1 mM EDTA pH 8,0 1 mM EGTA pH 7,3 30 mM $MgCl_2$ 0,5 % (v/v) Triton X-100 10 mM ortho-Phenanthrolin 1 mM Na-Orthovanadat 5 mM NAF 0,1 $\mu$ M Okadasäure 1x Complete EDTA-free Proteaseinhibitor



MalBP-Aufreinigung Elutionspuffer	10 mM Maltose in 1x MalBP-Aufreinigung Säulenpuffer
MalBP-Aufreinigung Säulenpuffer (2x)	40 mM Tris-HCl pH 7,4 400 mM NaCl 2 mM EDTA
Mowiol/DABCO	2,4 g Mowiol 6 g Glycerin 12 ml 0,2 M Tris-HCl pH 8,5 6 ml ddH <sub>2</sub> O 2.5 % (w/v) DABCO
PBS (10x)	1,37 M NaCl 27 mM KCl 101 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBST	0,2 % (v/v) Tween 20 in 1x PBS
RF1	100 mM RbCl 50 mM MnCl <sub>2</sub> 10 mM CaCl <sub>2</sub> 30 mM Kaliumacetat 15 % (v/v) Glycerin pH 5,8, sterilfiltriert
RF2	10 mM RbCl 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM MOPS 15 % (v/v) Glycerin pH 6,8, sterilfiltriert
RNAse A-Lösung	20 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH 7,5 15 mM NaCl 15 min bei 100 °C kochen Lagerung bei -20 °C
SDS-PAGE Auftragspuffer (5x)	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 20 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS 0,001 % (w/v) Bromphenolblau 200 mM DTT (frisch zugegeben)
SDS-PAGE Elektrophorese-Puffer (10x)	0,25 M Tris-HCl 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS
SDS-PAGE Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
SDS-PAGE Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
Southern Blot Blockierungsreagenz (10x)	100 mM Maleinsäure, pH 7,5 150 mM NaCl 10 % (w/v) Blockierungsreagenz Lagerung bei -20 °C

Southern Blot Denaturierungslösung	0,25 N HCl
Southern Blot DIG-Puffer 1	0,15 M NaCl 0,1 M Maleinsäure, pH 7,5
Southern Blot DIG-Puffer 2	10 % (v/v) Blockierungsreagenz (10x) in DIG-Puffer 1
Southern Blot DIG-Puffer 3	0,1 M Tris-HCl pH 9,5 0,1 M NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
Southern Blot DIG-Waschpuffer	0,3 % (v/v) Tween 20 in DIG- Puffer 1
Southern Blot Hybridisierungslösung	50 % (v/v) Formamid 5x SSC 20 % (v/v) Blockierungsreagenz (10x) 0,1 % (w/v) N-Lauroylsarkosin 0,02 % (w/v) SDS
Southern Blot Neutralisierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Southern Blot Prähybridisierungslösung	Hybridisierungslösung 100 µg/ml Fish sperm-DNA
Southern Blot Stripping-Lösung	0,2 M NaOH 0,1 % (w/v) SDS
Southern Blot Waschpuffer 1	2x SSC 0,1 % (w/v) SDS
Southern Blot Waschpuffer 2	0,1x SSC 0,1 % (w/v) SDS
SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M tri-Natriumcitrat pH 7,0
TBE (5x)	0,45 M Tris-Base 0,45 M Borsäure 10 mM EDTA pH 8,0
TBS (10x)	200 mM Tris-HCl pH 7,5 1,37 M NaCl
TBST	0,2 % (v/v) Tween 20 in 1x TBS
T <sub>10</sub> E <sub>0,1</sub>	10 mM Tris-HCl pH 8,0 0,1 mM EDTA pH 8,0
TELT-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0 62,5 mM EDTA pH 8,0 2,5 M LiCl 4 % (v/v) Triton X-100

TENS	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0 100 mM NaOH 0,5 % (w/v) SDS
------	-----------------------------------------------------------------------------

## 2.1.9 Kulturmedien

### 2.1.9.1 Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien

Alle Nährmedien wurden mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt und durch Autoklavieren (25 min bei 120 °C und 1 bar) sterilisiert. Für die Herstellung von Festmediumplatten wurden dem Medium 15 g/l Agar-Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt. Antibiotika wurden gegebenenfalls nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C zugegeben.

LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 10 g/l NaCl
NZY-Medium	5 g/l Hefe-Extrakt 10 g/l NZ-Amin (Casein-Hydrolysat) 5 g/l NaCl 2 g/l MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O, pH 7,5 5 g/l NaCl
TB-Medium	10 g/l Bacto-Tryptone 0,2 % (w/v) Maltose und 10 mM MgSO <sub>4</sub> frisch vor Gebrauch zugeben

### 2.1.9.2 Nährmedien und Lösungen für die Leishmanienkultur

DMEM komplett	10 % (v/v) iFCS (PAN) 1 % (v/v) Penstrep 1 % (v/v) L-Glutamin DMEM Medium
Einfriermedium für Leishmanien	90 % (v/v) iFCS 10 % (v/v) DMSO
Hämin-Stammlösung	2,5 mg/ml in 50 mM NaOH, steril
iFCS	FCS 45 min bei 56 °C inaktivieren, sterilfiltrieren, Lagerung bei -20 °C
Schneider's <i>Drosophila</i> Medium komplett	20 % (v/v) iFCS (PAN) 1 % (v/v) Penstrep 1 % (v/v) L-Glutamin 3,9 mg/ml MES Schneider's <i>Drosophila</i> Medium pH 5,5, sterilfiltriert

SDM Medium komplett	10% (v/v) iFCS 1% (v/v) Penstrep 7,5 µg/ml Hämin SDM Medium
---------------------	----------------------------------------------------------------------

### 2.1.10 *E. coli* Bakterienstämme

Name	Genotyp	Herkunft
BL21(DE3)	<i>B F dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal λ(DE3)</i>	Stratagene, La Jolla, CA, USA
BL21 (DE3) [pAP/lacI <sup>Q</sup> ]	<i>hsdS gal (λclts857 ind 1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1) pAP/lacIQ</i>	Joachim Clos, Hamburg
OneShot INV110 (dam-Methylase negativ)	<i>F' {traΔ36 proAB lacI<sup>Q</sup> lacZΔM15} rpsL (Str<sup>R</sup>) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) Δ(mcrC-mrr) 102::Tn10 (Tet<sup>R</sup>)</i>	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
OneShot TOP10F'	<i>F' {lacI<sup>Q</sup> Tn10 (Tet<sup>R</sup>)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
XL1-Blue	<i>recA endA gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 rel A1 lac [F' proAB lac<sup>Q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>)]</i>	Stratagene, La Jolla, CA, USA

### 2.1.11 Phagenbank

λ DASH II-gDNA-Phagenbank *L. mexicana* (2. Amplifikat)  
(Wiese, Diplomarbeit 1991; Wiese et al., 1995)

### 2.1.12 Leishmanien

*Leishmania mexicana mexicana* MNYC/BZ/62/M379, Klon 2

### 2.1.13 Versuchstiere

Die Infektionsstudien wurden mit sechs bis zehn Wochen alten, weiblichen BALB/c-Mäusen durchgeführt. Diese wurden am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (Hamburg) gezüchtet oder von Charles River (Sulzfeld) erworben.

### 2.1.14 Plasmide und Plasmidkonstrukte

Die genannten Plasmidkonstrukte lagen zu Beginn dieser Arbeit schon vor.

pBluescript II SK(+)	(pBSK)	Stratagene, La Jolla, CA, USA
pCR2.1-TOPO	(pCR2.1)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pGEX-KG		Guan und Dixon, 1991
pJCduet		Clos J., BNI, Hamburg
pMal-cRI		Borchert N., BNI, Hamburg
pX63polPAC		Bengs et al., 2005
pX14polNcoIPAC		Erdmann, Dissertation 2009
pBSH19mapkin153105		Wiese M.
pB1NNLmxMPK7Nterm-NEO		Kruse M., AG Wiese
pB3NNLmxMPK7NtermPHLEO		Kruse M., AG Wiese
pB7XNLmxMPK7Nterm		Kruse M., AG Wiese
pGEX1-LmxMPK7		Kruse M., AG Wiese
pX7.3MPK7PACds		Kruse M., AG Wiese
pX9TYMPK7PACds		Kruse M., AG Wiese

---

Danke an Herrn PD Dr. Joachim Clos und an Frau Dr. Borchert für die freundliche Überlassung der Plasmide.

---

### 2.1.15 Oligonukleotide

#### Projekt LmxMPK7:

LmxMPK7ctag.for	5' GCGACTAGTGGATCCTGATCAAAGGTAGCGAAAGAACCA CA 3'
LmxMPK7ctag2.rev	5' GCGACTAGTACATGTCTACAGTAGAAGCACGCGGAC 3'
LmxMPK7NcoI.for	5' AGCCCATGGTGCTGCGCCGCCATTG 3'
LmxMPK7NheI.rev	5' AGCGCTAGCTGATCAGGATCTGTCCAGCGG 3'
Mapkin143105_3.rev (LmxMPK5)	5' GAGAAGCCTCGGCGTGTTT 3'
Mapkin153105_4.rev	5' CCTGGTTGGTCAGCATT A 3'
Mapkin153105_5.for	5' GCGTAGTGTGTGCTGCAGT 3'
Mapkin153105_8.for	5' CTTCCGTGTCTCCTCTTCAT 3'
Mpk5_1.for	5' ATGCCATGCAGAGACCATT 3'
Mpk7_1.rev	5' ACACCTCCCCACGCGCCAGCG 3'
MPK7MunI.rev	5' CAATTGCTACACTACAGTAGAAGC 3'
MPK7s.rev	5' GCACCGTCGCGTAGGAGG 3'
MPK7SaclI_for	5' CCGCGGGGCCAGCCAACCCCGCTCT 3'

TY.for\* 5' P-CATGGAGGTGCACACGAACCAGGACCCGCTGGACA 3'  
 TY.rev\* 5' P-GATCTGTCCAGCGGGTCCTGGTTCGTGTGCACCTC 3'  
 pXPHEO2 5' AAACCGCTCGCGGTGTGTT 3'

Projekt LmxGSK3α:

GSK3\_1for 5' TGAAGGTGGTGTGCTGTTCCAG 3'  
 GSK3\_1rev 5' GCCATTTGATCGATCGAGGT 3'  
 GSK3a\_10rev 5' CACGAGGAGGAGAAGGGCAAATG 3'  
 GSK3aExpr\_for 5' GGATCCGGTCTAGAGAATTCTATGGGCGCGTGCGTGTG  
 CGTGT 3'  
 GSK3aExpr\_rev 5' GATATCAAGCTTTCATGGGTATTCGTCTTGCTTC 3'  
 MX2 5' TTTGACTATGAATATATCGCAATC 3'

Projekt LmxGSK3β:

GSK3b\_1for 5' TCCGTAAACGTGTGCCACC 3'  
 GSK3b\_1rev 5' GCACAATTTTCGTGCAGCTG 3'  
 GSK3b\_6rev 5' GACTCAACCAGTACATAT 3'  
 GSK3b\_7for 5' TGTGAGTGGCAGGCAGTT 3'  
 GSK3b\_12rev 5' ACACAGCGACGGCGCACG 3'  
 GSK3bdel\_dsBspLU11l  
 \_AvrII\_Nhelfor 5' GACAACATGTCCTAGGCTAGCAGTGGGGGAGTGGTG 3'  
 GSK3bdel\_dsEcoRVrev 5' GATATCGAGATGCACAAACGAAAAAAG 3'  
 GSK3bdel\_usBspLU11l  
 \_AvrII\_Nhelrev 5' ACTGCTAGCCTAGGACATGTTGTCTCGGGT 3'  
 GSK3bdel\_usEcoRVfor 5' GATATCTATCATCTCTCTTTTCCTTCAC 3'  
 GSK3bExpr\_for 5' GAATTCTGGATCCAACATGTCGCTCAATGCTGCCGAT 3'  
 GSK3bExpr\_rev 5' GATATCAAGCTTTTACTTGCGAACCAGCTTGGC 3'  
 GSK3bISfor 5' TACCTCAACGTTGTGGCGGAGTACGTGCCGGAT 3'  
 GSK3bISrev 5' GTACTCCGCCACAACGTTGAGGTAGATGTGCG 3'  
 GSK3bKMfor 5' AGCGTGGCGATCATGAAGGTTATCCAAGAC 3'  
 GSK3bKMrev 5' TTGGATAACCTTCATGATCGCCACGCTCAT 3'  
 GSK3bYFfor 5' GAGCCAAACGTTGCATTCATCTGCTCTCGTTAC 3'  
 GSK3bYFrev 5' CAGATGAATGCAACGTTTGGCTCGGACGGC 3'  
 LmjF036.0430 2for 5' GTCTGTTCCGCCCTTTTCGTTTC 3'  
 LmjF036.0430 2rev 5' AGTCAGGTATTCACTATA 3'  
 1344 5' TCTAGATGGATCCGGGAATTCTATGTATCGCCAGAGCAT  
 TGCA 3'  
 1345 5' GATATCAAGCTTTCACACCCGGCGCTCCCGCACT 3'  
 PTP\_reannPrimerfor\* 5' P-TCGAGGAAGATCAGGTGGATCCTCGTCTTATTGATGGG  
 AAAGA 3'

PTP_reannPrimerrev*	5' P-CATGTCTTTCCCATCAATAAGACGAGGATCCACCTGAT CTTCC 3'
Scalfor	5' CTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAG 3'
Scalrev	5' ATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTC 3'
TAP_XhoIAvrII BspLU11Ifor	5' GCTCCTAGGACATGTCACTTGAATTGATATCAAG 3'
TAP_XhoIAvrII BspLU11Irev	5' AGCCCTAGGCTCGAGTTCACCTTGAAAATAT 3'

\* Diese Primer sind phosphoryliert und wurden über HPLC aufgereinigt.

## 2.2 Methoden

### ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

#### 2.2.1 Arbeiten mit Leishmanien

##### 2.2.1.1 Kultivierung von *Leishmania mexicana*-Promastigoten

Promastigoten wurden in SDM-Medium (komplett) bei 27 °C ohne CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert (Brun und Schönenberger, 1979). Für die Standardpassage wurden 10 ml SDM-Medium in 50 ml-Zellkulturflaschen verwendet. Wurde eine größere Zellmenge benötigt wurden 50 ml Medium in 250 ml Zellkulturflaschen eingesetzt. Außerdem wurden Platten mit sechs bzw. 96 Vertiefungen benutzt. Bei Vorliegen von Resistenzgenen wurde das jeweilige Antibiotikum dem Medium zugesetzt. Zum Einsatz kamen 20 µg/ml Hygromycin, 10 µg/ml Neomycin (G418), 5 µg/ml Phleomycin (Bleomycin) und 40 µM Puromycin. Es wurde ohne Selektionsantibiotikum kultiviert, wenn es sich um Mutanten handelte, für die die eingebrachte Mutation als stabil betrachtet wurde, so z. B. Nullmutanten oder Mutanten, welche neben der mutierten Ausgabe eines essentiellen Gens das Wildtyp-Gen nicht mehr besaßen. Die Kulturen wurden passagiert, indem Zellen einer stationären bzw. spät-logarithmischen Kultur (5-8 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml) mit sterilen Einwegpipetten im Verhältnis 1 : 500 bis 1 : 1000 in frisches Medium überführt wurden.

##### 2.2.1.2 *In vitro*-Differenzierung zu Amastigoten und Amastigotenkultivierung

Zur Herstellung von axenischen Amastigoten wurden Promastigoten einer logarithmisch wachsenden Kultur (~3-4 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml) für 5 min bei 2050 x g (3000 rpm) und 4 °C (GS-6KR Zentrifuge) sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Zellsediment in einer Dichte von 3-4 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml in Schneider's *Drosophila* Medium (ggf. mit Antibiotikum) resuspendiert. Die Kultivierung erfolgte bei 34 °C unter 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (Bates et al., 1992). Traten Zellklumpen auf, wurden diese durch zweimaliges, behutsames Passagieren der Kultur durch eine 23 G-Injektionsnadel einer Spritze vereinzelt.

### 2.2.1.3 In vitro-Differenzierung zu Promastigoten

Läsionsamastigoten wurden mit SDM-Medium gewaschen und in einer Dichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in frisches SDM-Medium (komplett) aufgenommen. Die Differenzierung zu Promastigoten erfolgte bei 27 °C ohne CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

### 2.2.1.4 Leishmanien-Stabilate

Zur Herstellung von Stabilaten für die Lanzeitlagerung wurden 10 ml einer in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Leishmanienkultur für 10 min bei 4 °C und 2050 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellsediment in 1,5 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf drei gekühlte Kryoröhrchen verteilt. Die Röhrchen wurden über Nacht in der Gasphase eines Tanks mit Flüssigstickstoff eingefroren und nach 24 Stunden zur Lagerung in den flüssigen Stickstoff überführt.

Die Leishmanien wurden durch schnelles Auftauen bei 37 °C in einem Wasserbad revitalisiert und danach sofort in 10 ml SDM-Medium (komplett; ggf. mit Antibiotikum) überführt. Das Röhrchen wurde vor dem Öffnen zur Verhinderung von Kontamination mit Ethanol abgewaschen.

### 2.2.1.5 Transfektion von Leishmanien über Elektroporation

Bei der Transfektion durch Elektroporation wird die Zellmembran durch einen kurzen elektrischen Impuls permeabilisiert, dadurch kann die DNA von der Lösung in die Zelle gelangen. Siehe hierzu auch: Beverley und Clayton (1993). Es wurden  $4 \times 10^7$  Promastigoten einer Kultur in der spät-logarithmischen Wachstumsphase ( $4-6 \times 10^7$  Zellen/ml) 20 s bei 5600 x g (ProFuge 10K) sedimentiert, mit 500 µl kaltem Elektroporationspuffer gewaschen, in 400 µl des gleichen Puffers aufgenommen und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (4 mm; BIO-RAD Laboratoires, München) überführt. Anschließend wurden 1-5 µg linearisierte DNA bzw. 5 µg Plasmid-DNA in einem maximalen Volumen von 15 µl zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach dreimaligem elektrischen Impuls von 1,5 kV, 200 Ω, 25 µF und Zeitkonstante zwischen 0,9 und 1,1 ms im BIO-RAD-Gene Pulser wurde die Küvette 10 min auf Eis gekühlt. Dann wurde die Zellsuspension in 10 ml SDM-Medium (komplett), welches ggf. das Selektionsantibiotikum der Ausgangskultur enthielt, überführt. Nach 24 Stunden Kultivierung bei 27 °C wurde mit SDM-Medium auf 40 ml aufgefüllt und das Selektionsantibiotikum zugegeben, für dessen Resistenzgen das transfizierte DNA-Konstrukt neben dem einzubringenden Gen codierte. Die gesamte Zellverdünnung wurde auf zwei 96-well Platten (200 µl/Vertiefung) verteilt. Die Platten wurden mit Parafilm luftdicht verschlossen und bei 27 °C kultiviert, bis sich in einzelnen Vertiefungen Zellwachstum durch sichtbare Trübung bemerk-



bar machte (i. d. R. nach 1-2 Wochen). Die potentiell positiven Klone wurden in ein größeres Kulturvolumen überimpft und auf die Anwesenheit des eingebrachten Gens mittels Southern Blot bzw. PCR analysiert.

Alternativ wurde die Transfektion mit dem Amaxa Human T Cell Nucleofector Kit ausgeführt. Dazu wurden  $3 \times 10^7$  Promastigoten geerntet, in 100  $\mu$ l T-Zell-Lösung (enthielt Zusätze nach Herstellerangaben) resuspendiert und nach Zugabe der DNA (gleiche Menge wie oben) in eine im Kit enthaltene, gekühlte Küvette überführt. Die Elektroporation erfolgte im Amaxa Nucleofector II-Gerät mit dem Programm V-033. Im Anschluss wurde die Küvette 10 min auf Eis gekühlt. Das weitere Vorgehen entsprach dem oben genannten, mit dem Unterschied, dass die Zellen nach 24 Stunden Kultivierung und Zugabe des Selektionsantibiotikums in einer Verdünnung von 1 : 4 und 1 : 40 auf zwei 96-well-Platten ausgebracht wurden.

#### 2.2.1.6 Wachstumsversuche in Gegenwart von Inhibitoren

Alle Wachstumsversuche in dieser Arbeit wurden in einem Kulturvolumen von 10 ml ausgeführt. Es wurde mit Promastigotenkulturen in der logarithmischen Wachstumsphase ( $< 4 \times 10^7$  Zellen/ml) angeimpft und die Inhibitor- bzw. Kontrollsubstanz sofort bei Inokulation zugesetzt. Promastigoten einer Wildtyp-Kultur wurden für die Wachstumsreihen mit LiCl in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingesät und für die Differenzierung zu Amastigoten in Gegenwart von LiCl mit  $4 \times 10^6$  Zellen/ml. Von den Salzen LiCl, NaCl und KCl wurden einmolare Stammlösungen in SDM- bzw. Schneider's Drosophila Medium (jeweils komplett) hergestellt und sterilfiltriert.

Die Promastigotenkulturen der inhibitorsensitiven Muntante wurden mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml gestartet. Die Kontrollkulturen wurden dem gleichen Volumen an DMSO ausgesetzt wie die Kulturen mit Inhibitor 1-NA.

#### 2.2.1.7 Zellzählung und Bestimmung der Anzahl an Zellen mit Zellteilungsphänotyp

Die Zellsuspension wurde in einem geeigneten Verhältnis mit Fixierlösung verdünnt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (improved; Tiefe: 0,1 mm; Fläche des kleinsten Quadrats:  $0,0025 \text{ mm}^2$ ) bestimmt. Beide Seiten der Neubauer-Zählkammer wurden mit je 10  $\mu$ l Verdünnung beschickt. Die Zellen des zentralen Großquadrats auf jeder Seite wurden regelrecht unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und der Mittelwert aus der Zellzahl beider Großquadrate gebildet. Die Zelldichte in Zellen/ml wurde berechnet durch multiplizieren der Zellzahl mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor  $10^4$ .

Für die Ermittlung des Prozentsatzes an Zellen mit Phänotyp, der für einen Cytokinesedefekt spricht, wurden pro Kultur mindestens 250 Zellen ausgezählt. Die Zellen eines Quadrats der

Neubauer-Zählkammer wurden vollständig ausgezählt und für dasselbe Quadrat der Anteil an Zellen mit zwei oder mehr Flagellen bestimmt.

#### 2.2.1.8 Gewinnung und Infektion von Peritonealmakrophagen

Die Peritonealmakrophagen für die Primärkultur wurden aus BALB/c-Mäusen gewonnen. Die Maus wurde durch Genickbruch getötet und die Haut über der Bauchdecke abpräpariert. Die freigelegte Bauchdecke wurde mit 70%igem Ethanol abgewaschen, mit einer Pinzette angehoben und über die Kanüle einer Spritze kaltes DMEM-Medium (komplett) in den Bauchraum injiziert. Der mit Medium gefüllte Bauch wurde 2-3 Minuten vorsichtig massiert und erneut mit Ethanol desinfiziert. Dann wurde die Bauchdecke mit der Kanüle durchstochen und das Medium möglichst vollständig zurückgewonnen. Auf diese Weise wurden Peritonealmakrophagen aus mehreren Mäusen präpariert und ihre Zellsuspension in einem Röhrchen vereinigt. Pro Kammer eines 8-Kammer-Objektträgers (Nunc, Wiesbaden) wurden jeweils  $2 \times 10^5$  Makrophagen in 300  $\mu$ l Medium pipettiert. Zur Adhäsion der Makrophagen wurden diese bei 34°C und 5 % CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion durch Zugabe von Promastigoten einer Kultur in der spät-logarithmischen Wachstumsphase im Verhältnis: 2 Leishmanien : 1 Makrophage. Nach Bestimmen der Zellzahl wurden die Leishmanien hierfür bei 5600 x g für 20 s zentrifugiert und einmal mit kaltem DMEM gewaschen. Nach Inkubation über Nacht bei 27 °C und 5 % CO<sub>2</sub> und vierstündiger Inkubation bei 34 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden nicht internalisierte Leishmanien durch zweimaliges Waschen mit vorgewärmtem (34°C) DMEM entfernt und die infizierten Makrophagen am Kammerboden erneut mit 300  $\mu$ l Medium überschichtet. Im Anschluss wurde bei 34 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Gesamtkulturdauer betrug 7 Tage. An Tag 1, 3, 5 und 7 wurde je ein Objektträger mit unterschiedlichen Proben dem Inkubator entnommen, das Medium abgenommen, die Zellen mit 300  $\mu$ l Fixierlösung (2 % Paraformaldehyd in 1x PBS) überschichtet und für 15 min inkubiert. Danach wurden die Kammern zweimal mit je 1x PBS gewaschen. Zur Färbung der DNA-haltigen Organellen wurde 300  $\mu$ l DAPI-Färbelösung (1 : 500-Verdünnung der DAPI-Stammlösung in 1x PBS) in jede Kammer gegeben und für 20 min inkubiert. Es wurde zweimal mit 1x PBS gewaschen, die Kammeraufsätze abgenommen und der Objektträger an der Luft im Dunkeln kurz getrocknet. Nach Aufbringen von Mowiol/DABCO-Einbettlösung wurde ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt und der Objektträger über Nacht bei 4 °C im Dunkeln getrocknet. Die Beurteilung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop.

#### 2.2.1.9 Infektion von BALB/c-Mäusen mit Promastigoten

Für die Infektionsversuche wurden 6-10 Wochen alten, weiblichen BALB/c-Mäusen mit  $1 \times 10^7$  Leishmanien, die sich in der spät-logarithmischen Wachstumsphase befanden, infiziert. Hierfür wurde das entsprechende Volumen an Leishmanienkultur für 30 s bei

5600 x g zentrifugiert, die Zellen einmal mit kaltem 1x PBS gewaschen und anschließend, eine Zelldichte von  $3,2 \times 10^8$  Zellen/ml ergebend, in 1x PBS aufgenommen. Die Maus wurde kurz mit Ether narkotisiert und 30 µl der Leishmaniensuspension von interdigital in die Fußsohle des linken Hinterlaufs injiziert. Die dorso-ventrale Fußdicke beider Hinterläufe wurde regelmäßig mit einer Schieblehre (Oditest, Kroeplin, Schlüchtern) gemessen und so die Läsionsentwicklung überwacht.

#### 2.2.1.10 Transmissionselektronenmikroskopie von infizierten Gewebsmakrophagen

Aus den Mausfußläsionen präparierte Gewebstücke wurden nach Waschen mit 1x PBS in frisch angesetzter 2 %iger Glutaraldehydlösung in 1x PBS fixiert und bei 4 °C gelagert. Von Frau Christel Schmetz (BNI, Hamburg) wurden die Proben weiter aufgearbeitet, Schnitte hergestellt und Aufnahmen am Philips CM 10 Transmissionselektronenmikroskop (TEM) gemacht.

#### 2.2.1.11 Präparation von Amastigoten aus Mausfußläsionen

Die Maus wurde getötet, die Leishmanienläsion am infizierten Fuß mit 70 %igem Ethanol desinfiziert und abgetragen. Die Gewebstücke wurden in 1x PBS (eiskalt) gegeben und durch ein steriles Metallnetz zerrieben. Das Zellgemisch wurde in einer Petrischale gesammelt, das Metallnetz mit 1x PBS (4 °C) nachgespült und das gesamte, gewonnene Material in ein steriles Röhrchen überführt. Die Suspension wurde fünfmal behutsam durch die 23 G-Injektionsnadel einer Spritze passagiert und die Amastigoten freigesetzt. Durch zehninütige Zentrifugation bei 150 x g und 4 °C wurden größere Gewebstrümmer entfernt. Die Amastigoten im Überstand wurden in ein Röhrchen überführt und durch erneute Zentrifugation bei 1500 x g für 10 min bei 4 °C sedimentiert. Der Zelleniederschlag wurde anschließend in kaltem 1x PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

#### 2.2.1.12 Punktion von Mausfußläsionen zur Gewinnung von Amastigoten

Die infizierte Maus wurde kurz betäubt und die Fußläsion mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Die Läsion wurde mit einer 23 G x 1 ¼"-Kanüle punktiert und mit einer flüssigkeitsgefüllten (SDM-Medium bzw. SYTO 16-Puffer) Spritze vorsichtig 2-3 Mal aspiriert. Die Läsionsamastigoten wurden im Anschluss entweder kultiviert oder einer Zellsortierung mit nachfolgender PCR zugeführt. Zur Aufnahme in Kultur befanden sich 500 µl SDM-Medium (komplett) in der Spritze. Das Kulturmedium enthielt wegen des relativ hohen Risikos einer Kontamination mit Hautkeimen neben der üblichen Antibiotikakombination Penicillin/Streptomycin zusätzlich die antibakteriellen Substanzen Chloramphenicol (34 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml). Das entnommene Punktat wurde fünfmal behutsam durch die Kanüle passagiert und auf zwei

Vertiefungen einer 6-well-Platte mit SDM-Medium aufgeteilt. Die eine Hälfte des Punkts wurde mit Selektionsantibiotikum, die andere Hälfte ohne bei 27 °C ohne CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert und das Zellwachstum dokumentiert.

Für die Zellsortierung (2.2.1.13) wurde das Aspirat in 500 µl kaltem SYTO 16-Puffer (21 mM HEPES pH 7,5, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM Glucose) aufgenommen und fünfmal durch eine 30 G x ½"-Injektionsnadel passagiert um Einzelzellen zu erhalten. Die Probe wurde bis zur Färbung auf Eis gelagert.

#### 2.2.1.13 SYTO 16-Färbung und Sortierung von Läsionsamastigoten mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Zu den Läsionsamastigoten in SYTO 16-Puffer (2.2.1.12) wurden weitere 850 µl SYTO 16-Puffer, 150 µl DMSO, 0,5 µl des Nukleinsäure-bindenden Farbstoffs SYTO 16 gegeben und nach Mischen 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt. Auf einen anschließenden Waschvorgang wurde wegen der Gefahr des Zellverlusts verzichtet. Es wurden mit dem Durchflusszytometer 10 Zellen pro Vertiefung in eine 96-well-PCR-Platte (Sarstedt, Nümbrecht) sortiert. Die Voreinstellungen am Durchflusszytometer wurden zuvor anhand von SYTO 16-gefärbten axenischen Amastigoten ermittelt. Die Festlegung der hierarchischen Auswahlfenster für die Sortierung der Läsionsamastigoten ist im Anhang unter 7.3 wiedergegeben. Danach schloss sich eine Einzelzell-PCR an (2.2.6.7.4).

#### 2.2.1.14 Immunfluoreszenzmikroskopie

Das in der Zelle nachzuweisende Protein wurde durch einen spezifischen Primärantikörper gebunden und dieser Antikörper wiederum durch einen spezifischen Fluorochrom-tragenden Sekundärantikörper detektiert. Ein gereinigter 10-well-Objektträger wurde für 15 min bei RT mit 30 µl Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml in 1x PBS) pro well beschichtet und anschließend mit je 50 µl 1x PBS gewaschen. Zum Austausch der Lösung wurde diese mit einer Pipette von jeder Vertiefung des leicht schräg gehaltenen Objektträgers abgezogen und dann neue Lösung zupipettiert. Es wurden  $5 \times 10^6$  Zellen zentrifugiert, einmal mit 1x PBS gewaschen und in 50 µl 1x PBS resuspendiert. Pro Vertiefung wurden 20 µl dieser Zellsuspension zusammen mit 20 µl 4 %-igem Paraformaldehyd aufgebracht und die Zellen für 15 min bei RT fixiert und an die Objektträgeroberfläche adhärirt. Nach zweimaligem Waschen mit je 50 µl 1x PBS wurde die Zellmembran mit 50 µl Permeabilisierungslösung (0,1 % (w/v) Saponin, 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in 1x PBS) über 15 min durchlässig gemacht. Danach wurde die Lösung jeweils durch 50 µl Blockierungslösung (2 % BSA, 0,1 % Saponin in 1x PBS) ersetzt und für 15 min bei RT inkubiert. Nun wurden 25 µl des in Blockierungslösung verdünnten Erstantikörpers zupipettiert und der Objektträger zum Schutz vor Austrocknung in einer feu-

chten Kammer für 45 min bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit je 50 µl Waschlösung (0,1 % Saponin in 1x PBS) wurde der Zweitantikörper verdünnt in Blockierungslösung zusammen mit DAPI in einer Verdünnung von 1 : 100 aufgebracht und der Objektträger für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nun wurde dreimal mit je 50 µl Waschlösung und zweimal mit 1x PBS gewaschen. Nach fünfminütigem Trocknen (dunkel) wurden die Zellen in Mowiol/DABCO eingebettet und ein Deckglas aufgelegt. Die Betrachtung der DAPI-Färbung ( $A_{\text{max}} = 359 \text{ nm}$ ,  $E_{\text{max}} = 461 \text{ nm}$ ) erfolgte unter UV-Anregung mit DAPI-Filter, für die Alexa Fluor 488-Färbung ( $A_{\text{max}} = 493 \text{ nm}$ ,  $E_{\text{max}} = 519 \text{ nm}$ ) wurde der FITC-Filter gewählt.

#### 2.2.1.15 Flagellenlängenmessung

Für die Flagellenmessung wurden  $\sim 0,5 \times 10^7$  Zellen geerntet, einmal mit 1x PBS gewaschen und in 150 µl 1x PBS aufgenommen. Zur Fixierung wurden 60 µl dieser Zellsuspension mit 60 µl 4 %-igem Paraformaldehyd versetzt. Die Proben wurden bis zur Mikroskopie bei 4 °C gelagert. Die fixierten Promastigoten wurden auf einen Poly-L-Lysin beschichteten 10-well-Objektträger aufgebracht. Jede Vertiefung wurde zweimal mit 50 µl 1x PBS gewaschen und die Zellen mit Mowiol/DABCO eingebettet. Die Aufnahmen der Zellen wurden unter Einsatz des 100er Objektivs (Apochrom, mit Öl) am Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss) mit Digitalkamera (Hamamatsu Photonics) angefertigt. Die Flagellenlänge wurde von der Zelloberfläche bis zur Flagellenspitze gemessen, indem das Flagellum mit dem Freihandwerkzeug exakt nachgefahren wurde. Hierzu wurde die Openlab Software v 5.0.1 (Improvision) benutzt.

### 2.2.2 Kultur von Bakterienstämmen

#### 2.2.2.1 Kultivierung auf Festmediumplatten

Es wurden 50-200 µl einer Bakteriensuspension oder Bakterien aus Glycerinkultur auf einer LB-Agar-Platte, welche das entsprechende Antibiotikum (2.2.2.2) enthielt, ausgestrichen. Die Platten wurden umgedreht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert bis Kolonien zu sehen waren.

#### 2.2.2.2 Zellanzucht in Flüssigkultur

Für die Vorkultur wurden 3-4 ml LB-Medium mit einer einzelnen Kolonie von Festmediumplatte mit einer Pipettenspitze steril angeimpft. Das entsprechende Selektionsantibiotikum wurde in einer Endkonzentration von: Ampicilin 100 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml und Tetracyclin 20 µg/ml zugesetzt. Die Anzucht erfolgte bei 37 °C über Nacht im Schüttelinkubator (120-250 rpm).

### 2.2.2.3 Anlegen von Dauerkulturen

Von Bakterienkulturen wurden Glycerinkulturen angelegt, in denen Bakterien über Jahre lebensfähig bleiben. Hierzu wurden 500 µl einer dicht bewachsenen Bakteriensuspension in ein Kryoröhrchen überführt, mit dem gleichen Volumen an Glycerin gemischt (Vortex), auf Eis eine Stunde inkubiert und anschließend bei -70 °C eingefroren.

## MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

### ARBEITEN MIT DNA

#### 2.2.3 Klonierung von Plasmiden

##### 2.2.3.1 Herstellung von kompetenten Zellen nach Hanahan, 1983

###### Herstellung von kompetenten XL1-Blue Zellen mit der Rubidiumchlorid-Methode

Hierfür wurde eine Einzelkolonie von einer LB-/Tetracyclin-Platte in 3 ml Flüssigmedium mit 40 µg/ml Tetracyclin überimpft. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht im Schüttelinkubator wurden 500 µl der Vorkultur in 100 ml LB-Medium mit 40 µg/ml Tetracyclin überführt. Diese Kultur wuchs unter Schütteln heran bis eine optische Dichte bei 550 nm ( $OD_{550}$ ) von ~0,2 erreicht war. Die Kultur wurde auf zwei 50 ml Röhrchen verteilt, 15 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend bei 3500 x g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Die Zellsedimente wurden vorsichtig in je 16 ml RF1 resuspendiert, wiedervereinigt und weitere 90 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation, wie oben beschrieben, wurde das Zellpellet in 8 ml RF2 resuspendiert und 15 Minuten auf Eis stehen gelassen. Die kompetenten Zellen wurden in Aliquots à 200 µl aufgeteilt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -70 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

###### Herstellung von kompetenten BL21 (DE3) [pAP/acI<sup>Q</sup>] mit der Calciumchlorid-Methode

200 ml LB-Medium mit 10 µg/ml Kanamycin wurden mit 1 ml einer Vorkultur angeimpft. Die Kultur wuchs unter Schütteln bis zu einer Trübung, die einer optischen Dichte von ~0,3  $OD_{600}$  entsprach, heran. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation (3500 x g, 4 °C, 15 min) geerntet und in 20 ml vorgekühlter 50 mM  $CaCl_2$ -Lösung auf Eis resuspendiert. Die Zellen wurden erneut sedimentiert und das Zellpellet vorsichtig in 2 ml 50 mM  $CaCl_2$ , 50 % (v/v) Glycerin und 7 % (v/v) DMSO resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden in safe-lock 1,5 ml-Reaktionsgefäßen à 200 µl aliquotiert, in Flüssigstickstoff gefroren und schließlich bei -70 °C gelagert.

### 2.2.3.2 Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock

Ein Aliquot kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut, die zu transformierende Plasmid-DNA (5-10 µl Ligationsansatz, 1 µl präparierte Plasmid-DNA) zugegeben, gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen für 30 s (BL21 (DE3) [pAP/*acI*<sup>Q</sup>]), 60 s (BL21 (D3)) bzw. 90 s (XL1-Blue) bei 42 °C im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt und sofort für 2 min (BL21 (DE3) [pAP/*acI*<sup>Q</sup>]) bzw. 5 min auf Eis gekühlt. Im Anschluss wurden 500 µl LB-Medium hinzugegeben und für 60 min (BL21 (DE3) [pAP/*acI*<sup>Q</sup>]) bzw. 800 µl LB-Medium hinzugegeben und die Zellen für 40 min (XL1-Blue, BL21 (D3)) bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Je nach erwarteter Transformationseffizienz wurden 50-200 µl bis zu die ganze Bakteriensuspension, reduziert auf ein Volumen von 200 µl, ausplattiert. Die LB-Platten enthielten das zur Plasmidselektion notwendige Antibiotikum. Falls das transformierte Plasmid eine Blau-Weiss-Selektion zuließ, wurden zusätzlich 40 µl X-Gal (40 mg/ml in DMF) und 40 µl IPTG (100 mM in ddH<sub>2</sub>O) auf der Festmediumplatte ausgebracht.

## 2.2.4 Gewinnung von DNA

### 2.2.4.1 Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Die Isolierung der Plasmid-DNA gliedert sich in Anzucht und Aufschluss der Bakterien und Aufreinigung der Plasmid-DNA.

#### 2.2.4.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA (Zhou et al., 1990)

Von einer 3 ml Übernachtskultur wurden 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und für 30 s bei 15800 x g (14000 rpm; Centrifuge 5415C/D/R) und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ~100 µl dekantiert und das Bakterienpellet auf dem Vortex-Gerät resuspendiert. Es wurden 300 µl TENS-Puffer zugegeben, 4 s durch vortexen auf mittlerer Stufe gemischt und das entstandene Lysat auf Eis gekühlt. Zum Neutralisieren der Lösung und dadurch Präzipitieren von Membranbestandteilen, SDS, Proteinen und genomischer DNA wurden 150 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 zugesetzt und 3 s auf mittlerer Stufe gevortext. Nach Zentrifugation für 10 min bei 15800 x g und 4 °C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 900 µl 100 % Ethanol (eiskalt) wurde die Plasmid-DNA gefällt. Nach 15 min zentrifugieren (15800 x g, 4 °C) wurde der Überstand verworfen, die DNA mit 1 ml 70 % Ethanol (eiskalt) gewaschen und erneut 10 min unter denselben Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 40 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Plasmid-DNA wurde nach dieser Methode für die analytische Restriktionsspaltung isoliert.

#### 2.2.4.1.2 Minipräparation von Plasmid-DNA mit dem M&N NucleoSpin Plasmid Kit

Die Plasmid-DNA wurde aus 1,5 ml Übernachtskultur nach Herstellerangaben präpariert. Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde u. a. für Sequenzierung und PCR eingesetzt.

#### 2.2.4.1.3 Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab mit dem Midi Kit von Macherey & Nagel bzw. Invitrogen

Mit dieser Methode kann Plasmid-DNA in präparativen Mengen von 100 bis 300 µg aus *E. coli* Zellen isoliert werden. Es wurden 100 ml Übernachtskultur durch Zentrifugieren für 15 min bei 4000 x g und 4 °C (3000 rpm; HERMLE Z 400K) geerntet. Der Überstand wurde dekantiert und die Aufreinigung erfolgte bis zur Elution nach Herstellerangaben. Das Eluat wurde auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße à 833 µl verteilt und die DNA mit 583 µl Isopropanol (0,7faches Eluatvolumen) präzipitiert. Es wurde kurz durch vortexen gemischt und die Proben für 30 min bei 15800 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das DNA-Pellet mit je 1 ml 70% Ethanol (eiskalt) gewaschen und erneut für 10 min bei 15800 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Abgießen der Flüssigkeit wurden die DNA-Pellets an der Luft getrocknet, in insgesamt 120 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und über Nacht bei 4 °C gelöst.

#### 2.2.4.2 Isolierung von genomischer DNA aus Leishmanien

Es wurden 1,5-3 ml einer dicht bewachsenen Promastigotenkultur für 30 s bei 15800 x g und RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Flüssigstickstoff gefroren, auf Eis aufgetaut, mit 400 µl TELT-Puffer resuspendiert und 5 min bei RT lysiert. Dann wurden 400 µl TE-äquilibriertes Phenol (kalt) zugegeben und 5 min bei 4 °C über Kopf rotiert. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 15800 x g und 4 °C wurde die wässrige, obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) zugesetzt. Nach 5 min Über-Kopf-Rotieren wurde erneut, wie zuvor beschrieben, zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1 ml 100 % Ethanol (eiskalt) gefällt und mit 70 % Ethanol (eiskalt) gewaschen. Das Pellet wurde nach dem Trocknen in 200 µl T<sub>10</sub>E<sub>0,1</sub>-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 4 °C gelöst.

#### 2.2.4.3 Isolierung von Phagen-DNA mit dem Qiagen Lambda Kit

Mit einer Übernachtskultur des *E. coli*-Stammes P2 392 wurden 200 ml TB-Medium, dem 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO<sub>4</sub> zugesetzt wurden, angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,6 bewachsen (entspricht ca. 9 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml). 1 x 10<sup>9</sup> Zellen wurden in ein Röhrchen überführt und bei 1050 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Zellniederschlag wurde in 200 µl 10 mM MgSO<sub>4</sub> (kalt) resuspendiert und die Bakterien im Verhältnis Bakterien/Phagen: 200 : 1 mit Phagenlösung infiziert und gründlich gemischt. Die



Bakterien-Phagenmischung wurde 30 min bei 37 °C zur Adsorption der Phagen inkubiert und dann in einen Glaskolben mit 50 ml vorgewärmtem NZY-Medium überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) bis die zunächst zunehmende OD<sub>600</sub> stark abfiel. Dies zeigte, dass die Lyse der Bakterienwirtszellen durch die Bakteriophagen fortgeschritten war. Weiter wurde nach den Vorgaben im Qiagen Lambda Handbuch verfahren und die Phagen-DNA mittels Anionenaustauschchromatographie augereinigt (Qiagen tip-100). Der Lysepuffer L1 enthielt DNase I und RNase A um bakterielle DNA und RNA zu entfernen. Die isolierte λ-Phagen-DNA wurde in 120 µl T<sub>10</sub>E<sub>0,1</sub> aufgenommen.

## 2.2.5 Reinigen und Fällern von DNA

### 2.2.5.1 Phenol-Chloroform Extraktion

Die Methode wurde eingesetzt, um Verunreinigungen, wie Proteine, aus einer DNA-haltigen Lösung (z. B. Restriktionsenzymverdau) zu entfernen. 100 µl DNA-Lösung wurden mit dem gleichen Volumen TE-äquilibriertem Phenol versetzt und durch vortexen für 30 s gemischt. Die Phasentrennung der Mischung erfolgte durch Zentrifugation für 5 min bei 15800 x g und RT. Die wässrige obere Phase wurde unter Vermeidung der Interphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl Isoamylalkohol/Chloroform (24 : 1) 30 s gevortext. Nach 5 min Zentrifugieren bei 15800 x g und RT wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit Alkohol gefällt (2.2.5.2).

### 2.2.5.2 Ethanol-Fällung

Der DNA-Lösung wurde das 0,1fache Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5fachen Volumen 100 % Ethanol (eiskalt) zugesetzt, gemischt und die DNA 1 h bei -20 °C (oder 30 min bei -70 °C) gefällt. Danach wurde die DNA für 15 min bei 15800 x g und 4 °C pelletiert. Dann wurde mit 500 µl 70 % Ethanol (eiskalt) gewaschen, 10 min bei 15800 x g und 4 °C zentrifugiert und der Alkohol vollständig abgegossen. Das DNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

## 2.2.6 Analyse und Modifikation von DNA

### 2.2.6.1 DNA-Konzentrationsbestimmung durch Absorptionsspektrometrie

Die photometrische Analyse erfolgte mit dem UV-Spektralphotometer. Die DNA-Probe wurde 1 : 100 verdünnt in eine Kunststoffküvette gegeben und gegen einen Referenzwert (Lösungsmittel der Probe) bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen. Die DNA-Konzentration wurde berechnet unter der Annahme, dass eine OD<sub>260</sub> von 1,0 einer dsDNA-

Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Aus dem Verhältnis von  $OD_{260\text{ nm}}$  und  $OD_{280\text{ nm}}$  erhält man außerdem eine Aussage über Protein-Kontaminationen der DNA-Lösung. Eine protein-freie Nukleinsäurelösung weist ein Verhältnis von 1,8-2,0 auf (Maniatis et al., 1982).

### 2.2.6.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Proben wurde bis Juli 2007 von Agowa (Berlin) und danach von Bioscience Geneservice (Cambridge, UK) durchgeführt. Es wurden 1 µg DNA in 10 µl ddH<sub>2</sub>O und von der Oligonukleotid-Lösung 4 µl (Agowa) bzw. 10 µl mit 3,2 pmol/µl (Geneservice) verschickt.

### 2.2.6.3 Reaktionen mit DNA-modifizierenden Enzymen

#### 2.2.6.3.1 Spezifische Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen bakteriellen Ursprungs, die beide DNA-Stränge innerhalb spezifischer, palindromischer Sequenzen von zumeist vier, sechs oder acht Basen Länge spalten. Es entstehen in Abhängigkeit vom jeweiligen Enzym glatte, bündige Enden (blunt-ends) oder bedingt durch die versetzten Schnittstellen komplementäre, einzelsträngige Enden.

##### 2.2.6.3.1.1 Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA, Phagen-DNA bzw. PCR-Fragmenten

Es wurden 0,2-1,0 µg Plasmid-DNA aus einer analytischen Präparation bzw. Phagen-DNA in einem Ansatzvolumen von 15 µl mit 5-10 Units Restriktionsenzym (Typ II) für 1,5-2 h beim Temperaturoptimum des Enzyms, i. d. R. 37 °C, gespalten. Wurde die Plasmid-DNA nach Zhou et al. (1990) präpariert, waren im Ansatz 2 µg RNase A enthalten. Für präparative Ansätze wurden 10-20 µg Plasmid-DNA, Phagen-DNA bzw. PCR-Fragment (nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung) und 30-60 U Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 100 µl für 2 h - 2 h 45 min verdaut. Alle Ansätze enthielten 1/10 Volumen des vom Hersteller (NEB) empfohlenen 10x Puffers und falls empfohlen BSA (NEB). Schlossen sich der Restriktionsspaltung weitere Reaktionen mit DNA-modifizierenden Enzymen an, z. B. eine Behandlung mit Klenow-Fragment, wurden die Restriktionsenzyme 20 min bei 65 °C hitzeinaktiviert.

##### 2.2.6.3.1.2 Restriktionsspaltung von genomischer DNA:

Es wurden 3 µg gDNA aus Leishmanien zusammen mit 60-80 U Restriktionsendonuklease, 40 µg RNase A, 4 µg BSA, 1/10 Volumen des empfohlenen 10x Puffers in einem Gesamtvolumen von 400 µl bei 37 °C im Heizblock über Nacht schüttelnd inkubiert. Um un-

spezifische Spaltung zu vermeiden, wurde darauf geachtet, dass Enzyme ohne „Star-Aktivität“ für die Inkubation über Nacht gewählt wurden. Im Anschluss an den Verdau wurde die DNA mit Ethanol gefällt (2.2.5.2) und in 15 µl ddH<sub>2</sub>O mehrere Stunden bei 4 °C gelöst.

#### 2.2.6.3.2 Auffüllreaktion mit Klenow-Fragment

Mit dem Klenow-Enzym können überhängende, einzelsträngige Enden von gespaltener DNA mit Nukleotiden aufgefüllt und in glatte Enden überführt werden. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung der DNA wurde diese in 26 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen (davon wurden 0,5 µl über ein Agarose-Gel aufgetrennt). Zu 25,5 µl dieser DNA-Lösung wurden 1,5 U Klenow-Fragment, 0,75 µl 20 mM dNTPs und 3 µl 10x Klenow-Puffer gegeben und 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 µl 500 mM EDTA pH 8,0 oder 20 min Hitzeinaktivierung bei 75 °C gestoppt.

#### 2.2.6.3.3 Dephosphorylierung am 5'Ende von DNA-Fragmenten

Vektorfragmente mit kompatiblen Enden wurden mit Shrimp Alkaliner Phosphatase (SAP) behandelt, um zu verhindern, dass der Vektor mit sich selbst ligiert. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung der DNA wurde diese in 26 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen (davon wurden 0,5 µl über ein Agarose-Gel aufgetrennt). Zu 25,5 µl dieser DNA-Lösung wurden 1,5 U SAP und 3 µl 10x SAP-Puffer gegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 65 °C für 15 min hitzeinaktiviert.

#### 2.2.6.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Es wurden 50-200 ng linearisierte Vektor-DNA und das Dreifache an einzubringendem Fragment in einem Gesamtansatz von 10 µl zusammen mit 0,7 U T4 DNA-Ligase und 1 µl 10x Ligasepuffer eingesetzt. Zuvor wurden von Vektor und Fragment je 1 µl auf ein Agarose-Gel geladen, um die Menge von beiden für die Ligation abschätzen zu können. Die Ligation erfolgte bei 13 °C im Wasserbad über Nacht.

#### 2.2.6.4 Konventionelle Agarose-Gelelektrophorese

Alle Agarose-Gele wurden mit 0,5x TBE-Puffer angefertigt und enthielten 0,3 µg/ml Ethidiumbromid. Für die Auftrennung von Plasmid-DNA enthielt das Gel 0,8-0,9 % (w/v) Agarose. Die Proben wurden mit 1/10 Volumenanteil 10x Auftragspuffer versehen und in die Taschen geladen. In eine Tasche wurde ein DNA-Marker als Längenstandard pipettiert. Der Gellauf erfolgte bei 1,4-10 V/cm in 0,5x TBE-Puffer. Die Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids wurde auf dem UV-Schirm photographisch dokumentiert.

### 2.2.6.5 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen mit dem Kit von Qiagen und Macherey & Nagel

Ein präparativer Ansatz eines Restriktionsenzymverdaus wurde über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Bande von Interesse wurde unter einem UV-Licht mit niedriger Intensität ( $\lambda=365$  nm) identifiziert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde aus dem Gelstück nach Herstellerangaben präpariert und mit 20-50  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### 2.2.6.6 Annealing von phosphorylierten Oligonukleotiden zum Einbringen von DNA-Sequenzen

Je 5  $\mu$ l der Lösung der phosphorylierten Oligonukleotide (100 pmol/ $\mu$ l) und 40  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O wurden in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt. Das Annealing der weitgehend komplementären Primer erfolgte in der PCR-Maschine durch die Temperaturabfolge: 10 min bei 95° C (Strangtrennung), 10 min bei 65° C, 30 min bei 37° C und 30 min bei Raumtemperatur (graduelle Doppelstrangbildung). Der einzelsträngige 3'- bzw. 5'-Überhang des aneinander gelagerten Oligonukleotidpaares war zu den Überhängen des mit Restriktionsenzymen gespaltenen Vektors komplementär. 2  $\mu$ l der annealten Primer wurden mit 50-100 ng linearisiertem Plasmid wie unter 2.2.6.3.4 beschrieben ligiert.

### 2.2.6.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR-Reaktion wurden *Taq*-DNA-Polymerase von Promega (5 U/ $\mu$ l) oder das Expand High Fidelity PCR System von Roche benutzt. Letzteres enthält eine Mischung der thermostabilen *Taq*- und *Tgo*-DNA-Polymerase (3,5 U/ $\mu$ l). Die *Tgo*-Polymerase senkt durch ihre 3'-5'-Exonuklease-Aktivität die Fehlerrate der *Taq*-Polymerase beim Nukleotideinbau. Die PCR wurde in 200  $\mu$ l Reaktionsgefäßen im Thermocycler durchgeführt.

#### Reaktionsansatz:

Plasmid- oder genomische DNA (Template)	10-200 ng
Oligonukleotid A (10 $\mu$ M)	30 pmol
Oligonukleotid B (10 $\mu$ M)	30 pmol
dNTPs (20 mM)	1 $\mu$ l
DNA-Polymerase	0,75 $\mu$ l
Polymerase-Puffer mit 15 mM MgCl <sub>2</sub> (10x)	5 $\mu$ l
HPLC-H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l

#### Programm:

Denaturierung	94 °C	5 min	} 25-35 Zyklen
Denaturierung	94 °C	30 s	
Annealing	41-62 °C	30 s	
Elongation der DNA	72 °C (68 °C)	30 s – 3 min	
Finale Elongation der DNA	72 °C (68 °C)	7 min	
Reaktionsende und Kühlung	4 °C	$\infty$	

Die Annealing-Temperatur orientierte sich an der Schmelztemperatur der benutzten Primer. Die Elongationszeit hing von der Länge des Amplifikats ab (0,75 kb → 45 s; 1,5 kb → 1 min; 3 kb → 2 min). Es wurde mit einer Elongations-Temperatur von 72 °C gearbeitet, außer für den *Taq-/Tgo*-Polymerase-Mix bei längeren PCR-Produkten (> 3 kb), hier betrug sie 68 °C. Zur Analyse wurden 2-3 µl des PCR-Ansatzes über ein Agarose-Gel aufgetrennt.

#### 2.2.6.7.1 Klonierung eines PCR-Produkts mit dem TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen

Mit *Taq*-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte besitzen ein einzelnes Desoxyadenosin an ihrem 3'-Ende. Damit können sie in den linearisierten pCR2.1-TOPO-Vektor, der als 3'-Überhang ein einzelnes Desoxythymidin und eine kovalent gebundene Topoisomerase I besitzt, eingebracht werden. Dazu wurden 1-4 µl frisches PCR-Produkt mit 1 µl Salzlösung, 1 µl Vektor und H<sub>2</sub>O in einem Gesamtvolumen von 6 µl für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 3 µl des Ansatzes nach Herstellerangaben in *E. coli* TOP10F' Zellen transformiert.

#### 2.2.6.7.2 PCR auf kruden Leishmanienlysaten

Ein primäres Screening auf das Vorhandensein eines Gens wurde mittels PCR durchgeführt, wenn die aus Leishmanien-Transfektionen hervorgegangene Anzahl an Einzelallelmutanten den Umfang einer Southern Blot-Analyse überstieg. Die genetische Situation von finalen Doppelallelmutanten wurde aber immer mittels Southern Blot analysiert.

Zur Herstellung der Lysate wurden 20 µl Promastigoten einer logarithmisch wachsenden Kultur zusammen mit 80 µl HPLC-H<sub>2</sub>O in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und für zehn Minuten bei 95° C im Thermocycler aufgeköcht. Je 1 µl dieses Leishmanienlysats wurde in einen 50 µl PCR-Ansatz zusammen mit 1 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, je 100 pmol der beiden Primer, 2 µl 20 mM dNTPs, 0,7 µl Expand High Fidelity Polymerase-Mix, 5 µl Polymerase Puffer und HPLC-H<sub>2</sub>O eingesetzt.

#### 2.2.6.7.3 Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem M&N NucleoSpin Extrakt II Kit

Waren sich zwei resultierende Produkte eines PCR-Ansatzes in ihrer Größe sehr ähnlich, wurden sie über eine Säule nach Herstellerangaben aufgereinigt, mit 10 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert und zur Unterscheidung mit einem geeigneten Restriktionsenzym gespalten.

#### 2.2.6.7.4 Einzelzell-PCR

Wie unter 2.2.1.13 beschrieben, wurden pro well 10 SYTO 16-gefärbte Läsionsamastigoten mit dem Durchflusszytometer in eine 96-well-PCR-Platte sortiert. Für die nachfolgende PCR wurde das AccuPrime Taq DNA Polymerase System von Invitrogen benutzt. In jede Ver-

tiefung wurden 25 µl Mastermix pipettiert. Pro Ansatz bestand dieser aus je 100 pmol der beiden Primer, 0,5 µl Polymerase, 2,5 µl Polymerase-Puffer und HPLC-H<sub>2</sub>O. 24 µl des Mastermix zusammen mit 1 µl HPLC-H<sub>2</sub>O bzw. 1 µl gDNA von *L. mexicana* dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle. Nach Zugabe des Mastermix wurden die Platte mit Klebefolie (Sarstedt) verschlossen. Nach Abschluss der PCR wurde jeder Ansatz mit Auftragspuffer versehen und die Hälfte auf ein 1,5%iges Agarose-Gel geladen.

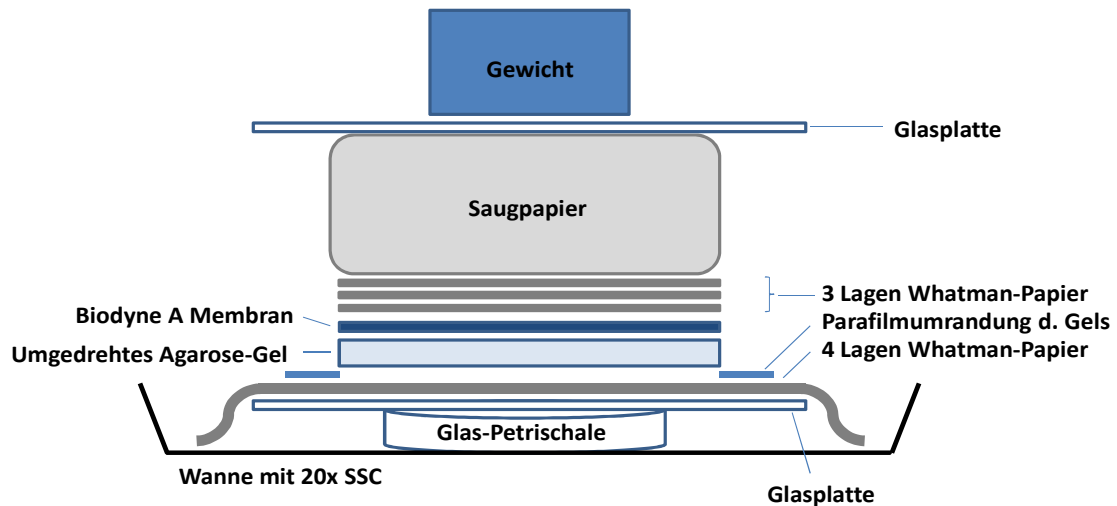
#### 2.2.6.7.5 Digoxigenin-Markierung zur Herstellung einer DNA-Gen-Sonde

Dazu wurde der PCR DIG Probe Synthesis Kit von Roche benutzt. Zuerst wurde durch Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA und nachfolgender Gelextraktion oder durch PCR auf gDNA ein < 600 bp großes Fragment generiert, das den Abschnitt des Zielgens trug an den die Sonde binden sollte. Von diesem Fragment wurde eine geringe Menge als Vorlage in die PCR zur Herstellung der DIG-markierten DNA durch Einbau von Digoxigenin-markierten dUTPs eingesetzt. Die Durchführung der DIG-PCR erfolgte nach Herstellerangaben. Die DIG-markierte Sonde wurde 10 min bei 95 °C denaturiert und in Hybridisierungslösung überführt. Die Sonde in Hybridisierungslösung wurde mehrfach benutzt (Lagerung: -20 °C). Sie wurde vor jedem Gebrauch 10 min im Wasserbad bei 95 °C erhitzt und dann abgekühlt.

#### 2.2.6.8 Southern Blot

##### 2.2.6.8.1 DNA-Autrennung und -Transfer auf die Membran

Die nach Restriktionsspaltung entstandenen Fragmente der gDNA (2.2.6.3.1.2) wurden nach ihrem Molekulargewicht in einem 0,7%iges Agarose-Gel mit 4,5 V/cm über 3-4 h elektrophoretisch getrennt. Die aufgetrennte DNA und Markerbanden wurden durch Fotografieren des Gels mit seitlich angelegtem Lineal unter UV-Licht dokumentiert. Das Agarose-Gel wurde 20 min in Denaturierungslösung und anschließend 30 min in Neutralisierungslösung auf einem Kippschüttler geschwenkt. Der nachfolgende Aufbau des Southern Blots ist in Abb. 11 schematisch dargestellt. Es wurde mit Hochsalzpuffer bei 4 °C über Nacht geblottet. Durch Kapillarwirkung wird 20x SSC-Puffer durch alle Schichten bis in das Papier gesaugt, dabei gelangt die DNA aus dem Gel auf die Biodyne A-Membran. Am nächsten Tag wurde der Blot abgebaut. Die Position der Geltaschen wurden auf der Blotmembran angezeichnet und die DNA durch UV-Quervernetzung auf dieser fixiert (Autocrosslinking-Funktion im UV-Stratalinker).



**Abb. 11:** Schematische Darstellung des Aufbaus eines Southern Blots

#### 2.2.6.8.2 Hybridisierung mit der spezifischen DIG-markierten DNA-Sonde

Zunächst wurde die Membran zusammen mit 50 ml Prähybridisierungslösung eingeschweißt, für 3-4 h bei 42 °C im Wasserbad geschwenkt und dadurch unspezifische Bindungsstellen mit der enthaltenen Fish sperm-DNA abgesättigt. Danach wurde der Blot mit der DIG-markierten DNA-Sonde (2.2.6.7.5) in Hybridisierungslösung eingeschweißt und über Nacht bei 42 °C im Wasserbad bewegt. Im Anschluss wurde die Membran in einer Plastikschiel mit jeweils 200 ml Waschpuffer 1 (2 x 7 min bei RT) und Waschpuffer 2 (2 x 10 min bei 68 °C) gewaschen.

#### 2.2.6.8.3 Nachweis der Digoxigenin-Markierung

Der Nachweis erfolgte mit dem AP-gekoppelten anti-Digoxigenin Antikörper. Es wurden für drei Waschvorgänge insgesamt 500 ml DIG-Puffer 1 vorbereitet. Zuerst wurde die Membran bei RT für 5 min in DIG-Puffer 1 gewaschen. Dann wurde sie zusammen mit 50 ml DIG-Puffer 2 eingeschweißt und für 2 h bei 37 °C unter Schütteln unspezifische Bindungsstellen blockiert. Danach wurde der Blot in 40 ml DIG-Puffer 2 zusammen mit dem Antikörper eingeschweißt und für 45 min bei 37 °C geschwenkt. Der Blot wurde 2 x 15 min in DIG-Puffer 1 gewaschen und 5 min in DIG-Puffer 3 äquilibriert. Jede Seite des Blots wurde für 2 min 30 s in 5 ml DIG-Puffer 3 mit 1 : 100 CSPD gelegt. Am Schluss wurde der feuchte Blot in eine Plastikfolie gepackt und in einer vorgewärmten Filmkassette der Röntgenfilm für 30 min-3 h bei 37 °C aufgelegt. Das Substrat CSPD wird von der Alkalischen Phosphatase (AP) unter Lichtemission dephosphoryliert und erzeugt so ein Signal auf dem Film.

#### 2.2.6.8.4 Entfernen der gebundenen Sonde – Stripping des Blots

Die Membran wurde unter ständigem Schwenken zuerst 10 min bei RT in ddH<sub>2</sub>O, dann 2 x 15 min in Southern Blot Stripping-Lösung bei 37 °C und 5 min in 2x SSC bei 37 °C

gewaschen. Danach konnte die Membran erneut einer Prä- und Hybridisierung mit einer anderen Sonde unterzogen werden.

## 2.2.7 Durchsuchen einer $\lambda$ DASH II-Phagenbank

### 2.2.7.1 Vorbereitung der Wirtsbakterien

Als Wirt diente der *E. coli* Stamm P2 392. Die Bakterien wurden auf NZY-Agarplatten angezogen. 3 ml TB-Medium, dem 0,2 % Maltose und 10 mM  $\text{MgSO}_4$  zugesetzt wurden, wurde mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. Mit der Übernachtskultur wurden 50 ml desselben Mediums beimpft und bei 37 °C unter Schütteln kultiviert, bis eine  $\text{OD}_{600} \approx 1$  erreicht war (nach ca. 3 h). Nach 15 min Zentrifugieren bei 1050 x g und 4 °C wurde das Bakterienpellet in 20 ml 10 mM  $\text{MgSO}_4$ -Lösung (eiskalt) resuspendiert und mit derselben Lösung auf  $\text{OD}_{600} = 0,5$  verdünnt. Die Bakteriensuspension wurde in Aliquots à 200  $\mu\text{l}$  auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt und auf Eis gelagert.

### 2.2.7.2 Phagenplattierung

Die benötigte Anzahl an NZY-Agarplatten wurde bei 37 °C getrocknet und 10 min vor Gebrauch im Trockenschrank auf 68 °C erwärmt. Die NZY-Top-Agarose (0,7 % (w/v) Agarose in NZY-Medium) wurde zum Lösen erhitzt und in sterilen Glasröhrchen à 3 ml in einem 52 °C warmen Wasserbad bereitgestellt. Die Phagenlösung wurde mit SM-Puffer so verdünnt, dass eine für die jeweilige Plattierung geeignete Phagenmenge in einem Volumen von 10  $\mu\text{l}$  pro Platte eingesetzt werden konnte. Die Phagenverdünnung wurde zu einem Aliquot P2 329 gegeben, gemischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien-Phagen-Mischung wurde in die Top-Agarose überführt und nach gründlichem Mischen sowie Abflammen des Glasröhrchens luftblasenfrei auf eine NZY-Platte gegossen. Nach Erstarren der Top-Agarose wurden die Platten über Kopf bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis Phagenplaques zu sehen waren. Phagenplaques entsprechen lysierten Bakterienkolonien im Bakterienrasen.

### 2.2.7.3 Identifikation der gentragenden Phagenklone

Die Platten mit den Phagenplaques wurden mindestens 30 min bei 4 °C gekühlt, um die Festigkeit der Top-Agarose zu erhöhen. Es wurde ein nummerierter Nylon-Rundfilter (Nytran Super Charge, Schleicher & Schuell, Dassel) auf die Platte aufgelegt und seine Orientierung durch mehrfaches Einstechen mit einer Kanüle am Rand der Platte festgehalten, damit sollte sichergestellt werden, dass später Signale auf dem Röntgenfilm einzelnen Plaques zugeordnet werden können. Die Nylonmembran wurde abgezogen, mit der Phagenseite nach oben jeweils für 5 min auf ein mit Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) und zweimal



Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7,2, 1 mM EDTA pH 8,0) getränktes Whatman-Papier gelegt und schließlich in eine Wanne mit 2x SSC überführt. Die DNA wurde durch UV-Quervernetzung an die Membran fixiert (Autocrosslinking-Funktion im UV-Stratalinker) und die Membran danach in 2x SSC gelegt. Die Prähybridisierung und Hybridisierung mit der spezifischen DIG-markierten DNA-Sonde sowie der DIG-Nachweis erfolgten wie unter 2.2.6.8.2 und 2.2.6.8.3 beschrieben. Die Lochmarkierungen wurden von den Filtern auf den Film übertragen.

#### 2.2.7.4 Vereinzelung der positiven Phagenklone

Auf einem Leuchtschirm wurden die Signale auf dem Röntgenfilm, mit Hilfe der Lochmarkierungen, einzelnen Plaques auf der Platte zugeordnet. Die das gesuchte Gen tragenden Kolonien wurden großzügig mit einer Pipettenspitze (Durchmesser: ~5 mm) ausgestochen, in jeweils 50 µl SM-Puffer überführt und gründlich gemischt. Die Elution der Phagen aus der Agarose erfolgte bei 4 °C über Nacht. Die Phagen wurden erneut verdünnt, ausplattiert und die gentragenden Klone identifiziert und extrahiert. Diese Vereinzelung wurde so oft wiederholt, bis sich nur noch positive Kolonien auf der Platte befanden.

#### 2.2.7.5 Phagengewinnung und Bestimmung des Phagentiters

Die eluierten Phagenklone wurden in einer Verdünnung ausplattiert, die zu einer vollständigen Lyse des Bakterienrasens führt. Drei solcher Platten wurden pro Klon bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die lysierten Platten wurden mit 3 ml SM-Puffer überschichtet, als Schutz vor Verdunstung mit Parafilm umwickelt und bei 4 °C über Nacht zum Übergang der Phagen in die Lösung geschwenkt. Die Lösung der drei Platten wurde in einem Schraubröhrchen vereinigt und die Platten jeweils mit 1 ml SM-Puffer nachgespült. Nach Zugabe von 5 % (v/v) Chloroform wurden die Röhrchen 15 min bei RT auf dem Roller inkubiert und anschließend 10 min bei 2060 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils in ein neues Röhrchen überführt, mit Chloroform in einer Endkonzentration von 0,3 % versehen und bei 4 °C gelagert. Es wurden mit SM-Puffer Verdünnungen der Phagenlösung hergestellt, ausplattiert (2.2.7.2) und anhand der Anzahl der Plaques auf der Platte unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, der Phagentiter der Lösung bestimmt.

## ARBEITEN MIT RNA

Für das Arbeiten mit RNA wurde der Arbeitsplatz mit einer sauberen Unterlage versehen, es wurden häufig die Handschuhe gewechselt und ausschließlich dafür vorgesehene Plastik-

ware und Filterspitzen verwendet. Durch diese Maßnahmen und äußerst sauberes Arbeiten, sollte das Risiko von RNase-Kontamination vermindert werden.

#### 2.2.8.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Leishmanien mit dem M&N NucleoSpin RNA II Kit

Es wurden  $5 \times 10^8$  Promastigoten durch Zentrifugieren bei  $5600 \times g$  für 20 s geerntet. Die Präparation der RNA erfolgte laut Herstellerangaben. Es wurde mit  $60 \mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser eluiert (Kit). Die Konzentration der RNA-Lösung wurde photometrisch durch Messung der  $OD_{260}$  bestimmt. Der Berechnung lag die Annahme zugrunde, dass eine  $OD_{260} = 1$  einer RNA-Konzentration von  $40 \mu\text{g/ml}$  entspricht.

#### 2.2.8.2 Reverse Transkription (RT-PCR)

Die Transkription der RNA in cDNA erfolgte in  $200 \mu\text{l}$  PCR-Gefäßen im Thermocycler. Für die cDNA-Erststrangsynthese wurde der SuperScript II Reverse Transkriptase Kit (Invitrogen Life Technologies) benutzt:  $2 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA aus Promastigoten wurden mit je  $5 \text{ pmol}$  der beiden spezifischen Oligonukleotide und HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  in einem Gesamtvolumen von  $12 \mu\text{l}$  10 min bei  $70^\circ\text{C}$  erhitzt und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Danach wurden  $4 \mu\text{l}$  5x First-Strand-Puffer (Kit),  $2 \mu\text{l}$   $0,1 \text{ M}$  DTT (Kit) und  $0,5 \mu\text{l}$   $20 \text{ mM}$  dNTPs zupipettiert und 2 min bei  $42^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach Zugabe von  $1 \mu\text{l}$  ( $=200 \text{ U}$ ) SuperScript II RT wurde für 1 h bei  $42^\circ\text{C}$  und 15 min bei  $70^\circ\text{C}$  inkubiert.

Die cDNA-Zweitstrangsynthese erfolgte mit  $2 \mu\text{l}$  cDNA aus der Erststrangsynthese als Vorlage und dem Expand High Fidelity PCR System von Roche wie unter 2.2.6.7 beschrieben.

## ARBEITEN MIT PROTEINEN

### 2.2.9 Protein- und Immunochemische Methoden

#### 2.2.9.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford, 1976

Beim Bradford-Test bindet der Baumwollfarbstoff Coomassie Blue an Arginin-Reste von Proteinen. Es wurden  $10 \mu\text{l}$  der Proteinlösung mit  $500 \mu\text{l}$  Bradford-Reagenz in einer Küvette vermischt, 2 min inkubiert und die Extinktion bei  $595 \text{ nm}$  gegen einen Leerwert photometrisch bestimmt. Die Zuordnung der Absorption zu einer Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Eichgerade, die für jede neu angesetzte Bradford-Lösung mit einer BSA-Verdünnungsreihe erstellt wurde.

### 2.2.9.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei SDS-PAGE werden die Proteine in Gegenwart von 0,1 % (w/v) SDS während ihrer Wanderung durch zuerst das Sammel-, dann das Trenngel in Richtung Anode gemäß ihrem Molekulargewicht getrennt (Methode nach Laemmli, 1970). Das Sammelgel besaß eine Polyacrylamid-Konzentration von 6 % (v/v), das Trenngel von 10, 12 bzw. 15 %. Der Starter der Polymerisation APS wurde zuletzt hinzugegeben. Benutzt wurde das Minigel-System von Biometra. Die Proteinproben wurden in 1x SDS-PAGE-Auftragspuffer für 10 min bei 95 °C denaturiert, abgekühlt und davon 15-30 µl in die Geltasche geladen. Es wurde auf jedes Gel ein Größenstandard (Prestained Protein Marker, NEB) geladen. Die Auftrennung der Proben bei RT erfolgte im Sammelgel bei einer Stromstärke von 15 mA und im Trenngel bei 20 mA bzw. bei 20 mA und 40 mA bei zwei Gelen in einer Kammer. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x SDS-PAGE-Laufpuffer verwendet.

#### Sammelgel:

1x Sammelgelpuffer  
6 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung  
0,1 % SDS  
0,001 Volumenanteil TEMED  
0,06 % APS

#### Trenngel :

1x Trenngelpuffer  
10, 12 oder 15 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung  
0,1 % SDS  
0,0005 Volumenanteil TEMED  
0,1 % APS

### 2.2.9.3 Färbung von SDS-PA-Gelen mit Coomassie Blue

Zur Proteinfärbung mit Coomassie Blue wurde das Gel mit Coomassie-Färbelösung für 45 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Gel in Coomassie-Entfärberlösung geschwenkt, bis die gefärbten Proteinbanden sich deutlich sichtbar vom Hintergrund abhoben. Der Entfärber wurde hierbei i. d. R. einmal ausgetauscht. Danach wurden die Gele getrocknet bzw. in Wasser gelagert und zur Dokumentation gescannt.

### 2.2.9.4 Trocknen von Gelen

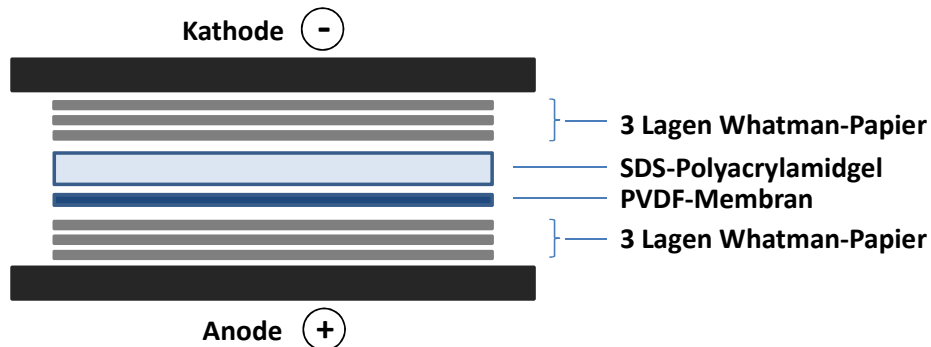
Die Gele wurden zunächst 30 min in Geltrocknungslösung leicht geschüttelt. Dann wurden sie luftblasenfrei zwischen zwei in Wasser eingeweichte Zellophan-Folienblätter in einen Geltrocknungsrahmen gespannt und für mindestens 24 Stunden unter dem Abzug getrocknet.

### 2.2.9.5 Immunoblot

#### 2.2.9.5.1 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen im Semi-Dry-Verfahren

Im Anschluss an die SDS-PA-Gelelektrophorese wurden die getrennten Proteine nach dem Semi-Dry-Verfahren auf eine Immobilon-P PVDF-Membran transferiert. Das Sammelgel wurde entfernt. Die auf die Größe des Trenngels zugeschnittenen Whatman-Papiere wurden

in Immunoblot-Transferpuffer getränkt und die PVDF-Membran 1 min in Methanol und 10 min in Puffer benetzt. Die Blotapparatur (Fastblot-Kammer) wurde nach dem Schema in Abb. 12 luftblasenfrei zusammengesetzt und beschwert. Der Blotvorgang erfolgte bei 4 mA pro cm<sup>2</sup> Membran für 30 min (45 min bei zwei Gelen in der Blotkammer) bei RT.



**Abb. 12:** Schematische Darstellung des Aufbaus eines Protein-Blots.

#### 2.2.9.5.2 Nachweis mittels Antikörperreaktion

Das SDS-PA-Gel wurde nach dem Blotvorgang mit Coomassie gefärbt. Zu Beginn der Nachweisreaktion wurde die Blotmembran zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen für 1 h bei 37 °C in Blockierungslösung (5 % MP/PBST oder 3 % BSA/TBST) geschwenkt. Für die Verdünnung der beiden Antikörper wurde nachfolgend die gleiche Art von Blockierungslösung benutzt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem gegen das zu detektierende Protein gerichteten Antikörper in Blockierungslösung bei 4 °C über Nacht unter Schwenken. Überschüssiger Primärantikörper wurde durch viermal Waschen mit PBST bzw. TBST für jeweils 10 min entfernt und der Blot mit dem spezifischen Sekundärantikörper in Blockierungslösung für 2 h bei RT geschwenkt. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde durch einmal Waschen mit PBST bzw. TBST und dreimal Waschen mit PBS bzw. TBS, jeweils für 10 min, entfernt. Die Visualisierung des mit Meerrettich-Peroxidase-(HRP-) gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte durch benetzen des Blots mit frisch angesetzter Entwicklerlösung, die zu je einem Teil aus den beiden Reagenzien des SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kits bestand. Am Schluss wurde der feuchte Blot, in einer Plastikfolie verpackt, in eine Filmkassette gelegt und der Röntgenfilm für 1 s - 45 min exponiert.

#### 2.2.9.5.3 Entfernung des gebundenen Antikörpers – Stripping des Blots

Die Membran wurde unter ständigem Schwenken zuerst 30 min bei 65 °C in Immunoblot Stripping-Lösung und dann 2 x 10 min in jeweils 250 ml PBST bei RT gewaschen. Danach wurde die Membran in Blockierungslösung überführt und begonnen mit der Blockierung, ein Nachweis mit einem anderen Primärantikörper durchgeführt.

### 2.2.9.6 Bestimmung von Phosphorylierungsstellen durch MALDI-TOF-MS und MS/MS

Die Proteinbande von Interesse wurde aus einem Coomassie-gefärbten SDS-PA-Gel mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden für die Durchführung der MALDI-TOF-MS- und MS/MS-Analysen an Frau Heidi Rosenqvist geschickt (Protein Research Group der Süddänischen Universität in Odense, Dänemark). Die folgenden Arbeitsschritte wurden von ihr durchgeführt: Die Proben wurden einem in-Gel-Trypsin-Verdau unterzogen und nachfolgend die Phosphopeptide mittels  $\text{TiO}_2$ -Chromatographie angereichert. Die massenspektrometrische Untersuchung der Peptide erfolgte am Bruker Ultraflex TOF-TOF-Gerät. Die Peptidsequenzen der Peaks von Interesse wurden nachfolgend mittels MS/MS-Analyse verifiziert. Die Datenanalyse wurde mit Hilfe der Programme FlexAnalysis, Version 2.4 und Biotools Version 3.0 durchgeführt. Zur Datenbanksuche wurde die Mascot Suchmaschine genutzt ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Größere Peptide ( $m/z > 3000$ ) treten schlechter vom Gel in den Verdau-Überstand über. Daher wurde neben dem Verdau-Überstand auch ein Gemisch aus diesem und einem Peptidextrakt, hergestellt aus der jeweiligen im Gel verbliebenen Probe, in die Analyse einbezogen.

## 2.2.10 Proteingewinnung

### 2.2.10.1 Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Leishmanien

#### 2.2.10.1.1 Herstellung von Leishmanienlysaten für Immunoblot-Analyse

Es wurden  $1 \times 10^8$  Leishmanien durch Zentrifugieren für 10 min bei  $2050 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  geerntet. Das Zellpellet wurde einmal mit kaltem 1x PBS-Puffer gewaschen und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Zellen wurden in  $100 \text{ }\mu\text{l}$  Leishmanienlysepuffer für Immunoblotting resuspendiert, 10 min bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  gekocht und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden  $20 \text{ }\mu\text{l}$  Probe ( $2 \times 10^7$  Zellen) auf ein SDS-PA-Gel geladen.

#### 2.2.10.1.2 Herstellung von Leishmanienlysaten für Kinase-Aktivitätstest

Für die Herstellung der Lysate wurden  $3 \times 10^8$  Promastigoten bzw.  $12 \times 10^8$  Amastigoten durch Zentrifugieren für 10 min bei  $2050 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  geerntet und die Zellpellets zweimal mit 1x PBS (kalt) gewaschen. Zunächst wurde das Zellpellet in  $500 \text{ }\mu\text{l}$  Leishmanienlysepuffer für Kinase-Aktivitätstest resuspendiert. Dann wurden die Zellen durch zwei Zyklen Einfrieren in Flüssigstickstoff und Auftauen aufgebrochen. Die Lyse wurde vervollständigt durch zehnmaliges Passagieren des Lysats durch die 25 G-Kanüle einer Spritze. Danach wurden die festen Bestandteile des Homogenats in mehreren Zentrifugationsschritten von jeweils 10 min bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  abgetrennt. Es wurde in der Reihenfolge  $500 \times g$ ,  $2300 \times g$  und  $15800 \times g$  sedimen-

tiert. Der Überstand wurde nach jedem Zentrifugationsschritt vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde das im Cytoplasmaextrakt enthaltene zelluläre ATP mit Hilfe einer HiTrap-Desalting Sephadex G-25 Säule entfernt. Dazu wurde die Säule zuerst mit 25 ml Äquilibrationpuffer gespült, dann wurde sie mit 1-1,5 ml Lysat beladen und schließlich mit 1,5 ml Äquilibrationpuffer eluiert. Zuletzt wurde das Säulenmaterial mit 25 ml 20 % Ethanol gespült und ebenfalls darin gelagert. Die Proteinkonzentration des Eluats wurde bestimmt, dieses aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.10.2 Expression und Synthese von rekombinantem Protein in *E. coli*, Ernte, Aufschluss und Affinitätsaufreinigung

Mit frisch transformierten Zellen von Festmediumplatte wurde eine Übernachtskultur angeimpft (siehe 2.2.2.2 und 2.2.3.2). Für die Herstellung von rekombinantem Protein wurden 100-400 ml LB-Medium, versetzt mit dem jeweiligen Antibiotikum, mit 1 ml der Übernachtskultur auf 100 ml Kultur angeimpft und bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln (250 rpm) kultiviert bis eine  $\text{OD}_{600} \approx 0,9$  erreicht war. Die Bakterienkultur wurde auf  $18\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und durch Zugabe von IPTG die Proteinexpression bei  $18\text{ }^{\circ}\text{C}$  über Nacht unter Schütteln gestartet. Nach 15 min Zentrifugieren bei  $2050 \times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurde das Zellpellet einmal in 1x PBS (kalt) resuspendiert, erneut durch Zentrifugieren sedimentiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und nach Auftauen auf Eis weiter lysiert. Dazu wurde der Zelleniederschlag in 5 ml Puffer für die Lyse pro 100 ml Ausgangskultur aufgenommen. Der nachfolgende Aufschluss durch Ultraschall (Branson Sonifier) erfolgte ebenfalls auf Eis. Nach jedem Schallschritt von 20 s Dauer wurde 20 s pausiert. 5 ml Zellsuspension wurden in ein 15 ml-Röhrchen überführt und mit der  $\text{Ø} 6\text{ mm}$ -Metallspitze mit zunehmender Intensität 2 x bei jeweils Stufe 2, 3 und 4 geschallt. Zellsuspensionen mit größerem Volumen (15-20 ml) wurden in ein gekürztes 50 ml-Röhrchen überführt und mit dem Metallknopf 2 x bei Stufe 2 und jeweils 3 x bei Stufe 3 und 4 sonifiziert. Dann wurde Triton X-100 in einer Endkonzentration von 1 % zugesetzt und das Röhrchen 30-60 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  rotiert. Das Lysat wurde in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und 15 min bei  $15800 \times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Das rekombinante Protein wurde aus dem Überstand laut 2.2.10.2.2-4 aufgereinigt. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis mit gekühlten Lösungen. Das rekombinante Protein wurde schnellstmöglich verwendet und bis dahin bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

<i>E. coli</i> -Stamm	Plasmid	Protein-Tag	Kultur-antibiotikum	Induktion der Proteinexpression	Puffer für die Lyse
BL21(DE3) [pAPlacI <sup>Q</sup> ]	pJCduet	His	Ampicillin/ Kanamycin	100 µM IPTG bei OD <sub>600</sub> ≈ 0,9	1x PBS
BL21(DE3)	pMal-cRI	MalBP	Ampicillin	50(100) µM IPTG bei OD <sub>600</sub> ≈ 0,9	MalBP- Säulenpuffer
BL21(DE3)	pGEX-KG	GST	Ampicillin	100 µM IPTG bei OD <sub>600</sub> ≈ 0,9	1x PBS

#### 2.2.10.2.1 Herstellung von Proben für SDS-PAGE von Gesamtzelllysat, Überstand und Pellet des Aufschlusses

Anhand der Verteilung des rekombinanten Proteins in Gesamtzelllysat, Überstand und Pellet konnte eine Aussage über die Proteinlöslichkeit und die synthetisierte Proteinmenge getroffen werden. Zur Herstellung des Gesamtzelllysats wurden aus dem Lysat nach Inkubation mit Triton X-100 50 µl entnommen. Nach dem folgenden Zentrifugationsschritt des Aufschlusses wurde eine Probe von 50 µl des Überstands gewonnen und nach Resuspension des Pellets im gleichen Volumen an ddH<sub>2</sub>O wie es der abgenommene Überstand besaß, wurden 50 µl der Suspension entnommen. Alle drei Proben wurden 1 : 5 mit ddH<sub>2</sub>O und Auftragspuffer (1x) verdünnt, 10 min bei 95 °C gekocht und jeweils 20 µl auf ein SDS-PA-Gel geladen.

#### 2.2.10.2.2 Aufreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen

Je nach Volumen der Ausgangskultur wurden 100-250 µl Säulenvolumen Chelating Sepharose Fast Flow mit Cobalt beladen. Dazu wurde die Säulenmischung für 3 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert und die Lagerlösung (20 % Ethanol) abgenommen. Dann wurde das Säulenmaterial nacheinander für jeweils 5 min zusammen mit 500 µl dH<sub>2</sub>O (auf 100 µl Bettvolumen), 100 µl 0,1 M CoCl<sub>2</sub>, dreimal mit 500 µl dH<sub>2</sub>O und schließlich 500 µl His-Aufreinigung Bindepuffer invertiert. Nach jedem Waschschrift wurde zentrifugiert wie oben beschrieben und die Flüssigkeit über dem Säulensediment mit der 23 G Kanüle einer Spritze vorsichtig abgenommen. Der Überstand aus 2.2.10.2 wurde mit dem gleichen Volumen an His-Aufreinigung Bindepuffer verdünnt und zusammen mit dem vorbereiteten Säulenmaterial für 1 h bei 4 °C rotiert. Nach Bindung des His-Fusionsproteins an die Säule wurden nicht gebundenes Protein und Verunreinigungen durch konsekutives Waschen des Säulenmaterials entfernt. Hierfür wurde jeweils 10 min bei 4 °C mit 2 x 6 ml Waschpuffer, 6 ml Bindepuffer und 6 ml Waschpuffer der His-Aufreinigung gewaschen. Abschließend wurde das His-Fusionsprotein zweimal eluiert. Hierzu wurde das Säulenmaterial mit je 500 µl Elutionspuffer für 10 min bei 4 °C rotiert und nach 3 min Zentrifugieren bei 500 x g und 4 °C das Eluat über dem Säulensediment abgenommen.

### 2.2.10.2.3 Aufreinigung von MalBP-Tag-Fusionsproteinen

Es wurden 500 bzw. 1000 µl Amylose-Resin zweimal mit MalBP-Aufreinigung Säulenpuffer gewaschen. Zum Austausch der Lösung wurde für 3 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert und die Flüssigkeit über dem Säulensediment mit der 23 G Kanüle einer Spritze behutsam abgenommen. Für die Bindung des MalBP-Fusionsproteins an die Amylose-Säule wurde der aus dem Zellaufschluss stammende Überstand (2.2.10.2) für 1 h bei 4 °C mit dieser rotiert. Im Anschluss wurde das Säulenmaterial viermal für 10 min mit je 12 ml Säulenpuffer bei 4 °C gewaschen und zuletzt zweimal für 45 min mit je 500 µl MalBP-Aufreinigung Elutionspuffer bei 4 °C eluiert. Das Säulenmaterial wurde mehrfach verwendet und daher im Anschluss an die Aufreinigung wie folgt aufbereitet: 1 ml Säulenvolumen wurden in jedem Waschschrift mit je 1 ml Lösung gewaschen, zuerst dreimal mit ddH<sub>2</sub>O, dann dreimal mit 0,1 % SDS-Lösung, einmal mit ddH<sub>2</sub>O und fünfmal mit Säulenpuffer. Anschließend wurde die Amylose-Säule in Säulenpuffer bei 4 °C gelagert.

### 2.2.10.2.4 Aufreinigung von GST-Tag-Fusionsproteinen

200 µl Säulenbett Glutathione-Uniflow Resin für 100-200 ml Ausgangskultur wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen. Zum Austausch der Flüssigkeit wurde das Säulenmaterial für 3 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand über dem Säulensediment über die 23 G Kanüle einer Spritze abgenommen. Der Lysat-Überstand (2.2.10.2) wurde 1 h bei 4 °C zusammen mit dem Säulenmaterial rotiert. Nach Bindung des GST-Fusionsproteins wurde die Glutathion-Säule viermal mit je 8 ml 1x PBS gewaschen und zweimal für 10 min mit je einem Bettvolumen GST-Aufreinigung Elutionspuffer bei 4 °C eluiert.

### 2.2.10.2.5 Thrombin-Spaltung zur Entfernung des GST-Tags

Der GST-Tag wurde von einigen GST-Fusionsproteinen durch Inkubation von 250 µg Protein mit 1,2 U Thrombin in einem Gesamtansatz von 125 µl über Nacht bei 20 °C abgespalten.

## 2.2.11 *In vitro* Kinase-Aktivitätstest

Es wurden 1-3 µg rekombinant exprimierte Kinase zusammen mit 10 µg des artifiziellen Substrats MBP (Myelin Basisches Protein), α-Casein bzw. Histon H1 in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 1 h schüttelnd bei 27 °C, 30 °C bzw. 34 °C inkubiert. Das für den Phosphatgruppentransfer notwendige Substrat und den Co-Faktor lieferten 5 µl 1 mM ATP mit 5 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (6000 Ci/mmol) und 5 µl 10x Kinase-Aktivitätstest Reaktionspuffer. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 12,5 µl 5x SDS-PAGE Auftragspuffer und Erhitzen für 10 min bei 95 °C beendet. 30 µl jedes Ansatzes wurden über ein 12%iges-SDS-PA-Gel



aufgetrennt. Das Gel wurde im Anschluss mit Coomassie gefärbt, entfärbt und nach Trocknen in einer Filmkassette fixiert. Es wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und bei -70 °C für mehrere Stunden bis Tage exponiert.

#### 2.2.11.1 Kinase-Aktivitätstest mit Leishmanienlysaten

Es wurden 20 µg des Leishmanienlysats (2.2.10.1.2) zusammen mit 2 µg rekombinant in *E. coli* exprimierter Kinase, 5 µl 1 mM ATP mit 5 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (6000 Ci/mmol) und 5 µl 10x Kinase-Aktivitätstest Reaktionspuffer in einem Gesamtansatz von 50 µl für 1 h bei 30°C inkubiert. Die weitere Durchführung entsprach 2.2.11.

### 2.2.12 Bioinformatische Analyse

#### GeneDB-Genomdatenbank parasitärer Pathogene

<http://www.genedb.org> (Logan-Klumpler et al., 2012)

#### TriTrypDB-Genomdatenbank von Kinetoplastiden

<http://www.tritrypdb.org> (Aslett et al., 2010)

#### Für die Suche nach homologen Proteinen und Peptiden

- NCBI Blast: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Altschul et al., 1997)
- GeneDB OmniBLAST: [http://www.genedb.org/blast/submitblast/GeneDB\\_proteins/omni](http://www.genedb.org/blast/submitblast/GeneDB_proteins/omni)  
und BLASTP 2.0MP-WashU: <http://blast.wustl.edu> (Gish, W. 1996-2006)

#### Alignment von Aminosäuresequenzen:

- EMBOSS Needle Paarweises Sequenzalignment: Benutzt den Needleman-Wunsch-Algorithmus (Needleman und Wunsch, 1970); verwendete Matrix: Blosom62.  
[https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)  
Von EMBL-EBI Services (Chojnacki et al., 2017).
- CLUSTAL 2.1 Multiples Sequenzalignment: <http://www.clustal.org/> (Larkin et al., 2007).

#### Vorhersage von Sekundärstrukturelementen von Proteinen

PSIPRED secondary structure prediction method: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>  
(Buchan et al., 2013)

#### Vorhersage von ungeordneten intrinsischen Proteinregionen

DISOPRED3 Protein Disorder Prediction: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/?disopred=1>  
(Ward et al., 2004)

#### Vorhersage von Signalpeptiden und Signalpeptidase-Schnittstellen

SignalP 4.0: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (Petersen et al., 2011)

Kombinierte Vorhersage von Signalpeptiden und Transmembran-DomänenPhobius: <http://phobius.sbc.su.se/> (Käll et al. 2004)Vorhersage von Transmembranhelices in ProteinenTMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> (Käll et al., 2004)Vorhersage von GPI-Modifikationssequenzen- big-PI Predictor: [http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html) (Eisenhaber et al., 1999)- GPI-SOM: <http://gpi.unibe.ch/> (Fankhauser und Mäser, 2005)Vorhersage der Aminosäuresequenz um die Phosphorylierungsstelle eines Kinase-SubstratsPredikin: <http://predikin.biosci.uq.edu.au/> (Brinkworth et al., 2003)2.2.12.1 Datenbank-Zugangsnummern von homologen Proteinen

Unter der genannten Zugangsnummer kann in der jeweiligen Datenbank (NCBI bzw. GeneDB) die für Sequenzvergleiche benutzte Aminosäuresequenz abgerufen werden.

Protein/Organismus	Abkürzung Organismus	NCBI	GeneDB
<u>GSK3<math>\alpha</math> (lange GSK3):</u>			
<i>Leishmania mexicana</i>	Lmx	DQ812911	LmxM.22.0490
<i>Leishmania major</i>	Lmj	XP_001683201	LmjF22.0490
<i>Leishmania infantum</i>	Lin	XP_001465568	LinJ.22.0370
<i>Leishmania braziliensis</i>	Lbr	CAM45088	LbrM.22.0440
<i>Leishmania donovani</i>	Ld	E9BFQ6	
<i>Trypanosoma brucei</i>	Tb	XP_845865	Tb927.7.2420
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Tc	XP_811041	TcCLB.509207.80
<i>Homo sapiens</i>	Hsap/Hs	P49840	—
<u>GSK3<math>\beta</math> (kurze GSK3):</u>			
<i>Leishmania mexicana</i>	Lmx	DQ812912	LmxM.18.0270
<i>Leishmania major</i>	Lmj	XP_001682433	LmjF18.0270
<i>Leishmania infantum</i>	Lin	XP_001682433	LinJ.18.0270
<i>Leishmania braziliensis</i>	Lbr	XP_001563953	LbrM.18.0290
<i>Leishmania donovani</i>	Ld	ABR18737	LdBPK_180270.1
<i>Trypanosoma brucei</i>	Tb	XP_827861	Tb927.10.13780
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Tc	XP_820602	TcCLB.507993.80
<i>Homo sapiens</i>	Hsap/Hs	P49841	—
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Crei	AY621077	—
<u>MPK7</u>			
<i>Leishmania mexicana</i>	Lmx	AJ293285	LmxM.13.1640
<i>Leishmania major</i>	Lmj	XP_001681908.1	LmjF.13.1640
<i>Leishmania infantum</i>	Lin	XP_001464183.2	LinJ.13.1380
<i>Leishmania braziliensis</i>	Lbr	XP_001563290.2	LbrM.13.1500
<i>Leishmania donovani</i>	Ld	CBZ32637.1	LdBPK_131380.1

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchung des MAP-Kinase Homologs LmxMPK7 aus *Leishmania mexicana*

Steckbrief: LmxMPK7	
<b>Proteinklasse</b>	Putative Mitogen-aktivierte Protein Kinase
<b>Länge:</b> Nukleinsäuresequenz Aminosäuresequenz	1740 bp 579 AS
<b>Theoretisches MW und pI</b>	64,7 kDa und pH 6,5
<b>Strukturelle Besonderheiten</b>	Drei zusätzliche Insertionen innerhalb der Kinasedomäne. Langer N-Terminus. TDY-Motiv.
<b>Accession Number</b>	AJ293285, LmxM.13.1640 (auf Chromosom 13)
<b>Homologe:</b> (Anteil an identischen Aminosäuren in Klammern)	<i>L. major</i> : LmjF.13.1640 (90 %) <i>L. infantum</i> : LinJ.13.1380 (92 %) <i>L. braziliensis</i> : LbrM.13.1500 (81 %) Keine in <i>T. brucei</i> und <i>T. cruzi</i>
<b>Funktion und Interaktionspartner</b>	Unbekannt

##### 3.1.1 *In vitro*-Untersuchungen

###### 3.1.1.1 Rekombinante Expression von *LmxMPK7*

Bei Aufnahme des Projekts existierte bereits das Konstrukt pGEXLmxMPK7 zur Expression von LmxMPK7 als GST-Fusionsprotein. In vorangegangenen Experimenten fand sich das mit GST-Tag versehene Protein, jedoch überwiegend in der unlöslichen Fraktion der Aufreinigung. Eine Variation der Expressionsparameter wie Temperatur, Antibiotika-Konzentration u. a. führte zu keiner verbesserten Löslichkeit des Proteins. Für das aus der Aufreinigung resultierende, wenig konzentrierte GST-LmxMPK7-Protein konnte keine Aktivität im Kinase-Aktivitätstest nachgewiesen werden. Daher wurde nachfolgend *LmxMPK7* alternativ in die Expressionsplasmide pMal-cRI und pJCduet kloniert, in *E. coli* exprimiert und als MalBP- (Maltose-bindendes Protein) bzw. His-Fusionsprotein aufgereinigt.

###### 3.1.1.1.1 Herstellung der Expressionskonstrukte

###### pMalcLmxMPK7

Das Plasmid pMal-cRI wurde in der Polylinker-Region durch Restriktionsenzymsspaltung mit *EcoRI* geöffnet und die überhängenden Enden mittels Klenow-Polymerase-Reaktion aufgefüllt. Durch Spaltung mit *HindIII* im Bereich des Polylinkers wurde an einem Ende des linearisierten Plasmids ein entsprechender Überhang geschaffen. Das *LmxMPK7* enthalten-

de Fragment wurde aus dem Plasmid pGEX1-LmxMPK7 gewonnen. Hierfür wurde pGEX1-LmxMPK7 durch Restriktionsenzymsspaltung mit *NcoI* stromauf von *LmxMPK7* geöffnet, die überhängenden Enden aufgefüllt und erneut, diesmal stromab des Gens, unter Einsatz der Restriktionsendonuklease *HindIII* geschnitten. Das gewünschte Fragment wurde mittels Gelextraktion isoliert und unter Beibehaltung des Leserasters in das linearisierte pMalc-RI-Plasmid ligiert. Das resultierende Konstrukt hieß pMalcLmxMPK7. Im Anschluss wurde das Gen vollständig durch Sequenzierung überprüft.

#### pJCLmxMPK7

Das pJCduet-Plasmid stellt zwei getrennte MCSs (multi cloning sites) zum Einbringen von je einem zu exprimierenden Gen zur Verfügung. Bei vorliegendem Klonierungsvorhaben wurde nur die MCS besetzt, welche die Information für die Expression des His-Tags besitzt. Selbige wurde an der *BamHI*-Schnittstelle durch Restriktionsspaltung geöffnet und die überhängenden Enden mittels Klenow-Polymerase-Reaktion aufgefüllt. Dann wurde durch Spaltung mit *HindIII* ein korrespondierender Überhang geschaffen. Das *LmxMPK7* tragende Fragment resultierte aus der Spaltung von pMalcLmxMPK7 mit *EcoRI*, nachfolgender Auffüllreaktion mittels Klenow-Polymerase, Restriktionsenzymsspaltung mit *HindIII* und abschließend der Gewinnung des Fragments durch Gelextraktion. Das geöffnete pJCduet-Plasmid und das *LmxMPK7*-Fragment wurden ligiert. Hieraus ging das Konstrukt pJCLmxMPK7 hervor.

Die Plasmidkarten aller Endkonstrukte finden sich im Anhang.

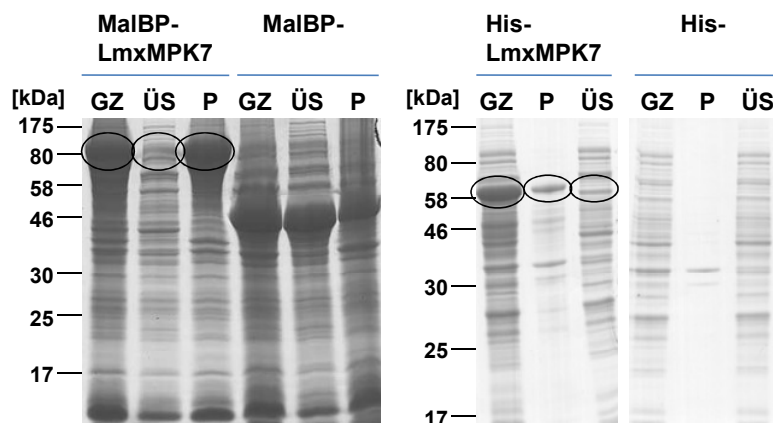
#### 3.1.1.1.2 Testexpression und Aktivitätstest der Fusionsproteine

Das Konstrukt pJCLmxMPK7 wurde zur Expression in den *E. coli* Stamm pAPIac eingebracht, pMalcLmxMPK7 in *E. coli* BL21-Zellen. Als Kontrolle wurden mit dem jeweiligen Leerplasmid transfizierte Zellen verwendet. Die Testexpression wurde im Maßstab von 50 ml LB-Medium ausgeführt und erfolgte bei 18 °C über Nacht. Neben der Überprüfung auf Proteinsynthese, sollte durch Entnahme von Proben aus unterschiedlichen Fraktionen des Zellaufschlusses eine Aussage über die Löslichkeit der Fusionsproteine gemacht werden. Die Aufreinigung des Fusionsproteins setzt das Vorkommen in der löslichen Fraktion voraus.

Die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend das Gel mit Coomassie gefärbt (Abb. 13). Anhand der Bandenstärke ist für das 40 kDa große MalBP-Protein eine kräftige Produktion und gute Löslichkeit abzulesen. Für das zugehörige MalBP-Fusionsprotein von *LmxMPK7* ist im Gesamtzelllysat und in der unlöslichen Fraktion (Pellet) des Aufschlusses eine starke Bande bei 104,7 kDa zu erkennen. In der löslichen Fraktion (Überstand) ist das gewünschte Protein auf dem Gel kaum als Bande wahrzunehmen. Weiterführend wurde versucht durch Optimierung der Expressionsbedingungen eine Erhöhung der

Ausbeute an löslichem MalBP-LmxMPK7 zu erzielen. Dies ist im Detail nicht aufgeführt. Folgende Bedingungen erschienen am vorteilhaftesten und wurden nachfolgend für die Herstellung von rekombinantem MalBP-LmxMPK7 gewählt: Kultivierung der Zellen in LB-Medium; Induktion der Kultur bei einer Zelldichte von  $OD_{600} = 0,9$  mit  $50 \mu\text{M}$  IPTG und anschließende Inkubation bei  $18 \text{ }^\circ\text{C}$  über Nacht.

Das His-Fusionsprotein hat ein errechnetes Molekulargewicht von  $65,5 \text{ kDa}$ . Eine deutliche Bande auf dieser Höhe findet sich in der Spur des Gesamtzelllysats (Abb. 13). Der Anteil an Fusionsprotein in der löslichen Fraktion fällt gering aus. Eine Optimierung der Expressionsbedingungen wurde nicht vorgenommen. Für die weitere Herstellung von His-LmxMPK7 wurden die Zellen in LB-Medium kultiviert und die Kultur nach Induktion mit  $100 \mu\text{M}$  IPTG bei  $OD_{600} = 0,9$  über Nacht bei  $18 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert.



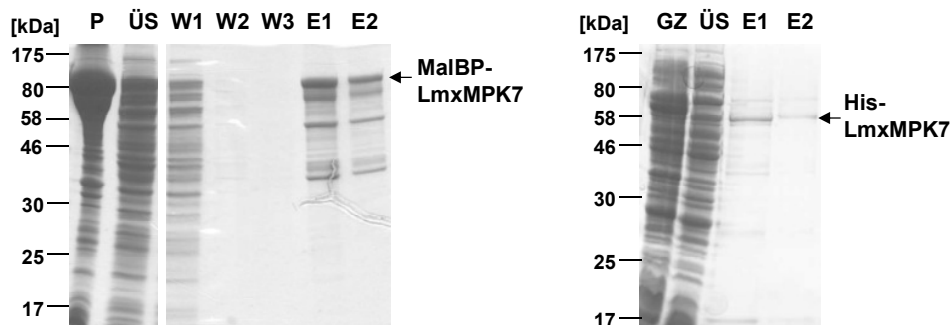
**Abb. 13: Testexpression und Synthese von LmxMPK7 als Fusionsprotein mit MalBP- bzw. His-Tag in *E. coli*.** Nach Aufschluss der Zellen wurde je eine Probe des Gesamtzelllysats (GZ), des Überstands (ÜS) und des Pellets (P) entnommen. Abgebildet sind die Coomassie-gefärbten 12 %-igen SDS-PA-Gele der aufgetrennten Proben der Proteinexpression und der Expression des Leerplasmids (MalBP-, His-). Die ovalen Fenster markieren die Fusionsproteine.

Die rekombinanten Proteine MalBP-LmxMPK7 und His-LmxMPK7 wurden aufgereinigt und auf ihre Kinase-Aktivität getestet. MalBP-LmxMPK7 als auch His-LmxMPK7 finden sich, wie zu sehen ist (Abb. 14), in den Eluaten der jeweiligen Aufreinigung wieder – wenngleich auch das His-Fusionsprotein in einer geringeren Konzentration vorliegt. Im Eluat von MalBP-LmxMPK7 ließen sich im Gel mehrere zusätzliche Proteinbanden anfärben. Diese befinden sich im Größenbereich zwischen  $\sim 40 \text{ kDa}$ , einer Größe welche dem MalBP-Tag alleine entspricht, und der Lauffhöhe des Gesamtlängenproteins von  $\sim 105 \text{ kDa}$ . Diese Proteine finden sich in allen Aufreinigungen von MalBP-LmxMPK7 auf gleicher Höhe und in geringerer Menge als das Gesamtlängenprotein wieder. Bei diesen Banden könnte es sich um verkürzt synthetisiertes rekombinantes Protein, Abbauprodukte des Gesamtlängenproteins oder Proteinverunreinigungen aus *E. coli* handeln.

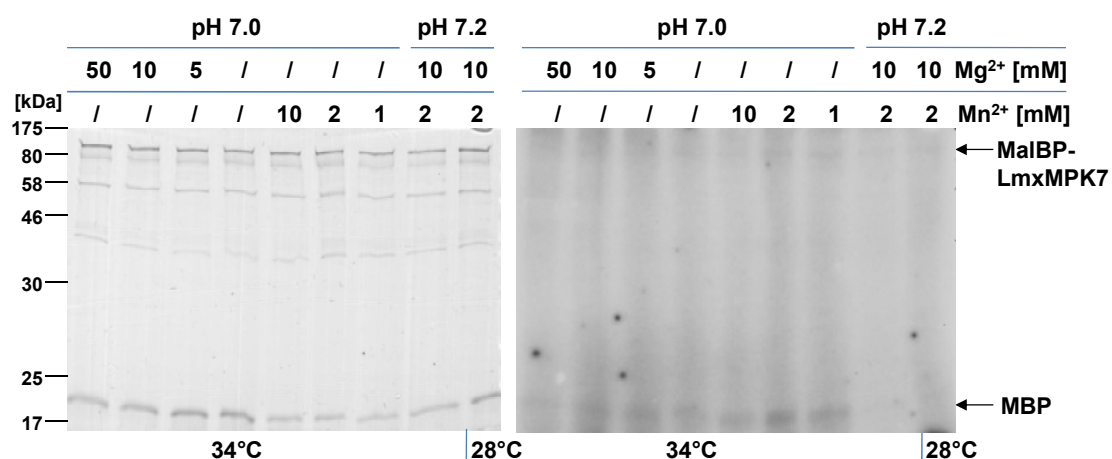
Im Kinase-Aktivitätstest machten  $3 \mu\text{g}$  His-LmxMPK7 in imidazolhaltigem Elutionspuffer zwischen 24 und 40 % (v/v) des Ansatzvolumens aus, dies entspricht einer Endkonzentration von 120-200 mM Imidazol. Ab einer bestimmten Konzentration vermag Imidazol die

Aktivität vieler Kinasen zu hemmen. Um einen Einfluss von Imidazol auf die Kinase-Aktivität ausschließen zu können, wurde neben His-LmxMPK7 auch das in maltosehaltigem Elutionspuffer vorliegende MalBP-Fusionsprotein auf seine Aktivität getestet. Für die enzymatische Aktivität von LmxMPK7 war kein Optimum bekannt, daher erfolgte die Testung im Kinase-Aktivitätstest bei unterschiedlichen Konditionen. Untersucht wurde die Aktivität von rekombinantem LmxMPK7 bei pH 7,0 bzw. 7,2 in Gegenwart von Magnesium und/oder Mangan, bei einer Reaktionstemperatur von 28 °C, 30 °C bzw. 34 °C gegenüber den Substraten Myelin Basisches Protein (MBP) (Abb. 14) und Histon H1 (H1) (nicht gezeigt). Dem dargestellten Film lag eine für das Versuchssystem des radioaktiven Kinase-Aktivitätstests lange Expositionszeit von fünf Tagen zu Grunde. Bei den getesteten Bedingungen ist keine signifikante Autophosphorylierungsaktivität der Kinase, noch eine Phosphorylierungsaktivität gegenüber den artifizialen Substraten MBP und Histon H1 zu erkennen. Dies trifft für das MalBP- (Abb. 14) als auch das His-Fusionsprotein (Film nicht abgebildet) von LmxMPK7 zu. Als sehr schwache Schwärzung zeichnet sich die Bande von Substrat und Kinase am ehesten in den Ansätzen mit Mangan als alleinigem zweiwertigem Kation ab. Für weitere modifizierte Testungen auf Kinase-Aktivität wurde für LmxMPK7 ein manganhaltiger Puffer gewählt.

**A.**



**B.**



**Abb. 14: Aufreinigung von MalBP- bzw. His-LmxMPK7 und Aktivitätstest.** **A.** Die aufgetrennten Proben entstammen den konsekutiven Schritten der Proteinaufreinigung: *E. coli*-Gesamtzelllysat (GZ), Überstand (ÜS) und Pellet (P). W1-W3 entstammen dem jeweiligen Durchlauf des gewaschenen Säulenmaterials. Es wurde zweimal eluiert (E1 und E2). Dargestellt sind die Coomassie-gefärbten 12 %-igen SDS-PA-Gele. **B:** Kinase-Aktivitätstest von MalBP-LmxMPK7 zusammen mit MBP. Die Ionenzusammensetzung und der pH-Wert des Puffers sowie die Reaktionstemperatur wurden wie angegeben variiert. Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Rechts: Autoradiogramm.

### 3.1.1.2 Herstellung einer um den „lip-loop“ verkürzten Form von LmxMPK7

LmxMPK7 besitzt im Vergleich zu den anderen MAP-Kinase-Homologen von Leishmanien drei zusätzliche Insertionen im Bereich der Kinasedomäne (Wiese, 2007). Diese Einschübe scheinen Schleifen (loops) zwischen den bekannten Sekundärstrukturelementen auszubilden. In der N-terminalen Untereinheit, zwischen Subdomäne I und II, befindet sich eine 69 Aminosäuren lange Insertion. Innerhalb der Aktivierungslippe der Kinase zwischen der Subdomäne VII und VIII ist eine weitere, 42 Aminosäuren lange Schleife lokalisiert. Diese wird im Folgenden als „lip-loop“ bezeichnet. In der C-terminalen Untereinheit im Bereich zwischen der Subdomäne X und XI befindet sich die dritte, 22 Aminosäuren lange Schleife. Die Aktivierungslippe bildet eine Art Plattform für die Substratbindung. Durch nachfolgende Klonierung wurde der zusätzliche lip-loop von LmxMPK7 entfernt. Die zugrunde liegende Idee war, durch Entfernung des loops die Eigenschaft der Kinase, wie die Fähigkeit zur Substratbindung, zu verbessern und dadurch die Phosphorylierung von Substraten im *in vitro* Ansatz effektiver zu gestalten. Da der lip-loop in anderen aktiven MAP-Kinasen von Leishmanien nicht vorhanden ist, wurde vermutet, dass seine Entfernung zu keiner Beeinträchtigung der für die enzymatische Aktivität wichtigen Tertiärstruktur führt. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von LmxMPK7 und Homologen sowie eine Vorhersage von Sekundärstrukturelementen und intrinsisch unstrukturierten Proteinbereichen mittels PSIPRED bzw. DISOPRED3, finden sich im Anhang.

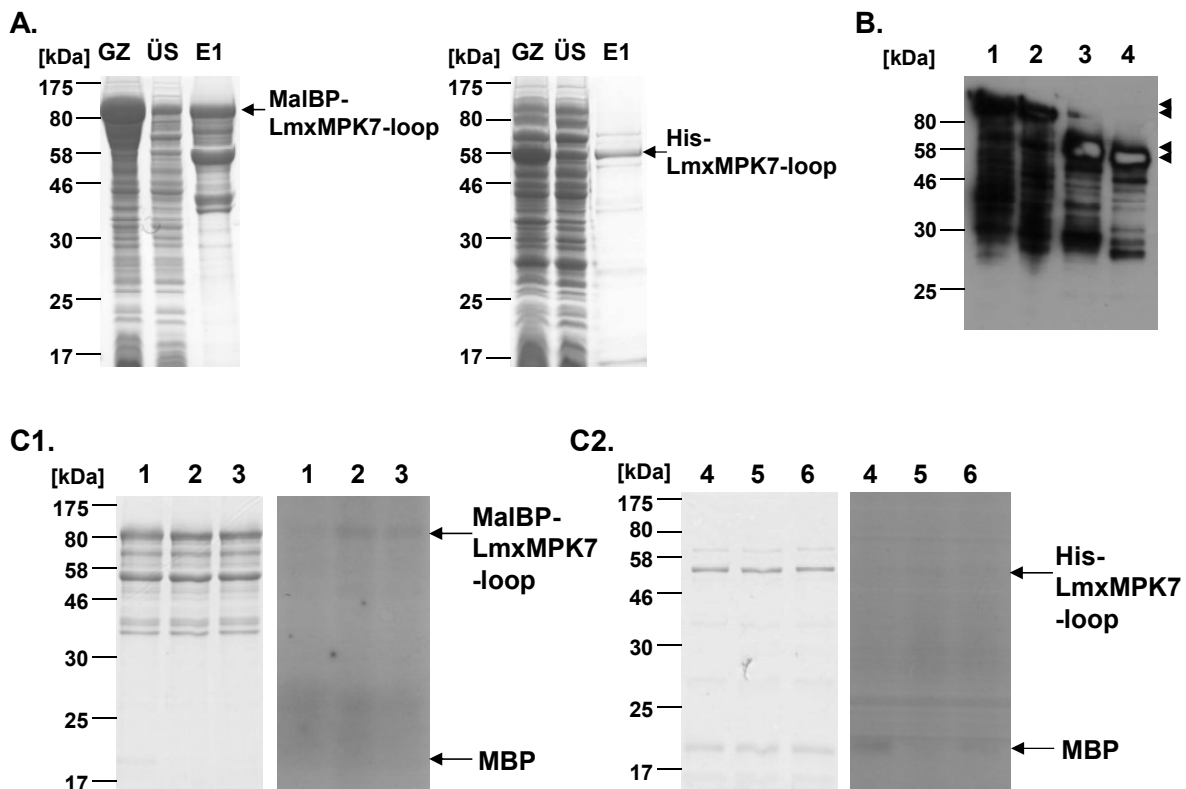
#### 3.1.1.2.1 Klonierungsstrategie zur Entfernung des lip-loops

Zu Beginn der Sequenz des lip-loops liegt eine *SacII*-Restriktionsenzymchnittstelle. Es wurde der vorwärts gerichtete Primer MPK7*SacII*\_for generiert, welcher am 3'-Ende des für den lip-loop codierenden Bereichs bindet und an seinem 5'-Ende eine *SacII*-Schnittstelle trägt. Eine zusätzliche *SacII*-Schnittstelle wurde mittels PCR mit den Primern MPK7*SacII*\_for und mapkin153105\_4.rev und dem *LmxMPK7* tragenden Plasmid pX7.3*LmxMPK7*-ds als Vorlage eingebracht und der, eine *XbaI*-Schnittstelle enthaltende Bereich stromab des lip-loops amplifiziert. Das Produkt wurde mittels TOPO-Klonierung in das pCR2.1-Plasmid kloniert. Aus dem resultierenden Plasmid pCR2.1*SacII*MPK7-loop wurde durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen *SacII* und *XbaI* und anschließender Auftrennung und Isolierung aus dem Gel, ein mit *SacII* beginnendes Fragment stromab des *lip-loops* gewonnen. Der *lip-loop* von *LmxMPK7* wurde aus dem Plasmid pMalcMPK7 durch Spaltung mit *SacII* und *XbaI* entfernt. Anschließend wurde in das aufgereinigte pMalcMPK7-Plasmid das *SacII*/*XbaI*-Fragment einligiert. Das resultierende Plasmid pMalcMPK7-loop (Plasmidkarte im Anhang) wurde durch Sequenzierung überprüft. Seinem Produkt fehlt ein, den lip-loop tragender, 47

Aminosäuren langer Bereich. Zusätzlich wurde LmxMPK7-loop in das His-Expression-plasmid kloniert, dies ergab pJCMPK7-loop (Plasmidkarte im Anhang). Die Plasmide pJCduet und pMalcMPK7-loop wurden hierfür mit *Bam*HI bzw. *Eco*RI geschnitten und die überhängenden Enden jeweils mittels Klenow-Polymerase aufgefüllt. Anschließend wurden beide Konstrukte nochmals geschnitten, diesmal jeweils mit *Hind*III. Nach Gelextraktion wurde das so erzeugte *MPK7-loop*-Fragment in das geöffnete pJCduet-Plasmid durch Ligation eingebracht. Die Sequenz von *LmxMPK7-loop* findet sich im Anhang.

### 3.1.1.2.2 Expression und Aktivitätstest von LmxMPK7-lip-loop

Das MalBP- und das His-Fusionsprotein von LmxMPK7-loop wurden in *E. coli* exprimiert und erfolgreich aufgereinigt. Im ersten Eluat der Aufreinigung (Abb. 15, A) finden sich für beide Fusionsproteine zusätzliche Banden, ähnlich wie in der jeweiligen Aufreinigung des Gesamtlängenproteins (Abb. 14, A). Im Immunoblot erkennt das gegen ein Peptid von LmxMPK7 gerichtete Antiserum die Volllängen- und verkürzte Form von LmxMPK7, sowohl mit His- als auch MalBP-Tag (Abb. 15, B). LmxMPK7-loop ist 4,9 kDa kleiner als das Volllängenprotein, dieser Größenshift ist ebenfalls erkennbar.



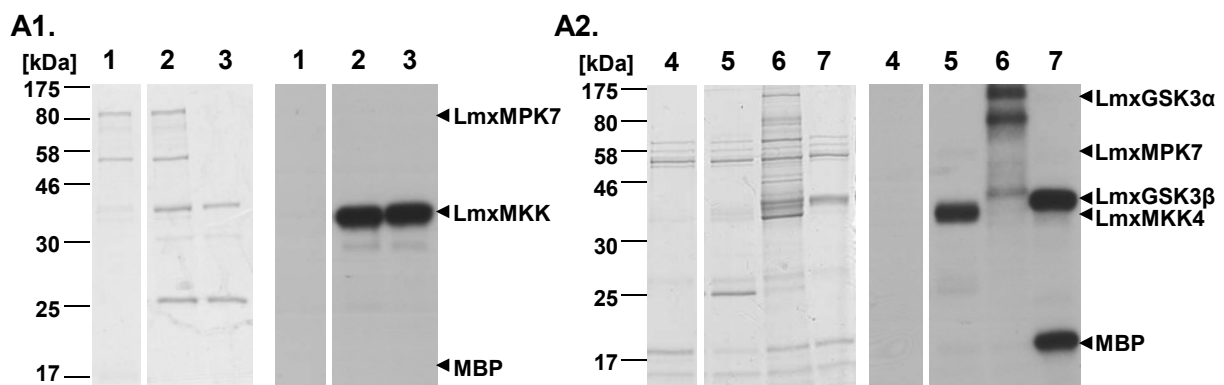
**Abb. 15: Aufreinigung von MalBP- bzw. His-LmxMPK7-loop und Kinase-Aktivitätstest.** **A:** Gesamtzelllysate (GZ), Überstand (ÜS) und erstes Eluat (E1) der Aufreinigung. Coomassie-gefärbte 12 %-ige SDS-PA-Gele. **B:** Immunoblot mit anti-LmxMPK7-Peptid-Antiserum (5109) 1:1000 (Herstellung des Antiserums siehe 3.1.2.5). 1: MalBP-LmxMPK7; 2: MalBP-LmxMPK7-loop; 3: His-LmxMPK7; 4: His-LmxMPK7-loop. **C:** Kinase-Aktivitätstest: C1: MalBP-LmxMPK7-loop, C2: His-LmxMPK7-loop zusammen mit MBP. Verwendete Pufferbedingungen: pH 7,2 und Spuren 1, 4 mit 10 mM  $Mg^{2+}$ ; Spuren 2, 5 mit 2 mM  $Mn^{2+}$ ; Spuren 3, 6 mit 10 mM  $Mg^{2+}$  + 2 mM  $Mn^{2+}$ . Reaktionstemperatur von 30 °C für 1 h. Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Rechts: Autoradiogramm nach 3 d.



MalBP-LmxMPK7-loop und His-LmxMPK7-loop wurden auf ihre Aktivität gegenüber MBP (Abb. 15, C1 und C2) und Histon H1 (nicht gezeigt) untersucht. Da die Bedingungen für das enzymatische Aktivitätsoptimum der Kinase unbekannt sind, wurden drei Puffer mit pH 7,2 und unterschiedlicher Ionenkonzentration an Magnesium und Mangan gewählt. Die Endkonzentration an Imidazol im Kinase-Aktivitätstest des His-Fusionsproteins lag bei 120 mM. In Spur 2 und 3 des Coomassie-gefärbten Gels ist keine MBP-Bande zu sehen. Trotz langer Exposition des Films ist in keiner Spur eine deutliche Schwärzung auf Höhe von Substrat oder Kinase zu erkennen. Die Entfernung des lip-loops von LmxMPK7 führt zu keiner Aktivitätssteigerung der Kinase gegenüber MBP bzw. Histon H1 oder gegenüber sich selbst (Autophosphorylierung).

### 3.1.1.3 LmxMPK7 im Kinase-Aktivitätstest zusammen mit anderen rekombinant exprimierten Leishmanien-Kinasen

Für das rekombinante Protein von LmxMPK7 war soweit keine Aktivität nachzuweisen. Viele Kinasen werden erst nach Phosphorylierung durch andere Kinasen in einen aktiven bzw. einen aktiveren Zustand überführt. Möglicherweise wird eine andere Leishmanien-Kinase für die Aktivierung von LmxMPK7 benötigt? LmxMPK7 wurde zusammen mit LmxMKK, LmxMKK4 (vormals LmxPK4), LmxGSK3 $\alpha$  und LmxGSK3 $\beta$  und dem artifiziellen Substrat MBP im Kinase-Aktivitätstest getestet. Der Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in die verschiedenen rekombinanten Proteine wurde nach deren Auftrennung über SDS-PA-Gel-elektrophorese durch Auflegen eines Films auf das getrocknete Gel detektiert.



**Abb. 16: Kinase-Aktivitätstest: LmxMPK7 zusammen mit LmxMKK, LmxMKK4, LmxGSK3 $\alpha$  und LmxGSK3 $\beta$ .** 1: MalBP-LmxMPK7; 2: MalBP-LmxMPK7 zusammen mit LmxMKK-D (LmxMKK-D nach Abspaltung des GST-Tags durch Thrombinverdau); 3: LmxMKK-D; 4: His-LmxMPK7; His-LmxMPK7 zusammen mit: 5: LmxMKK4 (nach Entfernung des GST-Tags durch Thrombinverdau) bzw. 6: MalBP-LmxGSK3 $\alpha$  bzw. 7: His-LmxGSK3 $\beta$ . Inkubation der Kinasen in Gegenwart von MBP 1 h bei 30 °C. Kein MBP in Spur 2 und 3. Pufferbedingungen: pH 7,2 und A1: 10 mM Mg<sup>2+</sup> + 2 mM Mn<sup>2+</sup>, A2: 5 mM Mg<sup>2+</sup> + 5 mM Mn<sup>2+</sup>. Links: Coomassie gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Rechts: Film nach A1: 1 d bzw. A2: 15 h Exposition.

Die Ausbeute an aufgereinigtem LmxMPK7-His-Fusionsprotein fiel erneut relativ gering aus. 40 % des Ansatzvolumens bestand aus Kinase in imidazolhaltigem Elutionspuffer der His-

Aufreinigung, um 3 µg Kinase im *in vitro* Assay zu erreichen. Dies entsprach einer Imidazol-Endkonzentration von 200 mM. Besonders LmxMKK reagierte im Test auf die erhöhte Imidazol-Konzentration mit einer Abnahme der Phosphorylierungsaktivität. Daher wurde LmxMKK zusammen mit dem MalBP- anstelle des His-Fusionsproteins von LmxMPK7 getestet. LmxMKK bzw. LmxMKK4 wurden als GST-Fusionsproteine aufgereinigt und anschließend der GST-Tag mit Hilfe von Thrombin abgespalten. Durch Coomassie wurden Banden angefärbt, die möglicherweise dem ~26 kDa großen, abgespaltenen GST-Tag bzw. dem ~32 kDa großen Thrombin zuzuordnen sind (Abb. 16, Spur 2, 3 und 5).

Für LmxMPK7 ist auf Höhe von 65,5 bzw. 104,7 kDa eine deutliche Bande des His- bzw. MalBP-Fusionsproteins auf dem Coomassie-gefärbten SDS-PA-Gel des Kinase-Aktivitätstests zu erkennen (Abb. 16). Auf dem zugehörigen Autoradiogramm ist in Gegenwart der anderen Kinasen, jedoch keine Phosphorylierung von LmxMPK7 festzustellen, obgleich LmxMKK, LmxMKK4, LmxGSK3 $\alpha$  und LmxGSK3 $\beta$  aktiv sind und eine Phosphorylierungsaktivität gegenüber MBP bzw. sich selbst aufweisen.

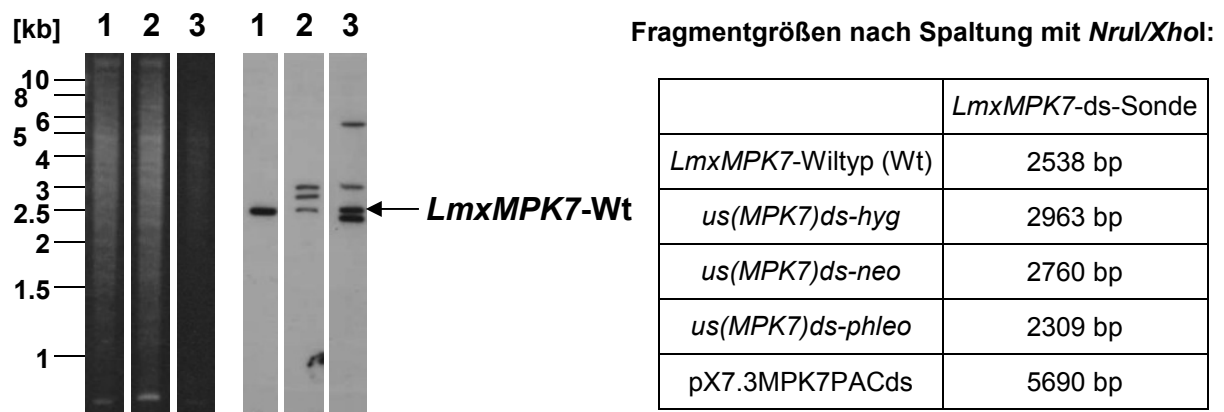
### 3.1.2 *In vivo*-Untersuchungen

#### 3.1.2.1 Versuch der Deletion von LmxMPK7 in *Leishmania mexicana*

Es ist nicht möglich ein essentielles Protein durch Gen-Knockout beider Allele zu entfernen, da die entstehenden Mutanten nicht überleben. *LmxMPK7* liegt in einfacher Kopienzahl im *L. mexicana* Genom vor. Das erste Allel von *LmxMPK7* wurde erfolgreich mittels homologer Rekombination durch das für die Hygromycin B Phosphotransferase codierende Resistenzgen ersetzt (Durchführung von M. Kruse). In mehreren unabhängigen Anläufen wurde versucht, das zweite Allel von *LmxMPK7* gegen verschiedene Antibiotikaresistenzgene auszutauschen – jedoch immer ohne Erfolg. Für die gewachsenen Klone zeigt sich im Southern Blot, mit gegen die stromab-Region von *LmxMPK7* gerichteter Sonde, zumeist folgendes Bild: Vorliegen des neu eingebrachten, zweiten Resistenzgens bei Erhalt des *LmxMPK7*-Wildtyp-Gens (Abb. 17, Spur 2).

Als Alternative wurde versucht das einzelne, verbliebene genomische Allel von *LmxMPK7* nach Einbringung einer extrachromosomalen Kopie auf Plasmid zu deletieren. Hierzu war bereits vor Beginn dieser Arbeit das Plasmid pX7.3MPK7PACds, welches *LmxMPK7* und ~1500 bp der sich anschließenden stromab-Region trägt, in Einzeldelentionsmutanten von *LmxMPK7* transfiziert worden (durchgeführt von M. Kruse). Diese Einzeldelentionsmutanten trugen auf einem Allel anstelle von *LmxMPK7* das Phleomycin-bindende Protein-Resistenzgen (Phleo). In mehreren unabhängigen Runden (zwei davon, von mir durchgeführt) wurde versucht, in diesen Mutanten das zweite Allel von *LmxMPK7* durch ein Resistenzgen codierend für die Neomycin Phosphotransferase (Neo) bzw. die Hygromycin B Phospho-

transferase (Hyg) zu ersetzen. Für die resultierenden Klone kann im Southern Blot mit Hilfe der *LmxMPK7*-stromab-(ds)-Sonde zwar der Nachweis einer genomischen Integration des jeweiligen Resistenzgens erbracht werden, jedoch haben alle diese Klone, wie man sieht, ebenfalls die genomische Kopie von *LmxMPK7* behalten (Abb. 17, Spur 3). Eine Erklärung wäre, dass eine ausreichende Expression von *LmxMPK7* vom Plasmid nicht gewährleistet ist. Möglicherweise besitzt die auf dem Plasmid vorhandene stromab-Region eine regulatorische Funktion und inhibiert die Expression von *LmxMPK7*. Daher wurden im nächsten Schritt Plasmide generiert, die *LmxMPK7* ohne flankierenden Bereich tragen.



**Abb. 17: Southern Blot-Analyse, exemplarisch für zwei Klone nach Versuch der genomischen Deletion von *LmxMPK7*.** Auftrennung *NruI/XhoI*-geschnittener Leishmanien-DNA über ein 0,7 %-iges Agarose-Gel (links dargestellt). Rechts gezeigter Film wurde 30 min exponiert und zeigt die Detektion mit der *LmxMPK7*-downstream(ds)-Sonde. Diese DIG-markierte Sonde hybridisiert in der stromab-Region von *LmxMPK7* und wurde mit den Oligonukleotiden Mapkin153105\_8.for und MPK7s.rev generiert. Spur 1: *L. mexicana* Wildtyp; 2:  $\Delta LmxMPK7(+/-)hyg$  transfiziert mit Deletionskonstrukt *us(MPK7)ds-neo*; 3:  $\Delta LmxMPK7(+/-)phleo$  + pX7.3MPK7PACds transfiziert mit Deletionskonstrukt *us(MPK7)ds-hyg*. Die Tabelle zeigt eine Übersicht der erwarteten Fragmentgrößen.

Um *LmxMPK7* besser nachweisen zu können, wurde die Kinase mit dem TY-Tag versehen. Beim TY-Tag handelt es sich um die Aminosäuresequenz EVHTNQDPLD des Hauptstrukturproteins des Ty1 Virus-ähnlichen Partikels von *Saccharomyces cerevisiae* (Brookman et al., 1995). Der Tag wurde für den Nachweis von Proteinen in *T. brucei* entwickelt (Bastin et al., 1996). Das TY-Epitop kann durch den monoklonalen Antikörper BB2 nachgewiesen werden. Der BB2-Antikörper kam im Rahmen dieser Arbeit im Immunoblot und in der Immunfluoreszenzanalyse zur Detektion von TY-markiertem *LmxMPK7* zum Einsatz.

### 3.1.2.2 Episomale Expression von *LmxMPK7* in *Leishmania mexicana*

#### 3.1.2.2.1 Herstellung von Plasmiden zur episomalen Expression

Um eine funktionelle Beeinträchtigung der Kinase durch das Vorhandensein des TY-Tags nachträglich ausschließen zu können, wurden dreierlei Konstrukte generiert: Die resultierenden Plasmide pX2MPK7-ds, pX10MPK7TYN-ds und pX6MPK7TYC-ds tragen *LmxMPK7*

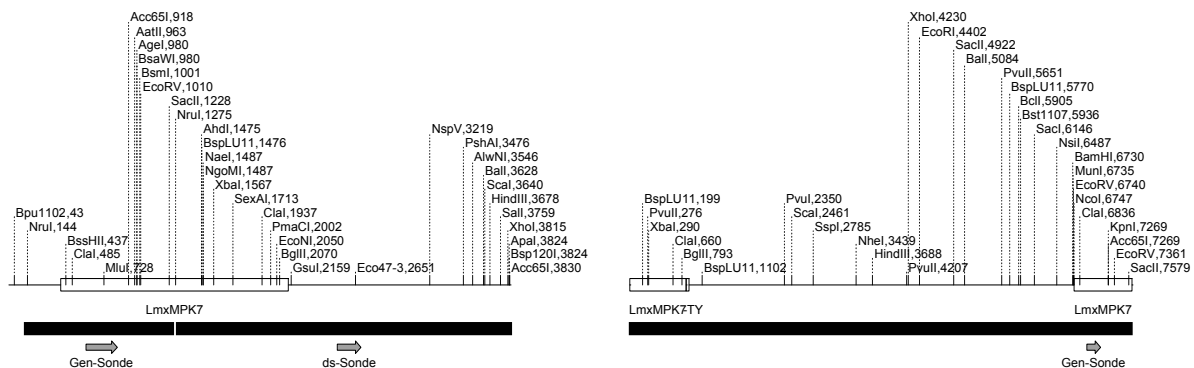
ohne zugehörige stromab(ds)-Region. Die jeweiligen Plasmidkarten finden sich im Anhang. In den beiden letztgenannten Plasmiden ist *LmxMPK7* mit einem N-terminalen (TYN) bzw. C-terminalen (TYC) TY-Tag ausgestattet. Die ds-Region wurde wie folgt aus den bereits im Labor vorliegenden, *LmxMPK7* mit ds-Region tragenden Plasmiden pX7.3MPK7PACds und pX9TYMPK7PACds (mit N-terminalem TY-Tag) entfernt: In der MCS befindet sich in beiden Konstrukten eine *MunI*-Schnittstelle. Diese geht dem 5'-Ende von *LmxMPK7* voran. In einer PCR mit dem Primerpaar pXPHLEO2 und MPK7MunI.rev und dem Plasmid pX7.3MPK7PACds bzw. pX9TYMPK7PACds als Vorlage wurde jeweils das offene Leseraster von *LmxMPK7* amplifiziert und eine neue *MunI*-Schnittstelle am 3'-Ende des Kinasegens eingeführt. Die Produkte wurden mittels TOPO-Klonierung in pCR2.1 eingebracht. Die resultierenden Konstrukte pCR2.1MPK7+MunI-ds und pCR2.1MPK7TY+MunI-ds wurden jeweils mit *MunI* geschnitten, das *LmxMPK7* tragende Fragment über Gelextraktion aufgereinigt und mit dem mit *MunI* linearisierten und SAP behandelten Plasmid pX63polpac ligiert. Die Orientierung des Inserts wurde mittels Restriktionsenzymsspaltung überprüft. Auf diesem Wege entstanden die Plasmide pX2MPK7-ds und pX10MPK7TYN-ds.

Im Folgenden wird die Herstellung des Konstrukts zur Expression und anschließenden Synthese von *LmxMPK7* mit C-terminalem TY-Tag beschrieben. Zu Beginn der Arbeit lag das den offenen Leserahmen sowie die stromauf- und stromab-Region von *LmxMPK7* tragende Plasmid pBSH19mapkin153105 vor. Ein das 3'-Ende und den angrenzenden Teil der stromab-Region von *LmxMPK7* umfassendes Fragment wurde durch Spaltung von pBSH19mapkin153105 mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *XbaI* und anschließender Aufreinigung mittels Gelextraktion erzeugt (Durchführung von M. Kruse). Dieses Fragment wurde mit dem mit *PstI* und *XbaI* linearisierten, SAP-behandelten pBSKII(+)-BspLU11I-Plasmid, dem die *BspLU11I* Schnittstelle fehlt, ligiert. Das resultierende Plasmid hieß pBMPK7CtermXbaIPstI und diente als Vorlage für die nachfolgende PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden *LmxMPK7ctag.for* und *LmxMPK7ctag2.rev*. Der vorwärtsgerichtete Primer *LmxMPK7ctag.for* codiert an seinem 5'-Ende für die zusätzlichen Restriktionsenzym-schnittstellen *SpeI*, gefolgt von *BamHI* und *BclI* und der rückwärtsgerichtete Primer *LmxMPK7ctag.rev* für *SpeI* gefolgt von *BspLU11I*. Die 3'-Komponente der Primersequenzen ist komplementär zur Vorlage. Über genannte PCR und anschließende Spaltung des Produkts mit *SpeI* und Religation wurden Schnittstellen für *BspLU11I*, *SpeI* (umfasst Stoppcodonsequenz), *BamHI* und *BclI* am 3'-Ende von *LmxMPK7* generiert. Das resultierende Konstrukt pB1pXMPK7CtermfTY wurde durch Sequenzierung überprüft. Nachfolgend wurde pB1pXMPK7CtermfTY mit *BspLU11I* und *BamHI* geöffnet und die annealten, die TY-Tag-Sequenz tragenden Oligonukleotide TY.for und TY.rev an das 3'-Ende des *LmxMPK7*-Fragments ligiert. Das entstandene Konstrukt pB3pXMPK7CTY wurde durch Sequenzierung überprüft und in den Dam-Methylase negativen *E. coli*-Stamm INV110 transformiert. Die

hieraus aufgereinigte Plasmid-DNA wurde mit *BclI* und *ClaI* gespalten und das, das modifizierte 3'-Ende tragende Fragment nach Gelaufftrennung isoliert. Durch Spaltung des Plasmids pX7.3LmxMPK7PACds mit *ClaI* und *BglII* und anschließende Isolierung eines 7385 bp großen Fragments aus dem Gel wurde die stromab-Region von *LmxMPK7* entfernt. Anschließend erfolgte die Ligation dieses aufgereinigten Fragments mit dem die TY-Tag-Sequenz tragenden Fragment des 3'-Endes. Das Endkonstrukt pX6MPK7TYC-ds wurde durch Sequenzierung kontrolliert.

### 3.1.2.2.2 In der Southern Blot-Analyse eingesetzte spezifische Sonden

Die Southern Blot-Analyse erfolgte mit DIG-markierten DNA-Sonden. Eine *LmxMPK7*-downstream-(ds)-Sonde existierte bereits zu Beginn der Arbeit. Zusätzlich wurde eine Sonde hergestellt, welche innerhalb des ORF von *LmxMPK7* hybridisiert (Abb. 18). Diese *LmxMPK7*-Gen-Sonde wurde mit den Oligonukleotiden mapkin153105\_5.for und Mpk7\_1.rev generiert. Ein durch Spaltung mit *Acc65I* und *XhoI* und anschließende Gelextraktion gewonnenes Fragment von *LmxMPK7* aus dem Plasmid pBSH19mapkin153105 diente als Vorlage für die PCR. Unter Verwendung des resultierenden PCR-Produkts als Vorlage, der bereits erwähnten Primer und des DIG-Kits der Fa. Roche wurde anschließend in einer zweiten PCR die Digoxigenin-markierte DNA-Sonde hergestellt.



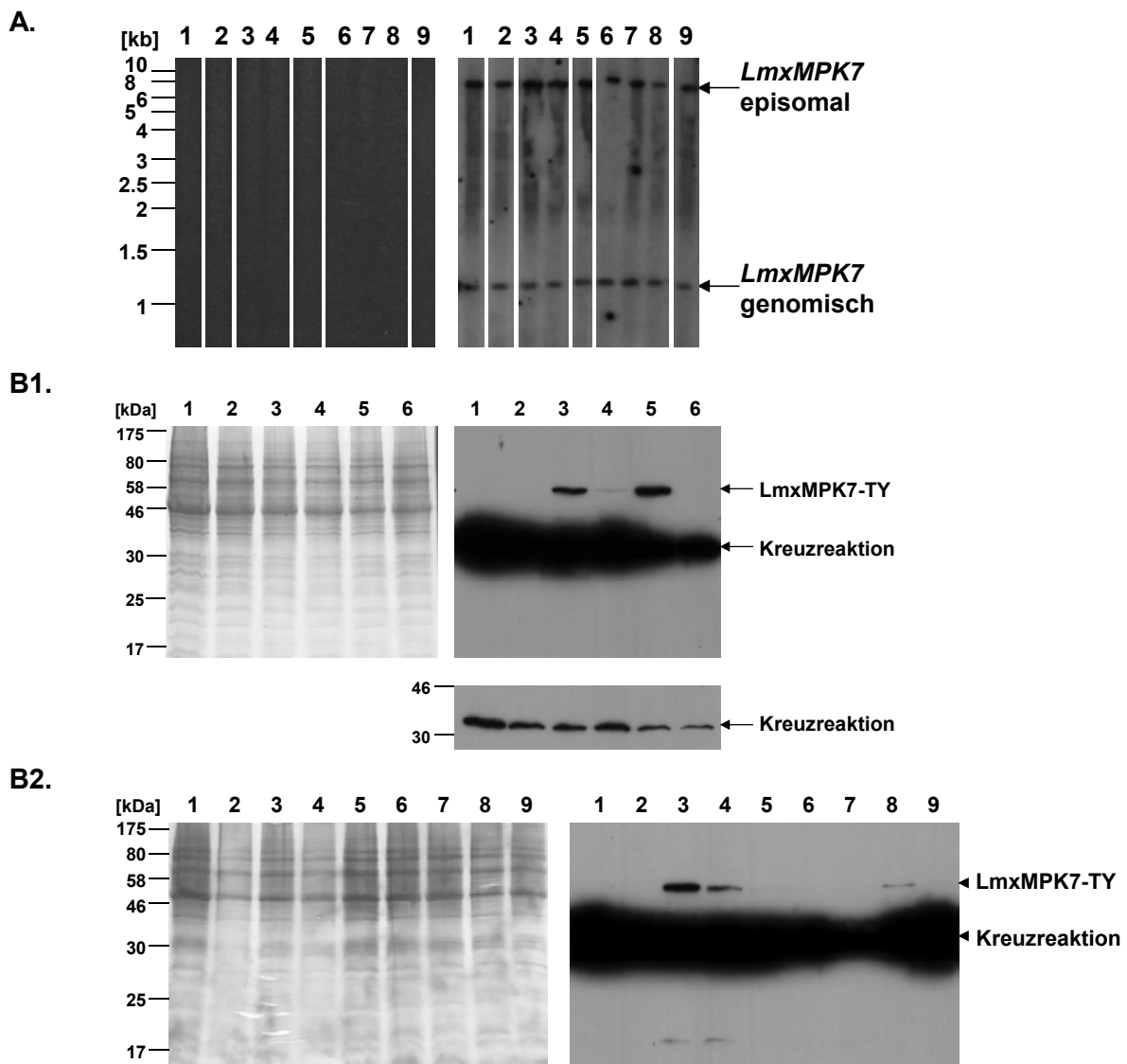
**Abb. 18:** Schematische Darstellung der genomischen und extrachromosomalen Kopie von *LmxMPK7* (weißer Balken) mit Enzymschnittstellen und benutzten Sonden (graue Pfeile). Die resultierenden Fragmente nach Spaltung mit *NruI*/*XhoI* (links) bzw. *NruI* (rechts) sind als schwarze Balken dargestellt.

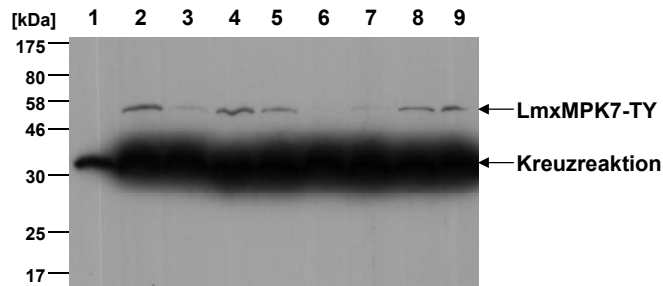
Für die Durchführung des Southern Blots wurden genomische und extrachromosomale DNA aus Wildtyp-Promastigoten und Mutanten präpariert und mit der Restriktionsendonuklease *NruI* (Nachweis mit Gen-Sonde) bzw. *NruI* und *XhoI* (Nachweis mit ds-Sonde) über Nacht gespalten. *NruI* schneidet im ORF und der stromauf-Region von *LmxMPK7*. Die *XhoI*-Schnittstelle befindet sich in der stromab-Region (schematisch dargestellt in Abb. 18). Die unterschiedlichen Größen von *LmxMPK7*, *neo*, *phleo* und *hyg* machen es möglich, nach Enzymspaltung, Fragmente unterschiedlicher Größe zu detektieren. Die Plasmide zur extrachromosomalen Expression, ohne die stromab-Region, besitzen lediglich die *NruI*-Schnitt-

stelle im ORF von *LmxMPK7*. Da die Sequenz des TY-Tags nur 30 bp lang ist, ist der Größenunterschied von Plasmid pX2MPK7-ds zu pX6MPK7TYC-ds und pX10MPK7TYN-ds im Southern Blot nicht erfassbar. Das mit *NruI* linearisierte Plasmid pX6MPK7TYC-ds ist exemplarisch in Abb. 18, rechts schematisch dargestellt.

### 3.1.2.2.3 Transfektion von *L. mexicana* und Überprüfung durch Southern Blot- und Immunoblot-Analyse

Die Plasmide pX2MPK7-ds, pX10MPK7TYN-ds und pX6MPK7TYC-ds wurden in den *L. mexicana* Wildtyp und Einzeldelentionsmutanten  $\Delta LmxMPK7(+/-)hyg$  von *LmxMPK7* transfiziert. Die Ausgangsklone 3 und 4 von  $\Delta LmxMPK7(+/-)hyg$  entstammen derselben Transfektionsrunde. Klone, welche das jeweilige Plasmid aufgenommen haben, wurden durch Zugabe des Antibiotikum Puromycin selektioniert. Nach zwei bis drei Wochen Kultivierung unter Selektionsdruck waren für alle Ansätze Klone gewachsen, die nachfolgend im Southern Blot und/oder Immunoblot auf das Vorhandensein des Plasmids und/oder die Synthese des TY-Fusionsproteins getestet wurden.



**B3.**

**Abb. 19: Episomale Expression von *LmxMPK7*.** **A:** Southern Blot-Analyse der Mutanten:  $\Delta LmxMPK7(+/-)hyg$  Klon 3 + pX2MPK7-ds, Klon: 1: 37 2B8, 2: 37 2E10;  $\Delta LmxMPK7(+/-)hyg$  Klon 4 + pX2MPK7-ds, Klon: 3: 47 1E6, 4: 47 1H8.  $\Delta LmxMPK7(+/-)hyg$  Klon 3 + pX10MPK7TYN-ds, Klon: 5: 3TYN 1A4, 6: 3TYN 1E9, 7: 3TYN 1G12;  $\Delta LmxMPK7(+/-)hyg$  Klon 4 + pX10MPK7TYN-ds, Klon: 8: 4TYN 1B2, 9: 4TYN 2G7. Spaltung der gDNA mit *Nrul* und Nachweis mit *LmxMPK7*-Gensonde. Links: Agarose-Gel, rechts: Film nach 2 h 30 min Exposition. **B:** Nachweis durch Immunoblot mittels anti-TY-Antikörper (BB2) 1 : 500 in Promastigotenlysaten der Klone: **B1:** 1: *LmxWt*, 2: 3TYN 1A4, 3: 3TYN 1E9, 4: 3TYN 1G12, 5: 4TYN 1B2, 6: 4TYN 2G7. **B2:** 1: *LmxWt*;  $\Delta LmxMPK7(+/-)hyg$  Klon 3 + pX6MPK7TYC-ds, Klon: 2: 3TYC 1C5, 3: 3TYC 2B11, 4: 3TYC 2G7, 5: 3TYC 2H4;  $\Delta LmxMPK7(+/-)hyg$  Klon 4 + pX6MPK7TYC-ds, Klon: 6: 4TYC 1A11, 7: 4TYC 1F2, 8: 4TYC 2A4, 9: 4TYC 2H6. **B3:** 1: *LmxWt*; *LmxWt* + pX6MPK7TYC-ds, Klon: 2: C1, 3: C2, 4: C3, 5: C4; *LmxWt* + pX10MPK7TYN-ds, Klon: 6: A1, 7: A2, 8: A3, 9: A4. B1 und B2 links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel, rechts: B1: Film nach 30 min und unten: Filmausschnitt nach 1 s Exposition, B2: Film nach 30 min und B3: nach 1 h Exposition.

Der Nachweis von Plasmid pX2MPK7-ds (Abb. 19, A, Spur 1-4) bzw. pX10MPK7TYN-ds (Spur 5-9) in den damit transfizierten Einzeldelektionsklonen fällt positiv aus. Im Southern Blot konnte für alle getesteten Klone eine korrespondierende Bande auf Höhe von 7629 bp detektiert werden. Das anstelle von *LmxMPK7* auf einem Allel bereits vorliegende Hygromycin-Resistenzgen ist mit der benutzten *LmxMPK7*-Gensonde nicht nachzuweisen, jedoch das zweite Allel von *LmxMPK7* auf Höhe von 1129 bp (Abb. 19, A).

Im Immunoblot mit gegen das TY-Epitop gerichtetem BB2-Antikörper ist für alle Zelllysate von *L. mexicana* auf dem Film die sehr stark ausfallende Schwärzung einer Kreuzreaktions-Bande auf Höhe von ~33 kDa zu erkennen (Abb. 19, B). Der TY-Antikörper erkennt das Peptid HTNQDP. Die *L. mexicana* Datenbank wurde nach Proteinen durchsucht (mit BLASTP 2.0MP-WashU), welche dieses Peptid besitzen. Es zeigte sich, dass in LmxM.16.1390 ein ähnliches Peptid (HNQDP) vorhanden ist. Für LmxM.16.1390 wird ein 32,6 kDa großes Protein vorhergesagt, bei welchem es sich um eine putative EMG1/NEP1-Methyltransferase handelt. Sein Homolog in *T. brucei* Tb927.8.5040 besitzt anstelle von HNQDP die Sequenz YKQDP.

Das TY-Fusionsprotein von *LmxMPK7* ist rechnerisch 65,9 kDa groß und läuft im Gel auf einer Höhe von knapp 58 kDa. Obgleich für alle der Klone  $\Delta LmxMPK7(+/-)hyg$  + pX10MPK7TYN-ds das Vorliegen des Plasmids durch Southern Blot-Analyse bestätigt worden ist, kann im Immunoblot *LmxMPK7* mit N-terminalem TY-Tag nicht in all diesen Klonen nachgewiesen werden (Abb. 19, B1). Für die Klone 3TYN 1E9, 3TYN 1G12 und 4TYN 1B2, mit positivem Nachweis von TY-*LmxMPK7*, fällt die zum TY-Fusionsprotein korrespondierende Bande unterschiedlich stark aus. Laut Coomassie-gefärbtem SDS-PA-

Gel ist pro Spur annähernd die gleiche Proteinmenge geladen. Ein ähnliches Bild liefern die Puromycin-resistenten Klone  $\Delta LmxMPK7(+/-)hyg + pX6MPK7TYC$ -ds (Abb. 19, B2). Auch diese zeigen im Immunoblot ein sehr variables Expressionslevel an TY-LmxMPK7-Fusionsprotein. Die Bande des am C-Terminus markierten LmxMPK7-Proteins fällt am stärksten für die Klone 3TYC 2B11 und 3TYC 2G7 aus. Der Klon 4TYC 2A4 erreicht im Vergleich, laut densitometrischer Auswertung, 8 bzw. 15 % der Schwärzung dieser beiden Klone auf Höhe von LmxMPK7-TY. Auch Zellen von *L. mexicana* Wildtyp konnten erfolgreich mit dem Plasmid  $pX6MPK7TYC$ -ds (Abb. 19, B3, Spur 2-5) bzw.  $pX10MPK7TYN$ -ds (Spur 6-9) transfiziert werden. Im Immunoblot besitzen alle erzeugten Klone eine Bande auf Höhe von LmxMPK7-TY, wenngleich auch hier Quantitätsunterschiede bestehen. Die Bande der Kreuzreaktion fällt für alle diese Klone annähernd gleich stark aus.

#### 3.1.2.2.4 Abnahme der nachgewiesenen Proteinmenge im Kulturverlauf

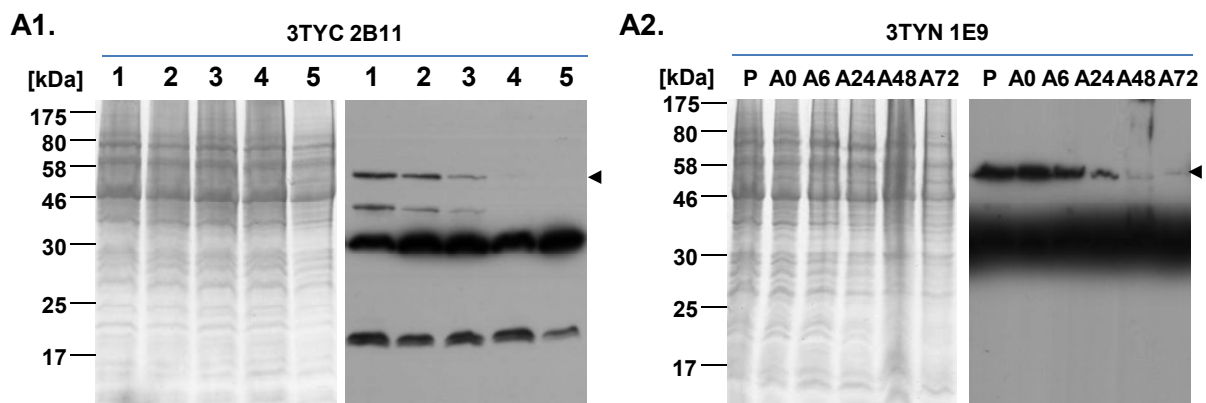
Den in 3.1.2.2.3 mittels Immunoblot analysierten Proben lagen Promastigotenlysate logarithmisch wachsender Kulturen zugrunde. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Entwicklung der Proteinmenge von LmxMPK7-TY im Kulturverlauf in beiden Lebensstadien von Klonen der Mutante  $\Delta LmxMPK7(+/-)hyg + pX6MPK7TYC$ -ds bzw.  $\Delta LmxMPK7(+/-)hyg + pX10MPK7TYN$ -ds erfasst. Die Kultivierung der Promastigoten bzw. die Differenzierung der Promastigoten zu axenischen Amastigoten erfolgte in Gegenwart der Selektionsantibiotika. Angeimpft wurde mit einer niedrigen Zelldichte und das Wachstum bis zum Erreichen einer hohen Zelldichte und der stationären Phase verfolgt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben gleicher Zellzahl entnommen und Gesamtzelllysate für die Immunoblot-Analyse hergestellt. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Gemäß Coomassie-Färbung der Proteingele (nach erfolgtem Blotvorgang) wurde für alle Proben annähernd die gleiche Proteinmenge geladen. Abweichungen hiervon sind vermerkt.

Die Probenentnahme im zeitlichen Verlauf einer Promastigotenkultur von Klon 3TYC 2B11 liefert im Immunoblot folgendes Ergebnis: Die Bande auf Höhe von LmxMPK7-TY nimmt mit der Zeit und zunehmender Zelldichte ab (Abb. 20, A1). Bei der Probe nach 80 h und einer Zellzahl von  $8,9 \times 10^7$  Zellen/ml (Spur 5) ist schließlich keine Bande mehr auf dem Film zu erkennen. In Spur 5 fällt die aufgetragene Proteinmenge vergleichsweise etwas niedriger aus (siehe Coomassie-Färbung). Zur für den BB2 Antikörper bekannten Kreuzreaktionsbande bei 33 kDa gesellen sich bei dem Klon 3TYC 2B11 zusätzliche Banden auf Höhe von ~44 kDa und ~20 kDa. Die Abnahme von LmxMPK7-TY über die Kulturzeit bestätigte sich für alle im Immunoblot getesteten Klone. Für 3TYN 1E9 wurde, genauso wie für 3TYC 2B11, ein Wachstumsversuch mit Promastigoten durchgeführt (nicht gezeigt). Für 4TYC 2A4 und 4TYN 1B2 wurden Proben bei einer Zelldichte von  $1,5 \times 10^7$  und  $6,5 \times 10^7$  Zellen/ml



entnommen und verglichen (nicht gezeigt). Für 4TYC 2A4 fanden sich dieselben Kreuzreaktionsbanden wie für 3TYC 2B11. Für die beiden Klone mit N-terminalen TY-Tag fanden sich zusätzliche Banden auf Höhe von 33 kDa, ~44 kDa und <17 kDa.

Für die Differenzierung von Promastigoten des Klons 3TYN 1E9 zu Amastigoten (Abb. 20, A2) ist auf dem Film eine Abnahme der Schwärzung auf Höhe von TY-LmxMPK7 ab 24 h (A24) nach Erniedrigung des pH-Werts und Erhöhung der Temperatur zu sehen. Nach 72 h Differenzierung fanden sich lichtmikroskopisch Zellen mit typischer Amastigoten-Morphologie. In der Probe aus Amastigoten nach 72 h (A72) fällt die Bande auf Höhe von TY-LmxMPK7 im Vergleich zu Promastigoten (P) um ein mehrfaches aus.



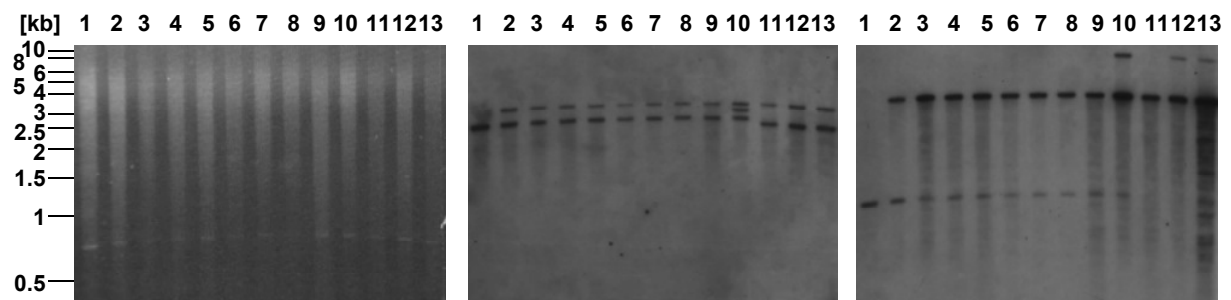
**Abb. 20: Immunoblot zum Nachweis von episomal exprimiertem LmxMPK7-TY im Kulturverlauf.** Proben wurden aus einer Promastigotenkultur der Mutante  $\Delta LmxMPK7(+/-)hyg + pX6MPK7TYC$ -ds Klon 3TYC 2B11 (**A1**) bzw. einer sich in Differenzierung zu Amastigoten befindlichen Kultur von  $\Delta LmxMPK7(+/-)hyg + pX10MPK7TYN$ -ds Klon 3TYN 1E9 entnommen (**A2**). **A1:** Angeimpft wurde mit  $0,7 \times 10^7$  Z/ml Promastigoten einer stationär wachsenden Kultur. Ernte zum Zeitpunkt (Zelldichte): 1: 8 h ( $1 \times 10^7$  Z/ml); 2: 24 h ( $2,3 \times 10^7$  Z/ml); 3: 32 h ( $2,9 \times 10^7$  Z/ml); 4: 48 h ( $6 \times 10^7$  Z/ml); 5: 80 h ( $8,9 \times 10^7$  Z/ml). **A2:** Angeimpft wurde mit Promastigoten einer logarithmisch wachsenden Kultur. Ernte von P: Promastigoten mit einer Zelldichte von  $2,6 \times 10^7$  Z/ml bzw. nach Beginn der Differenzierung zum Zeitpunkt (Zelldichte): A0: 0 h ( $0,35 \times 10^7$  Z/ml); A6: 6 h ( $0,6 \times 10^7$  Z/ml), A24: 24 h ( $1 \times 10^7$  Z/ml), A48: 48 h ( $2,3 \times 10^7$  Z/ml), A72: 72 h ( $2,5 \times 10^7$  Z/ml). Nachweis mit anti-TY-Antikörpers BB2 1:500. Links: Coomassie-gefärbtes SDS-PA-Gel. Rechts: Film nach 30 min Exposition.

### 3.1.2.3 Genomische Deletion von *LmxMPK7* bei gleichzeitiger episomaler Expression

Das Gen von *LmxMPK7* wird extrachromosomal abgelesen und das Protein erfolgreich in den genomischen Einzeldelentionsmutanten exprimiert. Auf Basis des episomalen Expressionshintergrunds wurde im nächsten Schritt versucht, die verbliebene genomische Kopie von *LmxMPK7* zu deletieren. In die mit dem Plasmid *pX2MPK7*-ds, *pX10MPK7TYN*-ds bzw. *pX6MPK7TYC*-ds transfizierten Einzeldelentionsmutanten  $\Delta LmxMPK7(+/-)hyg$  sollte durch homologe Rekombination das für die Neomycin Phosphotransferase (*neo*) bzw. das für das Phleomycin-bindende Protein (*phleo*) codierende Resistenzgen, flankiert von der stromauf- und stromab-Region von *LmxMPK7*, genomisch integriert und dadurch das *LmxMPK7*-Allel ersetzt werden. Die von M. Kruse hergestellten Deletionskonstrukte *pB1NNLmxMPK7Nterm*-

NEO und pB3NNLmxMPK7NtermPHLEO wurden mit *EcoRV* und *Scal* geschnitten und über Gelextraktion die Resistenzgenkassette für die Deletion isoliert. Die linearen Fragmente *us(MPK7)ds-neo* und *us(MPK7)ds-phleo* wurden zur Elektroporation verwendet.

Für die Transfektion der Klone 37 2B8, 47 1H8, 4TYN 1B2 (zweimalig) und 3TYN 1E9 (zweimalig) mit dem Fragment *us(MPK7)ds-phleo* und der Klone 4TYN 1B2, 3TYC 2B11 und 3TYC 2G7 mit dem Fragment *us(MPK7)ds-neo* waren keine Elektroporationsklone gewachsen. Für den mit *us(MPK7)ds-neo* transfizierten Klon 3TYN 1E9 wurden nach der Elektroporation sieben Klone gezählt. Die Kulturen dieser Klone machten einen „kränklichen“ Eindruck. Es fanden sich vermehrt abgerundete, aufgeblähte und stark granuliert Zellen – ein morphologisches Bild, welches zu dem sterbender Zellen passt. Für den Klon 4TYC 2A4 gingen aus der Transfektion mit *us(MPK7)ds-neo* ein Klon und mit *us(MPK7)ds-phleo* drei Klone hervor. Die gewachsenen Klone wurden mittels Southern Blot-Analyse auf ihre genetische Konstellation hinsichtlich *LmxMPK7* untersucht. Die Detektion erfolgte mit der *LmxMPK7*-stromab(ds)- und anschließend der *LmxMPK7*-Gen-Sonde.



Fragmentgrößen nach Spaltung mit *NruI/XhoI*:

	MPK7-ds-Sonde	MPK7-Gen-Sonde
<i>LmxMPK7</i> -Wt	2538 bp	1129 bp
<i>us(MPK7)ds-hyg</i>	2963 bp	-
<i>us(MPK7)ds-neo</i>	2760 bp	-
<i>us(MPK7)ds-phleo</i>	2309 bp	-
pX $\square$ MPK7TY $\square$ -ds	-	3395 bp

**Abb. 21:** Southern Blot-Analyse der *LmxMPK7* episomal exprimierenden Klone auf genomische Deletion von *LmxMPK7*. 1: *LmxWt*. 2:  $\Delta$ *LmxMPK7*(+/-)*hyg* + pX10MPK7TYN-ds Klon 3TYN 1E9; Klon 3TYN 1E9 + *us(MPK7)ds-neo* Klone 3: A10, 4: C4, 5: C7, 6: D5, 7: E10, 8: F7, 9: F10.  $\Delta$ *LmxMPK7*(+/-)*hyg* + pX6MPK7TYC-ds Klon 4TYC 2A4 transfiziert mit *us(MPK7)ds-neo* 10: Klon H8 bzw. mit *us(MPK7)ds-phleo* Klone 11: B10, 12: D3, 13: H8. Links: Auftrennung der *NruI/XhoI*-geschnittenen Leishmanien-DNA über ein 0,7 %-iges Agarose-Gel. Mitte: 4 h exponierter Film nach Detektion mit *LmxMPK7*-ds-Sonde. Rechts: Film nach 2 h Exposition und Detektion mit *LmxMPK7*-Gen-Sonde. Die Tabelle zeigt eine Übersicht der zu detektierenden Fragmentgrößen.

Mit der ds-Sonde wird für alle Klone der Transfektion eine Bande korrespondierend zum 2963 bp großen Hyg-Resistenzgen-tragenden Fragment nachgewiesen (Abb. 21, Mitte, Spur 2-13). Für die Abkömmlinge von Klon 3TYN 1E9 (Spur 2-9) findet sich für die Neomycin-

Resistenz keine Bande bei 2760 bp. Anders für den Neomycin-resistenten Klon H8 (Spur 10), der sich von Klon 4TYC 2A4 ableitet, für diesen ist eine Bande bei 2760 bp auf dem Film vorhanden. In Spur 1-10 wird mit der ds-Sonde eine 2538 bp-Bande und mit der Gen-Sonde (Abb. 21, Film rechts) eine 1129 bp-Bande detektiert. Die jeweilige Bande entspricht in ihrer Größe dem zugehörigen Fragment von *LmxMPK7* am genomischen Lokus des Wildtyps (Spur 1). Offensichtlich wurde der ORF von *LmxMPK7* nicht wie gewünscht durch das Neomycin-Resistenzgen ersetzt. Somit sind die Neomycin-resistenten Klone keine genomischen Doppeldelensionsklone von *LmxMPK7*.

Für die Abkömmlinge von Klon 4TYC 2A4, in welche das Phleomycin-Resistenzgen eingebracht worden war und die in Gegenwart von Phleomycin angewachsen waren, kann mit der ds-Sonde eine Bande auf Höhe von ~2300 bp detektiert werden (Abb. 21, Mitte, Spur 11-13). Diese Bande entspricht der Größe nach dem *phleo*-tragenden Fragment. Sowohl mit der *LmxMPK7*-ds-Sonde (Film Mitte) als auch mit der *LmxMPK7*-Gen-Sonde (Film rechts) kann kein 2538 bp- bzw. 1129bp-Fragment nachgewiesen werden, welches den ORF von *LmxMPK7* am genomischen Lokus trägt (Spur 11-13).

Für alle transfizierten Mutanten (rechter Film, Spur 2-13) ist mit der Gen-Sonde eine Bande auf Höhe von 3395 bp sichtbar. Diese Bande entspricht der Größe nach, der des *LmxMPK7*-tragenden Fragments aus der *Nrul/XhoI*-Spaltung des pX-Plasmids. Die extrachromosomale Kopie von *LmxMPK7* liegt somit in allen getesteten Mutanten vor. In Spur 10, 12 und 13 taucht zusätzlich eine Bande auf Höhe von ca. 7700 bp auf. Ein Fragment dieser Größe könnte durch unvollständige Spaltung aus dem *LmxMPK7*-tragenden Plasmid hervorgegangen sein. In Spur 13 (rechter Film) finden sich viele zusätzliche Banden. Möglicherweise wurde der Blot am Rand nicht ausreichend mit Prähybridierungslösung benetzt und dadurch unspezifische Bindungsstellen nicht ausreichend blockiert.

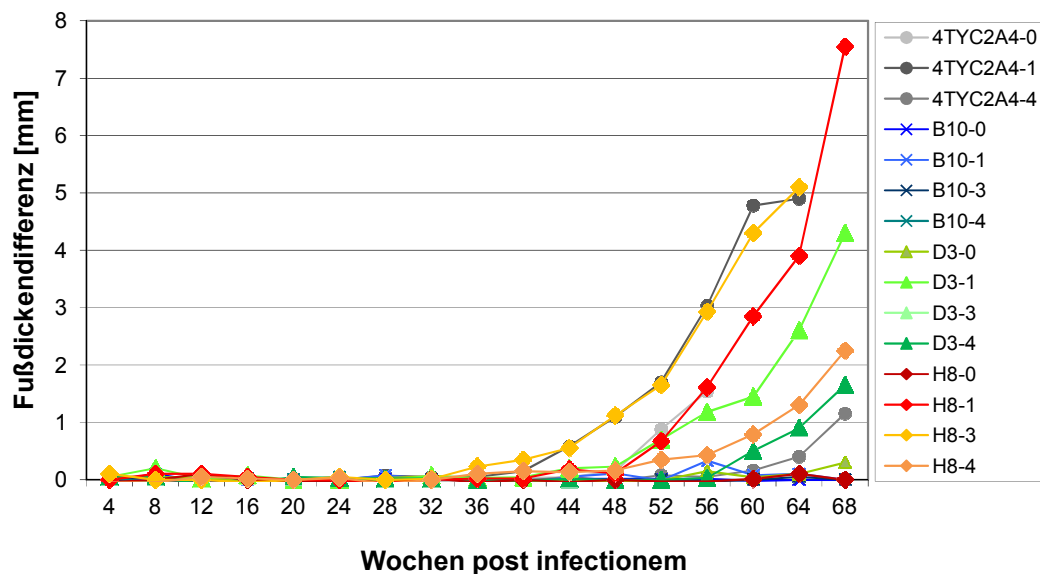
Die erzeugten Mutanten  $\Delta LmxMPK7(-/-)hyg/phleo + pX6MPK7TYC$ -ds Klon B10, D3 und H8 tragen das *LmxMPK7*-Gen somit ausschließlich auf Plasmid.

### 3.1.2.4 Verlust der alleinigen, extrachromosomalen Kopie von *LmxMPK7* in Pro- und Amastigoten der Mutante $\Delta LmxMPK7(-/-)hyg/phleo + pX6MPK7TYC$ -ds

#### 3.1.2.4.1 Mausinfektionsexperiment

*In vitro* vermögen Promastigoten der Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-)hyg/phleo + pX6MPK7TYC$ -ds die zur Ausbildung der amastigoten Morphologie notwendigen Differenzierungsvorgänge zu durchlaufen. Es stellte sich die Frage, ob Promastigoten dieser Mutante auch in der Lage sind Mausemakrophagen *in vivo* zu infizieren und sich in ihnen zu vermehren? Um dies zu beantworten wurden je vier BALB/c-Mäuse mit den Klonen B10, D3 und H8 der Mutante

infiziert. Als Kontrolle erfolgte die Infektion dreier BALB/c-Mäuse mit der Mutante  $\Delta LmxMPK7(+/-)hyg + pX6MPK7TYC$ -ds Klon 4TYC2A4, welche zusätzlich zur episomalen Kopie noch genomisch ein Allel von *LmxMPK7* trägt. Die Leishmanien befanden sich zum Zeitpunkt des Infektionsexperiments ca. 34 Wochen in Kultur bei etwa zweimaliger Passage pro Woche. Es wurden jeweils  $1 \times 10^7$  Promastigoten einer Kultur mit Zelldichte  $9-10 \times 10^7$  Zellen/ml in die Fußsohle des linken Hinterlaufs einer weiblichen BALB/c-Maus injiziert. Über 68 Wochen wurde die Fußdickendifferenz zum nicht infizierten rechten Hinterlauf gemessen. Die Fußdickendifferenz und damit der Infektionsverlauf ist für die einzelnen Mäuse in Abb. 22 wiedergegeben.



**Abb. 22:** Infektionsverlauf in mit  $\Delta LmxMPK7(-/-)Hyg/Phleo + pX6MPK7TYC$ -ds Klon B10, D3 und H8 und  $\Delta LmxMPK7(+/-)hyg + pX6MPK7TYC$ -ds Klon 4TYC2A4 infizierten BALB/c-Mäusen. post infectionem p. i. (nach Infektion).

Die Maus B10-4 war nach der 24. Woche und die Maus D3-3 bereits nach der 4. Woche verstorben, ohne Läsionen auszubilden. Die Todesursache war unklar. Die Mäuse H8-3 und 4TYC2A4-1 zeigen am mit Leishmanien infizierten Hinterlauf eine Dickenzunahme (Abb. 22). Als diese in eine offene Läsion überging wurden beide Tiere nach Vollendung der 64. Woche getötet. Die Versuchsreihe der Maus 4TYC2A4-0 mit Fußläsion wurde nach der 56. Woche beendet, da das Tier einen Rektumprolaps erlitten hatte. Ab einer Fußdickendifferenz von größer/gleich 0,1 mm zum nicht infizierten Fuß wird im Folgenden von Läsionen gesprochen. Im Infektionsexperiment ist zu sehen, dass die Mäuse der Versuchsreihe Klon B10 bis zur 68. Woche nach Inokulation keine Läsion am linken Hinterlauf ausbilden. Ebenso verhält es sich für die Maus D3-0 und H8-0. Die anderen, mit dem Klon D3 infizierten Mäuse bilden erstmals messbar in der 44. (D3-1) bzw. in der 60. (D3-4) Woche Läsionen aus. Die Mäuse der Reihe Klon H8 zeigen ab der 44. (H8-1) bzw. 36. (H8-3 und H8-4) Woche eine Fußdickenzunahme an der betroffenen Extremität. Alle drei mit Klon 4TYC2A4 infizierten Mäuse bilden Fußläsionen aus, 4TYC2A4-0 beginnend um die 48., 4TYC2A4-1 um die 40. und

4TYC2A4-4 um die 60. Woche. Alle Leishmanienläsionen führen zur fortschreitenden Vermehrung des Fußumfangs. Wildtyp-Promastigoten von *L. mexicana* bilden erfahrungsgemäß bereits in den ersten vier Wochen nach Infektion rasch progrediente Fußläsionen in BALB/c-Mäusen aus (siehe z. B. Infektionsexperiment unter 3.1.2.6.3). Im Vergleich dazu zeigen die mit den Klonen B10, D3, H8 und 4TYC2A4 infizierten Mäuse erst relativ spät erste Anzeichen von Läsionen, nämlich zwischen der 36. und 60. Woche p. i.. Vier der 13 Mäuse etablieren überhaupt keine durch Fußdickenzunahme messbare Infektion.

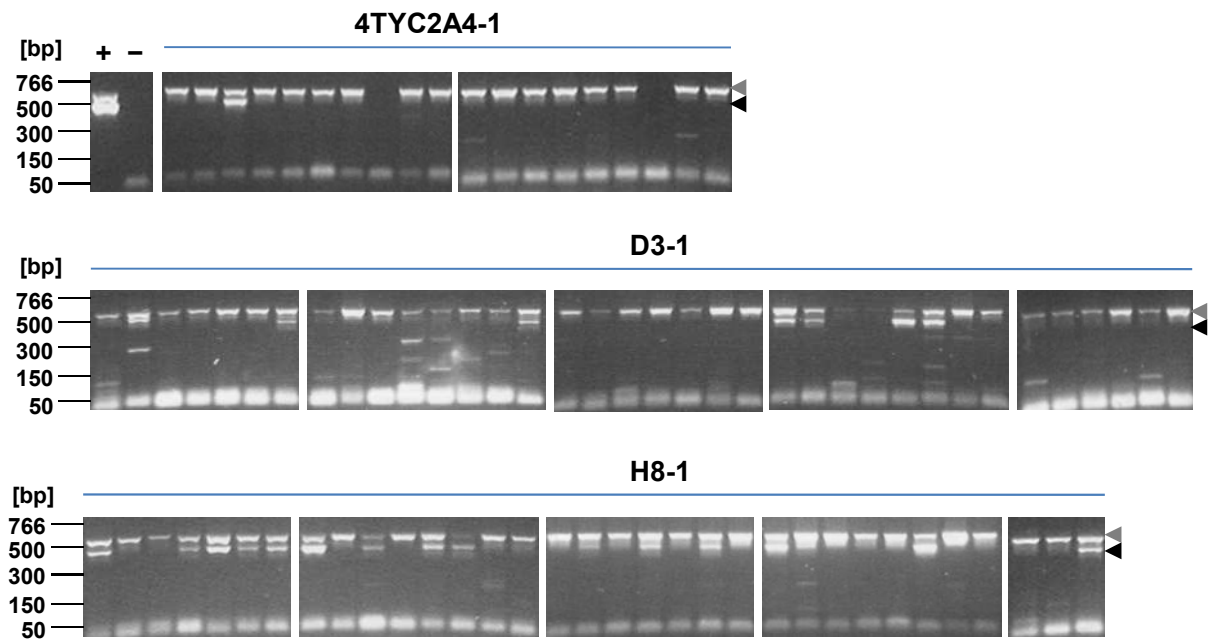
#### 3.1.2.4.2 Kultivierung von Läsionsamastigoten und Plasmidnachweis mittels Einzelzell-PCR

Die Fußläsion der Mäuse D3-1, H8-1 und 4TYC2A4-1 wurde unter Betäubung um die 60. Woche mit einer Kanüle punktiert.

##### Plasmidnachweis mittels PCR-Reaktion

Zum einen wurde das gewonnene Aspirat in SYTO 16-Puffer aufgenommen und die Läsionsamastigoten mit dem grün fluoreszierenden, Nukleinsäure-bindenden Farbstoff SYTO 16 nach Vorschrift gefärbt. Die gefärbten Amastigoten wurden mittels „fluorescent-activated cell sorting-“ FACS-Analyse erfasst und von der Sortiervorrichtung des Geräts je 10 Zellen pro Vertiefung in eine 96-„well“-PCR-Platte überführt.

Nachfolgend wurden die sortierten Zellen über eine PCR-Reaktion mit den Plasmid-spezifischen Oligonukleotiden pXPHLEO2 und Mpk7\_1.rev auf die Anwesenheit von pX6MPK7TYC-ds überprüft (Programm: 10 min 94 °C, 45 x [20 s 94 °C, 20 s 57 °C, 1 min 68 °C], 7 min 68 °C, 4 °C). Bei Vorliegen des Plasmids ist ein 504 bp großes PCR-Produkt zu erwarten. Die parallel durchgeführte Amplifikation einer ~600 bp langen Teilsequenz von *LmxMPK5* mit dem Primerpaar Mpk5\_1.for/Mapkin143105\_3.rev diente als interne Kontrolle und sollte bestätigen, dass genügend Leishmanien-DNA in jeder Vertiefung vorhanden war und die PCR-Reaktion funktionierte. Anschließend wurden die PCR-Produkte über ein Agarose-Gel aufgetrennt (Abb. 23.). In Abb. 23 unten findet sich eine Übersichtstabelle der Resultate. In der Positivkontrolle mit genomischer DNA aus Promastigoten des Klons 4TYC2A4 werden die geforderten Banden auf Höhe von ~500 bp und ~600 bp nachgewiesen (Abb. 23, +). Die Negativkontrolle mit ddH<sub>2</sub>O liefert keine Bande (-), mit Ausnahme einer bei < 50 bp verursacht durch die Oligonukleotide. In der Durchflusszytometrie wurden für den Klon 4TYC2A4-1 20 „wells“ mit Läsionsamastigoten befüllt. Davon liefern in der PCR-Reaktion 17 „wells“ auf Höhe von ~600 bp die Kontrollbande von *LmxMPK5*. Lediglich einer dieser 17 Ansätze liefert zusätzlich ein ~500 bp großes Amplifikat, korrespondierend zur *LmxMPK7*-Plasmid-DNA. 34 der befüllten 36 „wells“ des Klons D3-1 und 33 der 34 „wells“ des Klons H8-1 können aufgrund des PCR-Nachweis der 600 bp-Kontrollbande in die Auswertung einbezogen werden. Eine Bande auf Höhe von ~500 bp findet sich in sechs der 34 Ansätze des Klons D3-1 und 16 der 33 Ansätze des Klons H8-1.



	4TYC2A4-1	D3-1	H8-1
Nachweis der Kontrollbande	17	34	33
Nachweis von pX6MPK7TYC-ds	1	6	16

**Abb. 23:** Einzelzell-PCR auf Läsionsamastigoten-DNA der Klone 4TYC2A4-1, D3-1 und H8-1 zum Nachweis von pX6MPK7TYC-ds. ~600 bp Amplifikat von *LmxMPK5* (graue Pfeilspitze), ~500 bp Amplifikat von pX6MPK7TYC-ds (schwarze Pfeilspitze).

Zusammenfassend liefert die PCR auf Ebene von ganz wenigen (max. 10) Zellen folgendes Ergebnis: Rund 94 % der Läsionsamastigoten von Klon 4TYC2A4-1, welcher *LmxMPK7* auch in genomischer Kopie trägt, haben die extrachromosomale Kopie von *LmxMPK7* verloren. Für die Klone D3-1 und H8-1, welche *LmxMPK7* ausschließlich extrachromosomal tragen, ist festzustellen, dass mit ~82 % (D3-1) bzw. 52 % (H8-1) weniger Läsionsamastigote das Plasmid pX6MPK7TYC-ds in der Maus verloren haben. Angemerkt sei, dass alle drei Klone um die 40. bis 44. Woche zu Läsionen in der Maus geführt haben.

#### Kultivierung der Läsionsamastigoten

Zum anderen wurde das gewonnene Aspirat der Mausfußpunktion in komplettiertes SDM-Medium überführt. Das Aspirat wurde in Medium resuspendiert und je eine Hälfte ohne und eine Hälfte in Gegenwart des Selektionsantibiotikums Puromycin [40 µM] bei 27 °C kultiviert. Das zugehörige Puromycin-Resistenzgen wird vom Plasmid pX6MPK7TYC-ds der Klone 4TYC2A4, D3 und H8 codiert. Die aus der Maus isolierten Läsionsamastigoten der Klone 4TYC2A4-0, -1, D3-1, H8-1, -3 waren alle in der Lage zu Promastigoten zu differenzieren. Die mikroskopische Beurteilung der Kultur zeigte, dass der Teil des Mauspunktats von 4TYC2A4-0, -1, D3-1 und H8-1 der ohne Selektionsantibiotikum kultiviert wurde, in der gleichen Zeit zu einer höheren Promastigotendichte heranwuchs als jener mit Puromycin.

Dies wurde je nach Klon in zwei bzw. drei unabhängigen Durchläufen bestätigt.

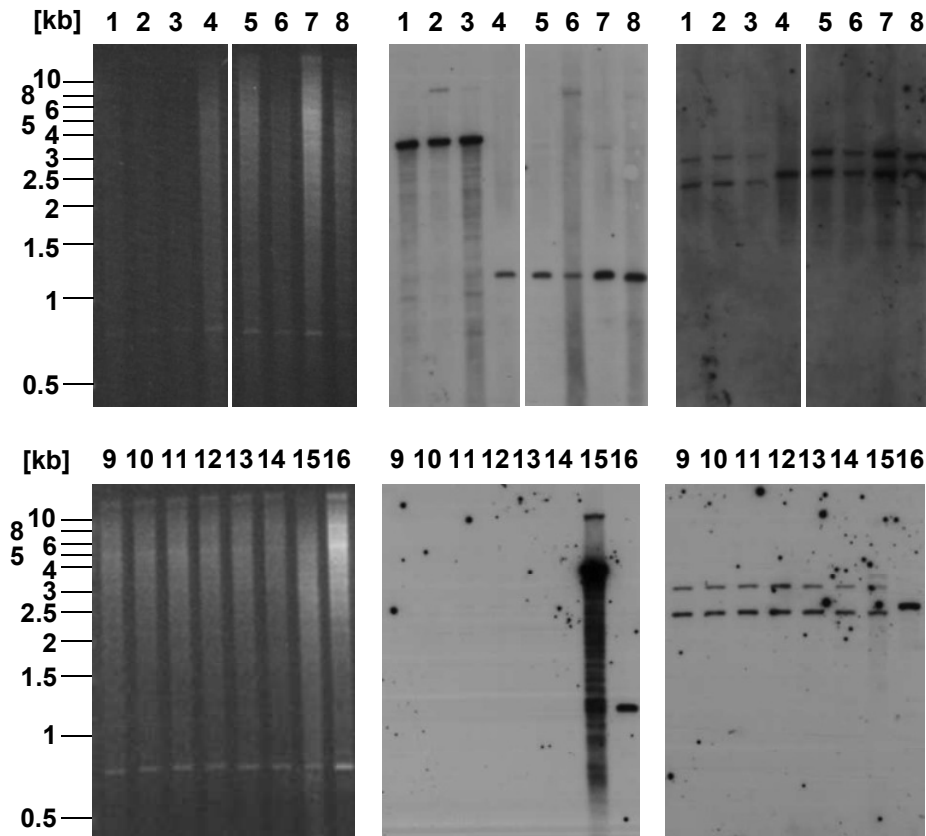
#### 3.1.2.4.3 Plasmidnachweis in vereinzelt kultivierten Promastigoten nach Kultivierung ohne Selektionsantibiotikum

Bietet das extrachromosomal exprimierte *LmxMPK7-TY*-Protein keinen Überlebensvorteil, verlieren Promastigoten kultiviert ohne Puromycin mit der Zeit das Plasmid pX6MPK7TYC-ds mit dem Puromycin-Resistenzgen und *LmxMPK7-TY*. Im folgenden Versuch wurden Promastigoten der Klone B10, D3, H8 und 4TYC2A4 zum einen in Gegenwart von Puromycin, Phleomycin und Hygromycin und zum anderen ohne jegliche Selektionsantibiotika über vier Wochen kultiviert. Während dieses Zeitraums erfolgten in etwa neun Zellpassagen. Anschließend wurden die ohne Selektionsantibiotika kultivierten Promastigoten mittels Verdünnungskulturverfahren vereinzelt. Hierfür wurden drei Verdünnungen der Zellsuspension mit 1,8, 0,6 und 0,3 Zellen/ml hergestellt und davon je 200 µl pro Vertiefung auf 96-„well“-Platte ausplattiert. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist von Einzelklonen auszugehen, wenn weniger als jede dritte Vertiefung bewachsen ist. Dies war für alle vier Klone in allen drei Verdünnungen der Fall. Somit war bei allen bewachsenen Vertiefungen von Zellen monoklonalen Ursprungs auszugehen.

Besonderes Augenmerk galt nun dem Vorhandensein der Puromycin-Resistenz als Indiz für das Vorliegen des Plasmids. Daher wurden im Folgenden die Einzelklone erneut in Gegenwart von Puromycin [40 µM] kultiviert. Acht von 13 Einzelklone des Klons B10, sechs von 12 des Klons D3, sechs von 14 des Klons H8 und sieben von 14 des Klons 4TYC2A4 hatten die Fähigkeit, in Gegenwart von Puromycin zu wachsen verloren. Der Großteil der Einzelklone mit Anhaltspunkt für einen Verlust der Puromycinresistenz wurde nachfolgend im Southern Blot mittels *LmxMPK7*-Gen- und *LmxMPK7*-stromab-Sonde auf die Existenz des Plasmids und ihr genetische Resistenzmuster untersucht. Hierfür wurde die DNA aus Promastigoten isoliert, mit den Restriktionsenzymen *NruI* und *XhoI* geschnitten und aufgetrennt. Als Kontrollen diente gDNA aus *L. mexicana* Wildtyp und gDNA der in Gegenwart von Selektionsantibiotika kultivierten Klone B10, D3, H8.

Der Nachweis mit der *LmxMPK7*-Gen-Sonde (Abb. 24, Mitte) liefert folgendes Ergebnis: Erwartungsgemäß wird in den vier von 4TYC 2A4 abstammenden, vereinzelt kultivierten Klone (Spur 5-8) die verbliebene genomische Kopie von *LmxMPK7* nachgewiesen. Genauso wie der Wildtyp (Spur 4 und 16) besitzen alle vier Klone die entsprechende Bande auf Höhe von 1129 bp. Es findet sich jedoch keine Bande auf Höhe von 3395 bp, korrespondierend zum Fragment der extrachromosomalen Kopie von *LmxMPK7* (Spur 5-8). Damit haben alle vier von 4TYC 2A4 abstammenden Klone das Plasmid mit *LmxMPK7* während der Kultivierung ohne Puromycin verloren. Für gDNA der Klone B10, D3 und H8, welche weiterhin mit Selektionsantibiotika kultiviert worden waren, ist eine plasmidspezifische Bande auf Höhe

von 3395 bp zu sehen (Spur 1-3 und 15). Der Nachweis mit der *LmxMPK7*-stromab-Sonde (Abb. 24, rechts) liefert für die von 4TYC 2A4 abstammenden Klone (Spur 5-8) eine Bande auf Höhe von 2963 bp, korrespondierend zum Hygromycin-Resistenzgen tragenden Fragment und eine Bande auf Höhe von 2538 bp korrespondierend zu *LmxMPK7* am genomischen Locus. Die Klone B10, D3 und H8 (Spur 1-3 und 15) besitzen je eine Bande auf Höhe von 2309 bp und 2963 bp, welche dem Fragment des Phleomycin- bzw. Hygromycin-Resistenzgens integriert am *LmxMPK7*-Lokus entspricht.



**Abb. 24: Untersuchung potentieller *LmxMPK7*-Doppeldelektionsmutanten mittels Southern Blot-Analyse.** Die Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-)hyg/phleo + pX6MPK7TYC$ -ds 1: und 15: Klon B10, 2: Klon D3, 3: Klon H8 nach Kultivierung in Gegenwart von Puromycin. 4: und 16: *LmxWt*. Einzelklone der Mutante  $\Delta LmxMPK7(+/-)hyg + pX6MPK7TYC$ -ds Klon 4TYC 2A4 nach Kultivierung ohne Puromycin 5: D5, 6: F2, 7: F3, 8: G2. Einzelklone der Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-)hyg/phleo + pX6MPK7TYC$ -ds Klon B10, 9: B10A3, 10: B10D4; Klon D3 11: D3B2, 12: D3E6 und Klon H8 13: H8A12, 14: H8C1 nach Kultivierung ohne Puromycin. Links: Auftrennung der *NruI/XhoI*-gespaltenen gDNA über ein Agarose-Gel. Mitte: Detektion mit *LmxMPK7*-Gen-Sonde. Film nach 2 h (oben) bzw. 1 h 30 min (unten) Exposition. Rechts: Nach Entfernung der gebundenen Gen-Sonde durch Stripping des Blots, erfolgte die Detektion mit *LmxMPK7*-ds-Sonde. Film nach 12 h (oben) bzw. 14 h (unten) Exposition.

Für fünf der sechs getesteten vereinzelt Klone von Ursprungsklon B10, fünf der sechs von Ursprungsklon D3 und drei von fünf von H8 kann das Gen von *LmxMPK7* weder extrachromosomal noch genomisch nachgewiesen werden – die *LmxMPK7*-Gen-Sonde liefert keinerlei Bande (Abb. 24, Mitte, Spur 9-14 zeigt exemplarisch die Situation jeweils zweier, der von B10, D3 bzw. H8 abstammenden Klone). Die *LmxMPK7*-stromab-Sonde (Abb. 24, rechts) detektiert in Spur 9-14 ein zur Phleomycin- und Hygromycin-Resistenz passendes

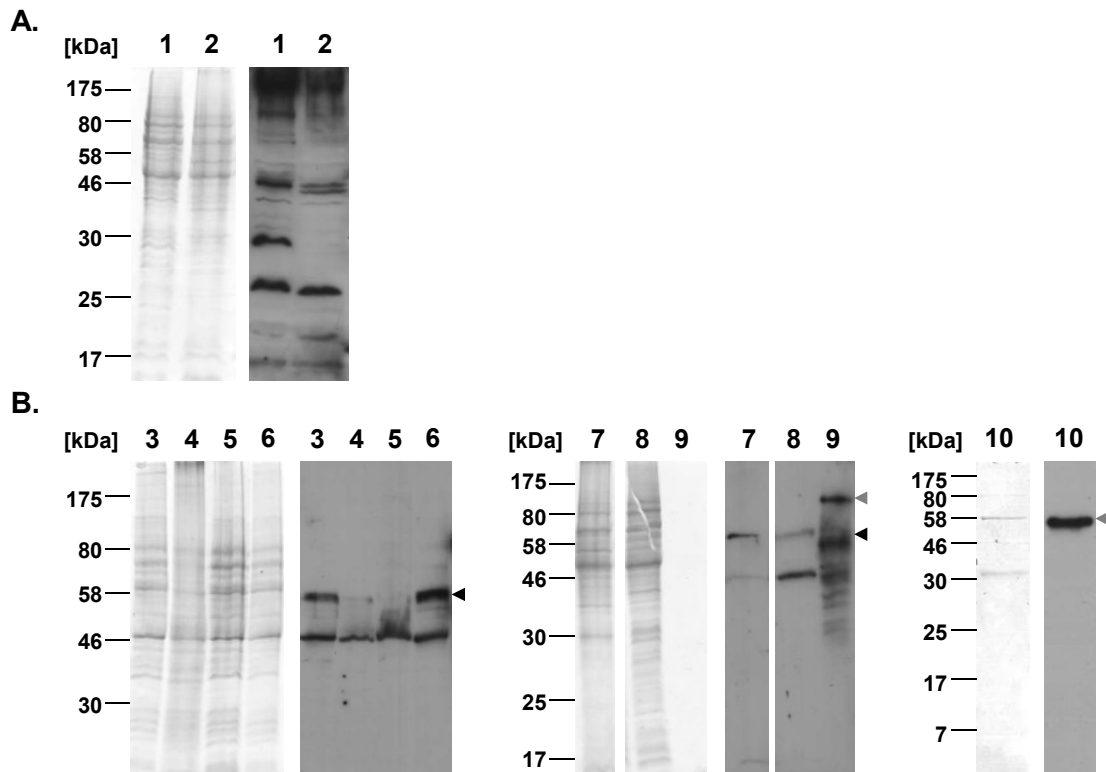


Bandenmuster. Die Einzelklone B10A3, B10D4, D3B2, D3E6, H8A12 und H8C1 haben im promastigoten Lebensstadium während der Kultivierung ohne Puromycin die episomale Kopie von *LmxMPK7* verloren, bei ihnen handelt es sich um *LmxMPK7*-Doppeldelektionsklone.

### 3.1.2.5 Antikörperherstellung und Nachweis von *LmxMPK7* in Promastigoten und Amastigoten

Ein für *L. mexicana*, *L. major* und *L. infantum* konserviertes Sequenzepitop nahe dem C-Terminus von MPK7 wurde ausgewählt. Die Firma Eurogentec wurde beauftragt das korrespondierende Peptid H<sub>2</sub>N- PVF TWE FDH RIT SAQ -COOH zu synthetisieren und damit zwei Kaninchen zu immunisieren. Das nach Affinitätsaufreinigung gewonnene Antiserum (Nr. 5059 und 5109) wurde jeweils im Immunoblot getestet. Das Antiserum 5059 lieferte knapp unterhalb der Laufhöhe von *LmxMPK7* eine, die gewünschte Bande überstrahlende, Kreuzreaktionsbande und schied deshalb aus. Ein Immunoblot mit dem Antiserum 5109 ist in Abb. 25 gezeigt. Das Antiserum 5471 aus einer Immunisierung zweier Kaninchen mit dem C-terminalen MPK7-Peptid H<sub>2</sub>N- LSF DPR KRP TAV EAL -COOH lieferte im Immunoblot kein zufriedenstellendes Ergebnis.

*LmxMPK7* kann im Immunoblot (Abb. 25, B) eine Bande zugeordnet werden mit einer Laufhöhe vergleichbar der der 58 kDa-Markerbande. Seinem Laufverhalten nach bleibt *LmxMPK7* somit etwas hinter der kalkulierten Größe von 64,7 kDa zurück. *LmxMPK7* kann in Gesamtzelllysaten von Promastigoten (Spur 3), Amastigoten aus Mausfußläsionen (Spur 4) und Amastigoten einer drei Tage alten axenischen Kultur (Spur 7) nachgewiesen werden. In der homozygoten Nullmutante findet keine Expression von *LmxMPK7* statt und ist daher keine Bande auf Höhe von ~58 kDa zu finden (Spur 5). Als Positiv-Kontrolle wurden zwei Proben der mit dem Plasmid pX6MPK7TY-ds transfizierten Mutante geladen (Spur 6 und 8). In dieser Mutante konnte *LmxMPK7*-TY mit dem anti-TY-Antikörper bereits erfolgreich nachgewiesen werden. Auch mit dem *LmxMPK7*-Peptid-Antikörper kann eine Bande auf Höhe der *LmxMPK7*-TY detektiert werden. In allen Leishmanienlysaten findet sich eine Kreuzreaktionsbande auf Höhe von ~48 kDa. Diese tritt bereits für das getestete Präimmunserum (Abb. 25, A) in Pro- und Amastigotenlysaten auf (Spur 1 und 2). Eine Bande auf Höhe von *LmxMPK7* liefert das Präimmunserum im Test nicht. Auch das rekombinante MalBP-Fusionsprotein (Spur 9) und His-Fusionsprotein (Spur 10) von *LmxMPK7* wird vom anti-*LmxMPK7*-Peptid-Antikörper 5109 erkannt.



**Abb. 25: Immunoblot-Analyse zum Nachweis von LmxMPK7.** In Spur 1-8 wurden folgende Zelllysate aufgetrennt: *L. mexicana* Wildtyp: Spur 1 und 3 Promastigoten einer spät-logarithmischen Kultur, Spur 2 und 7 axenische Amastigoten und Spur 4 Läsionsamastigoten. In Spur 5 Promastigoten einer logarithmischen Kultur von  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  Klon H8C1. In Spur 6 bzw. 8 Promastigoten einer logarithmischen Kultur der Mutante LmxWt + pX6MPK7TYC-ds Klon C1 bzw. C3. Schwarze Pfeilspitzen zeigen die Laufhöhe der LmxMPK7-Bande an. Das rekombinante Protein MalBP-LmxMPK7 bzw. His-LmxMPK7 wurde in Spur 9 bzw. 10 geladen. Die zugehörige Bande des Vollängenproteins ist mit einer grauen Pfeilspitze markiert. Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges bzw. Spur 3-6 10 %-iges SDS-PA-Gel. Rechts: Film. **A.** Inkubation des Blots mit Prä-Immunsereum der Antikörper-Herstellung verdünnt 1 : 1000 in 5 % MP/PBST. Film nach 5 min Exposition. **B.** Einsatz des Kaninchen-anti-LmxMPK7-Peptid Antiserums 5109 1 : 500 in 5 % MP/PBST. Film nach 20 min (links) 30 min (Mitte) bzw. 10 min (rechts) Exposition.

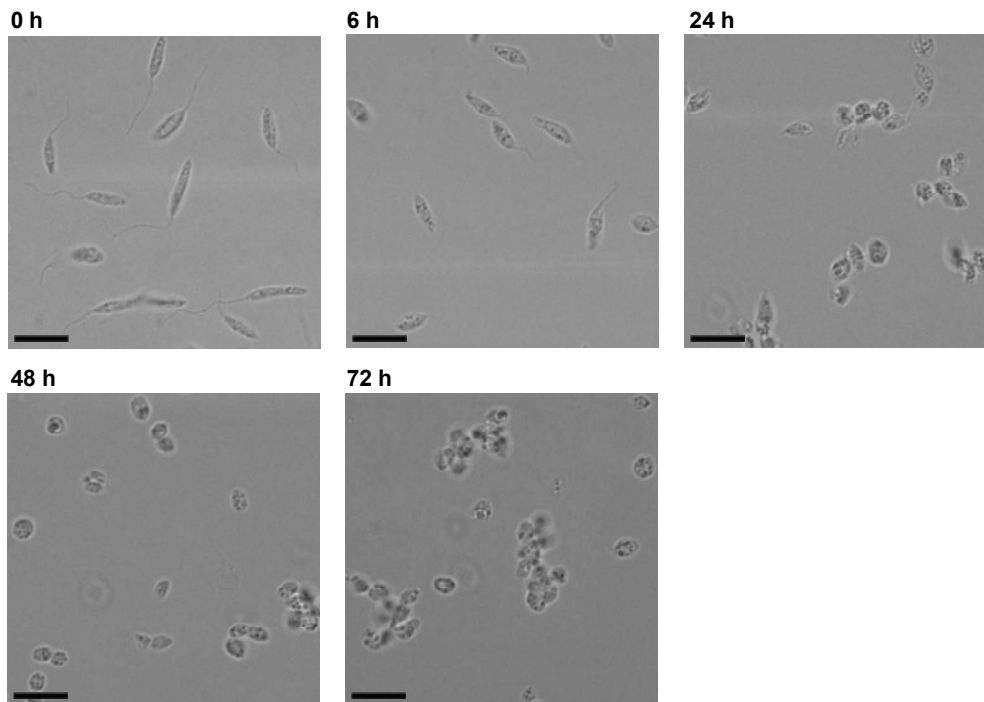
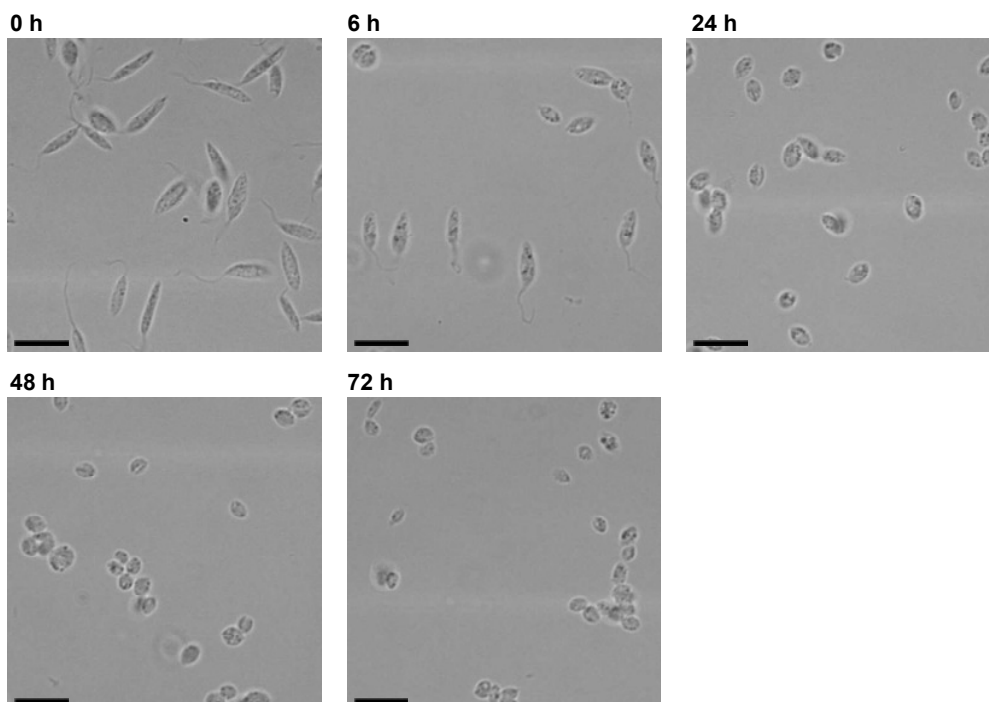
### 3.1.2.6 Charakterisierung der Deletionsmutante $\Delta LmxMPK7$

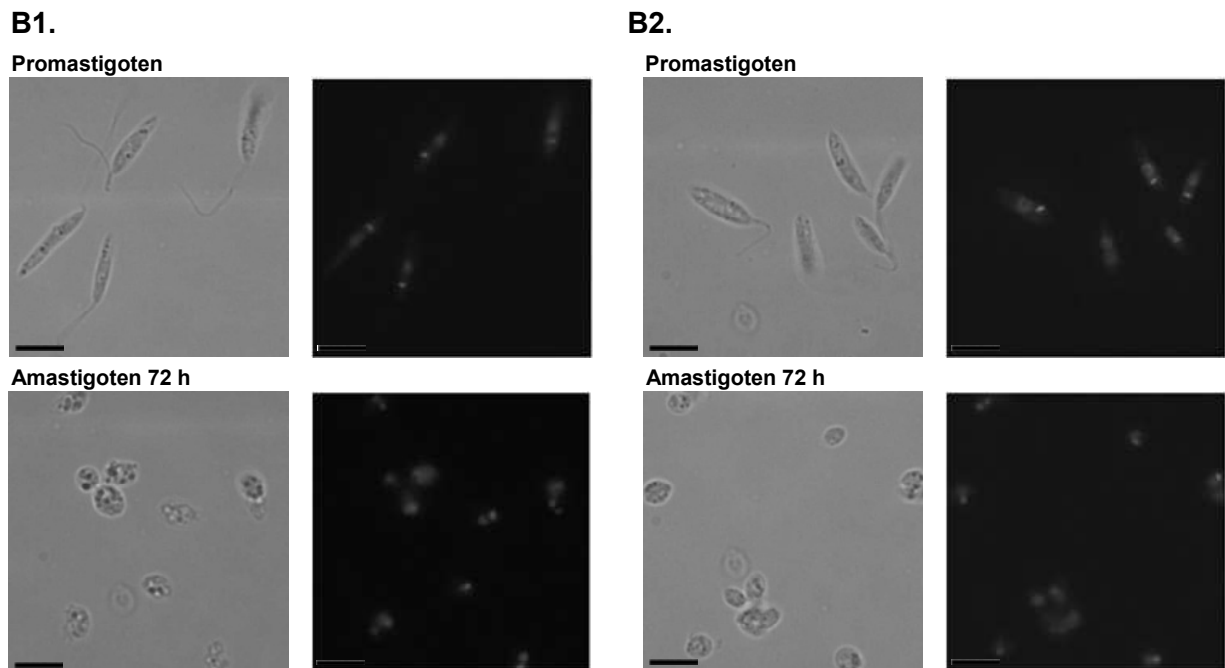
Die Nullmutante ging aus Promastigoten hervor, welche *LmxMPK7* ausschließlich in extra-chromosomaler Kopie besaßen und diese ohne Selektionsdruck verloren haben. Inwieweit wirkt sich die erzeugte homozygote Deletion von *LmxMPK7* auf die Morphologie, die Differenzierungsfähigkeit, das Infektionsverhalten und das Wachstum von Leishmanien aus?

#### 3.1.2.6.1 Beurteilung der Morphologie durch mikroskopische Verfahren

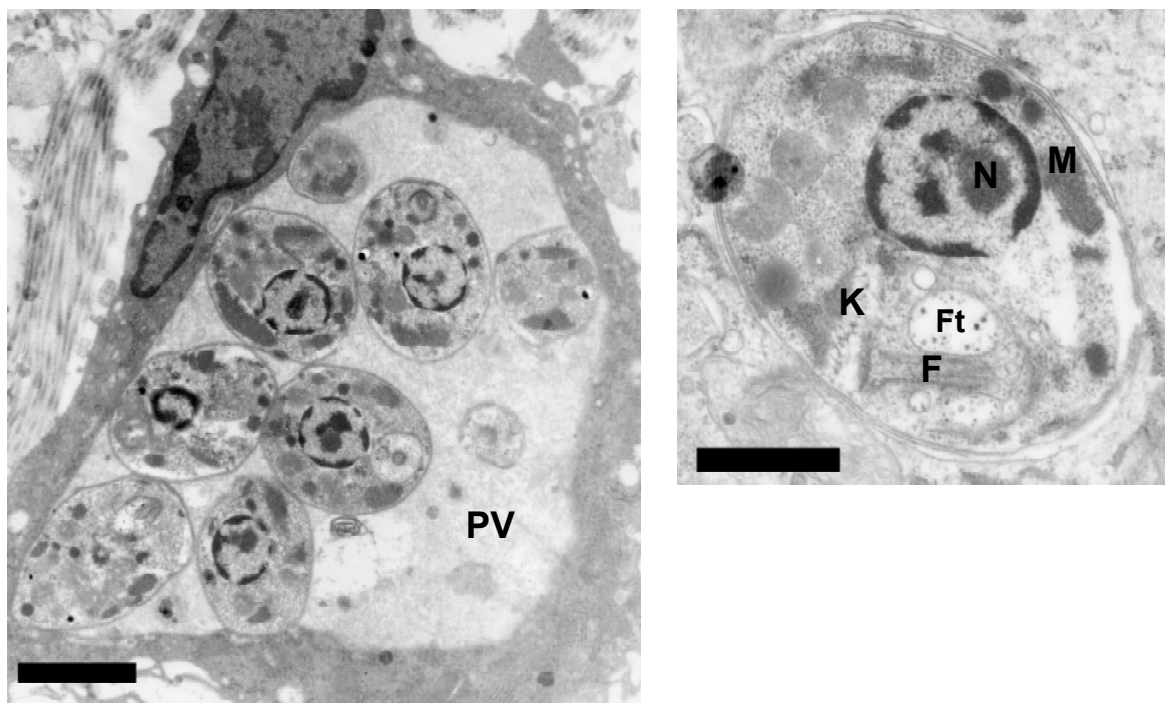
Promastigoten von *L. mexicana* Wildtyp und der *LmxMPK7*-Nullmutante Klon B10D4, D3E6 und H8A12 wurden *in vitro* zu Amastigoten differenziert. Nach 6, 24, 48 und 72 Stunden wurden Proben entnommen. Diese und Proben einer logarithmisch wachsenden Promastigoten-Kultur wurden fixiert, mit DAPI gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht (Abb. 26).

Bereits nach 6 Stunden *in vitro* Differenzierung zeichnet sich sowohl für die Zellen des Wildtyps als auch für die der Mutante  $\Delta LmxMPK7$  eine Verkürzung des Zelleibs ab (Abb. 26, A). Nach 24 Stunden ist eine deutliche Größenreduktion der sich abgerundeten Zellen festzustellen. Bei Mutante und Wildtyp finden sich nur noch vereinzelt Zellen mit sichtbarem Flagellum. Nach 72 Stunden ist für Zellen beider Reihen die typische Amastigoten-Morphologie zu erkennen. Die DAPI-Färbung von Zellkern und Kinetoplast (Abb. 26, B) liefert in der Fluoreszenzmikroskopie für Pro- und Amastigoten von Mutante und Wildtyp ebenfalls dasselbe Bild.

**A1.****A2.**



**Abb. 26:** Durchlicht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Doppeldeletionsmutante im pro- und amastigoten Stadium. A1 und B1: *LmxWt*. A2 und B2:  $\Delta LmxMPK7(-/-)hyg/phleo$  Klon B10D4. **A:** Phasenkontrastaufnahmen von Proben einer *in vitro* Differenzierung von Pro- zu Amastigoten. **B:** Phasenkontrastaufnahme (links) und zugehörige DAPI-Fluoreszenzaufnahme (rechts). Der schwarze Balken entspricht 100 pixel; 10,43  $\mu m$  für das 64x Objektiv (A) und 6,57  $\mu m$  für das 100x Objektiv (B).



**Abb. 27:** Ultrastuktur von Läsionsamastigoten der *LmxMPK7*-Nullmutante: Klon D3B2-(Maus)3. PV = Parasitäre Vakuole; N = Zellkern; F = Flagellum; Ft = Flagellartasche; K = Kinetoplast; M = Mitochondrium. Der schwarze Balken entspricht im Bild links 2  $\mu m$  und im Bild rechts 1  $\mu m$ .

Mit Promastigoten der  $\Delta LmxMPK7$ -Mutante wurden Mäuse infiziert (Näheres im Abschnitt 3.1.2.6.3). Der gezeigte Klon D3B2-3 (Abb. 27) führte erstmals messbar nach 20. Wochen

p. i. zu einer Läsion. Aus Mausfußläsionen gewonnene Proben wurden fixiert und ultradünne Schnitte für die Elektronenmikroskopie hergestellt. Im linken Bild von Abb. 27 ist eine in der Wirtszelle befindliche parasitäre Vakuole dargestellt, welche sich mehrere Amastigoten teilen. Das rechte Bild zeigt die Struktur einer einzelnen amastigoten Zelle. Vom morphologischen Aspekt können für Amastigoten der *LmxMPK7*-Nullmutante keinerlei Besonderheiten ausgemacht werden.

Sowohl Läsionsamastigoten der *LmxMPK7*-Nullmutante als auch im wirtszellfreien System erzeugte Amastigoten waren in der Lage sich in Kultur zu Promastigoten umzuwandeln.

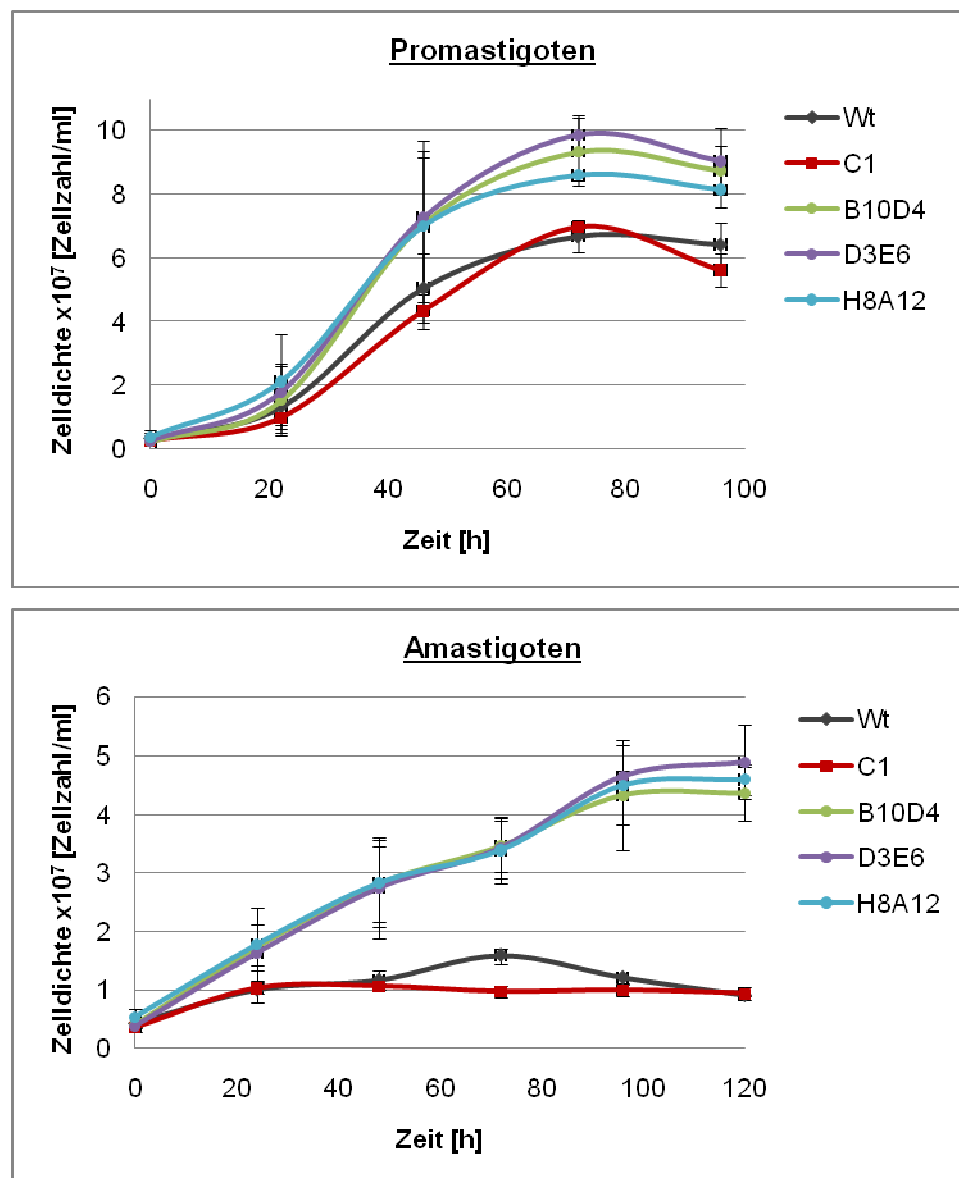
#### 3.1.2.6.2 Wachstumsverhalten

Beeinflusst das Fehlen von *LmxMPK7* die Zellproliferation im pro- und/oder amastigoten Lebensstadium? Zur Beantwortung der Frage wurde ein Wachstumsexperiment *in vitro* durchgeführt. Hierfür wurde den Klonen B10D4, D3E6 und H8A12 der Mutante  $\Delta LmxMPK7$  Zellen des *L. mexicana* Wildtyps gegenübergestellt. Außerdem wurde das Wachstum von Klon C1 der Mutante, welche *LmxMPK7* zusätzlich zur endogenen Kinase vom Plasmid pX6MPK7TYC-ds exprimiert, erfasst.

Die jeweilige Kultur wurde mit Promastigoten einer logarithmischen bis spätlogarithmischen Ausgangskultur angesetzt. Für die Promastigotenkultur wurden je  $2 \times 10^6$  Zellen in 10 ml komplettiertes SDM-Medium überführt und bei 27 °C für vier Tage kultiviert. Zur Erzeugung von axenischen Amastigoten wurden je  $4 \times 10^6$  Promastigoten in 10 ml komplettiertes Schneiders-Medium eingebracht und bei 34 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für fünf Tage kultiviert. Es wurden zur selben Zeit täglich Proben genommen und die Zelldichte ermittelt. Die in Abb. 28 gezeigten Wachstumskurven bilden die Entwicklung der Zellzahl über die Zeit ab.

An der Teilungsrates lässt sich ablesen, dass sich die Promastigotenkulturen nach ca. 24 bis 48 Stunden Kultivierung in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Dieser schließt sich die spät-logarithmische Phase an, welche nach etwa 72 Stunden in die stationäre Phase übergeht (Abb. 28). Der 96-Stunden-Wert zeigt einen Rückgang der Zellzahl zum Ende des Experiments, am wahrscheinlichsten aufgrund von Zellsterben. Dieser zeitliche Wachstumsablauf ist für alle in diesem Experiment eingeschlossenen Promastigotenkulturen zu erkennen, jedoch mit dem Unterschied, dass die Klone der *LmxMPK7*-Nullmutante zu jedem Messzeitpunkt eine 1,3-1,4fach höhere Zellzahl als der Wildtyp erreichen. Die Kulturen der  $\Delta LmxMPK7$ -Klone erreichen nach 96 Stunden Differenzierung zu Amastigoten eine Zellzahl von  $4-5 \times 10^7$  Zellen pro ml. Danach geht die Teilungsaktivität stark zurück (Abb. 28). Die Differenzierung und Kultivierung der Wildtyp-Amastigoten erfolgte in derselben Mediencharge und unter den gleichen Bedingungen wie die der Nullmutante. Im Gegensatz zur

Nullmutante zeigte der Wildtyp jedoch eine Tendenz zur Ausbildung von Zellhaufen und erreicht nach 72 Stunden eine maximale Zellzahl von lediglich um die  $1,6 \times 10^7$  Zellen pro ml. Die Zellproliferation der Promastigoten der Mutante LmxWt + pX6MPK7TYC-ds Klon C1 ähnelt der von Wildtyp-Promastigoten. Die Amastigoten von Klon C1 vermehren sich nur wenig und erreichen nach ein bis zwei Tagen eine maximale Zellzahl von um die  $1 \times 10^7$  Zellen pro ml.



**Abb. 28: Proliferation von Promastigoten und Amastigoten der  $\Delta LmxMPK7$ -Mutante:** Klon B10D4, D3E6 und H8A12. Dem gegenübergestellt ist das Wachstum von *L. mexicana* Wildtyp (Wt) 03/05 und der Mutante LmxWt + pX6MPK7TYC-ds Klon C1 (hervorgegangen aus Wt03/05). Dargestellt ist der Mittelwert aus je drei Wachstumsreihen. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an.

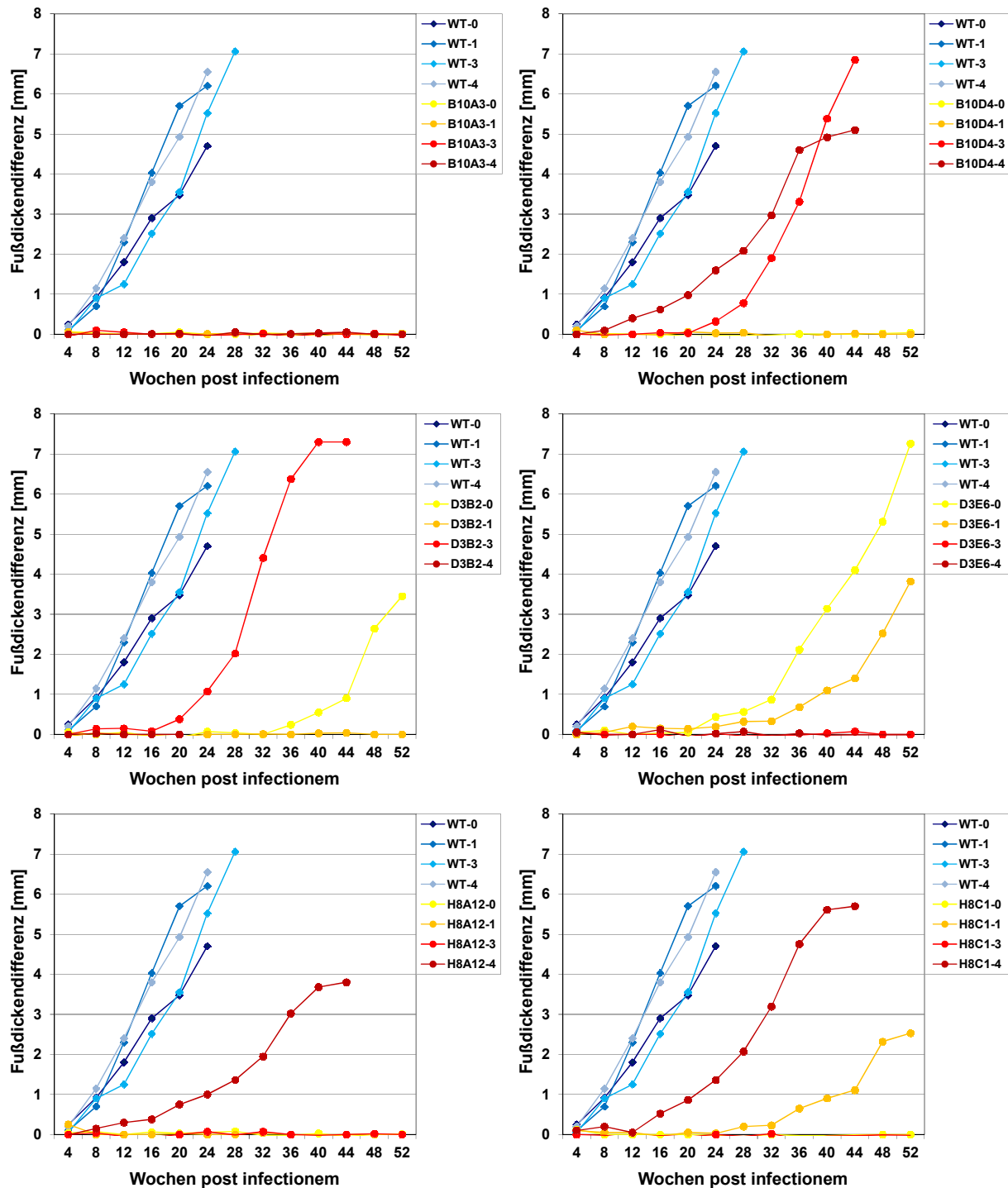
Die homozygote Deletionsmutante  $\Delta LmxMPK7$  zeichnet sich im pro- als auch amastigoten Stadium durch eine gesteigerte Zellteilungsaktivität verglichen mit der des Wildtyps aus.

### 3.1.2.6.3 Mausinfektionsexperimente

Je  $1 \times 10^7$  Promastigoten einer spät-logarithmischen Kultur wurden in die Fußsohle des linken Hinterlaufs einer weiblichen BALB/c-Maus injiziert. Die Mutanten befanden sich zum Zeitpunkt des Infektionsexperiments ca. 42 Wochen in Kultur bei etwa zweimaliger Passage pro Woche. Je eine Gruppe von vier Mäusen wurde mit einem der sechs Klone von  $\Delta LmxMPK7$  (B10A3, B10D4, D3B2, D3E6, H8A12 und H8C1) und zum Vergleich mit dem *L. mexicana* Wildtyp infiziert. Über einen Zeitraum von bis zu 52 Wochen wurde die Fußdickendifferenz zum nicht infizierten, rechten Hinterlauf gemessen und so der Infektionsverlauf verfolgt (Abb. 29).

Die Maus D3B2-4 war nach 20 Wochen in einem kachektischen Zustand und ist, ohne eine Fußläsion zu entwickeln, gestorben. Wie zu sehen ist, haben von den restlichen 23 mit Klonen der *LmxMPK7*-Nullmutante infizierten Mäusen nach 52 Wochen 14 Mäuse keine Läsion entwickelt (Abb. 29). Der Klon B10A3 führt in allen vier Mäusen zu keiner Fußläsion. Zwei Mäuse infiziert mit Klon B10D4 weisen erstmals nach der 8. bzw. 24. Woche eine Dickendifferenz zum nicht infizierten Fuß größer/gleich 0,1 mm auf und bilden nachfolgend eine größenprogrediente Läsion aus. Zwei Mäuse infiziert mit D3B2 zeigen erstmals messbar in der 20. bzw. 36. Woche, eine Maus infiziert mit H8A12 in der 8. Woche und zwei Mäuse infiziert mit H8C1 in der 16. bzw. 28. Woche beginnende Fußläsionen. Eine Maus infiziert mit Klon D3E6 bildet um die 24. Woche eine Fußläsion aus und ein Tier infiziert mit demselben Klon zeigt nach der 12. Woche eine, zuerst bis zur 32. Woche kaum an Volumen zunehmende Läsion am betroffenen Hinterlauf. Die Mäuse der mit Wildtyp-Promastigoten infizierten Kontrollgruppe weisen bereits in der ersten Messung, vier Wochen nach Injektion, eine Fußdickendifferenz zwischen 0,05 und 0,25 mm auf. Nachfolgend kommt es bei allen Mäusen dieser Gruppe am betroffenen Fuß zu einer rasch fortschreitenden Volumenzunahme und Ausbildung einer Leishmanien-Läsion. Nach 24 bzw. 28 Wochen wurde das Kontrollgruppenexperiment beendet.

Das Infektionsverhalten der Leishmanien, welche keine *LmxMPK7* exprimieren ist als sehr heterogen zu beschreiben. 14 Mäuse zeigen keine Anzeichen einer Infektion. Neun der mit der *LmxMPK7*-Nullmutante infizierten 23 Mäuse etablieren zwischen der 8. und 36. Woche p. i. eine Infektion. Die Läsion bildet sich in diesen Mäusen, verglichen zum Wildtyp, also mit einer Verzögerung unterschiedlichen Ausmaßes aus.

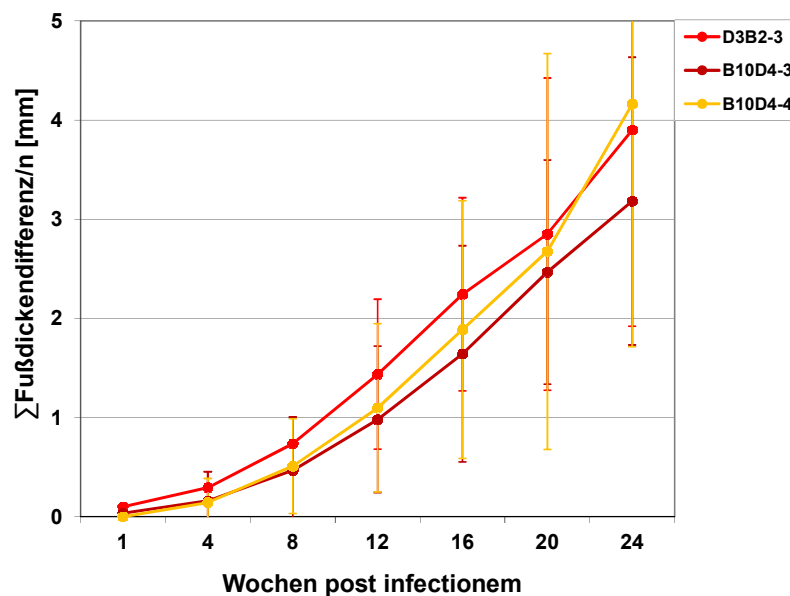


**Abb. 29:** Infektionsverlauf in mit  $\Delta LmxMPK7(-/-)hyg/phleo$  Klon B10A3, B10D4, D3B2, D3E6, H8A12 und H8C1 infizierten BALB/c-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp.

Womöglich geht der *LmxMPK7*-Nullmutante die Fähigkeit verloren eine Infektion hervorzurufen? Die neun der 23 homozygoten Deletionsklone, welche verzögert zu Läsionen geführt haben, haben möglicherweise das Defizit kompensiert und dadurch die Infektiosität wiederhergestellt. Zum Beweis einer wiederhergestellten Infektiosität wurden aus den Läsionen der Mäuse B10D4-3 (Läsionsbildung um die 24. Woche p. i.), B10D4-4 (Läsionsbildung um die 8. Woche p. i.) und D3B2-3 (Läsionsbildung um die 20. Woche p. i.) Amastigoten isoliert, *in vitro* zu Promastigoten differenziert und erneut je Klon eine Gruppe



von vier BALB/c-Mäusen infiziert. Eine Maus der Gruppe D3B2-3 und eine der Gruppe B10D4-3 bildete bis Versuchsende keine Läsion aus. Möglicherweise war die Injektion von Leishmanien in diese beiden Mäuse nicht erfolgreich? Im Infektionsexperiment ist zu sehen, dass alle anderen infizierten Mäuse Läsionen ausbilden (Abb. 30). Eine Fußdickendifferenz größer/gleich 0,1 mm besteht für fünf Mäuse ab der 4. Wochen p. i. und ist für die restlichen Mäusen spätestens ab der 12. Woche p. i. messbar. Im Schaubild ist der Mittelwert der Fußdickendifferenz aller Mäuse mit Läsion einer Gruppe angegeben.



**Abb. 30:** Reinfektion von BALB/c-Mäusen mit aus Mausfußläsionen isolierten Klonen von  $\Delta LmxMPK7$ . Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung wieder. Für D3B2-3 und B10D4-3  $n=3$  und für B10D4  $n=4$ .

Alle drei Klone führen in der zweiten Mauspassage ohne Verzögerung, wie in der ersten Passage, zu Leishmanien-Läsionen. Das Infektionsverhalten dieser Klone entspricht annähernd dem von Wildtyp-Promastigoten, die Infektiosität ist somit wiederhergestellt.

Ist die Beeinträchtigung der Infektiosität darauf zurückzuführen, dass  $\Delta LmxMPK7$  eine verminderte Fähigkeit besitzt von Phagozyten aufgenommen zu werden und/oder sich in diesen zu vermehren? Zur Abklärung wurden Makrophagen *in vitro* mit  $\Delta LmxMPK7$  infiziert. Das Potential, sich in den Makrophagen zu teilen wurde mit dem des *L. mexicana* Wildtyps verglichen.

#### 3.1.2.6.4 Infektion von Peritonealmakrophagen

Murine Peritonealmakrophagen wurden nach Protokoll präpariert und mit Promastigoten einer spät-logarithmischen Kultur von *L. mexicana* Wildtyp und den drei Klonen B10D4, D3E6 und H8A12 von  $\Delta LmxMPK7$  infiziert. Das intrazelluläre Wachstum der Amastigoten wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen verfolgt. Die zum Zeitpunkt 0, 1, 3, 5 und 7 Tage gewonnenen Proben wurden fixiert und einer DNA-Färbung mit DAPI unterzogen.

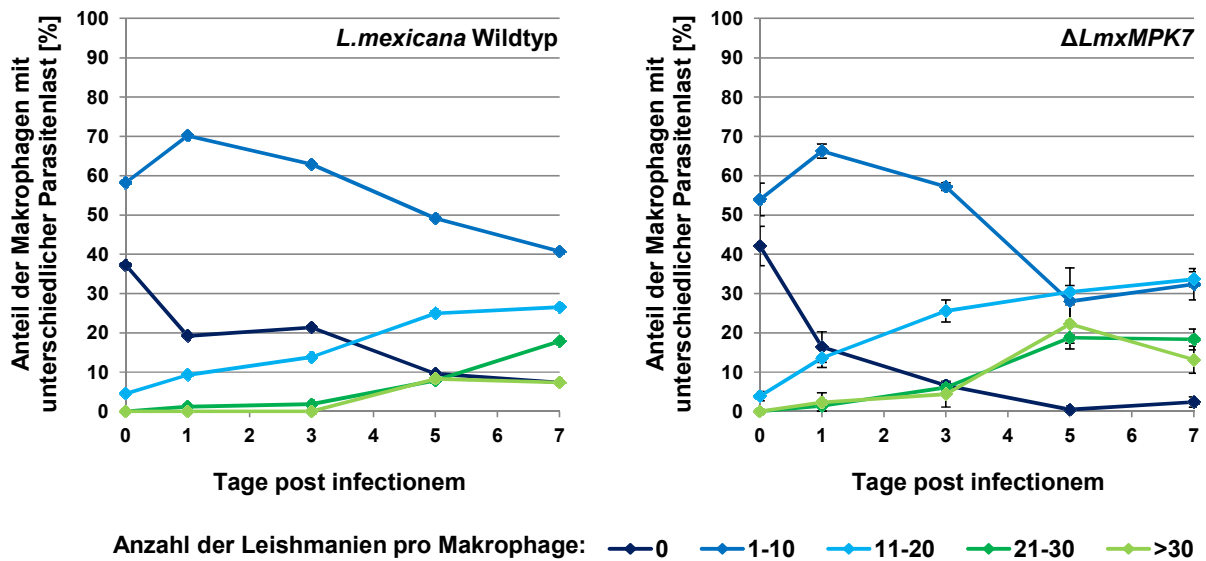
Durch die DAPI-Färbung bildete sich in der Fluoreszenzmikroskopie der Makrophagen-Zellkern ab. Anhand der sich ebenfalls darstellenden Leishmanien Zellkerne und Kinetoplasten ließ sich die Anzahl der parasitären Einheiten pro Zelle bestimmen. Die am Mikroskop randomisiert ausgewählten Bildausschnitte wurden vollständig durch Auszählung ausgewertet. Je Probe wurden  $n = 120-200$  Makrophagen ausgezählt. Exemplarisch ist in Abb. 31, C eine Fluoreszenzmikroskopie- und zugehörige Phasenkontrastaufnahme von Makrophagen infiziert mit Klon D3E6 nach 0 bzw. 5 Tagen gezeigt. Zu Beginn des Infektionsexperiments (0 d) zeigen die aufgenommenen Leishmanien noch ein deutlich promastigotes Erscheinungsbild. Die in Abb. 31, C zum Zeitpunkt 0 Tage abgebildeten beiden Makrophagen hatten zusammen etwa 10 Parasiten phagozytiert. Nach 5 Tagen Infektion finden sich Makrophagen mit parasitären Vakuolen vollgepackt mit Amastigoten. Der in Abb. 31, C abgebildete Phagozyt beherbergt zu diesem Zeitpunkt mehr als 50 Parasiten.

Das Infektionsexperiment wurde zweimal durchgeführt, jedoch nur einmal eine umfangreiche Auszählung von Wildtyp und dreier Klone der Nullmutante vorgenommen. Für letztere wurde der Mittelwert gebildet. Das Ergebnis der Quantifizierung ist in Abb. 31, A und B dargestellt. Die Makrophagen wurden anhand ihrer Parasitenlast in folgende Gruppen eingeteilt: Keine, 1-10, 11-20, 21-30 und mehr als 30 Parasiten pro Zelle. Wie zu sehen ist, verhält sich die Infektionsrate, gemessen an der Anzahl an infizierten Makrophagen, für Wildtyp und  $\Delta LmxMPK7$  zu Beginn des Experiments gleich. Sie liegt initial, nach Inkubation der Makrophagen mit Promastigoten über Nacht, bei etwa 60 %. Nach einem weiteren Tag sind bei beiden rund 80 % der Makrophagen infiziert. Mehr als 90 % der Zellen sind mit dem Wildtyp nach fünf Tagen und mit der Nullmutante nach zwei Tagen infiziert. Nach fünf Tagen p. i. liegt für knapp 50 % der mit dem Wildtyp infizierten Makrophagen die Anzahl an intrazellulären Leishmanien zwischen eins und zehn. 25 % der Makrophagen enthalten 11-20 Parasiten und je 10 % gehören der Gruppe 21-30 und >30 Parasiten pro Zelle an.  $\Delta LmxMPK7$  führt ebenfalls zu sich teilenden intrazellulären Amastigoten. Nach 5 Tagen p. i. bewirten etwa 30 % der Makrophagen 1-10, 30 % 11-20, knapp 20 % 21-30 und mehr als 20 % über 30 Leishmanien.

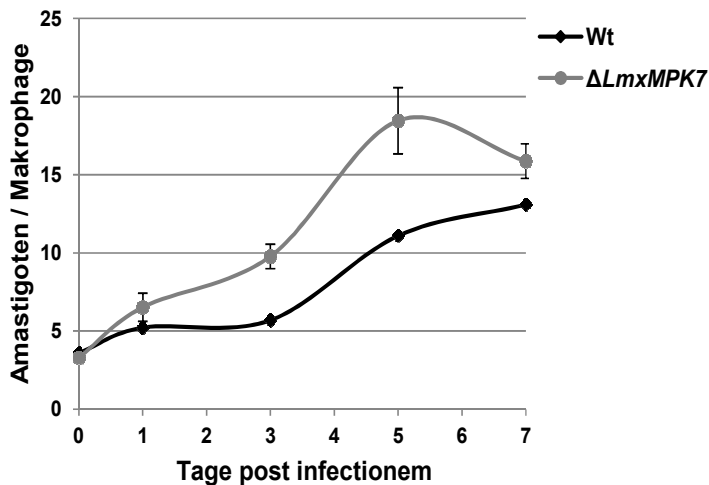
Zur Verdeutlichung wurde die durchschnittliche Parasitenlast zu jedem Zeitpunkt errechnet. Hierfür wurde für die Gruppe 1-10 die Anzahl an Parasiten pro Zelle gleich 5 gesetzt, für die Gruppe 11-20 gleich 15, für die Gruppe 21-30 gleich 25 und für die Gruppe >30 gleich 35. Das Ergebnis ist in Abb. 31, B aufgetragen. Ausgehend von der gleichen durchschnittlichen Parasitenlast für Wildtyp und  $\Delta LmxMPK7$  zu Beginn des Experiments ist zum Zeitpunkt drei, fünf und sieben Tage für die mit der Nullmutante infizierten Makrophagen eine höhere Anzahl an intrazellulären Parasiten festzustellen als für den Wildtyp. Für die Klone der Nullmutante zeigt sich eine Verminderung der durchschnittlichen Parasitenlast pro Zelle zwischen Tag fünf und sieben p. i.. Möglicherweise ist dies auf eine Freisetzung von

Amastigoten aus Makrophagen mit hoher Parasitendichte zur Neuinfektion naiver Zellen zurückzuführen.

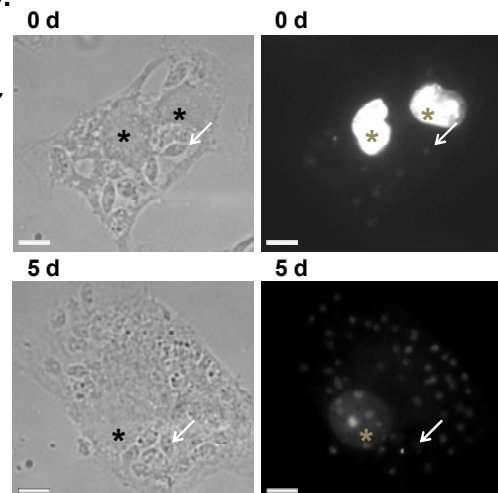
**A.**



**B.**



**C.**



**Abb. 31: Wachstumsverhalten von  $\Delta LmxMPK7$  und *L. mexicana* Wildtyp (Wt'99) in murinen Peritonealmakrophagen.** **A:** Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil der jeweiligen Gruppe (0, 1-10, 11-20, 21-30 und >30 Leishmanien pro Makrophage) an der Gesamtpopulation. **B:** Durchschnittliche Parasitenlast. Für  $\Delta LmxMPK7$  wurde aus der Auszählung der Klone B10D4, D3E6 und H8A12 der Mittelwert gebildet (A und B). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung wieder. **C:** Durchlicht- (links) und DAPI-Fluoreszenzaufnahme (rechts): fixierte Probe nach Infektion von Makrophagen mit Promastigoten von Klon D3E6 und Waschschrift zur Entfernung freier Zellen (0 d) und Probe nach 5 Tagen (5 d). Stern: Makrophagenzellkern; Pfeil: exemplarisch eine *Leishmania*-Zelle mit gefärbtem Zellkern und Kinetoplast. Der Balken entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.2.7 Genomische Komplementation der Mutante $\Delta LmxMPK7$

Im Folgenden wurde *LmxMPK7* in die Nullmutante an seinem genomischen Lokus reintegriert. Die resultierende „add-back“-Mutante sollte hinsichtlich ihres Wachstums- und Infektionsverhaltens der Deletionsmutante  $\Delta LmxMPK7$  gegenübergestellt werden (die Um-

setzung von Letzterem ist nicht mehr erfolgt). Hiermit sollte geklärt werden, ob der Phänotyp der Deletionsmutante auf das Fehlen der Kinase zurückzuführen ist. Ist das der Fall, sollte die Re-Expression von *LmxMPK7* zu einem Phänotyp ähnlich dem des Wildtyps führen.

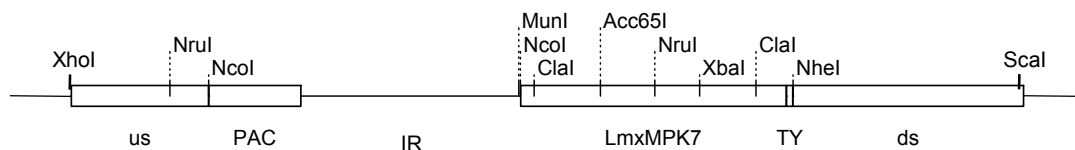
Außerdem wurde eine inhibitorsensitive-(IS)-Mutante von *LmxMPK7* durch Mutation von Threonin-210 zu Alanin hergestellt und erfolgreich beide Allele von *LmxMPK7* im Wildtyp mit *LmxMPK7-IS* ersetzt (nicht gezeigt).

#### 3.1.2.7.1 Herstellung des Konstrukts zur genomischen Reintegration von *LmxMPK7*

Das Plasmid pX14polNcoIPAC (hergestellt von M. Erdmann), welches unmittelbar stromauf des Puromycinresistenzgens eine zusätzliche *NcoI*-Schnittstelle besitzt, wurde mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *SacI* geschnitten. Das resultierende Fragment wurde aus dem Gel isoliert und in das mit den gleichen Enzymen gespaltene Plasmid pX6MPK7TYC-ds eingebracht. Das resultierende Plasmid pX6MPK7TYC+NcoI unterschied sich von seinem Vorgänger nun durch das Vorliegen der zusätzlichen *NcoI*-Schnittstelle vor dem Resistenzgen. Aus der sich anschließenden Klonierung, ging als Vorläufer zum „add-back“-Konstrukt, das Konstrukt zur Generierung einer inhibitorsensitiven-Mutante *LmxMPK7-IS* hervor. Hierzu wurde ein, die IS-Mutation tragendes *Acc65I/XbaI*-Fragment über gleichnamige Schnittstellen in das Plasmid pX6MPK7TYC+NcoI einligiert. Es resultierte das Plasmid pXMPK7ISTYC+NcoI. Um die Angliederung der flankierenden Bereiche von *LmxMPK7* zu ermöglichen, wurde mittels den Oligonukleotiden *LmxMPK7NheI.rev* und *LmxMPK7NcoI.for* und dem Plasmid pX6MPK7TYC-ds als Vorlage in einer PCR-Reaktion, unmittelbar stromab der Sequenz des C-terminalen TY-Tags eine zusätzliche *NheI*-Schnittstelle und innerhalb des ORF von *LmxMPK7* eine *NcoI*-Schnittstelle geschaffen. Diese nicht permanente *NcoI*-Schnittstelle wurde eingeführt, um die Länge der amplifizierten Sequenz und damit die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers beim Nukleotideinbau möglichst klein zu halten. Das PCR-Produkt wurde mittels TOPO-Klonierung in das Plasmid pCR2.1 überführt und durch Sequenzierung überprüft. Das Plasmid pB7XNLmxMPK7Nterm trägt 897 bp der stromauf- und 1540 bp der stromab-Region von *LmxMPK7* und existierte bereits zu Beginn dieser Arbeit. Die stromauf- und stromab-Region sind durch eine *NcoI*- und *NheI*-Schnittstelle voneinander getrennt. Das mit *NcoI*- und *NheI*-Schnittstelle versehene MPK7TY-PCR-Produkt in pCR2.1 wurde mittels Spaltung mit gleichnamigen Enzymen und anschließender Aufreinigung aus dem Gel gewonnen und zwischen die flankierenden Bereiche des mit *NcoI* und *NheI* geöffneten Plasmids pB7XNLmxMPK7Nterm eingebracht. Es resultierte pBusdsMPK7NcoI/NheI.

An Basenpaarposition 89 und 1541 von *LmxMPK7* befindet sich je eine *ClaI*-Schnittstelle. Die *ClaI*-Schnittstelle an Position 89 ist dam<sup>-</sup>-Methylase sensitiv, d. h. das zugehörige Enzym vermag das Plasmid, welches im *E. coli* Stamm XL1 kloniert wurde, an dieser Stelle nicht zu

schneiden. Somit wird nur die Schnittstelle an Position 1541 benutzt. Das Plasmid pXMPK7ISTYC+NcoI wurde mit *NcoI* und *ClaI* verdaut. Zwei der resultierenden Fragmente wurden aus dem Gel isoliert, zum einen das die ersten 1541 bp des *LmxMPK7*-Gens (inkl. IS-Mutation) tragende *NcoI/ClaI*-Fragment und zum anderen das das Puromycinresistenzgen und die intergene Region der DHFR-TS umfassende *NcoI/NcoI*-Fragment. pBusdsMPK7NcoI/NheI wurde mit *NcoI* und *ClaI* gespalten und in der anschließenden Gelaufrreinigung das 5911 bp große Fragment des Plasmids isoliert. Zuerst wurde das *NcoI/ClaI*-Fragment einligiert und dadurch das *LmxMPK7*-Gen komplementiert. Dann wurde das resultierende Plasmid mittels *NcoI*-Spaltung geöffnet und das *NcoI/NcoI*-Fragment eingebracht. Die Orientierung wurde durch Spaltung mit geeigneten Restriktionsenzymen überprüft. Das generierte Plasmid hieß pBusdsMPK7ISTYCPAC und stellte das Endkonstrukt der Klonierung der *LmxMPK7*-IS-Mutante dar. Die zugehörige Plasmidkarte findet sich im Anhang. Das Konstrukt wurde durch Sequenzierung überprüft. Durch Spaltung von pBusdsMPK7ISTYCPAC und pX6MPK7TYC-ds mit jeweils *MunI* und *ClaI* und anschließendem Austausch des die IS-Mutation tragenden Bereichs gegen den gleichen Abschnitt des *LmxMPK7*-Wildtyp-Gens wurde das Endkonstrukt pBusdsMPK7abTYCPAC der „add-back“(ab)-Klonierung erzeugt.

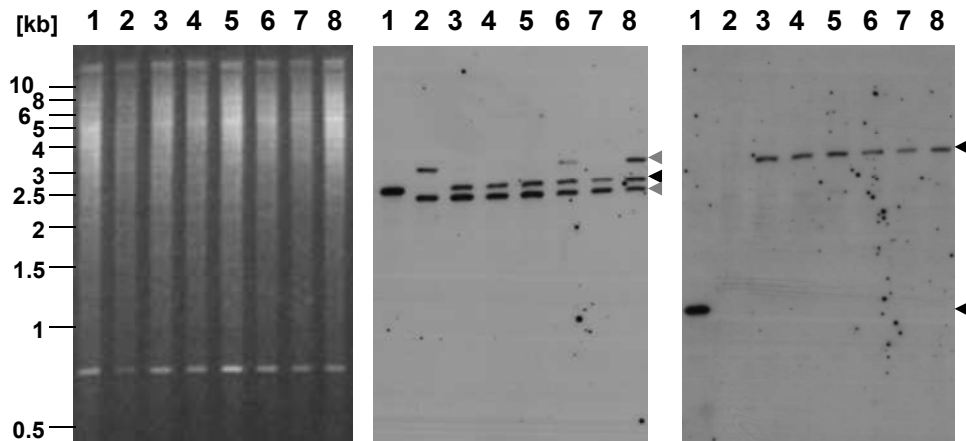


**Abb. 32: Schematische Darstellung des *LmxMPK7*-„add-back“-Konstrukts.** Neben *LmxMPK7* mit C-terminalem TY-Tag umfasst es: us = stromauf-, ds = stromab-Region; PAC = Gen der Puromycin-N-Acetyltransferase; IR = intergene Region der Dihydrofolatreduktase Thymidylatsynthase (DHFR-TS).

### 3.1.2.7.2 Herstellung der $\Delta LmxMPK7(+/-)$ -„add-back“-Mutante

Durch homologe Rekombination über die flankierenden Regionen, sollte *LmxMPK7* an seinen ursprünglichen genomischen Locus reintegriert und dadurch die Expression und Synthese von *LmxMPK7* in der Nullmutante wiederhergestellt werden. Zum erleichterten Nachweis war das Protein mit einem C-terminalen TY-Tag versehen. Die Selektion positiver Klone sollte durch das Vorhandensein der Puromycin-Resistenz gewährleistet werden.

Das Konstrukt pBusdsMPK7abTYCPAC wurde mit *XhoI* und *Scal* geschnitten (beachte Schema Abb. 32). Das gewünschte lineare Fragment wurde in Promastigoten der Klone B10D4, D3E6 und H8A12 von  $\Delta LmxMPK7$  transfiziert und lieferte in allen Fällen rekombinante Klone. Deren genomische DNA wurde präpariert, mit *NruI* und *XhoI* geschnitten und einer Southern Blot-Analyse unterzogen (Abb. 33). Als Kontrollen dienten mit denselben Restriktionsenzymen gesplante gDNA von *L. mexicana* Wildtyp und dem Klon B10D4 der Nullmutante.

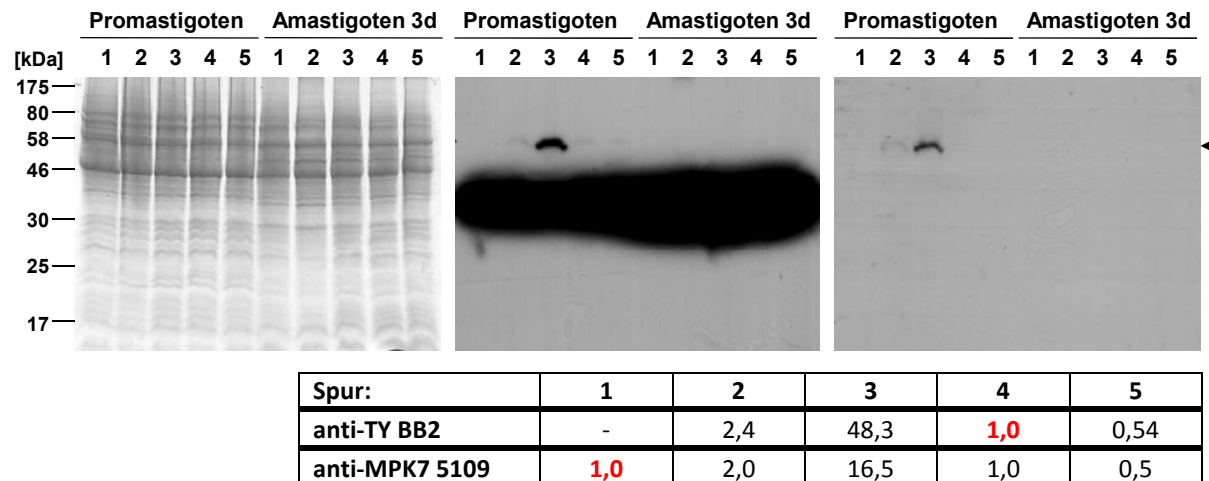


**Abb. 33: Southern Blot-Untersuchung zum Nachweis der genomischen Reintegration von *LmxMPK7* in  $\Delta$ *LmxMPK7*.** 1: *LmxWt*; 2:  $\Delta$ *LmxMPK7* Klon B10D4; 3-8: potentielle *LmxMPK7*-„add-back“-Mutanten: Klon B10G4, B10G5 (Abkömmlinge von B10D4), D3F5 (Abkömmling von D3E6), H8H2, H8H3 und H8H5 (Abkömmlinge von H8A12). Mitte: Detektion mit der *LmxMPK7*-ds-Sonde, Film nach 1 h 30 min Exposition. Rechts: Nach stripfen des Blots Detektion mit der *LmxMPK7*-Gen-Sonde, Film nach 14 h Exposition. Links: Korrespondierendes 0,7 %-iges Agarose-Gel. Die schwarze Pfeilspitze verweist auf Fragmente, welche Abschnitte des *LmxMPK7*-Gens tragen. Die graue Pfeilspitze zeigt Banden der Resistenzgene *hyg* und *phleo* an.

Mit der stromab-(ds)-Sonde (Abb. 33, Mitte) wird für den Wildtyp, korrespondierend zum *LmxMPK7*-Fragment, eine Bande auf Höhe von 2538 bp nachgewiesen (Spur 1). Für den Doppeldeletionsklon werden Banden auf Höhe von 2963 bp und 2309 bp nachgewiesen (Spur 2). Diese Banden sind dem Fragment zuzuordnen, welches das Hygromycin-Resistenzgen (*hyg*) bzw. Phleomycin-Resistenzgen (*phleo*) trägt. Die ds-Sonde liefert für alle potentiellen *LmxMPK7*-„add-back“-Klone eine Bande auf Höhe von 2584 bp, korrespondierend zum Fragment des *LmxMPK7-TY* tragenden „add-back“ Konstrukts (Spur 3-8). Außerdem wird für alle Klone eine Bande auf Höhe von 2309 bp nachgewiesen. Dies spricht für den Erhalt der Phleomycin-Resistenz. Vier der sechs potentiellen „add-back“-Klone besitzen keine Bande auf Höhe von 2963 bp. Offensichtlich haben mit Ausnahme der Klone H8H2 und H8H5 alle „add-back“-Klone das *LmxMPK7-TY*-Konstrukt anstelle des Hygromycin-Resistenzgens genomisch integriert. Möglicherweise haben die Klone H8H2 und H8H5 nach Chromosomverdopplung das *LmxMPK7*-„add-back“-Konstrukt unter Beibehaltung der Hygromycin- und Phleomycin-Resistenz genomisch integriert. Die Detektion mit der *LmxMPK7*-Gen-Sonde (Abb. 33, rechts) liefert für die Wildtyp-Situation eine Bande auf Höhe von 1129 bp (Spur 1). Wie nicht anders zu erwarten, fehlt diese Bande in der Spur der *LmxMPK7*-Nullmutante (Spur 2). Für alle „add-back“-Klone wird eine Bande auf Höhe von 3172 bp detektiert (Spur 3-8). Diese entspricht dem *Nrul*-Fragment, welches *pac*, die Intergene Region und Teile der stromauf-Region und des ORF von *LmxMPK7* umfasst. Die Klone H8H3, B10G4, B10G5 und D3F5 haben das *LmxMPK7*-Gen unter Verlust des Hygromycin-Resistenzgens in den ursprünglichen Genloкус reintegriert – bei ihnen handelt es sich um „add-back“-(+/-)-Mutanten von *LmxMPK7*. Diese Klone wurden weiter verwendet.

### 3.1.2.8 Nachweis von LmxMPK7-TY in unterschiedlichen Mutanten

Für die Gegenüberstellung der Expression und Synthese von LmxMPK7-TY in unterschiedlichen Mutanten wurden Immunoblot und Immunfluoreszenzmikroskopie als Nachweismethoden gewählt. Für beides wurde der etablierte anti-TY-Antikörper BB2 genutzt.



**Abb. 34: Immunoblot zum Nachweis von LmxMPK7-TY in Zelllysaten unterschiedlicher Mutanten.** 1: LmxWt; 2: LmxWt + pX6MPK7TYC-ds Klon C3; 3:  $\Delta$ LmxMPK7(-/-) + pX6MPK7TYC-ds Klon H8; 4 und 5: „add-back“-Mutante  $\Delta$ LmxMPK7(+/-) Klon H8H3 nach Kultivierung ohne (Spur 5) und in Gegenwart von 40  $\mu$ M Puromycin (Spur 4). Aufgetragen wurden Lysate von spät-logarithmischen Promastigoten bzw. axenischen Amastigoten nach 3 d Differenzierung. Das 12 %-ige SDS-PA-Gel (links) wurde nach dem Blotvorgang Coomassie gefärbt. Nachweis mit Maus-anti-TY-Antikörper BB2 (Film Mitte) und nach stripping des Blots mit Kaninchen-anti-LmxMPK7-Peptid-Antiserum 5109 (Film rechts). Alle Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1 : 500 eingesetzt. Die Filme wurden nach 45 min Exposition entwickelt. Die schwarze Pfeilspitze zeigt die Laufhöhe der LmxMPK7-Bande an. **Tabelle: Densitometrische Auswertung** der Bande auf Höhe von ~58 kDa in Promastigotenlysaten beider Nachweise mittels ImageJ 1.46r. Das Messergebnis der Spur mit der rot unterlegten Zahl wurde gleich eins gesetzt und die Werte der anderen Spuren des Antikörpers dazu ins Verhältnis.

Die Coomassie-Färbung des Proteingels bestätigt, dass für alle Proben annähernd gleiche Proteinmengen geladen wurden. Neben der bekannten Kreuzreaktion bei 33 kDa detektiert der gegen den TY-Tag von LmxMPK7-TY gerichtete Antikörper in den Spuren 2-5 der Promastigotenlysate eine Bande auf Höhe von ~58 kDa (Abb. 34, oben Mitte). Nach Abwaschen des gebundenen Antikörpers und erneuter Detektion, diesmal mit dem gegen LmxMPK7 gerichteten Antiserum 5109, wird in den Spuren 2-5 eine Bande auf derselben Höhe erkannt (Abb. 34. oben rechts). Die Bande bei ~58 kDa wird somit als LmxMPK7-TY identifiziert. Der Nachweis mit dem anti-LmxMPK7-Antiserum fällt schwächer aus als von vorangegangenen Durchläufen gewohnt. Im Promastigotenlysat des Wildtyps (Spur 1) und der „add-back“-Mutante (Spur 4 und 5) findet sich lediglich ein Hauch von einer Bande. Es wäre möglich, dass beim Strippen des Blots Protein verloren gegangen ist. Die stärkste Expression und Synthese von LmxMPK7 findet sich für den Klon der Mutante, welche *LmxMPK7* ausschließlich auf dem Plasmid pX6MPK7TYC-ds trägt (Spur 3). Sie übersteigt die Expression und Synthese von LmxMPK7 in Wildtyp-Zellen bzw. die der add-back-

Mutante, laut Auswertung der Bandenstärke mittels Densitometrie, um das gut 16- bzw. 48-fache. Gefolgt von dem Klon der Mutante, welche zusätzlich zur episomalen Kopie noch im Besitz beider genomischen Kopien von *LmxMPK7* ist (Spur 2). Dieser exprimiert *LmxMPK7* mehr als doppelt so stark wie der Wildtyp. Unter Einbezug des Ergebnisses von beiden Antikörpern ist die Expression von *LmxMPK7* in der genomischen „add-back“-Mutante (Spur 4 und 5) annähernd vergleichbar mit der des Wildtyps. Für Zellen der „add-back“ Mutante, die in Gegenwart von Selektionsantibiotikum und für welche, die ohne dieses kultiviert worden sind (Spur 4 und 5) ist kaum ein Unterschied festzustellen.

In den verschiedenen Lysaten von axenischen Amastigoten nach drei Tagen Differenzierung konnte kein *LmxMPK7*-TY nachgewiesen werden (Abb. 34, Mitte und rechts). Das *LmxMPK7*-Antiserum liefert keine Bande im Amastigotenlysat von *L. mexicana* Wildtyp (Spur 1). Das Vorhandensein des *LmxMPK7*-Proteins in drei Tage alten Wildtyp-Amastigoten konnte jedoch in vorangegangenen Versuchen bereits unter Verwendung des Antiserums nachgewiesen werden (siehe 3.1.2.5).

Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte unter Verwendung des anti-TY-Antikörpers BB2. Sie lieferte Einblicke in das Expressionsniveau auf Einzelzellebene und die Lokalisation von *LmxMPK7*-TY in der Zelle. Der gebundene Erstantikörper BB2 wurde mit einem Alexa Fluor 488® tragenden anti-Maus Antikörper detektiert. Zur Lokalisation von Zellkern und Kinetoplast wurde mit DAPI gefärbt. .

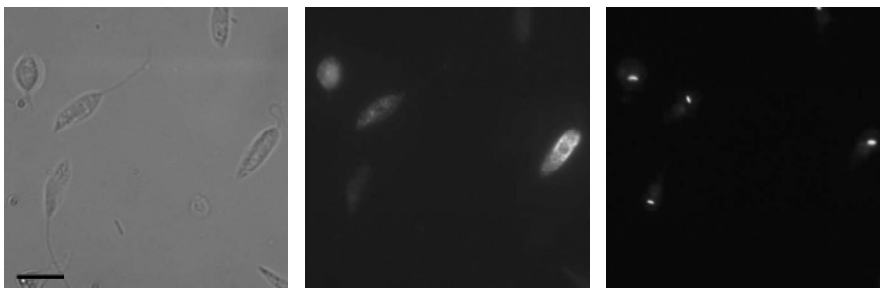
Trotz starker Kreuzreaktivität im Immunoblot liefert der Antikörper BB2 keine entsprechende Fluoreszenz im *L. mexicana* Wildtyp bzw.  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  (Abb. 35). In einigen Zellen dieser Kontrollen sind minimale, leuchtende Punkte im Cytoplasma zu erkennen. Ob es sich dabei um Artefakte oder das kreuzreaktive Protein handelt ist unklar. Die deutliche, cytoplasmatische Grün-Fluoreszenz der *LmxMPK7*-TY exprimierenden Mutanten stammt daher von *LmxMPK7*-TY, das der Antikörper gebunden hat. Innerhalb der untersuchten Mutanten findet sich die stärkste Grün-Fluoreszenz in Promastigoten bzw. axenische Amastigoten von  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6MPK7TYC-ds. Wobei zu sehen ist, dass die Färbung von Amastigoten schwächer ausfällt als die von Promastigoten (Abb. 35). Die Menge an vom Plasmid exprimiertem *LmxMPK7*-TY fällt innerhalb der Zellpopulation von  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6MPK7TYC-ds sehr heterogen aus. Es finden sich stark leuchtende Zellen, wenngleich die Mehrheit an Zellen eine mittlere bis schwache Färbung aufweist. Die wahrscheinlichste Erklärung für das unterschiedliche Expressionsniveau ist, dass das Plasmid in den einzelnen Zellen in unterschiedlicher Kopienzahl vorliegt. Als homogen gefärbte Population bilden sich Promastigoten der „add-back“-Mutante  $\Delta LmxMPK7(+/-)$ -TY ab. Die Färbung fällt im Vergleich zu der von Promastigoten der *LmxMPK7*-Nullmutante jedoch nur wenig stärker aus. Kein Unterschied ist zwischen der Fluoreszenz drei Tage alter axenischer Amastigoten der „add-back“-Mutante und der Nullmutante zu erkennen.



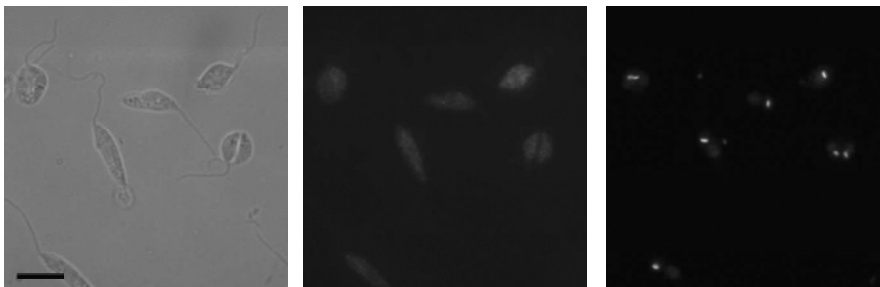
Sowohl für Promastigoten der LmxMPK7-TY episomal exprimierenden Mutante als auch für Promastigoten der LmxMPK7-TY-„add-back“-Mutante ist zu erkennen, dass die Grün-Fluoreszenzfärbung den Zellkern ausspart (Abb. 35, A2). Auch das Flagellum und der Bereich der Flagellartasche scheinen von der Färbung, welche sich ansonsten über die gesamte Zelle erstreckt, ausgenommen zu sein. Folglich scheint es sich bei LmxMPK7 um eine Kinase mit überwiegend cytoplasmatischer Lokalisation in Promastigoten zu handeln. Für Amastigoten konnte aufgrund der schwachen Fluoreszenz keine eindeutige Aussage getroffen werden.

### **A1: Promastigoten:**

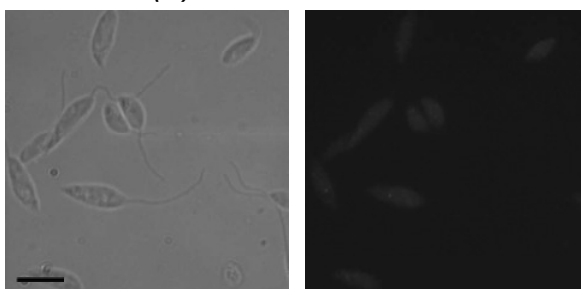
**$\Delta$ LmxMPK7(-/-) + pX6MPK7TYC-ds**



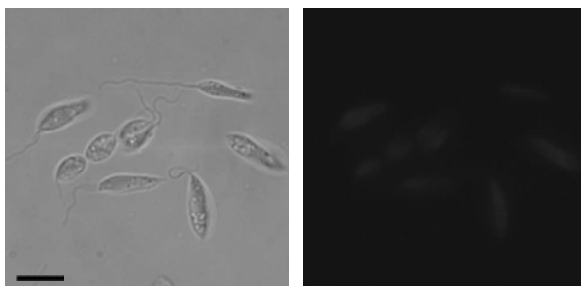
**$\Delta$ LmxMPK7(+/-) „add-back“**

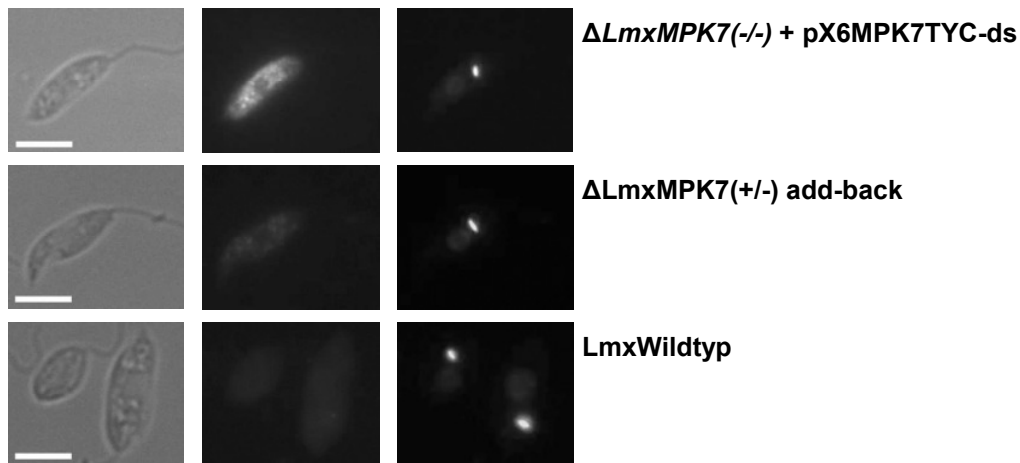
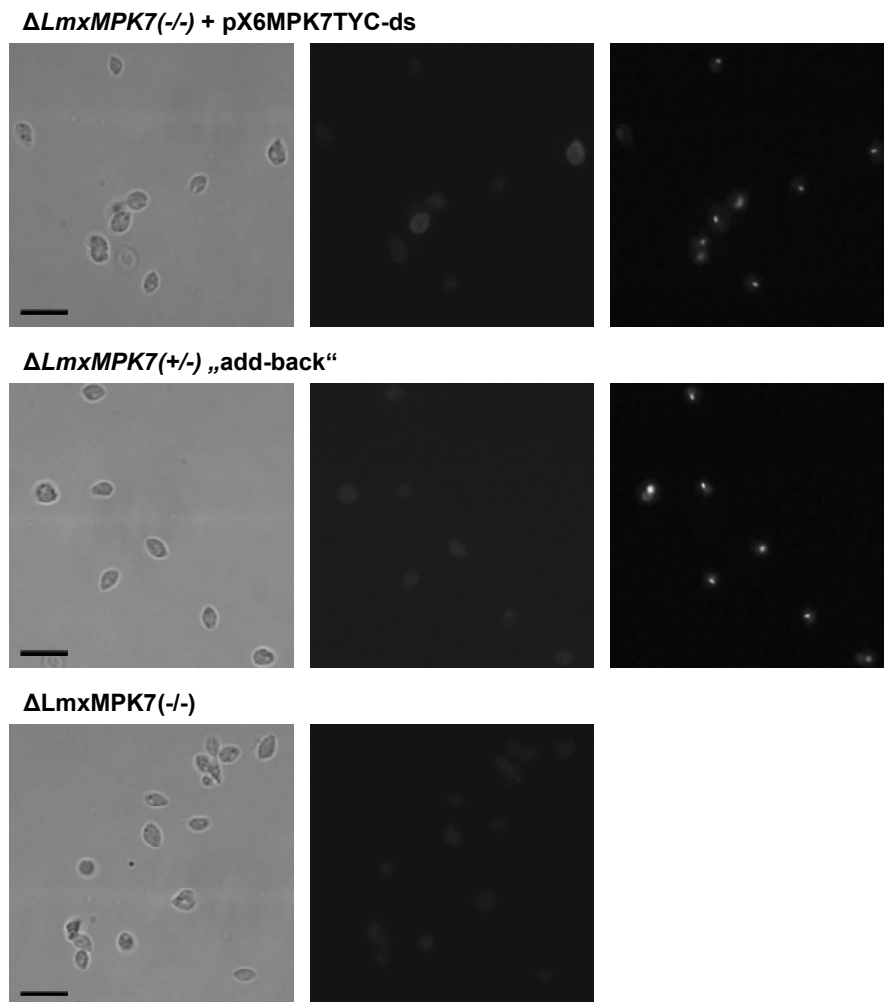


**$\Delta$ LmxMPK7(-/-)**



**2. Antikörper:  $\Delta$ LmxMPK7(-/-) + pX6MPK7TYC-ds**



**A2:****B: Amastigoten:**

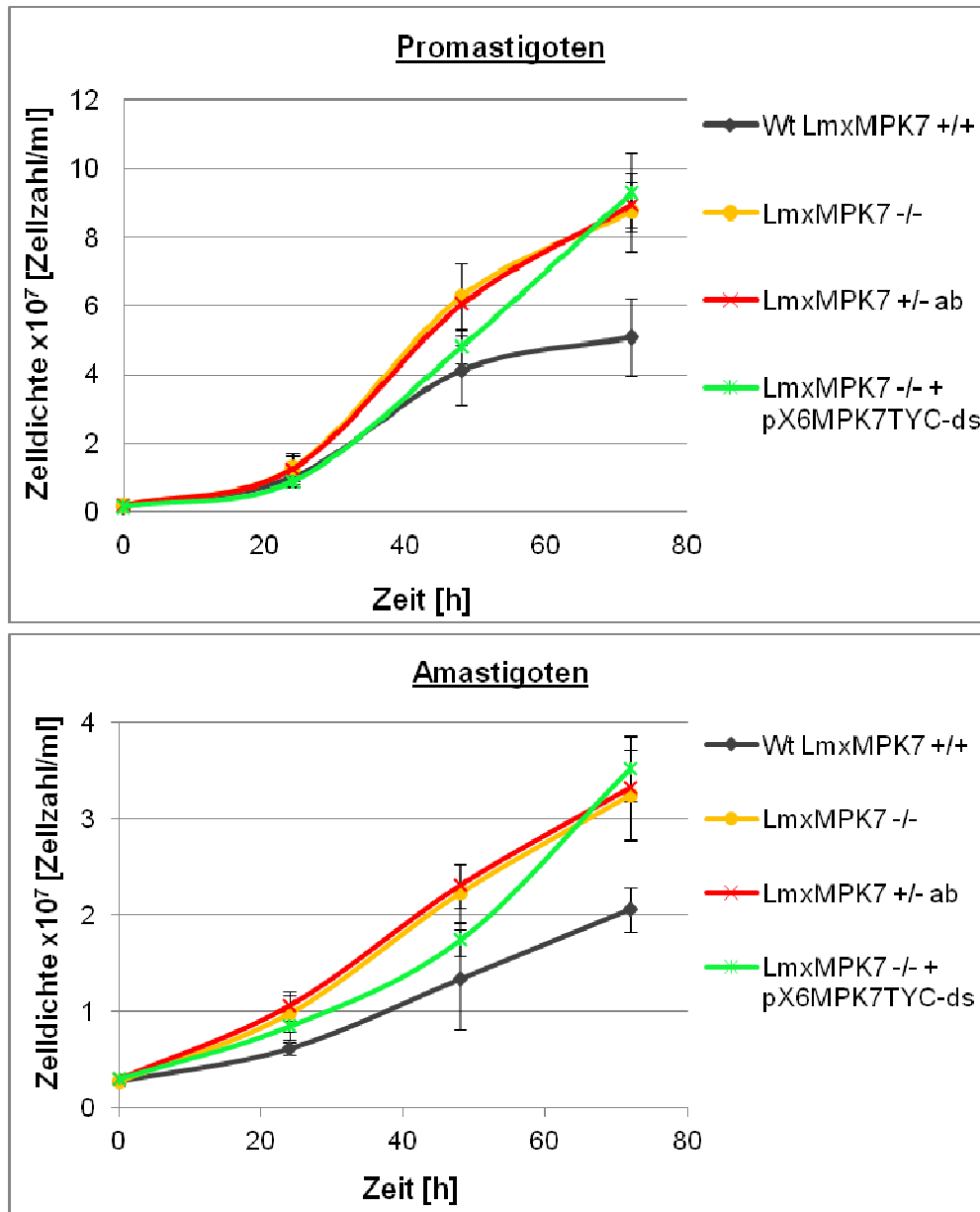
**Abb. 35: Nachweis von LmxMPK7-TY in unterschiedlichen Mutanten durch Immunfluoreszenzmikroskopie. A: Promastigoten** einer logarithmischen Kultur:  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6MPK7TYC-ds Klon B10;  $\Delta LmxMPK7(+/-)$  „add-back“-Mutante Klon B10G4;  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  Klon B10D4; Kontrollen:  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6MPK7TYC-ds Klon B10 ohne Erstantikörperinkubation bzw. LmxWildtyp. **B: Axenische Amastigoten** nach drei Tagen Differenzierung:  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6MPK7TYC-ds Klon H8;  $\Delta LmxMPK7(+/-)$  „add-back“-Mutante Klon H8H3;  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  Klon H8A12. Links: Phasenkontrastaufnahme; Mitte: Fluoreszenzaufnahme mit FITC-Filter, Expositionszeit für alle Aufnahmen 0,9 s; Rechts: Fluoreszenzaufnahme der DAPI-Färbung. Aufnahmen mit 100er Objektiv. Der Balken entspricht 6,57  $\mu\text{m}$  (A1 und B) bzw. 5  $\mu\text{m}$  (A2).

### 3.1.2.9 Wachstumsverhalten unterschiedlicher Mutanten im Vergleich

Die homozygote Deletionsmutante  $\Delta LmxMPK7$  zeigt im Vergleich zum Wildtyp ein beschleunigtes Wachstum. Zur Klärung der Frage, ob die genomische Reintegration von *LmxMPK7* in die Deletionsmutante zu einer Verlangsamung der Proliferationsgeschwindigkeit, möglicherweise sogar bis auf Wildtyp-Niveau führt, wurde das Wachstum der  $\Delta LmxMPK7(+/-)$ -„add-back“-Mutante mit dem von  $\Delta LmxMPK7$  und dem des Wildtyps verglichen. Zudem wurde in der gleichen Versuchsreihe die Wachstumsgeschwindigkeit der Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-) + pX6MPK7TYC$ -ds erhoben. Hierfür wurden Stabilate des zugrundeliegenden Wildtyps Wt'99, der Klone B10D4, D3E6 und H8A12 von  $\Delta LmxMPK7$ , der Klone B10G4, D3F5 und H8H3 der  $\Delta LmxMPK7(+/-)$ -„add-back“-Mutante und der Klone B10 und H8 der  $\Delta LmxMPK7(-/-) + pX6MPK7TYC$ -ds-Mutante in Kultur genommen und einmal bis wenige Male vor Versuchsbeginn passagiert. Für die Promastigotenkultur wurden je  $1-2 \times 10^6$  Promastigoten einer logarithmisch wachsenden Kultur in 10 ml komplettiertes SDM-Medium und zur Erzeugung von axenischen Amastigoten je  $3 \times 10^6$  Promastigoten einer logarithmischen wachsenden Kultur in 10 ml komplettiertes Schneiders-Medium überführt. Täglich wurden zu derselben Zeit Proben genommen und die Zelldichte durch Auszählung in der Neubauer-Zählkammer ermittelt (Abb. 36). Falls notwendig wurden die Amastigotenkulturen vor jedem Zählen zweimal behutsam durch die 23 G Injektionsnadel einer Spritze passagiert. Dies geschah, um der Ausbildung von Zellklumpen, wie dies häufig für den Wildtyp beobachtet wird, entgegenzuwirken.

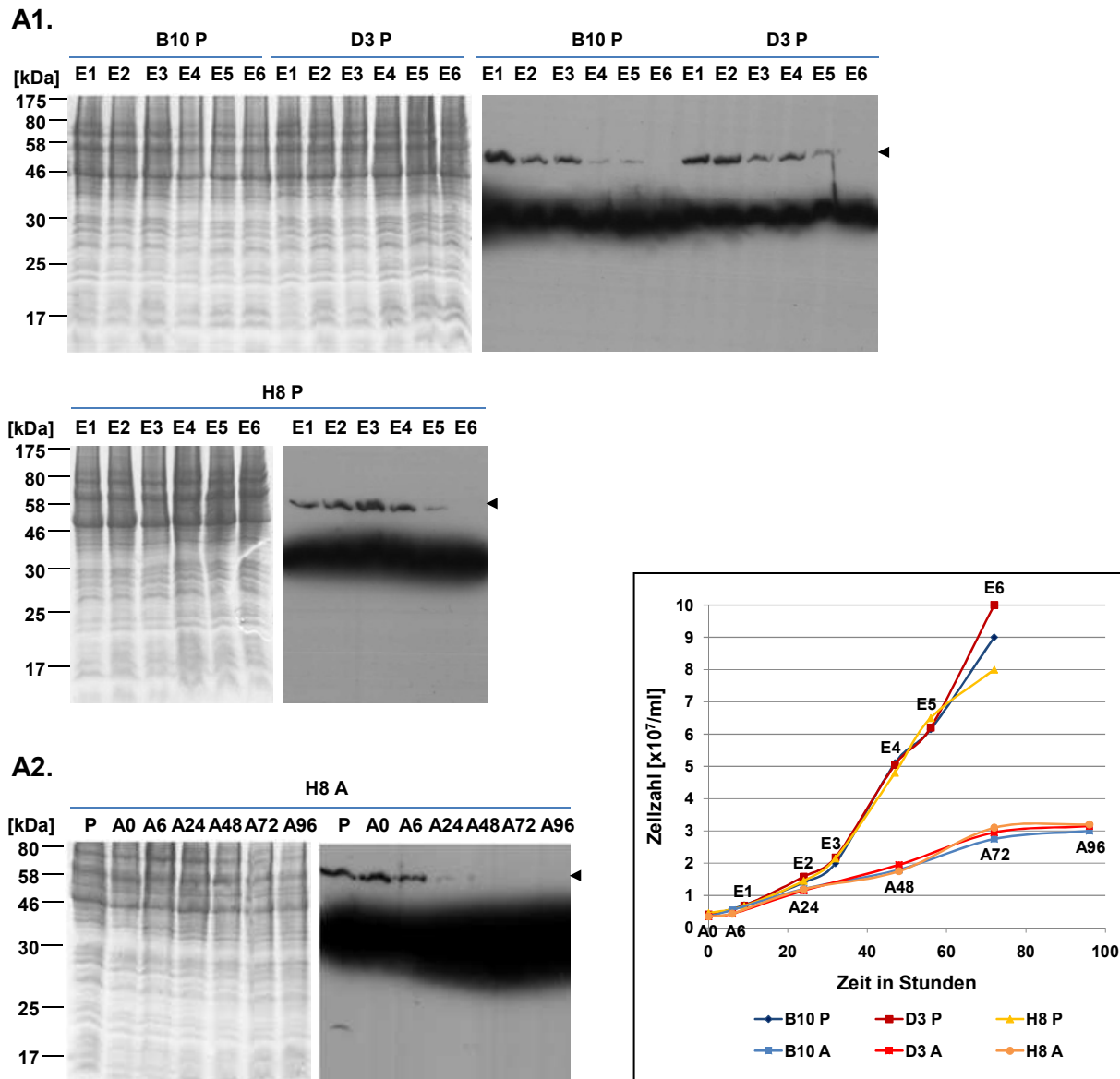
Wie die Wachstumskurve zeigt, wachsen die Klone der  $\Delta LmxMPK7(+/-)$ -„add-back“-Mutante sowohl im promastigoten als auch nach Differenzierung im amastigoten Lebensstadium mit derselben Geschwindigkeit wie die der  $\Delta LmxMPK7$ -Nullmutante und somit um das 1,3-1,8-fache schneller als der Wildtyp (Abb. 36). Es ist hierbei nicht von Bedeutung, ob die genomische „add-back“-Mutante in Gegenwart des Selektionsantibiotikums oder ohne dieses kultiviert wird, die Wachstumsgeschwindigkeit ist für beide Gruppen dieselbe (Kurve der Kultivierung ohne Antibiotikum wurde nicht in die Darstellung aufgenommen).

Die Promastigotenkultur der Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-) + pX6MPK7TYC$ -ds zeigt ab dem 48-Stundenwert eine Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit verglichen zu der des Wildtyps. Zum Zeitpunkt 24 Stunden besitzt sie noch eine ähnliche Zelldichte wie der Wildtyp. Zum Zeitpunkt 72 Stunden entspricht die gemessene Zelldichte der der *LmxMPK7*-Nullmutante (Abb. 36). Die Zelldichte der Amastigotenkulturen von  $\Delta LmxMPK7(-/-) + pX6MPK7TYC$ -ds bewegt sich zwischen der niedrigeren des Wildtyps und der höheren der Nullmutante und übersteigt nach 72 Stunden die der Nullmutante.



**Abb. 36:** Proliferation unterschiedlicher *LmxMPK7*-Mutanten und von *L. mexicana* Wildtyp (Wt) im pro- und amastigoten Lebensstadium. In die Wachstumsreihe eingeschlossen wurden der Wt'99, die Klone B10D4, D3E6 und H8A12 von  $\Delta LmxMPK7$ , die Klone B10G4, D3F5 und H8H3 der  $\Delta LmxMPK7(+/-)$ -„add-back“-Mutante und die Klone B10 und H8 der Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6MPK7TYC-ds. Die Auszählungen der einzelnen Klone wurden für jede Mutante durch Bildung des Mittelwerts zusammengefasst. Die Wachstumsreihe wurde für die Klone B10 und H8 Promastigoten je dreimal ( $n = 3$ ) und Amastigoten je zweimal ( $n = 2$ ) und D3F5 und D3E6 je zweimal durchgeführt ( $n = 2$ ). Für alle anderen Klone galt: Amastigoten  $n = 4$  und Promastigoten  $n = 5$ . Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung an.

Ein weiteres Wachstumsexperiment wurde mit den Klonen B10, D3 und H8 der Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6MPK7TYC-ds, welche *LmxMPK7* ausschließlich episomal als TY-Fusionsprotein exprimiert, vorgenommen (Abb. 37). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden parallel zu den Proben zur Ermittlung der Zelldichte, Proben zur Herstellung von Gesamtzelllysaten gewonnen. Nach Aufschluss der Proben wurde *LmxMPK7-TY* mit dem anti-TY-Antikörper im Immunoblot nachgewiesen.



**Abb. 37: Nachweis von LmxMPK7-TY der Mutante  $\Delta$ LmxMPK7(-/-)hyg/phleo + pX6LmxMPK7TYC-ds im Immunoblot. A1: Promastigoten (P) Klone B10, D3 und H8 A2: Nach Differenzierung zu Amastigoten (A) Klon H8. Das Diagramm zeigt die Entwicklung der Zelldichte und die Zeitpunkte der Probenentnahme: Promastigoten E1-E6 und Amastigoten A0-A96. Einsatz des anti-TY-Antikörpers BB2 1:500. Links: Coomassie-gefärbtes SDS-PA-Gel. Rechts: Film nach 1 h Exposition.**

Die Promastigotenkultur wurde mit einer Zelldichte von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml angeimpft und ihr Wachstum bis zu einer Zelldichte von  $\sim 9 \times 10^7$  Zellen/ml verfolgt (Abb. 37, A1). In den Proben zu Beginn der Promastigotenkultur mit Zelldichten kleiner  $2 \times 10^7$  Zellen/ml (E1-E3) ist eine deutliche Bande auf Höhe von LmxMPK7 auf dem Film zu sehen. In der Immunoblot-Analyse ist für alle drei Klone ab einer Zelldichte von  $\sim 5 \times 10^7$  Zellen/ml (ab Probe E4) auf dem Film eine fortschreitende Abnahme der Schwärzung auf Höhe von LmxMPK7-TY zu erkennen. Bei einer Zelldichte von  $8-10 \times 10^7$  Zellen/ml nach 72 h Kultur ist keine Bande für das TY-Fusionsprotein mehr nachweisbar. In Spur B10 P E4 und D3 P E3 ist etwas weniger Protein aufgetragen. Die Amastigotenkultur wurde mit einer Zelldichte von  $3,5 \times 10^6$  Zellen/ml aus einer logarithmisch wachsenden Promastigotenkultur angesetzt. Das Wachstum der sich

differenzierenden Kultur wurde über 96 Stunden verfolgt. Im Immunoblot nimmt die nachgewiesene Proteinmenge von LmxMPK7-TY moderat ab sechs Stunden *in vitro* Differenzierung ab (Abb. 37, A2: dargestellt für Klon H8). Die Kinase ist in der Probe des 48-Stundenwertes noch nachweisbar (A48), nach 72 bzw. 96 Stunden (A72 bzw. A96) schlägt die Detektion jedoch fehl. Nach 72 Stunden bilden alle drei Klone eine morphologisch unauffällige Amastigotenkultur aus, deren Wachstumsverhalten bereits der einer stationären Kultur mit verminderter Zellteilungsaktivität entspricht (siehe Wachstumskurve Abb. 37).

## 3.2 Charakterisierung der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) aus *Leishmania mexicana*

Es existieren zwei Isoformen der Glykogensynthase-Kinase 3 in humanen Zellen – GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$ . Das Genom von *Leishmania mexicana* war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht sequenziert. Die Analyse der Gendatenbank von *L. major* ergab zwei Sequenzen putativer Glykogensynthase-Kinasen, annotiert unter LmjF.22.0490 und LmjF.18.0270. Diese Sequenzen dienten als Ausgangspunkt für die Suche und anschließende Isolierung der Homologe *LmxGSK3 $\alpha$*  und *LmxGSK3 $\beta$*  aus *L. mexicana*.

### 3.2.1 Isolierung aus einer gDNA-Phagenbank und Sequenzierung der Gene mit flankierenden Regionen

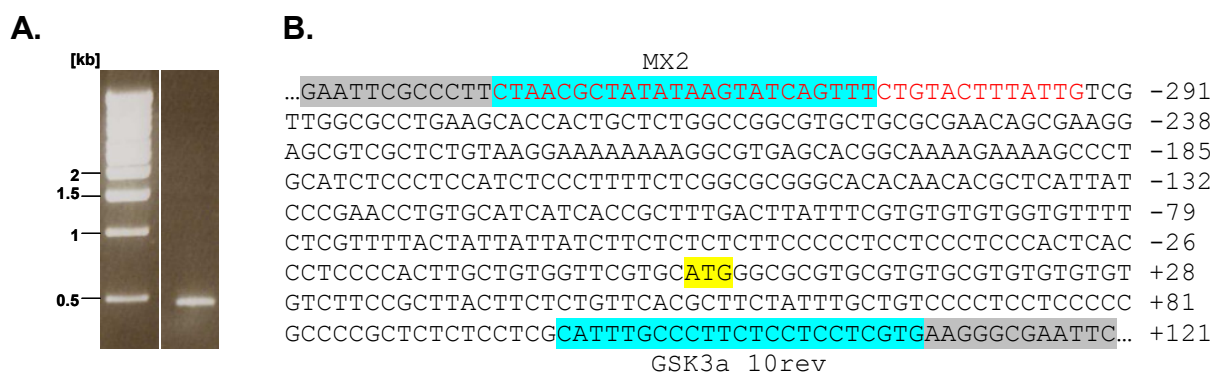
Anhand eines zwischen den Spezies *L. major* und *L. infantum* hochkonservierten Bereichs von GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$  wurden Oligonukleotide entworfen. Mit den Oligonukleotiden GSK3\_1for und GSK3\_1rev für GSK3 $\alpha$  bzw. GSK3b\_1for und GSK3b\_1rev für GSK3 $\beta$  wurde jeweils eine PCR auf genomischer DNA von *L. mexicana* durchgeführt. Das 340 bp (GSK3 $\alpha$ ) bzw. 292 bp (GSK3 $\beta$ ) große Amplifikat wurde nach Klonierung in pCR2.1 durch Sequenzierung überprüft. Unter Verwendung des jeweiligen PCR-Produkts, derselben Primer und des DIG-Kits der Fa. Roche wurde in einer zweiten PCR jeweils ein Digoxigenin markiertes DNA-Fragment generiert. Ein Alignment der Gensequenzen einschließlich Position der Sonden findet sich im Anhang. Mit den DIG-markierten Gensonden wurde eine *L. mexicana* gDNA-Phagenbank nach den korrespondierenden Genen von GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$  durchsucht. Hierbei konnte auf eine in der Arbeitsgruppe bereits vorhandene  $\lambda$  DASH II-gDNA Phagenbank von *L. mexicana* zurückgegriffen werden. Aus den identifizierten Phagenklonen wurde DNA isoliert und mit der Restriktionsendonuklease *Xba*I gespalten. Die entstandene Fragment wurde in das pBSKII(+)-Plasmid, welches ebenfalls mit *Xba*I linearisiert worden war, kloniert.

#### 3.2.1.1 *LmxGSK3 $\alpha$*

Der Klon pBSKGSK3 $\alpha$ 9XI trug ein ~7 kb großes Insert. Die Sequenzierung zeigte, dass dieses den vollständigen ORF von *LmxGSK3 $\alpha$*  und flankierende Bereiche enthielt. Der Anfangsbereich des Gens enthält eine „genuntypische“ Sequenz, welche am N-Terminus des Proteins im Abstand von 42 Aminosäuren zweimal zu einer Aminosäurenabfolge von Valin und Cystein im Wechsel führt. Beide Oligo-VC-Sequenzabschnitte umfassen 7-8 Aminosäuren. Das Start-Methionin wurde daher durch Bestimmung der für das Trans-Spleißen wichtigen AG-Akzeptorsequenz verifiziert. Hierzu wurde aus Promastigoten von *L. mexicana* RNA präpariert. Reife mRNA-Moleküle besitzen an ihrem 5'-Ende eine 39 bp lange Miniexonsequenz (spliced leader sequence). Diese wird durch die Trans-Spleiß-

reaktion an eine AG-Akzeptorsequenz („splice addition site“) der prä-mRNA angehängt und an ihrem 5'-Ende mit 7-Methylguanosen versehen. Beim nächsten, dem AG-Dinukleotid in der Sequenz folgenden ATG-Basentriplett handelt es sich um das Start-Methionin.

Mit Hilfe der RNA-abhängigen DNA-Polymerase Reverse Transkriptase (RT) wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde im Anschluss als Ausgangsmaterial für eine PCR verwendet, bei welcher ein gegen die Miniexonsequenz gerichteter Vorwärtsprimer (MX2) und ein in der Gensequenz bindender Rückwärtsprimer (GSK3a\_10rev) zum Einsatz kamen (Programm: 5 min 94 °C, 30 x [30 s 94 °C, 30 s 56 °C, 1 min 30 s 72 °C], 7 min 72 °C, 4 °C). Das 451 bp große PCR-Produkt (Abb. 38, A) wurde in pCR2.1-TOPO kloniert. Die Sequenzierung ergab, dass die AG-Akzeptorsequenz 296 bp vor dem Start-Codon liegt (Abb. 38, B).



**Abb. 38: Reverse Transkriptase-PCR zur Ermittlung der AG-Akzeptorsequenz des Transkripts.**  
**A:** Nachweis des 451 bp großen Amplifikats im Agarosegel. **B:** Auswertung der Sequenzierung: Der sequenzierte Teil der Miniexonsequenz ist in roten Buchstaben dargestellt. Das Start-Codon ist gelb, die Sequenz der Oligonukleotide türkis, die Plasmidsequenz grau unterlegt.

Der ORF von *LmxGSK3α* umfasst 2532 bp. Neben der Gensequenz wurden 313 bp der stromauf- und 347 bp der stromab-Sequenz durch Sequenzierung mittels Vorwärts- und Rückwärtsprimer doppelt bestätigt. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz findet sich im Anhang. Die vollständige Sequenz von *LmxGSK3α* wurde in der NCBI-Datenbank unter der Zugangsnummer DQ812911 veröffentlicht. Die Nukleotidsequenz von *LmxGSK3α* wurde nach Publikation der *L. mexicana* Genomsequenz (Rogers et al., 2011) mit dieser verglichen und stimmte mit dem zugehörigen Korrelat auf Chromosom 22 überein. Es sei erwähnt, dass von den Autoren des Genomprojekts ein Protein mit kürzerem N-Terminus annotiert wurde (Accession: NCBI: CBZ27015; Gene-DB: LmxM.22.0490). Als Start wurde hierbei das Methionin-121 der von uns veröffentlichten *LmxGSK3α*-Aminosäuresequenz angenommen.

### 3.2.1.2 *LmxGSK3β*

Der Klon pBSKGSK3β1.2XI trug ein > 12 kb großes Insert, welches das 1068 bp lange Gen von *LmxGSK3β* und flankierende Bereiche umfasst. Neben der Gensequenz wurden 398 bp der stromauf- und 686 bp der stromab-Sequenz durch Sequenzierung mittels Vorwärts- und Rückwärtsprimer doppelt bestätigt. Die Sequenz findet sich zusammen mit der Proteinsequenz im Anhang. Die vollständige Sequenz von *LmxGSK3β* wurde in der NCBI-Daten-



bank unter der Zugangsnummer DQ812912 hinterlegt. Die im *L. mexicana* Genomprojekt ermittelte Nukleotidsequenz auf Chromosom 18 und annotierte Aminosäuresequenz (Accession: NCBI: CBZ25535; Gene-DB: LmxM.18.0270) entspricht der von uns ermittelten Sequenz von LmxGSK3 $\beta$ .

Sowohl *LmxGSK3 $\alpha$*  als auch *LmxGSK3 $\beta$*  liegen in einfacher Kopie im Genom von *L. mexicana* vor.

### 3.2.2 *In silico*-Untersuchung von LmxGSK3

LmxGSK3 $\alpha$  besteht aus 843 Aminosäuren und besitzt ein durchschnittliches Molekulargewicht von ~90,9 kDa und einen isoelektrischen Punkt (pI) bei pH 6,5.

LmxGSK3 $\beta$  ist aus 355 Aminosäuren aufgebaut und hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von ~40,7 kDa und einen pI bei pH 7,6.

Beim Sequenzvergleich beider parasitärer Glykogensynthase-Kinasen mit den humanen Enzymen zeigt sich für LmxGSK3 $\alpha$  eine nur mäßige Homologie, sowohl zu GSK3 $\alpha$  als auch zu GSK3 $\beta$  von *Homo sapiens* (zu ~18 % bzw. ~19 % gleiche und zu ~25 % bzw. ~26 % ähnliche Aminosäurereste). LmxGSK3 $\beta$  entspricht mit ~37 % Sequenzgleichheit und über 52 % Sequenzähnlichkeit als Homolog eher der humanen GSK3 $\beta$ . Zudem besitzt LmxGSK3 $\beta$  ein höheres Maß an Homologie zur humanen GSK3 $\alpha$  (~32 % Gleichheit und ~46 % Ähnlichkeit), als dies für LmxGSK3 $\alpha$  der Fall ist. In dieser Arbeit wurde in Anlehnung an die Nomenklatur in Säugetieren, das in *L. mexicana* identifizierte kürzere Homolog als „ $\beta$ “ und die längere Form als „ $\alpha$ “ gekennzeichnet. Es sei hiermit darauf hingewiesen, dass es sich bei LmxGSK3 $\alpha$  und LmxGSK3 $\beta$  nicht um eindeutige Äquivalente von GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$  von Säugetieren handelt.

#### GSK3 $\alpha$

	Lmx	Lin	Lmj	Tb	Tc	LmxGSK3 $\beta$	Hsap
Lmx		83,4	78,1	25,3	24,9	17,9	18,2
Lin	85,8		79,4	25	24,9	18	18,8
Lmj	80,4	80,7		28	28,9	20,7	19,7
Tb	34,1	33,9	38,2		53,4	28,7	27,8
Tc	34,3	33,8	39,2	66,5		29,1	29
LmxGSK3 $\beta$	26,4	26,9	30,7	42	42,8		32,6
Hsap	25,7	26,6	28,1	39,2	39,8	46,8	

**Tab. 2:** Aminosäurengleichheit (in %; oberhalb der Diagonale) und Aminosäureähnlichkeit (in %; unterhalb der Diagonale) von LmxGSK3 $\alpha$  im Vergleich zu homologen Proteinen anderer Kinetoplastiden sowie zur humanen GSK3 $\alpha$  und zu LmxGSK3 $\beta$ . Lmx: *L. mexicana*, Lmj: *L. major*, Lin: *L. infantum*, Tb: *T. brucei*, Tc: *T. cruzi*, Hsap: *Homo sapiens*. Die Zugangsnummer der jeweiligen Aminosäuresequenz findet sich unter 2.2.12.1. Die Tabelle wurde mit Emboss Needle erstellt.

LmxGSK3 $\alpha$  weist ein großes Maß an Homologie zu der langen GSK3 der anderen Leishmanienspezies auf (Siehe Tabelle 2). Mit der langen Form von *L. infantum* und *L. major* teilt sie eine um die 80 % gleiche und zwischen 80 und 85 % ähnliche Aminosäuresequenz. Die

für das Homolog aus *L. donovani* annotierte Sequenz umfasst lediglich 147 Aminosäuren. Die Translation der sich der annotierten Sequenz anschließenden Gensequenz zeigt eine Fortsetzung der anzunehmenden Aminosäuresequenz in einem anderen Leseraster. Für GSK3 $\alpha$  aus *L. braziliensis* liegt für den C-Terminus keine Gensequenz vor. Die vermutlich nicht vollständigen Aminosäuresequenzen dieser Proteine wurden für Homologievergleiche nicht herangezogen. Zu GSK3 $\alpha$  von *T. brucei* bzw. *T. cruzi* besteht eine Sequenzgleichheit von ~25 % und Sequenzähnlichkeit von ~34 %.

### **GSK3 $\beta$**

	<b>Lmx</b>	<b>Lin</b>	<b>Lmj</b>	<b>Lbr</b>	<b>Tb</b>	<b>Tc</b>	<b>LmxGSK3<math>\alpha</math></b>	<b>Hsap</b>
<b>Lmx</b>		98,6	96,9	93	65,1	68,3	17,9	37,3
<b>Lin</b>	99,7		98	93,5	65,1	68	17,8	37,5
<b>Lmj</b>	98,6	99,2		93,5	65,7	68,3	18,4	37,5
<b>Lbr</b>	96,3	96,9	95,8		66,9	66,6	17,4	37,8
<b>Tb</b>	79,9	80,2	80,9	80,6		77,9	18,3	39,2
<b>Tc</b>	83,4	83,1	83,1	82,9	90,4		18,9	38,8
<b>LmxGSK3<math>\alpha</math></b>	26,4	26,1	26,9	25,1	25,9	26,5		19,2
<b>Hsap</b>	52,8	52,8	53	53,4	54,3	54,7	26,8	

**Tab. 3: Aminosäuregleichheit (in %; oberhalb der Diagonale) und Aminosäureähnlichkeit (in %; unterhalb der Diagonale) von LmxGSK3 $\beta$  im Vergleich zu homologen Proteinen anderer Kinetoplastiden sowie zur humanen GSK3 $\beta$  und zu LmxGSK3 $\alpha$ .** Lmx: *L. mexicana*, Lin: *L. infantum*, Lmj: *L. major*, Lbr: *L. braziliensis*, Tb: *T. brucei*, Tc: *T. cruzi*, Hsap: *Homo sapiens*. Die Zugangsnummer der jeweiligen Aminosäuresequenz findet sich unter 2.2.12.1. Die Tabelle wurde mit Emboss Needle erstellt.

Die GSK3 $\beta$ -Vertreter von Leishmanien sind aus der gleichen Anzahl von Aminosäuren aufgebaut und weisen ein hohes Maß an Homologie auf. Die Sequenz der Form aus *L. donovani* stimmt exakt mit der *L. infantum*-Sequenz überein und ist der *L. mexicana*-Sequenz am ähnlichsten (über 98 % Gleichheit und mehr als 99 % Ähnlichkeit). Auch die Aminosäuresequenz von GSK3 $\beta$  von *L. major* (~97 % Gleichheit, ~99 % Ähnlichkeit) und *L. braziliensis* (93 % Gleichheit, ~93 % Ähnlichkeit) zeigt ein großes Maß an Übereinstimmung zu LmxGSK3 $\beta$  (Siehe Tabelle 3).

Hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz weisen die humane GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$  zu ~66 % gleiche und zu ~73 % in ihrer Eigenschaft ähnliche Reste auf. Zu ~97 % ähnliche Reste und ein hohes Maß an Übereinstimmung von ~91 % zeigt die Kinasedomäne beider humanen GSKs. Der Sequenzvergleich zeigt: Die beiden in *L. mexicana* identifizierten GSK3-Formen besitzen untereinander eine viel geringere Ähnlichkeit von ~26 % und weisen zu knapp 18 % an den jeweiligen Positionen die gleichen Reste auf. Gleichermäßen verhält es sich für ihre Kinasedomäne, diese ist zu ~22 % aus gleichen und zu fast 32 % aus Resten mit ähnlichen Eigenschaften aufgebaut. Der Blick auf die Sequenz gibt Aufschluss, wie dieses geringe Maß an Homologie zustande kommt. Im Vergleich zu den humanen Formen und zu LmxGSK3 $\beta$  besitzt LmxGSK3 $\alpha$  innerhalb der Kinasedomäne drei zusätzliche Einschübe sowie eine deutlich längere CMGC-Insertion zwischen Domäne X und XI. Zwischen der

Domäne III und IV von GSK3 $\alpha$  findet sich ein Einschub von 53 Aminosäuren (AS) Länge für *Leishmania spec* und 50 Aminosäuren Länge für *Trypanosoma* (Sequenzalignment Abbildung 39). Der zweite und dritte Sequenzeinschub von 52 bzw. 67 Aminosäuren zwischen Domäne IV und V bzw. V und VIa stellt sich nur bei der alpha-Form der aufgeführten Leishmanien-Spezies dar, nicht jedoch bei der von Trypanosomen. Bei diesen Einschüben handelt es sich um Schleifen, die sich zwischen den konservierten Domänen befinden. Für die Schleifen werden so gut wie keine Sekundärstrukturelemente vorhergesagt (Abb. 39). Das CMGC-Insert umfasst bei LmxGSK3 $\alpha$  165 Aminosäuren und ist somit deutlich länger als bei der langen Form von Trypanosomen (*T. brucei*: 73 AS, *T. cruzi*: 65 AS), *Homo sapiens* (36 AS) und LmxGSK3 $\beta$  (39 AS). Werden die Einschübe und die Verlängerung der CMGC-Insertion bei Homologie-Vergleichen der Kinasedomäne nicht mit einbezogen, zeigt sich eine deutliche Zunahme der Übereinstimmung zwischen den Spezies: Die Kinasedomäne von LmxGSK3 $\alpha$  besitzt dann zur Kinasedomäne der humanen GSK3 $\alpha$  bzw. GSK3 $\beta$  eine Gleichheit der Aminosäuresequenz von knapp 45 % und eine Ähnlichkeit von ~ 63 %. Für LmxGSK3 $\beta$  sind dies im Vergleich 49 % Gleichheit und ~ 69 % Ähnlichkeit zu der Kinasedomäne der humanen Formen. Zu der Kinasedomäne von LmxGSK3 $\beta$  stimmt die von LmxGSK3 $\alpha$  dann zu ~ 42 % überein und zeigt eine Sequenzähnlichkeit von ~ 60 %.

Die Glykogensynthase-Kinasen von Trypanosomatiden teilen dieselbe, für alle Proteinkinase charakteristische Grundstruktur. Ihre katalytische Domäne setzt sich aus den 12 bekannten Subdomänen zusammen. Die zentralen konservierten Reste sind für alle untersuchten GSK3s gleich (Siehe Sequenzalignment GSK3 $\alpha$  bzw. GSK3 $\beta$  in Abb. 39). GSK3s aus *L. mexicana* weisen für Serin-/Threoninkinasen charakteristische Motive (Hanks et al., 1988) auf. Die Abfolge D-L-K-P-A-N von LmxGSK3 $\alpha$  bzw. D-I-K-P-H-N von LmxGSK3 $\beta$  in Subdomäne VIb und C-S-R-Y-Y-R-A-P-E in Subdomäne VIII beider Leishmanien-GSK3s repräsentieren die für Ser-/Thr-Kinasen typischen Motive D-L-K-P-E-N und G-T/S-x-x-Y/F-x-A-P-E. Ein weiteres konserviertes Merkmal von Ser-/Threoninkinasen findet sich in S189 von LmxGSK3 $\beta$  bzw. S502 von LmxGSK3 $\alpha$  in der katalytischen Schleife, welches mit dem positiv geladenen Rest K153 bzw. K464 interagiert (Krupa et al., 2004). Das RD-Motiv in Subdomäne VIb findet sich in Proteinkinase, welche durch Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife reguliert werden (Johnson et al., 1996). Dieses Motiv ist auch in GSK3 vorhanden. Das für die CMGC-Kinasefamilie spezifische Konsensusmotiv L-G-x-P, hier für LmxGSK3 $\alpha$  L-G-A-P und LmxGSK3 $\beta$  L-G-C-P, findet sich am Start der für CMGC-Kinasen charakteristischen Insertion zwischen Subdomäne X und XI (Kannan und Neuwald, 2004). Für diesen nicht konservierten C-terminalen Bereich von LmxGSK3 $\alpha$  wurden vier  $\alpha$ -Helices vorhergesagt. Das 39 Aminosäuren lange CMGC-Insert von LmjGSK3 $\beta$  weist zwei  $\alpha$ -Helices mit dazwischenliegender 3/10-Helix auf.

## A. GSK3α Sequenzalignment

Lmx	MGACVVCVCVCLPLTSLFTLLFAVPSSPAPLSPRICPSPPRVSCRSSQTASLRVVCVVCVCLG--ERIGAEAGPCCSYTR	77
Lin	MGACVVCVHVFRLLCSRFFLFAVPSSSP-----APPSRVSCPSSQKAFRLRARVCVPRRASRCGSGSSRHRAPVARIR	72
Lmj	-----	
Lbr	-----	
Tb	-----	
Tc	-----	
Hs	-----MSGGGPSSGGPGGGSG	15
LmxGSK3b	-----	
Lmx	TCTRVSYLPKVLKCCPVTPPLPIS-----RVLYSSSPLPSLQVMSEKSMQPRRPLSSSRASARASAAS-----	140
Lin	TFTRIAHSPKALSKYCPFTPLSTSSCFSRFAFFRPPFPPLPTLQVMSEKSVRSRRPLSVSRASARASAAS-----	141
Lmj	-----MRSRRPLSASRASARASAAS-----	20
Lbr	-----MSDKPTRSRRLPSAAQISARASGAS-----	25
Tb	-----MSERILPS--TLRGVTNGQKEVTASVGERVPLLPR	33
Tc	-----MRKLSGDLKATAATPLT	17
Hs	RARTSFAEPGGGGGGGGGGPGGSASGPGGTGGGKASVGMGGVGASSGGGPGGSGGGGSGGGGAGTSFPPPGVKLG	94
LmxGSK3b	-----	
Lmx	----RPQPHRTVSSDGASRSQTTTPMYRPLRYVGRGSFGVLLAEVHTGDKVAI RVHYDARLHNREVAILNSVLVDN	215
Lin	----RPQLHRTVSSDGASPSQATAPMYRPLRYVGRGSFGVLLAEVHTGVKVAIKRVHYDARLHNREVAILNSVLVDN	216
Lmj	----RPQPHTTVSSDDASRSQTTAPIYRPLRYVGRGSFGVLLAEVHTGDRVAIKRVHYDARLHNREVAILNSVLVDN	95
Lbr	----RPQAQRSVSSGGTARAQATTPVYRPLRYVGRGSFGVVLLAEELHTGEKVAIKRVHYDARLHNREVAILNSVLVDN	100
Tb	RFSARPQGNQEAQERTAVKCEQVR--YAIQEVIGRGAFGEVSSAEVVGTRDLVAIKRVIHDGRLRQRELTLMRDHLG--	108
Tc	PPVTPPQPQPDGTRDRSKSAGGQAT--YEPLHVLQGSFGVMMARVRETGKMVAVKVLFDRRLHHRDLRLRDHLG--	92
Hs	RDSGKVTTVVATLGQGPERSQEVA--YTDIKVINGSGFGVYQARLAETRELVAIKVLQDKRFKNEFLQIMRKL----	167
LmxGSK3b	----MSLNAADAADERSRKEMDR--FLVERMAQGTFTGTVQLGKEKSTGMSVAIKKVIQDPRFRNRELQIMQDLAVL-	71
	: . *.*:* * .. * **:* * * *:*:* * ..	
	I II III	
Lmx	PRHQQPSNTAVDSNDTSRLPDGATRISSTSSPSALSSSHTVEDVHLWPGTH--HPNIVELLDIFYVTYDTASSEQVL	289
Lin	PRHQQPSHTTVVDSNDASRLPGGAAASSTSFLSASSSHTVEDVHLWPGTH--HPNIVELLDIFYVTYDTASSEQAL	290
Lmj	PRHQQPSSTAVDSNDASRRPGGAAASCTSFLSASSSHTVEDVHLWPGTH--HPNIVELLDIFYVTYDTASSEQAL	169
Lbr	PRHQQTSSTVGGSTGVSRLSGGTIGASLSPSLSASSSHTVEDVHLWAGRH--HPNIVELLDIFYVTYDTSS-EQAL	173
Tb	PNTQQGGVSSLDVGNVGAHATSVTGSNGEEANGTTAIDGLESWN-MPTIVPYHPCVVKLLDHFASDPSPG-VQ--	180
Tc	PGTHAGQAGTGNHDD-PGKEAGKTDPSNTNNSAGEVGFPLGLDLASVPTTVSYHPCIVRLLDHFVTAVGPNQ-EQ--	164
Hs	-----DHCNIVRLRYFFYSSEKKDE--	188
LmxGSK3b	-----HHPNIVQLQSYFYTLGERDRRD--	93
	* :*. * .:	
	IV	
Lmx	GADMVGTGGAGAGFEFLPSHHPTAHRYPLSGGGAASASAPPASAPLAAFAYLEMVMSYLPMDLCYVKKYYFRFHDM	366
Lin	GPDVGVGGASAGFESLPSHHPAAHRYPLSGGGAASTNAPPVAPLAAFAYLEMVMSYLPMDLCYVKKYYFRFHDM	367
Lmj	GADMVAGGAGAGFEFLPSYHHPAAHRYPLSGGGAASASAPPVAPLAAFAYLEMVMSYLPMDLCYVKKYYFRFHDM	246
Lbr	GLDMVAGGAGTGAFFELSSHPTAHRYPLSGGRGPTSPGVLSASAPLSAFAYLEMVMSYLPMDLCYMKKHFHFRHEI	250
Tb	-----YLFMVMYIPLDVRRLHMHFLRQREQ	206
Tc	-----YLYIVMDYLPDIHHLHHIYLRQKQQ	190
Hs	-----LYLNLVLEYVPETVYRVARHFHTKAKLT	215
LmxGSK3b	-----IYLNVMVYVPTLHRCRNYRRQVA	120
	** :* :* * : : : : :	
	V	
Lmx	PTMVTSSSSSPLASPEQAPTDLSSGELPEGTADRSPASPKHAGTGCNGSNSRRHGSTGSSGADVNCNHLPLRWVKVVL	444
Lin	PTMVTSSSSSPLASPEQAAAELLSGELPEGTADRPPASPKHAGTGCNGSNSRRHSSTGGSGGDAFNHLPLRWVKVVL	445
Lmj	PTIATSSSSSPIASPEQAPELSSGELPEGTADRLPASPKHAGTGCNGSNSRRHSSTSSGGDVNCNHLPLRWVKVVL	324
Lbr	PSRIASSASPLVSPVQAPTDLSSGELPECMAGRPPSPKHPGTDCRKRSSCCHSSTGTSGGDFHNLPLNWKVVL	328
Tb	-----QMPIILVKVIMF	218
Tc	-----RMPFILVKVIMF	202
Hs	-----IPILYKVVYMY	226
LmxGSK3b	-----PPILIKVFL	131
	* :** ::	

Lmx	QLARALAFMH--VRHVCHFDLKPANVLVDPDTGRVRLCDFGSAKLIARPG----EKNVSIICRYRRAPELLFGALH	516
Lin	QLARALAFMH--VRHVCHFDLKPANVLVDPDTGRVQVCFDGSAKQIARPA----EKNVSIICRYRRAPELLFGALH	517
Lmj	QLARALAFMH--VRHVCHFDLKPANVLVDPDTGRVQVCFDGSAKQITRPA----EKNVSIICRYRRAPELLFGALH	396
Lbr	QLARALAFMH--ARHVCHFDLKPANVLVDPHTGRVQVCFDGSAKQIMQPA----EKNVSIICRYRRAPELLFGALH	400
Tb	QLARALAFMH--ARGICHFDVKNPNLLVDPQETGVVVKLCDFGSAKQIMQPA----EKNVSIICRYRRAPELLFGALH	294
Tc	QLARALAFMH--LRGICHFDVKNPNLLVDPQETGVVVKLCDFGSAKQIMQPA----EKNVSIICRYRRAPELLFGALH	278
Hs	QLFRSLAYIH--SQGVCHFDIKPQNLVLPDPTAVLKLCDFGSAKQLVRG-----EPNVSIICRYRRAPELLFGATD	296
LmxGSK3b	QLIRSIGCLHLPVNVCHFDIKPHNVLVNEAEGTLKLCDFGSAKKLSPS-----EPNVSIICRYRRAPELLIFGNQH	203
	** *: : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : *	
	<b>VIa</b> <b>VIb</b> <b>VII</b> <b>VIII</b>	
Lmx	YGCPVDMWSFGCIAAELLRESGKPLFRG-CTTIDQMAELFKVVLGAPSKREMYAMNPQCAEALLRTRAMHRHQSLDNDP	593
Lin	YGCAVDMWSFGCIAAELLRESGKPLFRG-CTSIDQMAELFKVVLGAPSKREMYAMNPQCAEALLRTRAMHRHQSLDNDP	594
Lmj	YGCAVDMWSFGCIAAELLRESGKPLFRG-CTSIDQMAELFKVVLGAPSKREMYAMNPQCAEALLRTRAMHRHQSLDNDP	473
Lbr	YGCAVDMWSFGCIAAELLRESGRPLFRG-CTSIDQMAELFKVVLGAPSKREMYAMNPQCAEALLRTHAMHRNQSFRRHP	477
Tb	YHFHVDMWAFGCVLAELL--CGKVLFKGSSSTMQLVEIKVLGKPSERELFALNPQSAGSALIRTWGDSDHNASGLSP	370
Tc	YHFHVDMWAFGCVLAELL--CGEVLFKG-ASTVDQMAEIFKVLGAPSRQELLALNPQGAELFHATG-----AGLEV	347
Hs	YTSISDVWSAGCVLAELL--LGQPIFRG-DSGVDQLVEIKVLTPTREQIREMNPNYTEFKFPQ-----	358
LmxGSK3b	YTTSDIWSVGCIFAEMM--LGEPIFRG-DNSAGQLHEIVRVLGCPREVLRLKLNPSHTDVDLYN-----	265
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	<b>IX</b> <b>X</b>	
Lmx	HSGSR----GGVRQGRSCGLELEVDYQVEEDNDVELRGSARQGGYDVDVSHGEFLRDALDDGLSSQTSASPGMATASPP	667
Lin	HSGSG----GGVRQDRSCGLELEVDYQAEEDDVELRGGAQGGYDVDVSHGEFLRDALDDGISSQASASPGMATASPP	668
Lmj	HSGSG----GGVRQDRSCGLELEVDYQAEEDDVELRGGAQGGYDVDVSHGEFLRDALDDGISSQASASPGMATASPP	547
Lbr	HSGARGCGSGAERRNRSCGLALGVGYQAEEDDDELHSGLQQAQAEYDAENHGDFLRDALDDGILSQASVSPGMATGSQV	555
Tb	TPSGP-----LPSSNSANADYMQRRSAPRVKSLWVLELPPN-----	414
Tc	TPTSA-----ANTATSS--DYLQRYHALRIKALQWQNVLPN-----	389
Hs	-----	
LmxGSK3b	-----	
	-----	
Lmx	PSSTKDPDRDYKTRFASAPSTAATATLDDVAPTFFEEYYDVLKVRVIPWRRLFPAD---TPMEAVTLVASLLCYAPDKR	742
Lin	SSCTKDPDRDYKTAFSAPPSTAATATLDDVAPTFFEEYYDVLKVVHAIIPWRRLFPAD---TPTEAVALVASLLCYAPDKR	743
Lmj	SSSTKDPDRDYKTFASAPPSTAATAMLDDVAPTFFEEYYDVLKVRVIPWRRLFPVD---TPTEAVALVASLLCYAPDKR	622
Lbr	SS-----	557
Tb	-----TSQAALSLIEQLLRYTPPEER	427
Tc	-----TPPAAVSLVGLLRYTPAER	402
Hs	-----IKAHPWTKVFKSR---TPPEAIALCSSLLEYTPSSR	391
LmxGSK3b	-----SKGIPWSTVFCDSLKDAAEYDLSALLQYLPEDR	301
	. * * * * * *	
	<b>XI</b>	
	☆	
Lmx	LTAAELEHVPFFDDLFSAAQAQLRTGDLDPATAMESGATMSPSDDGVA <sup>☆</sup> SAAALRLPNGRLMPLSMFQVTEVERGLYTD	820
Lin	LTAAELEHVPFFDDLFSAAQAQLGAVGRDTATAMASGTNSPSEDDGVA <sup>☆</sup> SAAALRLPNGRLMPLSMFQVTEVERGLYTD	821
Lmj	LTAAELEHVPFFDDLFSAAQAQLATVDRDAATAVASGATMSPSEDDGVA <sup>☆</sup> SAAALRLPNGRLMPLSMFQVTEVERGLYTD	700
Lbr	-----	
Tb	LTSAAEVLEHVPFFDELFSDDAR-----LPNGAPLPASMFQVTRREEAELPPWLLERMAAAEGVAKGRELNQS	493
Tc	LSAAEVLEHVPFFDIFAEDAS-----LPNGAPLPVSMFEVTAEMEALPPWLLERMAAAEGVARRRHVSAG	468
Hs	LSPLEAC <sup>☆</sup> AHSFFDELRLCLGTQ-----LPNNRPLPP-LFNFSAGELSIQPSLNAILIPPHLRS <sup>☆</sup> PAGTTTLTP	456
LmxGSK3b	MKPYEALCHPYFDELHDSATK-----LPNHKNLPEDLFRFLPSEIEVM-----SEAQAKALVR	354
	: . . . : . . . : . . . .	
Lmx	AFLTRMARQAELVAAAMKQDEYP----	843
Lin	AFLTRMARQAELVAAAMKQDEYP----	844
Lmj	AFLTRMARQAELVAAAMKQDEYP----	723
Lbr	-----	
Tb	ATAPENAI-----	501
Tc	GSGKVVPPQKRQEGRK-----	486
Hs	SSQALTEPTSSDWQSTDATPTLTNNS	483
LmxGSK3b	K-----	355

**A: Vergleich der Aminosäuresequenz von LmxGSK3a und homologen Proteinen.** CLUSTAL2.1 multiple sequence alignment (Larkin et al., 2007) mit anschließender Optimierung des Alignments durch manuelle Abgleichung. Lmx: *L. mexicana*, Lin: *L. infantum*, Lmj: *L. major*, Lbr: *L. braziliensis*, Tb: *T. brucei*, Tc: *T. cruzi*, Hs: *Homo sapiens*. Die Zugangsnummer der jeweiligen Aminosäuresequenz findet sich unter 2.2.12.1.

**B. GSK3β Sequenzalignment**

Lmx	-----MSLNAADAADER-----SRKEMDR	19
Lmj	-----MSLNAAAAADER-----SRKEMDR	19
Lin	-----MSLNAADAADER-----SRKEMDR	19
Lbr	-----MSLNAADAADDR-----SRKEMDR	19
Tb	-----MSLNLTDADDR-----SYKEMEK	19
Tc	-----MSLNLAEADER-----SQREMEK	19
Crei	-----MKELNIKDKDEAGSSKAQNAATAEIFEGRLIEGLTKGGHVLSSASGTGASRQTYN	58
Hs	MSGRPRTTFAESCKPVQQPSAFGSMKVSIRDK---GSKVTTVVAIPGQGP-----DRPQEV	55
	: . : :	
☆		○
Lmx	FLVERMAGQQTFTGTVQLGKEKSTGMSVAIKKVIQDPRFRNRELQIMQDLAVLHHPNIVQLQSYFYTL-GERDRR-DIYLVN	98
Lmj	FQVERMAGQQTFTGTVQLGKEKSTGMSVAIKKVIQDPRFRNRELQIMQDLAVLHHPNIVQLQSYFYTL-GERDRR-DIYLVN	98
Lin	FQVERMAGQQTFTGTVQLGKEKSTGMSVAIKKVIQDPRFRNRELQIMQDLAVLHHPNIVQLQSYFYTL-GERDRR-DIYLVN	98
Lbr	FQVERMAGQQTFTGTVQLGKEKSTGMSVAIKKVIQDPRFRNRELQIMQDLAVLHHPNIVQLQSYFYTL-GERDRR-DIYLVN	98
Tb	YTVERVAGQQTFTGTVQLARDKSTGSLVAIKKVIQDPRFRNRELQIMQDLAVLHHPNIVMLKNYFYTVGGE-GRRNDVYN	99
Tc	YLVERVAGQQTFTGTVQLAREKNTGVNVAIKKVIQDPRFRNRELQIMQDLSRLRHPNIVLLKNYFYTVLGD-HRHNDVYN	99
Crei	YSTDREVVGNGSFGVVFQATCLETGETVAIKKVLQDKRFKNERLQIMKL---VDHPNIVKPKHCFYS-HTD---KDETYLHL	132
Hs	YTDTKVI GNGSFGVVFQAKLCLDSGELVAIKKVLQDKRFKNERLQIMRK---LDHCNIVRLRYFYFS-SGE---KKDEVYNL	130
	: : *:*:*.* . : * ****:* * **:* ***** : * * * * : ** : : : ** : :	
	<b>I</b> <b>II</b> <b>III</b> <b>IV</b>	
○		○
Lmx	VMEYVPDTLHRCCRNYYRQVAPPPILIKVFLFQLIRSIGCLHLPSVNVCHRD IKPHNVLVNEAEGTLKLCDFGSAKCLSP	179
Lmj	VMEYVPDTLHRCCRNYYRQVAPPPILIKVFLFQLIRSIGCLHLPSVNVCHRD IKPHNVLVNEADGTLKLCDFGSAKCLSP	179
Lin	VMEYVPDTLHRCCRNYYRQVAPPPILIKVFLFQLIRSIGCLHLPSVNVCHRD IKPHNVLVNEADGTLKLCDFGSAKCLSP	179
Lbr	VMEYVPDTLHRCCRNYYRQVAPPPILIKVFLFQLIRSIGCLHLPSVNVCHRD IKPHNVLVNEAEGTLKLCDFGSAKCLSP	179
Tb	VMEFVPDTHLHRCRNYYRMTNPPILLVKVMFQQLRSIACLHIPVINICH RD IKPHNVLVDEQGTGELKLCDFGSAKRLAA	180
Tc	VMEFVPDTHLHRCRNYYRRLASPMMILVVKVMFQQLRIACLHPAVNVCH RD IKPHNVLVDESTGDGLKLCDFGSAKCLSP	180
Crei	VLEFVDPDVTYRISKHYAKNNQRMPLFVKLYAYQMCRLNLSIHKM--GICH RD IKPONLLVNTETHQLKLCDFGSAKVLVK	211
Hs	VLDYVPDTPVYRVARHYSRAKQTLQPVYVVKLYMQLFRSLAYIHSF--GICH RD IKPONLLDLDPTAVLKLCDFGSAKQLVR	209
	*: : * * * : * . : * : : * : * : * : * : * * : : * * * * * : * * * * * *	
	<b>V</b> <b>Via</b> <b>Vib</b> <b>VII</b>	
●		○
Lmx	SEPNVAICSRYYRAPELIFGNQHYTTSVDIWSVGCIFAEMMLGPEIFRGD NSAGQLHEIVRVLGCP SREVLRKLNPSHTD	260
Lmj	SEPNVAICSRYYRAPELIFGNQHYTTSVDIWSVGCIFAEMMLGPEIFRGD NSAGQLHEIVRVLGCP SREVLRKLNPSHTD	260
Lin	SEPNVAICSRYYRAPELIFGNQHYTTSVDIWSVGCIFAEMMLGPEIFRGD NSAGQLHEIVRVLGCP SREVLRKLNPSHTD	260
Lbr	SEPNVAICSRYYRAPELIFGNQHYTTSVDIWSVGCIFAEMMLGPEIFRGD NSAGQLHEIVRVLGCP PREVLRKLNPSHTD	260
Tb	DEPNVAICSRYYRAPELIFGNQFYTTAVDIWSVGCIFAEMMLGPEIFCGENTSGQLREIVKILGKPTKEELHKLNGSSTE	261
Tc	SEPNVAICSRYYRAPELIFGNQYYTAVDVWSVGCIFAEMMLGPEIFCGENTSGQLREIVRVLGRPSREELHKLSTSNVE	261
Crei	GEPNVIICSRYYRAPELIFGATDYSIDVWSVGCIVLAELLQGLPFPGSGVDQLVEI IKVLGTP TREEINAMNPNYTE	292
Hs	GEPNVIICSRYYRAPELIFGATDYSIDVWSVGCIVLAELLQGLPFPGSGVDQLVEI IKVLGTP TREEIREMNPNYTE	290
	. * : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
	<b>VIII</b> <b>IX</b> <b>X</b>	
☆		☆
Lmx	VDLYNSKGI PWSVFCDHSLKDAKEAYDLLSALLQYLPEERMKPYEALCHPYFDELHDSATKLPNHNKLPEDLFRFLPSEI	341
Lmj	VDLYNSKGI PWSNVDHSLKDAKEAYDLLSALLQYLPEERMKPYEALCHPYFDELHDSATKLPNNDLPEDLFRFLPNEI	341
Lin	VDLYNSKGI PWSVFCDHSLKDAKEAYDLLSALLQYLPEERMKPYEALCHPYFDELHDSATKLPNNDLPEDLFRFLPSEI	341
Lbr	VDLYNSKGI PWSNVDHSLKDAKEAHDLLSALLQYLPEERMKPYEALCHPYFDELHDSATKLPNNDLPDDLFLPAEV	341
Tb	INAN-AKATPWENVFKQ---LP AEVYDLCGKIFKYVFDORITPLDALCHPFFNELREPTTKLPSGNLPAHLQFTPDEV	338
Tc	LNVPTNKSTPWEDVFKR---LP AEVYDLCAKIFKYLPEORITPLDIALCHPFFDELHDATVKLPSGNALPAHFLTPLEEI	339
Crei	FKFPQIKAHPTWVFSK---RMPDAVLDVSKLLQYAPQRMTAVQAMTHPFFDELDRPATRLPNGRALPP-LFNWLPGL	369
Hs	FKFPQIKAHPTWVFR---RTPPEAIALCSRLLLEYTPARLTPLDIALCHPFFDELDRDPNVKLPNGRDTPA-LFNFTTQEL	367
	. . * . * * * * . . . * * * * * . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
	<b>XI</b>	
Lmx	EVMS-----EAQKAKLVRK-----	355
Lmj	EVMS-----EAQKAKLVRK-----	355
Lin	EVMS-----EAQKAKLVRK-----	355
Lbr	ETMT-----DVQKGLIRK-----	355
Tb	EAMT-----EAQREYLLKK-----	352
Tc	NEMT-----EAQRSQLVQK-----	353
Crei	DEV---ADIVR----KLQPVAKAS-----	387
Hs	SSNPPLATILIPPHARIQAAASIP TNATAASDANTGDRGQTNNAASASASNST	420
	. . : . : . : .	

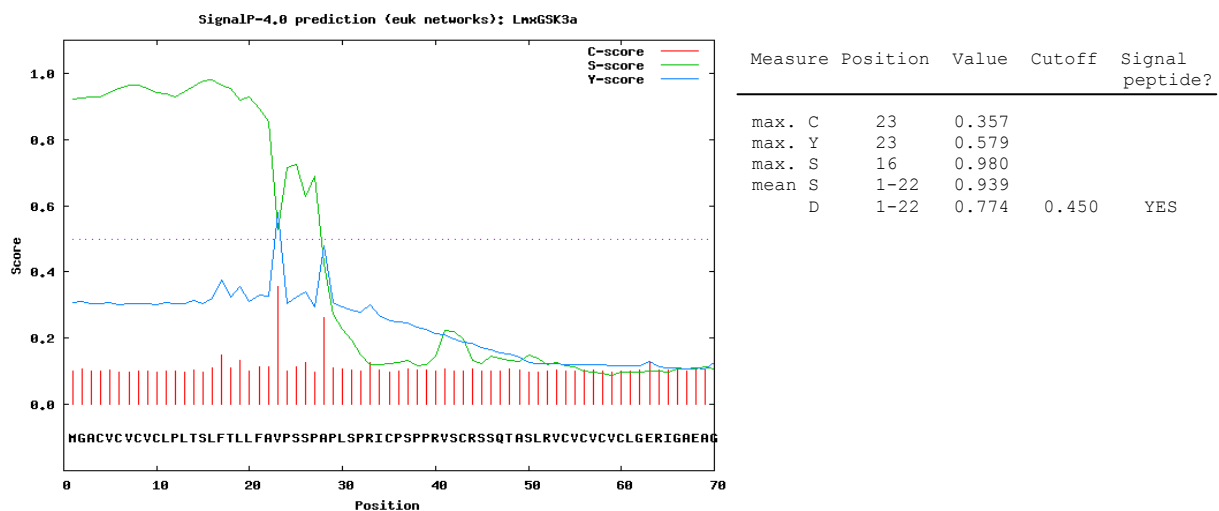
**B: Vergleich der Aminosäuresequenz von LmxGSK3β und homologen Proteinen.** CLUSTAL2.1 multiple sequence alignment mit anschließender Optimierung durch manuelle Abgleichung. Lmx: *L. mexicana*, Lmj: *L. major*, Lin: *L. infantum*, Lbr: *L. braziliensis*, Tb: *T. brucei*, Tc: *T. cruzi*, Crei: *C. reinhardtii*, Hs: *Homo sapiens*. Die Sequenz von *L. infantum* entspricht der von *L. donovani*. Die Zugangsnummer der jeweiligen Aminosäuresequenz findet sich unter 2.2.12.1.

**Abb. 39: Erläuterungen zu A und B:** Sterne markieren konservierte Reste, Doppelpunkte Reste mit sehr ähnlichen Eigenschaften (Scoring > 0,5 in der Gonnet PAM 250 Matrix) und Punkte Reste mit Eigenschaften von geringer Ähnlichkeit (Scoring ≤ 0,5 in der Gonnet PAM 250 Matrix). Der weiße Stern kennzeichnet Beginn und Ende der katalytischen Domäne. Die 12 Subdomänen sind mit römischen Zahlen beziffert. Insertionen sind mit gestrichelten Linien unterlegt. Zentrale konservierte Reste und Motive sind farbig unterlegt: Hellgrau: Glycin-reiches Sequenzmotiv G-x-G-x-Ω-G-x-V (Ω steht für eine aromatische Aminosäure, für GSK3 ist dies Phenylalanin; x entspricht jeder beliebigen Aminosäure). DFG-Motiv am Anfang und APE-Motiv am Ende der katalytischen Schleife. D-x-x-x-x-G Motiv in Subdomäne IX. L-G-x-P-Motiv in Kinasen der CMGC-Familie. Die im Folgenden angegebene Aminosäureposition ist von LmxGSK3β und die von LmxGSK3α steht in Klammern. Blau: Ionenpaar K49/E61 (K192/E204) welches mit die ATP-Bindung koordiniert. Dunkelgrau: N156 (N467) und D170 (D481) koordinieren die Metallionen, das Asparagin zusätzlich die katalytische Base. Türkis: D151 (D462) katalytische Base der Phosphotransfer-Reaktion. Pink: R60, R150 und K175 (R203, R461 und K486) bilden die positiv geladene Tasche zur Bindung der „priming“-Phosphatgruppe aus. Blaugrün: K153 und S189 (K464, S502) in Ser-/Thr-Kinasen konservierte Reste bzw. Motive (blaugrüner Balken). Oliv: Invariantes R301 (R742) 12 Reste vor Ende der katalytischen Domäne. Gelb: „gatekeeper“-Rest M100 (M346). Grün: Phosphorylierungsstelle in der Aktivierungsschleife Y186 (Y499). Rot: nachgewiesen regulative Phosphorylierungsstellen in *Homo sapiens*: S9, T43, T390 in HsGSK3β und S21 in HsGSK3α. Kreise kennzeichnen die in dieser Arbeit mutierten Reste: weiß: Inhibitorsensitive-Mutante (M->A); grau: K->M-Mutante; schwarz: Y->F-Mutante. Sekundärstrukturelemente von LmjGSK3β bestimmt durch Röntgenkristallographie (PDB Code: 3E3P; Ojo et al., 2011) in farbigen Buchstaben: Rot: α-Helix; blau: β-Faltblatt; grün: Turn; orange: 3/10-Helix; lila: β-Brücke. Sekundärstrukturelemente von LmxGSK3α und HsGSK3α vorhergesagt mit PSIPRED (Jones, 1999; Server: Buchan et al., 2013): Rot: α-Helix; blau: β-Faltblatt.

In GSK3 von Säugetieren ist ein charakteristisches Tyrosin in der Aktivierungsschleife der Kinase konstitutiv phosphoryliert und für die Kinase-Aktivität wichtig. Dieses Tyrosin findet sich auch in der parasitären GSK3. In LmxGSK3α an Position 499 und in LmxGSK3β an Position 186. Eine negative Regulation ihrer Aktivität erfährt die humane Kinase durch Phosphorylierung an Serin-9 von GSK3β bzw. Serin-21 von GSK3α. Das Sequenzalignment zeigt im Bereich des N-Terminus kaum Übereinstimmung, so dass eine sichere Zuordnung eines Rests der LmxGSK3α-Sequenz zu dem humanen Serin-21 nicht möglich ist. Auch in der Sequenz der kurzen GSK3β von Trypanosomatiden ist kein Rest Serin-9 direkt zuordenbar. Der „gatekeeper“ Rest ist in Leishmanien und Trypanosomen Methionin (LmxGSK3α: M346; LmxGSK3β: M100) anstelle von Leucin der humanen GSK3. In der humanen GSK3α und GSK3β sowie in LmxGSK3β ist der „gatekeeper“ Rest Teil einer β-Faltblattstruktur. Für LmxGSK3α wird für diesen Bereich der Subdomäne V eine α-Helix vorhergesagt (Abb. 39).

Der C-terminale Bereich von GSK3β aus Trypanosomatiden fällt kürzer aus als der von GSK3α und der von GSK3β-Homologen aus anderen Organismen wie Säugetieren, *Drosophila melanogaster* oder *Plasmodium spec.* (für die beiden letztgenannten Spezies ist das Alignment nicht dargestellt). Der N-terminale Bereich, der der Kinasedomäne vorangeht, ist in der humanen GSK3α um einiges länger als in der humanen GSK3β. In GSK3α aus *Homo sapiens* ist er reich an Glycin-Resten. Auch LmxGSK3α zeichnet sich durch einen langen N-terminalen Bereich aus, welcher LmxGSK3β fehlt. Die Aminosäure Glycin ist in diesem Abschnitt nicht überproportional repräsentiert. Auffällig ist eine sich wiederholende CV-Sequenz kurz nach dem Start-Methionin (3 x CV) und weiter stromabwärts (4 x VC),

welche laut Sekundärstrukturvorhersage je eine  $\beta$ -Faltblattstruktur ausbildet. Ersterer schließt sich direkt eine  $\alpha$ -Helix an. In allen Leishmanienspezies finden sich stromauf der Kinasedomäne von GSK3 $\alpha$  ein oder zwei kurze CV-Sequenzwiederholungen (bei *L. major* und *L. braziliensis* vor dem annotierten Start). Aufgrund des langen, andersgearteten N-Terminus rückte LmxGSK3 $\alpha$  ins Zentrum weiterer Untersuchungen mit Hilfe bioinformatischer Werkzeuge. Bei der Analyse der Sequenz auf charakterisierende Motive wurde als Besonderheit mittels „SignalP“ das Vorliegen eines N-terminalen, 22 Aminosäuren langen Signalpeptids festgestellt (Abb. 40). SignalP Version 4.0 ist ein auf künstlichen neuronalen Netzwerken basierendes Programm, mit welchem in Eukaryonten und Prokaryonten Signalsequenzen des sekretorischen Weges identifiziert und von Transmembranregionen unterschieden werden können (Petersen et al., 2011). Eine Schnittstelle der Signalpeptidase I wurde von der Software zwischen Aminosäureposition 22 und 23 gefunden (Abb. 40), wobei das reife Protein mit Valin-23 begänne.



**Abb. 40: SignalP 4.0-Vorhersage für LmxGSK3 $\alpha$ .** Einstellungen: Organism group: Eucaryotes; Method: Input sequences may include transmembrane regions. In der Graphik sind der C-, S- und Y-Score dargestellt, zusätzlich sind die numerischen Werte für den S-mean und D-Score in der Tabelle angegeben. Die Ordinate gibt die Höhe des Scores an, wobei das Maximum bei 1.0 liegt. Die Abszisse zeigt die zugehörige Aminosäureposition im dargestellten Sequenzabschnitt von LmxGSK3 $\alpha$  an. Der S-Score wird für jede einzelne Aminosäure angegeben, hohe Werte zeigen an, dass die korrespondierende Aminosäure Teil eines Signalpeptids ist, niedrige Werte finden sich für das reife Protein. Der C-Score ist der „cleavage site“ Score. Er wird für jeden einzelnen Rest berechnet und ist an der Peptidase-Schnittstelle signifikant erhöht. Y-max resultiert aus C-Score kombiniert mit dem S-Score und führt zu einer verbesserten Vorhersage der Peptidase-Schnittstelle. Der S-mean-Wert und der verbesserte D-Score sagen etwas zum Vorliegen eines sekretorischen bzw. nicht-sekretorischen Proteins aus. Für nicht sekretierte Proteine sollten alle aufgeführten Werte idealerweise sehr niedrig ausfallen.

Die Sequenzanalyse mittels der Programme „Phobius“ und „TMHMM“ ergab, ausgenommen vom Signalpeptid, keinen Hinweis auf Transmembran-Domänen, wie sie in membrangebundenen Proteinen gefunden werden (Käll et al., 2004). Die meisten Oberflächenproteine in Trypanosomatiden werden mit einem C-terminalen GPI-Anheftungssignal synthetisiert, welches nach Transport in das ER durch einen GPI-Anker ersetzt wird (McConville et al., 2002). Die Suche nach einer GPI-Modifizierungsstelle in LmxGSK3 $\alpha$  unter Zuhilfenahme der



Programme „big-PI Predictor“ (Einstellung: Protozoa) und „GPI-SOM“ (Eisenhaber et al., 1999; Fankhauser und Mäser, 2005) verlief erfolglos.

### 3.2.3 Rekombinante Expression von LmxGSK3 $\alpha$ und LmxGSK3 $\beta$

#### 3.2.3.1 Herstellung der Expressionskonstrukte

Mittels der Oligonukleotide GSK3aExpr\_for und GSK3aExpr\_rev wurde in einer PCR auf dem Plasmid pBSKGSK3 $\alpha$ 9XI der ORF von *LmxGSK3 $\alpha$*  amplifiziert und gleichzeitig für weitere Klonierungsschritte Restriktionsenzymchnittstellen unmittelbar vor dem Start- und nach dem Stopp-Codon eingefügt.

Für *LmxGSK3 $\beta$*  kamen die Oligonukleotide GSK3bExpr\_for und GSK3bExpr\_rev zum Einsatz. Diese enthielten ebenfalls eine veränderte Sequenz, um geeignete Restriktionsenzymchnittstellen einzufügen. In der PCR diente das Plasmid pBSKGSK3 $\beta$ 1.2XI als Kopiervorlage. Das jeweilige PCR-Produkt wurde in das Plasmid pCR2.1TOPO zwischenkloniert und durch Sequenzierung überprüft.

##### GSK3aExpr\_for

GGA TCC GGT CTA GA G AAT TCT ATG GGC GCG TGC GTG TGC GTG T  
*Bam*HI *Xba*I *Eco*RI Star  
 ↓ ↓ ↓  
 pMAL-c, pGEX-KG, pJCduet

##### GSK3aExpr\_rev

GAT ATC AAG CTT TCA TGG GTA TTC GTC TTG CTT C  
*Eco*RV *Hind*III Stopp  
 ↓  
 pMAL-c, pGEX-KG, pJCduet

##### GSK3bExpr\_for

GAA TTC TGG ATC CAA CAT GTC GCT CAA TGC TGC CGA T  
*Eco*RI *Bam*HI *Bsp*LU11  
 ↓ ↓ ↓  
 pJCduet, pMAL-c, pGEX-KG

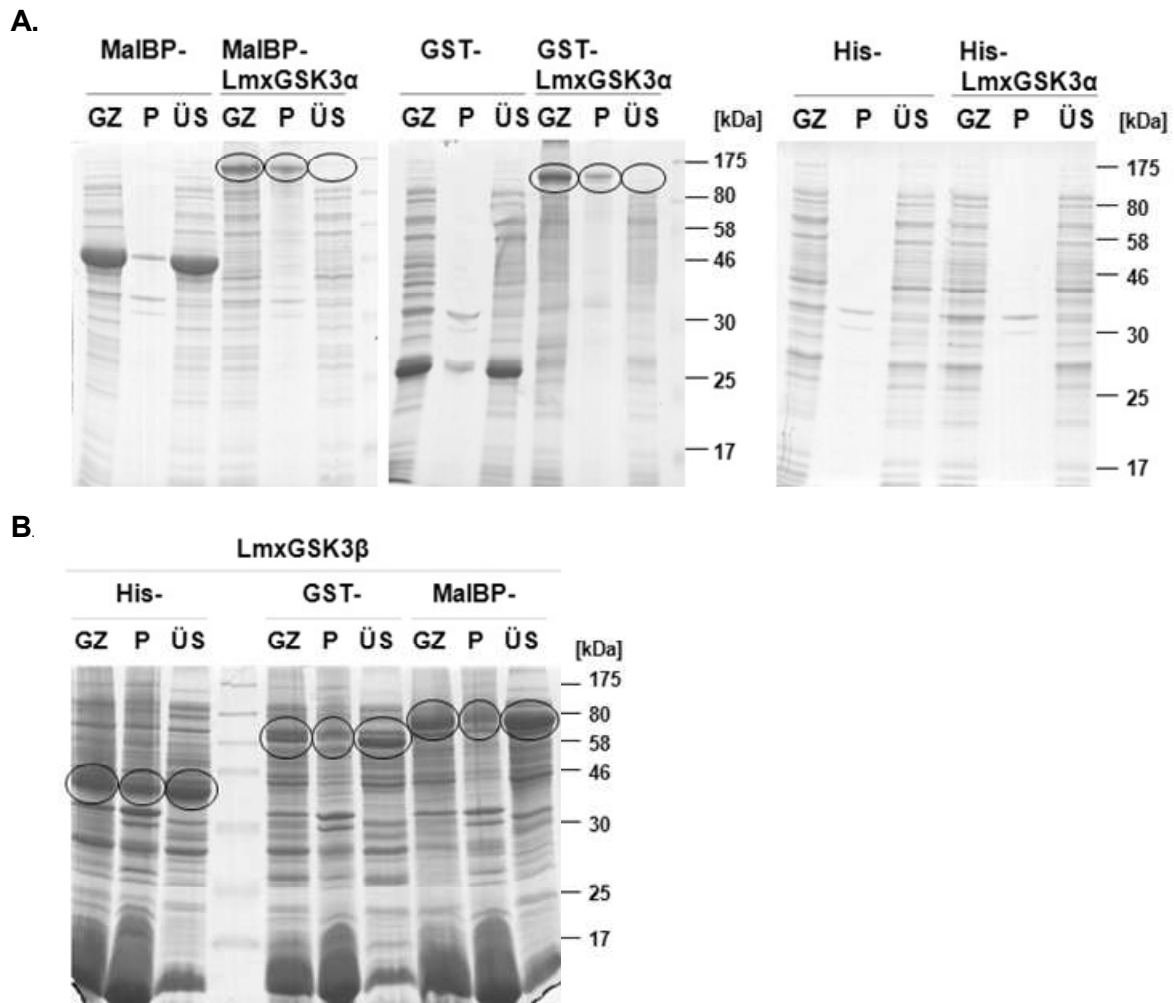
##### GSK3bExpr\_rev

GAT ATC AAG CTT TTA CTT GCG AAC CAG CTT GGC  
*Eco*RV *Hind*III Stopp  
 ↓  
 pMAL-c, pGEX-KG, pJCduet

Über die jeweiligen Restriktionsenzymchnittstellen wurde *LmxGSK3 $\alpha$*  und *LmxGSK3 $\beta$*  ausgeschnitten und unter Beibehaltung des Leserasters in die Expressionsplasmide pGEX-KG, pJCduet und pMAL-cRI eingefügt. Die Plasmidkarten finden sich im Anhang.

#### 3.2.3.2 Testexpression der Fusionsproteine

Das Expressionskonstrukt pJCGSK3 $\alpha$  bzw. pJCGSK3 $\beta$  wurde in den *E.coli* Stamm pAP*lac* transformiert, alle anderen Konstrukte in *E. coli* BL21-Zellen. Als Kontrolle wurden mit dem jeweiligen Leerplasmid transfizierte Zellen verwendet. Die Testexpression wurde im Maßstab von 50 ml ausgeführt. Nach Induktion der Kultur bei OD<sub>600</sub>  $\approx$  0,9 mit 100  $\mu$ M IPTG erfolgte die Expression und Synthese des rekombinanten Proteins bei 18° C über Nacht.



**Abb. 41:** Testexpression von **A: LmxGSK3 $\alpha$**  und **B: LmxGSK3 $\beta$**  als Fusionsprotein mit His-, GST- bzw. MalBP-Tag in *E.coli*. Nach Aufschluss der Zellen wurde je eine Probe des Gesamtzelllysats (GZ), nach Zentrifugation des Überstands (ÜS) und nach Resuspension des Pellets (P) entnommen. Abgebildet sind die Coomassie-gefärbten 12 %-igen SDS-PA-Gele der aufgetrennten Proben der Proteinexpression und unter A der Expression des Leerplasmids (MalBP-, GST-, His-Tag). Ovale markieren die Fusionsproteine.

Neben der Überprüfung auf Expression sollte durch Entnahme von Proben aus unterschiedlichen Fraktionen des Zellaufschlusses eine Aussage über die Löslichkeit der Fusionsproteine, als Voraussetzung für eine anschließende Aufreinigung, gemacht werden. Die Analyse der Proben mittels SDS-PAGE zeigt, dass der 40 kDa große MalBP-Tag und der 27,4 kDa große GST-Tag für sich alleine kräftig exprimiert wird und eine gute Löslichkeit aufweist (Abb. 41, A). Die zugehörigen, relativ großen Fusionsproteine von LmxGSK3 $\alpha$  werden exprimiert und synthetisiert. Sie finden sich nach dem Aufschluss, jedoch überwiegend in der unlöslichen Fraktion (P) und liegen nur in geringer Menge im Überstand (ÜS) vor. Gekoppelt mit dem kleinen His-Tag (0,84 kDa) ist unter den getesteten Bedingungen für die rekombinante LmxGSK3 $\alpha$  keine Expressionsbande zu erkennen. Trotz des geringen Anteils in der löslichen Fraktion wurden die rekombinanten Proteine MalBP-LmxGSK3 $\alpha$  (~131 kDa) und GST-LmxGSK3 $\alpha$  (~118 kDa) nachfolgend aufgereinigt und auf ihre Kinase-Aktivität getestet.

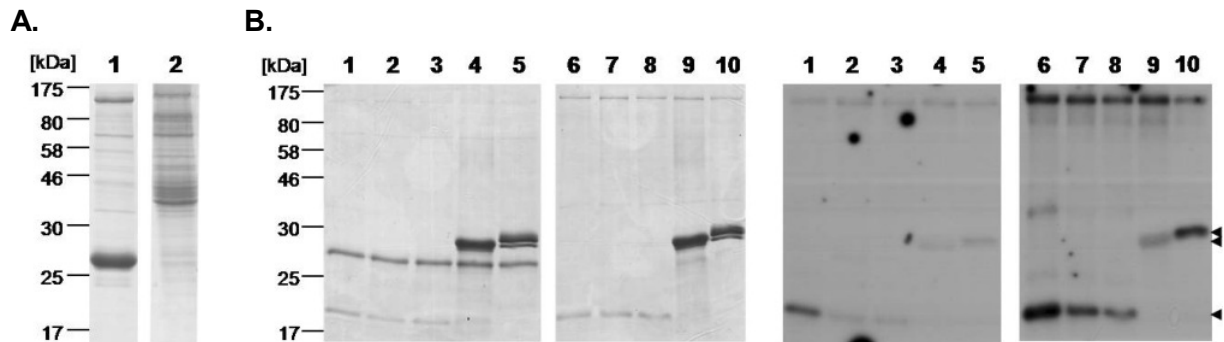
Für die Fusionsproteine von LmxGSK3 $\beta$  ist mit allen genannten Tags quantitativ eine gute Ausbeute zu verzeichnen (Abb. 41, B). In den folgenden Testungen der Kinase-Aktivität wurde, soweit nicht anders angegeben, das His-Fusionsprotein von LmxGSK3 $\beta$  eingesetzt. Die Entscheidung fiel auf diesen Tag aufgrund seiner geringen Größe und seiner geringen Störanfälligkeit betreffs Modifikationen in der Zelle.

### 3.2.3.3 LmxGSK3 $\alpha$ im Kinase-Aktivitätstest

Zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität wurden GST-LmxGSK3 $\alpha$  und MalBP-LmxGSK3 $\alpha$  im Kinase-Aktivitätstest zusammen mit  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und Proteinsubstrat inkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Auflegen eines Röntgenfilms auf das Coomassie-gefärbte, getrocknete Gel wurde der Einbau von radioaktivem Phosphat nachgewiesen. Trotz, wie zuvor gezeigt, eingeschränkter Proteinlöslichkeit findet sich im ersten Eluat der jeweiligen Aufreinigung (Coomassie-gefärbtes Gel Abb. 42, A.) eine Bande auf Höhe der zu erwartenden Größe von ~118 kDa für GST-LmxGSK3 $\alpha$  und ~131 kDa für MalBP-LmxGSK3 $\alpha$ . In der GST-Aufreinigung ist zusätzlich eine dominante Bande auf Höhe von ~27 kDa zu erkennen. Eine entsprechende Größe würde der allein exprimierte GST-Tag besitzen. Außerdem finden sich im jeweiligen Eluat weitere Banden von kleinerer Größe als das gewünschte Produkt. Bei diesen könnte es sich um verkürzt synthetisierte Formen bzw. Abbauprodukte des Fusionsproteins oder um bakterielle Verunreinigungen aus der Aufreinigung handeln. Die Gesamtproteinkonzentration des Eluats wurde mittels Bradford-Test bestimmt. Pro Ansatz sollten 3  $\mu\text{g}$  Kinase im Test eingesetzt werden. Das gefärbte Proteingel nach Kinase-Test zeigt, dass die Konzentration an Fusionsprotein effektiv wohl niedriger ausgefallen ist. Dies gilt besonders für das GST-gekoppelte Protein in Spur 1-5 (Abb. 42, B). Höchstwahrscheinlich ist dies auf das Vorhandensein der verunreinigenden Proteinbanden, besonders der kräftigen 27 kDa-Bande in der GST-Aufreinigung, zurückzuführen.

Wie zu sehen ist, zeigt LmxGSK3 $\alpha$  mit beiden Tags einen Einbau von radioaktivem Phosphat (Abb. 42, B, Spur 1-10). Die 27 kDa-Bande, bei welcher es sich vermutlich um den alleine exprimierten GST-Tag handelt, lässt keine Phosphorylierung erkennen. Dies würde für einen Phosphateinbau in LmxGSK3 $\alpha$  und nicht in den Tag sprechen. Für GST-LmxGSK3 $\alpha$  fällt die Autophosphorylierung als auch Substratphosphorylierung aufgrund der geringeren Menge an Kinase schwächer aus als für die MalBP-gekoppelte Form. Ein *in vitro* häufig eingesetztes artifizielles Substrat für Kinasen ist das Myelin Basische Protein (MBP). Neben diesem wurden die artifiziiellen Substrate  $\alpha$ -Casein und Histon H1 getestet. Alle drei angebotenen Substrate werden phosphoryliert. Der Vergleich der Spuren 3-5 bzw. 8-10 (Abb 42, B) untereinander zeigt, bezogen auf die Menge an Substrat wird MBP am stärksten phosphoryliert, gefolgt von Histon H1 und danach  $\alpha$ -Casein. Für LmxGSK3 $\alpha$  geht somit MBP

als das geeignetste Substrat für den *in vitro* Ansatz hervor. Der Vergleich der Spuren 1-3 bzw. 6-8 (Abb 42, B) untereinander macht deutlich, dass MBP am besten phosphoryliert wird, wenn ausschließlich Magnesium-Ionen im Puffer vorliegen (Spur 1 und 6). LmxGSK3 $\alpha$  scheint Mg<sup>2+</sup> gegenüber Mn<sup>2+</sup> als Cofaktor zu bevorzugen.



**Abb. 42: Rekombinante Expression von GST- bzw. MalBP-LmxGSK3 $\alpha$  und anschließender Kinase-Aktivitätstest mit unterschiedlichen artifiziellen Substraten. A:** Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Eluat 1 der Proteinaufreinigung: 1: GST-LmxGSK3 $\alpha$  2: MalBP-LmxGSK3 $\alpha$ . **B:** Kinase-Aktivitätstest, 1 h bei 30° C. 1-5: GST-LmxGSK3 $\alpha$ ; 6-10: MalBP-LmxGSK3 $\alpha$  mit den Substraten 1-3: und 6-8: MBP; 4: und 9:  $\alpha$ -Casein; 5: und 10: Histon H1 unter den Pufferbedingungen pH 7,2 und einer Ionenkonzentration von 1: und 6: 10 mM Mg<sup>2+</sup>; 2: und 7: 2 mM Mn<sup>2+</sup>; 3-5: und 8-10: 2 mM Mn<sup>2+</sup> + 10 mM Mg<sup>2+</sup>. Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Rechts: Autoradiogramm nach 24 h Exposition. Pfeilspitzen markieren die jeweiligen Substratbanden.

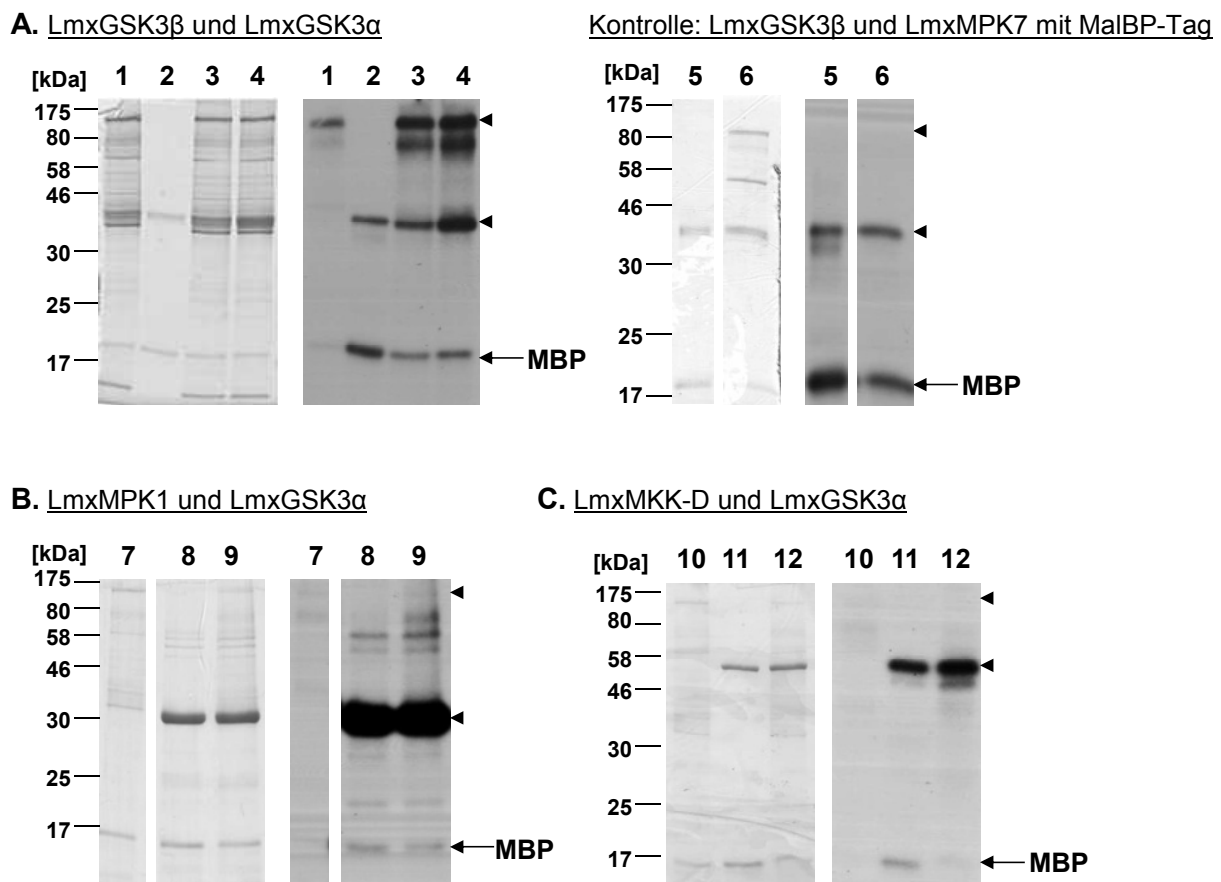
#### 3.2.3.4 LmxGSK3 $\alpha$ im Kinase-Aktivitätstest zusammen mit unterschiedlichen Kinasen der CMGC-Familie von *L. mexicana*

Das mit MalBP-Tag versehene LmxGSK3 $\alpha$ -Protein wurde zusammen mit den ebenfalls in *E. coli* rekombinant exprimierten Proteinen His-LmxGSK3 $\beta$ , His-LmxMPK1 bzw. GST-LmxMKK im Kinase-Aktivitätstest auf eine gegenseitige Phosphorylierungsaktivität getestet. Es kam jeweils die Wildtyp-Form der Kinase zum Einsatz – einzige Ausnahme war LmxMKK. Von dieser Kinase wurde die konstitutiv aktive Mutante LmxMKK-D (Scholz, Dissertation 2008) verwendet.

LmxMPK1 und LmxMKK vermögen LmxGSK3 $\alpha$  im Kinase-Aktivitätstest nicht zu phosphorylieren (Abb. 43, Spur 9 und 12). LmxGSK3 $\alpha$  scheint umgekehrt LmxMKK ebenfalls nicht als Substrat zu akzeptieren. Bei Inkubation zusammen mit LmxGSK3 $\alpha$  ist keine Zunahme der Schwärzung auf Höhe von LmxMPK1 festzustellen, jedoch ist die Beurteilbarkeit aufgrund der starken Autophosphorylierungsaktivität von LmxMPK1 eingeschränkt. Das in Ansatz B und C verwendete Protein von MalBP-LmxGSK3 $\alpha$  entstammte der gleichen, das in Ansatz A eingesetzte Protein einer davon unterschiedlichen Aufreinigung. Für Ansatz B und C fällt die auf dem Coomassie-gefärbten Gel ausgewiesene Proteinmenge an MalBP-LmxGSK3 $\alpha$  geringer aus als für Ansatz A (Abb. 43).

His-LmxGSK3 $\beta$  vermag MalBP-LmxGSK3 $\alpha$  *in vitro* zu phosphorylieren (Abb. 43, Spur 3 und 4). In umgekehrter Richtung scheint keine Phosphorylierung stattzufinden. Der

Phosphateinbau in MBP durch LmxGSK3 $\beta$  fällt in Gegenwart von LmxGSK3 $\alpha$  schwächer aus (Spur 3 und 4) als bei Inkubation von LmxGSK3 $\beta$  mit MBP alleine (Spur 2). Der 40 kDa große Tag des MalBP-LmxGSK3 $\alpha$ -Fusionsproteins umfasst drei T/S-x-x-x-T/S- und zwei S/T-P-Motive als potentielle Phosphorylierungsstellen. Um auszuschließen, dass der Phosphatgruppeneinbau durch LmxGSK3 $\beta$  innerhalb des MalBP-Tags von statten geht, wurde in einem Kontrollansatz LmxGSK3 $\beta$  zusammen mit einem anderen MalBP-getaggen Fusionsprotein (hier: LmxMPK7) in Gegenwart von radioaktivem  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. In dieses MalBP-Fusionsprotein findet kein Phosphateinbau durch LmxGSK3 $\beta$  statt (Spur 6).



**Abb. 43: Kinase-Aktivitätstest: MalBP-LmxGSK3 $\alpha$  in Kombination mit anderen rekombinant exprimierten Kinasen.** Inkubation der Kinasen in Gegenwart von  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und MBP 1 h bei 30° C. Pfeilspitzen markieren MalBP-LmxGSK3 $\alpha$  (~131 kDa); His-LmxGSK3 $\beta$  (41,5 kDa); MalBP-LmxMPK7 (104,7 kDa); His-LmxMPK1 (41,8 kDa) und GST-LmxMKK-D (68,9 kDa). Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Die gezeigten Spuren entstammen demselben Gel. Rechts: Zugehöriges Autoradiogramm. **A:** Pufferbedingungen: pH 7,2, 10 mM Mg $^{2+}$  1: MalBP-LmxGSK3 $\alpha$  (3  $\mu\text{g}$ ); 2: His-LmxGSK3 $\beta$  (1  $\mu\text{g}$ ); 3 und 4: MalBP-LmxGSK3 $\alpha$  (3  $\mu\text{g}$ ) in Kombination mit His-LmxGSK3 $\beta$  (1  $\mu\text{g}$ ) bzw. (3  $\mu\text{g}$ ). Autoradiogramm nach 2 h Exposition. Kontrolle: Pufferbedingungen: pH 7,2, 10 mM Mg $^{2+}$  + 2 mM Mn $^{2+}$  5: His-LmxGSK3 $\beta$  (2  $\mu\text{g}$ ); 6: His-LmxGSK3 $\beta$  (2  $\mu\text{g}$ ) zusammen mit MalBP-LmxMPK7 (3  $\mu\text{g}$ ). **B:** 7: MalBP-LmxGSK3 $\alpha$  (3  $\mu\text{g}$ ) und Pufferbedingungen pH 7,0, 5 mM Mn $^{2+}$  + 5 mM Mg $^{2+}$ ; 8: His-LmxMPK1 (~6  $\mu\text{g}$ ); 9: LmxGSK3 $\alpha$  (3  $\mu\text{g}$ ) zusammen mit LmxMPK1 (~6  $\mu\text{g}$ ). Die Pufferbedingungen in Ansatz 8 und 9 waren pH 7,2, 5 mM Mn $^{2+}$  + 5 mM Mg $^{2+}$ . Autoradiogramm nach 5 h 30 min Exposition. **C:** Pufferbedingungen: pH 7,0, 5 mM Mn $^{2+}$  + 5 mM Mg $^{2+}$  10: MalBP-LmxGSK3 $\alpha$  (3  $\mu\text{g}$ ); 11: GST-LmxMKK-D (3  $\mu\text{g}$ ); 12: beide in Kombination. Autoradiogramm nach 5 h 30 min Exposition.

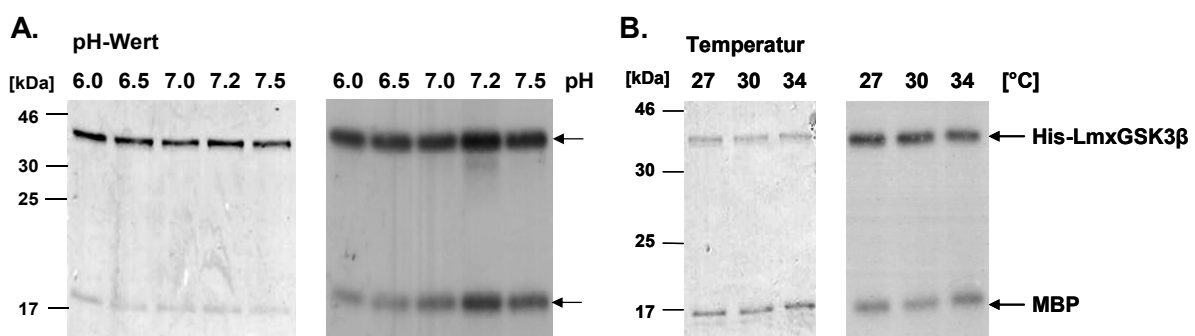
### 3.2.3.5 LmxGSK3 $\beta$ : Bestimmung der Optima der Enzymaktivität im Kinase-Aktivitätstest

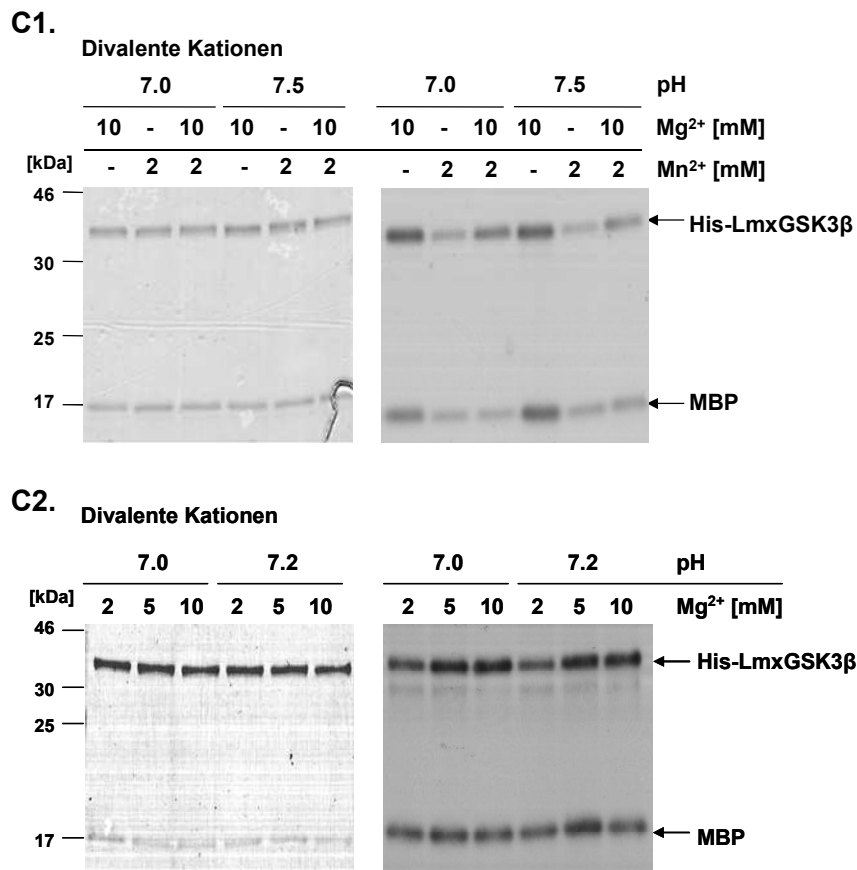
Im *in vitro* Aktivitätstest wurde das His-Fusionsprotein von LmxGSK3 $\beta$  eingesetzt und die Abhängigkeit der Auto- und Substratphosphorylierung vom pH-Wert, der Temperatur und den zweiwertigen Kationen Mangan und Magnesium ermittelt. Als artifizielles Substrat kam MBP zum Einsatz.

Das pH-Optimum wurde in Gegenwart von 2 mM Mn<sup>2+</sup> und 10 mM Mg<sup>2+</sup> ermittelt. Es befindet sich für die Auto- als auch Substrat-Phosphorylierung bei pH 7,2 (Abb. 44, A). Ein pH-Wert des Reaktionspuffers von 6,0 bis 7,5 wird von der Kinase gut toleriert.

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur wurde für die zwei in Leishmanien physiologisch maßgeblichen Temperaturen von 27° C (Promastigoten) und 34° C (Amastigoten) sowie für 30° C ermittelt (Abb. 44, B). In allen Durchläufen ist für die drei Temperaturen kein nennenswerter Unterschied in der Kinase-Aktivität festzustellen. Alle weiteren Kinase-Aktivitätstests wurden bei der mittleren der drei Temperaturen, bei 30° C, ausgeführt.

Alle ATP-abhängigen Enzyme mit Phosphoryltransfer-Aktivität benötigen divalente Kationen wie Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> oder Co<sup>2+</sup> als Cofaktor. Die Hauptaufgabe des Cofaktors besteht in der Koordination des Phosphatgruppendonors ATP (Adams und Taylor, 1993; Waas et al., 2004). Für die Aktivität von LmxGSK3 $\beta$  zeigt sich eine deutliche Überlegenheit von Magnesium als Cofaktor gegenüber Mangan (Abb. 44, C1). Die stärkste Phosphorylierungsaktivität weist LmxGSK3 $\beta$  in Gegenwart von Magnesium alleine auf. Die im Vergleich schwächste enzymatische Aktivität zeigt die Kinase, wenn ihr Mangan alleine angeboten wird. Als nächstes wurde die optimale Konzentration an Magnesium im Kinase-Aktivitätstest bestimmt (Abb. 44, C2). Wie zu erkennen ist, ist bei einer Steigerung der Mg<sup>2+</sup>-Konzentration von 2 mM auf 5 mM eine Zunahme des Phosphateinbaus in Kinase und MBP zu verzeichnen. Bei 5 mM Mg<sup>2+</sup> befindet sich die Phosphorylierung bereits im Sättigungsbereich, bei einer Steigerung der Ionenkonzentration auf 10 mM Mg<sup>2+</sup> ist keine weitere Zunahme des Phosphateinbaus festzustellen. Die MBP-Phosphorylierung in der letzten Spur mit 10 mM Mg<sup>2+</sup> bleibt etwas hinter der in der vorangehenden mit 5 mM Mg<sup>2+</sup> zurück. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass laut Coomassie-Färbung im letzten Ansatz etwas weniger MBP zum Einsatz kam.





**Abb. 44: Enzymatische Charakterisierung von His-LmxGSK3β.** Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Rechts: Autoradiogramm. Der Kinase-Aktivitätstest wurde 1 h bei 30° C inkubiert (mit Ausnahme von B). A und B wurden unter einer Standard-Ionenkonzentration von 2 mM Mn<sup>2+</sup> + 10 mM Mg<sup>2+</sup> ausgeführt. **A:** Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert. Je Ansatz wurden 1,5 µg Kinase und 0,4 µg MBP eingesetzt. Autoradiogramm nach 2 h 15 min Exposition. **B:** Temperaturabhängigkeit. Je Ansatz wurden 2 µg Kinase eingesetzt und bei pH 7,2 mit 0,6 µg MBP inkubiert. Autoradiogramm nach 20 h Exposition. **C1** und **C2:** Abhängigkeit der Kinase-Aktivität von der Anwesenheit und Konzentration divalenter Kationen. Einsatz von 0,4 µg MBP. C1: Mn<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>. Einsatz von 3 µg Kinase je Ansatz. Autoradiogramm nach 4 h Exposition. C2: Verwendung unterschiedlicher Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen. Einsatz von 1,5 µg Kinase je Ansatz. Autoradiogramm nach 1 h Exposition.

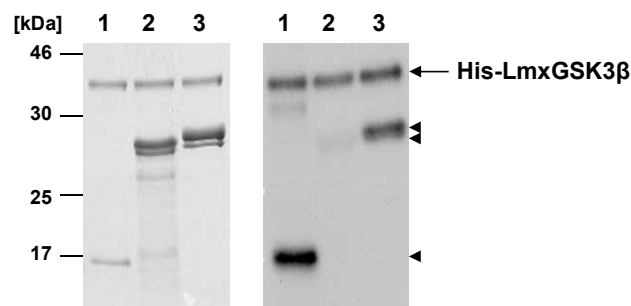
Zusammenfassend ist festzustellen: Optimale Reaktionsbedingungen für LmxGSK3β im Kinase-Aktivitätstest werden mit Puffereigenschaften von pH 7,2 und 5 mM Mg<sup>2+</sup> und einer Inkubation von 1 h bei 30 °C geschaffen. Alle folgenden Aktivitätstests erfolgten unter diesen Bedingungen.

### 3.2.3.6 Aktivität von LmxGSK3β gegenüber artifiziellen Substraten

Bis dato liegen keine Erkenntnisse zu physiologischen Substraten von GSK3β in Leishmanien vor. Auf ein natürliches Substrat konnte daher für die Testung der Kinase-Aktivität nicht zurückgegriffen werden. Das Myelin Basische Protein (MBP) bildet den Hauptbestandteil der Proteinfraction des zentralnervösen Myelins. Myelin dient als lipidreiche Biomembran zur Isolation der Nervenzellausläufer. Bei MBP handelt es sich um ein natürliches Substrat von GSK3β in Säugetieren. Es konnten drei Phosphorylierungsstellen (T94, T97,

S160), an denen GSK3 $\beta$  MBP *in vitro* phosphoryliert, nachgewiesen werden. Beim bevorzugt phosphorylierten Threonin-97 handelt es sich um einen Rest, der auch *in vivo* in MBP in phosphoryliertem Zustand anzutreffen ist (Yu und Yang, 1994; Martenson et al., 1983). Histon H1 und  $\alpha$ -Casein wurden als weitere artifizielle Substrate getestet. Beim Histon H1 Subtyp H1.5 handelt es sich um ein weiteres, in Säugerzellen identifiziertes Substrat von GSK3 $\beta$  (Happel et al., 2009).

Im Kinase-Aktivitätstest wurden MBP, Histon H1 und  $\alpha$ -Casein zusammen mit His-LmxGSK3 $\beta$  inkubiert (Abb 45). Das Coomassie-gefärbte SDS-PA-Gel zeigt, dass annähernd gleiche Mengen an  $\alpha$ -Casein und Histon H1, jedoch im Vergleich hierzu um ein Vielfaches weniger an MBP eingesetzt worden war. Trotz der geringsten Proteinmenge unter den getesteten artifiziellen Substraten wird das meiste radioaktive Phosphat in MBP eingebaut. LmxGSK3 $\beta$  ist ebenfalls zur Phosphorylierung von Histon H1 fähig. Verglichen dazu fällt die Phosphorylierungsaktivität gegenüber  $\alpha$ -Casein sehr schwach aus. MBP wurde als artifizielles Substrat für weiterführende Aktivitätstests gewählt.



**Abb. 45: Kinase-Aktivitätstest mit His-LmxGSK3 $\beta$  und unterschiedlichen artifiziellen Substraten.** 1: Myelin Basisches Protein (MBP); 2:  $\alpha$ -Casein; 3: Histon H1. Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Rechts: Autoradiogramm nach 12 h Exposition. 1  $\mu$ g Kinase wurde für 1 h bei 30° C, Pufferbedingungen pH 7,2, 5 mM Mg<sup>2+</sup> mit dem jeweiligen Substrat inkubiert. Pfeilspitzen markieren die Laufhöhe der jeweiligen Substrate.

### 3.2.4 LmxGSK3 $\beta$ : Untersuchungen zur Kinase-Aktivität und Regulation durch Autophosphorylierung

#### 3.2.4.1 Herstellung einer inaktiven K $\rightarrow$ M Mutante von LmxGSK3 $\beta$

Durch Mutation eines hochkonservierten, für den Phosphatgruppentransfer essentiellen Lysinrests (K49) zu Methionin, sollte eine Kinase-inaktive Mutante LmxGSK3 $\beta$ -KM erzeugt werden. Diese wurde anschließend rekombinant in *E. coli* exprimiert und im Vergleich zur Wildtyp-Form (Wt) auf ihre Aktivität im Kinase-Aktivitätstest analysiert (Abb. 46).

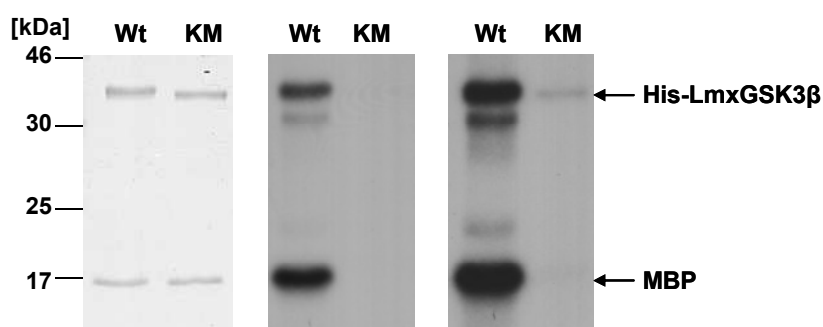
#### Klonierung von LmxGSK3 $\beta$ -KM

Der Aminosäuren-Austausch wurde mittels zielgerichteter Mutagenese in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen erreicht. Hierfür wurden die zwei komplementären, gegenläufigen Oligonukleotide GSK3bKMfor und GSK3bKMrev entworfen, welche die Punkt-



mutation (AAG→ATG) trugen. Diese Punktmutation führte neben dem Aminosäuren-Austausch zur Einführung einer zusätzlichen Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Bsp*HI. Das Fragmentmuster nach *Bsp*HI-Spaltung sollte eine spätere Differenzierung vom Wildtyp-Gen ermöglichen. In der ersten PCR-Runde diente das Plasmid pCR2.1GSK3beta als Vorlage. Mit je einem der genannten, die Mutation tragenden Primer und einem gegenläufigen, weiter außen liegenden Primer (GSK3bExpr\_for bzw. GSK3bExpr\_rev) wurden in zwei unabhängigen PCR-Reaktionen zwei Fragmente amplifiziert. In der zweiten PCR-Runde wurden beide Fragmente als Vorlage zusammen mit den beiden äußeren Primern eingesetzt. Das Produkt wurde mittels TOPO-Klonierung in das Plasmid pCR2.1 kloniert und durch Restriktionsspaltung und anschließende Sequenzierung überprüft. Aus letzterem Plasmid wurde ein die KM-Mutation tragendes *Sac*II/*Eco*RI-Fragment erzeugt und über die Schnittstellen *Sac*II/*Eco*RI in das pJCDuet-Plasmid eingebracht. Das resultierende Plasmid hieß pJCGSK3bKM und wurde für die Expression in *E. coli* verwendet. Die Plasmidkarte findet sich im Anhang.

#### Kinase-Aktivitätstest von LmxGSK3β-KM



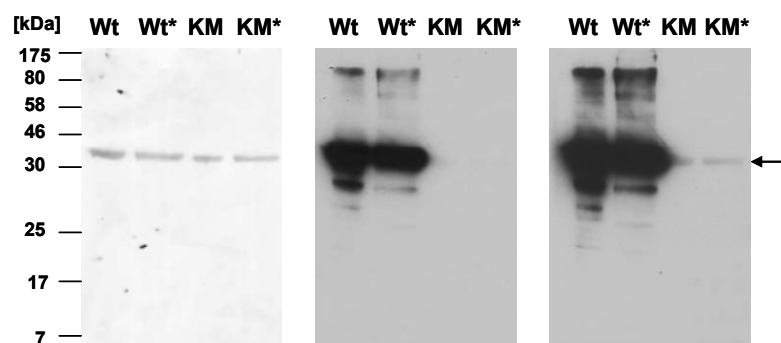
**Abb. 46: Kinase-Aktivitätstest mit rekombinantem His-LmxGSK3β-Wildtyp (Wt) und inaktiver KM-Mutante.** Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Autoradiogramm nach 12 h (Mitte) und 24 h (rechts) Exposition. Je 1 µg Kinase wurden 1 h bei 30 °C mit dem artifiziellen Substrat MBP inkubiert; Pufferbedingungen pH 7.2, 5 mM Mg<sup>2+</sup>.

Der Film zeigt nach zwölf Stunden Exposition keinerlei Schwärzung in der Spur der Kinase-inaktiven KM-Mutante, während die Wildtyp-Form (Wt) eine ausgeprägte Phosphorylierungsaktivität gegenüber sich selbst und MBP erkennen lässt (Abb. 46, Mitte). Außerdem zeigen einige Banden, die kleiner sind als His-LmxGSK3β-Wt, einen diskreten Phosphateinbau. Bei diesen Banden handelt es sich vermutlich um Abbauprodukte oder nicht in voller Länge synthetisierte Formen von His-LmxGSK3β. Diese Banden traten zum Teil auch in anderen Aktivitätstests auf. Nach 24 Stunden Filmexposition ist eine schwache Bande auf Höhe von LmxGSK3β-KM zu erkennen. Der Einbau von radioaktivem Phosphat in die KM-Mutante fällt im Vergleich zum Wildtyp äußerst gering aus. Eine Phosphorylierung des Substrats MBP durch die KM-Mutante ließ sich nach mehrtägiger Exposition des Films in Form einer sehr schwachen Schwärzung lediglich erahnen (nicht dargestellt). Somit bestätigt der Test, dass

es sich bei der KM-Mutante, in Bezug auf Substrat- und Autophosphorylierungsaktivität, um eine nahezu vollständig inaktive Mutante von LmxGSK3 $\beta$  handelt.

### 3.2.4.2 Autophosphorylierung an Tyrosin

Zum Nachweis von Phosphorylierung an Tyrosin wurde ein Immunoblot mit einem anti-Phospho-Tyrosin-Antikörper durchgeführt. Zum Einsatz kamen His-LmxGSK3 $\beta$ -Wt und His-LmxGSK3 $\beta$ -KM in äquivalenter Menge, beide zum einen direkt nach Proteinaufreinigung aus *E.coli* und zum anderen nach einstündiger Inkubation mit ATP unter optimalen Reaktionsbedingungen. Die Proteine wurden ebenfalls im radioaktiven Kinasetest auf ihre Aktivität überprüft (nicht gezeigt).



**Abb. 47:** Immunoblot zur Detektion von Tyrosin-Phosphorylierung in His-LmxGSK3 $\beta$ -Wt und His-LmxGSK3 $\beta$ KM. Es wurden je 2  $\mu$ g / 50  $\mu$ l rekombinantes Protein aus *E.coli* mit SDS-Ladepuffer aufgeköcht (Wt, KM). Je 2  $\mu$ g Kinase / 50  $\mu$ l wurden mit 100  $\mu$ M ATP 1 h bei 30° C, Pufferbedingungen pH 7.2, 5 mM Mg<sup>2+</sup> inkubiert, anschließend mit Ladepuffer versehen und aufgeköcht (Wt\*, KM\*). Primärantikörper: anti-Phospho-Tyrosin, 1:1 in 3 % BSA/TBST. Links: nach dem Blotten Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Mitte bzw. rechts: Film nach 10 s bzw. 1 min Exposition.

Die Stärke der Coomassie-gefärbten Banden auf dem SDS-PA-Gel lässt auf den Einsatz annähernd gleicher Proteinmengen schließen (Abb. 47). Für die Probe von LmxGSK3 $\beta$ -Wt direkt nach Aufreinigung aus *E. coli* ist im Immunoblot eine kräftige Phosphorylierung an Tyrosin nachzuweisen. Für die Probe der Wildtyp-Kinase nach Inkubation mit ATP ist im Vergleich keine Zunahme der Schwärzung auf dem Film festzustellen. Auf dem Film nach einminütiger Exposition zeichnet sich für beide Ansätze von LmxGSK3 $\beta$ -KM eine sehr schwache Bande ab (Abb. 47). Eine Phosphorylierung von LmxGSK3 $\beta$  an Tyrosin findet bereits in *E. coli* statt. Die Tyrosin-Phosphorylierung fällt im aktiven LmxGSK3 $\beta$ -Wt-Protein sehr stark aus und ist im Vergleich im inaktiven LmxGSK3 $\beta$ -KM-Protein kaum vorhanden.

Die Enzymaktivität der humanen GSK3 $\beta$  wird durch Phosphorylierung an Tyrosin-216 in der Aktivierungsschleife der Kinase deutlich gesteigert. Laut Sequenzalignment (Abb. 39, B) kann diesem konservierten Tyrosinrest der Tyrosin-186 von LmxGSK3 $\beta$  zugeordnet werden. Es stellte sich die Frage, ob dieser Rest in der Wildtyp-Form von LmxGSK3 $\beta$  in phosphoryliertem Zustand vorliegt und falls ja, ob eine Phosphorylierung an Y186 für die Kinase-

Aktivität von Bedeutung ist. Dies sollte zuerst für die rekombinante Kinase beantwortet werden.

#### 3.2.4.3 Phosphorylierungsprofil von His-LmxGSK3 $\beta$

Zum Studium des Phosphorylierungsstatus des rekombinanten LmxGSK3 $\beta$ -Proteins wurde die Analyse durch Matrix-unterstützte Laserdesorption / Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS-Analyse) und Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS-Analyse) herangezogen. LmxGSK3 $\beta$  wurde als His-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, gereinigt und über SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde Coomassie gefärbt, die korrespondierende Bande ausgeschnitten und zur Massenspektrometrie gesendet. Die Sequenz potentieller Phosphopeptide von His-LmxGSK3 $\beta$ , deren Masse durch MALDI-TOF-MS-Analyse ermittelt und welchen anschließend durch Peptidmassenfingerprint (PMF) Peptide und Modifikationen zugeordnet wurden, findet sich im Anhang. Die Sequenz folgender Phosphopeptide wurde mittels MS/MS-Analyse für die Probe His-LmxGSK3 $\beta$ -Wildtyp bestätigt:

177-LSPSEPNVApYICSR-190 (m/z 1672.748)

176-KLSPSEPNVApYICSR-190 (m/z 1800.828)

229-GDNpSAGQLHEIVR-241 (m/z 1475.683)

Die Phosphorylierung (p) am Tyrosin-186 des His-Fusionsproteins fand sich sowohl in der Probe direkt nach Aufreinigung aus *E. coli* als auch in einer Probe, welche für eine Stunde bei 30 °C mit ATP unter optimalen Pufferbedingungen inkubiert wurde. Der Nachweis des Phospho-Serin-232 tragenden Peptids war nur in der Probe des Proteins direkt nach Aufreinigung erfolgreich. Die Aufschlüsselung des Peaks bei m/z 1686.772 mit Hilfe der MS/MS-Analyse zeigte, dass es sich bei diesem um das Peptid 177-L\*SPSEPNVApYICSR-190 handelt, welches neben der Phosphorylierung als zusätzliche Modifikation eine N-Methylierung (\*) an Leucin-177 besitzt. Die inaktive Mutante LmxGSK3 $\beta$ -KM wurde ebenfalls als His-Fusionsprotein aus *E. coli* aufgereinigt. In der MALDI-TOF-MS- und MS/MS-Analyse konnten für LmxGSK3 $\beta$ -KM keine Phosphopeptide identifiziert werden (Spektrum im Anhang). Auf die mögliche Co-Existenz einer Phosphorylierung an Threonin-33 sei hingewiesen, jedoch liegt kein MS/MS-Spektrum für das zugehörige Peptid 25-MAGQGTFGpTVQLGK-38 mit m/z 1474,620 vor. Aufgrund der großen Ähnlichkeit des Masse-Ladungs-Quotienten zu dem des Peptids 229-GDNpSAGQLHEIVR-24 besteht die Möglichkeit einer Überlagerung der Peaks in diesem Bereich.

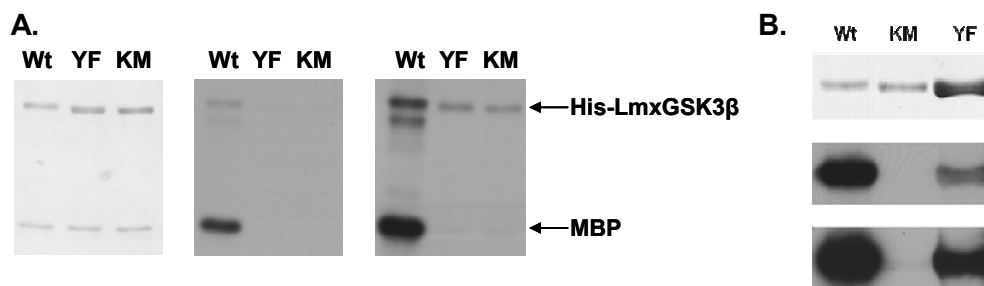
#### 3.2.4.4 Herstellung einer Y $\rightarrow$ F-Mutante

Hierzu wurde Tyrosin-186 gegen die nicht phosphorylierbare, ebenfalls aromatische Aminosäure Phenylalanin ausgetauscht. Danach wurde die Aktivität der so erzeugten Y $\rightarrow$ F-Mutante LmxGSK3 $\beta$ -YF im Kinase-Aktivitätstest bestimmt sowie das Ausmaß einer

möglichen Tyrosin-Phosphorylierung mittels anti-Phospho-Tyrosin Antikörper im Immunoblot nachgewiesen. Die YF-Mutante wurde dem Wildtyp und der inaktiven KM-Mutante gegenübergestellt.

#### Klonierung von LmxGSK3 $\beta$ -YF

Das grundlegende Vorgehen zum Austausch der Aminosäure Tyrosin gegen Phenylalanin durch zielgerichtete Mutagenese entsprach dem, zur Herstellung der KM-Mutante. Mit den hierfür generierten Oligonukleotiden GSK3bYFfor und GSK3bYFrev wurden zwei Punktmutationen eingebracht, von denen eine zum Aminosäure-Austausch (TAC $\rightarrow$ TTC) führte und die zweite eine neue *AcI*-Schnittstelle schaffte. Mit je einem der genannten Primer, einem gegenläufigen äußeren Primer (GSK3bExpr\_for bzw. GSK3bExpr\_rev) und dem Plasmid pCR2.1GSK3beta als Vorlage wurden zwei Fragmente amplifiziert, welche zusammen mit den äußeren Primern in eine weitere PCR eingesetzt wurden. Das Produkt wurde in das pCR2.1-Plasmid mittels TOPO-Klonierung kloniert und mittels Restriktionsenzymsspaltung kontrolliert. In der anschließenden Sequenzierung fiel auf, dass der überprüfte Klon im weiterverwendeten Sequenzabschnitt eine zusätzliche Punktmutation trug. Bei dieser handelte es sich jedoch um eine „stumme“ Mutation, was bedeutet, dass die resultierende Aminosäuresequenz unverändert ist. Der Klon wurde daher weiter verwendet und ein die YF-Mutation tragendes *AgeI*/*SacII*-Fragment über eben diese Schnittstellen in das pJCduet-Plasmid eingebracht. Das resultierende Plasmid pJCGSK3bYF wurde für die Expression in *E. coli* genutzt. Die Plasmidkarte findet sich im Anhang.



**Abb. 48: Phosphorylierungsaktivität von His-LmxGSK3 $\beta$ -Wt, -YF- und -KM-Mutante und deren Phosphorylierung an Tyrosin.** **A:** Kinase-Aktivitätstest. Je 2  $\mu$ g Kinase wurden mit MBP für 1 h bei 30° C inkubiert. Pufferbedingungen: pH 7.2, 5 mM Mg<sup>2+</sup>. Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Autoradiogramm nach 6 h (Mitte) und 19 h (rechts) Exposition. **B:** Immunoblot mit anti-Phospho-Tyrosin-Antikörper. Nach dem Blotten Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel (oben). Film nach 10 s (Mitte) und 1 min (unten) Exposition.

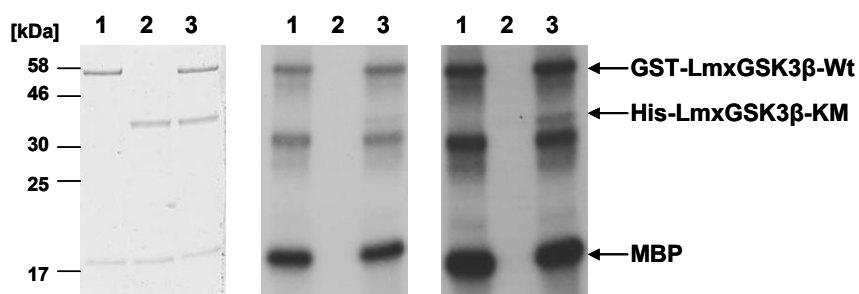
Auf dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel (Abb. 48, A) ist zu sehen, dass von LmxGSK3 $\beta$ -YF und -KM jeweils etwas mehr Protein im Kinase-Aktivitätstest eingesetzt worden war als vom Wildtyp. Auf dem Autoradiogramm nach sechs Stunden Exposition zeigt die Wildtyp-Kinase bereits eine diskrete Autophosphorylierung und hat eine deutliche Phosphorylierung von MBP hervorgerufen. Die YF-Mutante weist gleichermaßen wie die inaktive KM-Mutante einen schwachen Einbau von radioaktivem Phosphat auf. Dies ist nach 19 Stunden, jedoch noch

nicht nach sechs Stunden Film-Exposition zu erkennen. Die Substratphosphorylierungsaktivität beider Mutanten, zu sehen auf dem Film nach 19 Stunden, geht nahezu gegen Null. Die YF-Mutante weist im Vergleich zu LmxGSK3 $\beta$ -Wildtyp eine deutliche Beeinträchtigung ihrer Phosphorylierungsaktivität auf.

Im Immunoblot zum Nachweis von Tyrosin-Phosphorylierung wurde rekombinantes Protein direkt nach Aufreinigung aus *E. coli* eingesetzt (Abb. 48, B). Bereits eine Expositionszeit des Films von Sekunden liefert ein deutliches Signal auf Höhe von His-LmxGSK3 $\beta$ -Wt. Nach einer Minute befindet sich die Schwärzung auf dem Film im Sättigungsbereich. Auf Höhe der inaktiven KM-Mutante ist nach einer Minute Exposition eine sehr schwache Bande zu sehen. Vom Wildtyp und der KM-Mutante sind laut Coomassie-gefärbtem Gel annähernd gleiche Mengen geladen. Von der YF-Mutante liegt hingegen um ein 4-5faches mehr Protein vor als vom Wildtyp. Der Nachweis von Phospho-Tyrosin im Immunoblot fällt für die YF-Mutante positiv aus. Die Schwärzung auf dem Film ist für die YF-Mutante, trotz unbeabsichtigt zu viel geladenem Protein, um ein Mehrfaches geringer als für den LmxGSK3 $\beta$ -Wildtyp.

#### 3.2.4.5 Mechanismus der Autophosphorylierung von reifem LmxGSK3 $\beta$ -Protein

Für rekombinantes Protein von LmxGSK3 $\beta$  konnte in Gegenwart von radioaktivem  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP eine Phosphorylierung der Kinase durch sich selbst (Autophosphorylierung) nachgewiesen werden. Erste Hinweise auf den Mechanismus, welchem diese Autophosphorylierung folgt, sollte ein gemischter Kinase-Aktivitätstest mit der aktiven Wildtyp-Form (Wt) von LmxGSK3 $\beta$  als GST-Fusionsprotein und der inaktiven KM-Mutante als His-Fusionsprotein liefern. Die ungleiche Größe der Protein-Tags ermöglicht eine Unterscheidung der beiden Formen anhand der Laufhöhe ihrer Bande auf dem Gel.



**Abb. 49: Phosphorylierungstest mit GST-LmxGSK3 $\beta$ -Wt und His-LmxGSK3 $\beta$ -KM.** 1: GST-LmxGSK3 $\beta$ -Wt; 2: His-LmxGSK3 $\beta$ -KM; 3: GST-LmxGSK3 $\beta$ -Wt + His-LmxGSK3 $\beta$ -KM. Es wurden je 1,5  $\mu\text{g}$  Kinase in den Test eingesetzt und zusammen mit MBP und den Pufferbedingungen pH 7,2, 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  eine Stunde bei 30° C inkubiert. Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Mitte: Autoradiogramm nach 20 h; rechts: nach 24 h Exposition.

GST-LmxGSK3 $\beta$ -Wt weist eine deutliche Autophosphorylierung auf und besitzt eine sehr gute Substratphosphorylierungsaktivität gegenüber MBP (Abb. 49, Spur 1). Bei einer Höhe von ~30 kDa ist darüber hinaus eine Bande zu erkennen, in die Phosphat eingebaut worden war. Bei dieser Bande handelt es sich möglicherweise um eine Abbaubande oder um ver-

kürzt synthetisiertes Protein von GST-LmxGSK3 $\beta$ -Wt. Für die inaktive His-LmxGSK3 $\beta$ -KM ist keine Schwärzung auf dem Film zu erkennen (Spur 2). Wurden beide GSK3 $\beta$ -Formen zusammen inkubiert zeigt sich eine diskrete Schwärzung auf Höhe der KM-Mutante (Spur 3). Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Autophosphorylierung von LmxGSK3 $\beta$  zumindest zum Teil einem intermolekularen Mechanismus folgen könnte.

### 3.2.5 Nachweis von LmxGSK3 $\beta$ in Promastigoten und Amastigoten

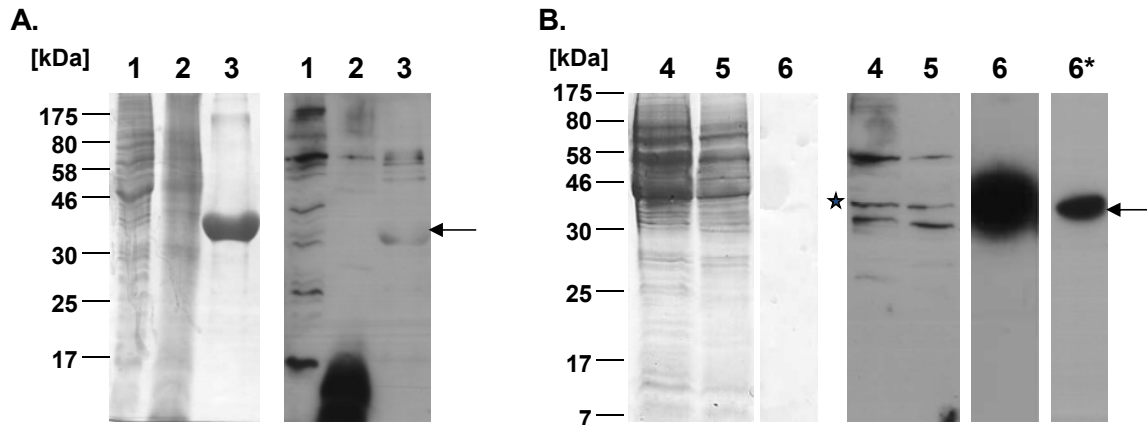
Der Nachweis in Pro- und Amastigotenlysaten erfolgte mittels anti-LmxGSK3 $\beta$ -Peptid-Antiserum im Immunoblot. Das innerhalb von *Leishmania spec* weitgehend konservierte Sequenzepitop H<sub>2</sub>N- KVI QDP RFR NRE LQI -COOH in der N-terminalen Untereinheit von LmxGSK3 $\beta$  wurde zur Generierung eines Antiserums in Kaninchen ausgewählt. Der Firma Eurogentec wurde der Auftrag erteilt, das genannte Peptid zu synthetisieren, zwei Kaninchen damit zu immunisieren und abschließend die Aufreinigung des nach Testung als besser befundenen Antikörpers vorzunehmen. Hieraus resultierte der gegen das genannte Peptid gerichtete, polyklonale Antikörper rabbit-anti-LmxGSK3 $\beta$  (5466).

Das vor Peptid-Injektion gewonnene Prä-Immuneserum des Kaninchen erkennt das rekombinante Protein im Immunoblot nicht: Es findet sich auf dem Film in Spur 3 keine Schwärzung auf Höhe von His-LmxGSK3 $\beta$  (Abb. 50, A). In der Coomassie-Färbung wird auf dieser Höhe eine kräftige Proteinbande nachgewiesen. Das Prä-Immuneserum erkennt mehrere Banden in den Zelllysaten (Spur 1 und 2), es findet sich jedoch keine dominante Bande auf der Höhe, auf der LmxGSK3 $\beta$  zu erwarten ist. Für das aus Läsionsamastigoten gewonnene Lysat (Spur 2) zeigt sich auf dem Film eine starke Schwärzung im unteren Größenbereich und auf dem Gel ein verwaschener Bandenverlauf. Beides kann darauf hindeuten, dass Proteine zumindest zum Teil abgebaut waren.

Wie man sehen kann, wird das rekombinante Protein in Spur 6 von dem in Kaninchen generierten Antiserum erkannt. Schon bei Einsatz einer durch Coomassie-Färbung kaum nachweisbaren Proteinmenge (Spur 6) findet sich nach 10 Sekunden Auflegen des Films (Spur 6\*) eine deutliche Schwärzung auf Höhe von His-LmxGSK3 $\beta$ . Die Detektionsgrenze für die verwendete Coomassie R-250 Färbung von SDS-PAGE Gelen liegt bei etwa 0,1  $\mu$ g Protein pro Bande (<https://www.nationaldiagnostics.com>).

Laut Coomassie-Färbung wurde das Lysat aus Promastigoten etwas konzentrierter eingesetzt als das aus axenischen Amastigoten (Spur 4 im Vergleich zu 5). Sowohl in Pro- als auch in Amastigoten lässt sich eine Bande auf Höhe von ~41 kDa nachweisen (Abb. 50, B, Markierung durch Stern). Dies entspricht der Größe von LmxGSK3 $\beta$ . Darunter findet sich in Spur 4 und 5 eine Bande von etwa gleicher Stärke. Diese Bande erscheint jedoch mit einer Laufhöhe von etwa 32 kDa zu klein, als dass es sich bei ihr um LmxGSK3 $\beta$  handeln

könnte. Die vom anti-LmxGSK3 $\beta$  Antiserum im Lysat detektierte Bande (Spur 4 bzw. 5) fällt schwach aus, verglichen mit dem Signal, welches das in geringer Menge eingesetzte rekombinante Protein (Spur 6) nach gleicher Expositionszeit hervorruft. Die Kinase scheint in den Zellen in sehr geringer Menge vorzuliegen.



**Abb. 50: Immunblot zum Nachweis von LmxGSK3 $\beta$ .** Die Zelllysate wurden aus *L. mexicana* Wildtyp präpariert; Spur 1 und 4 aus Promastigoten; Spur 2 aus Läsionsamastigoten; Spur 5 aus axenischen Amastigoten. Das rekombinante Protein His-LmxGSK3 $\beta$  wurde in Spur 3 und 6 geladen. Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Rechts: Film. **A:** Inkubation des Blots mit Prä-Immunsersum der Antikörper-Herstellung 1 : 1000 in 5 % MB/PBST. Film nach 1 min Exposition. **B:** Einsatz des aufgereinigten rabbit-anti-LmxGSK3 $\beta$ -Peptid Antiserums 1 : 400 in 5 % MP/PBST. Film nach 30 min bzw. \* 10 s Exposition. Der Pfeil zeigt die Laufhöhe des rekombinanten Proteins an. Der Stern markiert die potentielle Bande von LmxGSK3 $\beta$  in den Spuren mit Lysat. Die in B dargestellten Spuren entstammen demselben Gel.

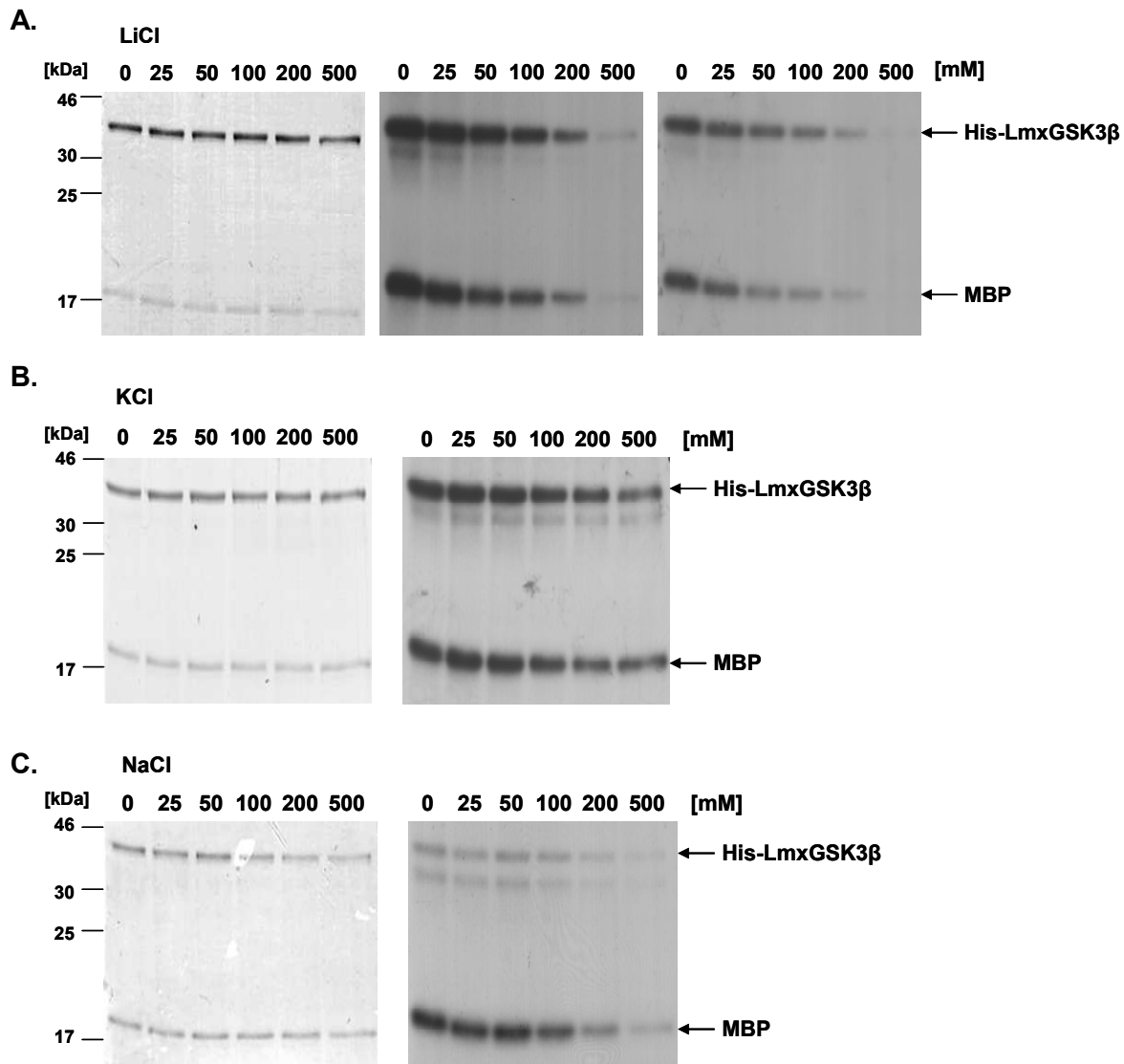
### 3.2.6 Effekt von LiCl auf *Leishmania mexicana* und auf LmxGSK3 $\beta$ *in vitro*

Für GSK3 $\beta$  der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* wurde eine Beteiligung an der Regulation der Flagellenlänge nachgewiesen (Wilson und Lefebvre, 2004). Diese Alge besitzt zwei apikale Flagellen von gleicher Länge. Eine Behandlung von *C. reinhardtii* mit 25 mM Lithiumchlorid (LiCl) für eine Stunde resultierte in einer deutlichen Verlängerung der Flagellen. Die Arbeitsgruppe um Wilson konnte darüber hinaus eine Hemmung von GSK3 durch LiCl *in vitro* und *in vivo* nachweisen. 1996 wurde Lithium als Inhibitor von GSK3 $\beta$  in höheren Eukaryonten identifiziert (Klein und Melton). Nachfolgend wurde untersucht, ob LiCl zu einer Aktivitätsänderung von rekombinanter LmxGSK3 $\beta$  führt und welchen Effekt Lithium auf Leishmanienkulturen besitzt.

#### 3.2.6.1 Inhibition von LmxGSK3 $\beta$ durch LiCl *in vitro*

Im radioaktiven Kinase-Aktivitätstest wurde His-LmxGSK3 $\beta$  mit dem artifiziellen Substrat MBP in Gegenwart von LiCl in ansteigender Konzentration inkubiert. Die ebenfalls zu einem monovalenten Kation und Chlorid dissoziierenden Salze Kaliumchlorid (KCl) und

Natriumchlorid (NaCl) dienten als Kontrollen. Die Salze wurden in einer Konzentration von 25, 50, 100, 200 und 500 mM zugegeben.



**Abb. 51: Aktivität von His-LmxGSK3 $\beta$  in Anwesenheit monovalenter Kationen in ansteigender Konzentration.** Einfluss von LiCl (A), KCl (B) bzw. NaCl (C) auf die Substrat- und Autophosphorylierung. Der Kinase-Aktivitätstest wurde mit Puffer pH 7,2, 5 mM Mg<sup>2+</sup> durchgeführt und 1 h bei 30° C inkubiert. Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Daneben: Autoradiogramm nach A. Mitte: 4 h, rechts: 2 h 15 min; B. 4 h 15 min bzw. C. 20 h Exposition. A und B entstammen demselben Durchlauf.

Die Coomassie-Färbung zeigt, dass gleiche Mengen an Protein geladen wurden (Abb. 51). Bereits ab einer Konzentration von 25 mM ist in Gegenwart von LiCl eine Verminderung der Substrat- als auch Autophosphorylierungsaktivität der rekombinanten LmxGSK3 $\beta$  zu beobachten (Abb. 51., A). Bei Zusatz von 25 mM KCl bzw. NaCl ist verglichen zum Nullwert keine Abnahme der Schwärzung im Autoradiogramm festzustellen (Abb. 51, B und C). Mit zunehmender LiCl-Konzentration nimmt die Kinase-Aktivität weiter ab. Beim Einsatz von KCl und NaCl kommt es ebenfalls zu einer Verminderung der Kinase-Aktivität in konzentrationsabhängiger Weise. Jedoch ist dies erst ab einer zugesetzten Ionenkonzentration von



100 mM der Fall. Diese Ergebnisse wurden in mehreren separaten Durchläufen bestätigt, die Puffer wurden immer frisch angesetzt.

Der *in vitro* Test zeigt, dass LmxGSK3 $\beta$  durch LiCl gehemmt werden kann.

### 3.2.6.2 Axenische Kultivierung von Leishmanien in Gegenwart von Lithium-Ionen

*L. mexicana* Wildtyp-Promastigoten wurden in Gegenwart von 25 mM bzw. 50 mM LiCl unter Standardbedingungen kultiviert. Die Kontrollkulturen mit Zugabe von 50 mM NaCl bzw. KCl sollten Aufschluss darüber geben, ob es sich bei beobachteten Effekten um Lithium spezifische handelt. Der Vergleich mit einer parallel angesetzten Normalkultur (mit Medium) diente dazu, Veränderungen als Folge der erhöhten Osmolarität ausschließen zu können. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, fixiert und untersucht.

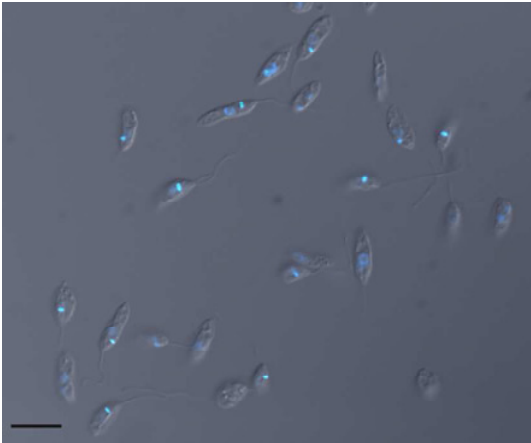
#### 3.2.6.2.1 Mikroskopie von Promastigoten

Nach 24 h, 48 h und 96 h entnommene Proben wurden fixiert, mit dem DNA-bindenden Farbstoff DAPI gefärbt und unter dem Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

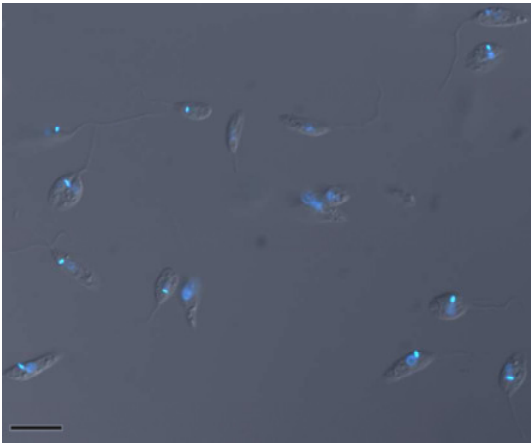
Die Wachstumskurve zu diesem Experiment ist in Abb. 53, A dargestellt. Das Wachstumsverhalten der Standardkultur ist nach 24 Stunden mit logarithmisch, nach 48 Stunden mit spät-logarithmisch und nach 96 Stunden mit stationär zu beschreiben. Nach 24 Stunden finden sich große, breite Zellen, außerdem sind in allen Kulturen viele abgerundete, sich teilende Zellen vorhanden (Abb. 52, 24 h). Im Vergleich dazu besitzen die Zellen der spät-logarithmischen Phase einen schlanken Zellkörper (Abb. 52, 48 h). In der stationären Phase entwickeln die Zellen eine eher spindelförmige Morphologie und viele besitzen im Vergleich zu den vorangegangenen Phasen einen viel kürzeren Zellkörper (Abb. 52, 96 h). Bei diesen Zellen könnte es sich dem Aussehen nach um metazyklische Formen handeln. Diese augenscheinlich metazyklischen Formen sind auch in den Kulturen mit LiCl vorhanden (Abb. 52, 96 h). Zwischen den Zellen der Wildtypstandardkultur und den Zellen der mit NaCl bzw. KCl versetzten Kulturen ist morphologisch zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zu erkennen (Abb. 52). In den Kulturen mit Lithium befinden sich auffällig viele Zellen im Stadium der Zellteilung. Die Zellen im Begriff der Zellteilung lassen bereits eine Verdopplung des Zellkörpers erkennen, scheinen jedoch noch nicht in ihre Tochterzellen zerfallen zu sein. Eine Anhäufung von Zellen dieses Phänotyps ist in der Zellpopulation zu den beiden späteren Zeitpunkten der Probenentnahme besonders auffällig, in der Kultur versetzt mit 50 mM LiCl mehr als in der mit 25 mM. In den Kontrollkulturen ist im Vergleich in der spät-logarithmischen bzw. stationären Phase der Anteil an teilenden Zellen sehr gering. Der beobachtete Phänotyp von Zellen mit zusammenhängenden Zellkörpern in der lithiumhaltigen Kultur wird im nächsten Abschnitt anhand von Beispielen noch genauer beschrieben.

24 h:

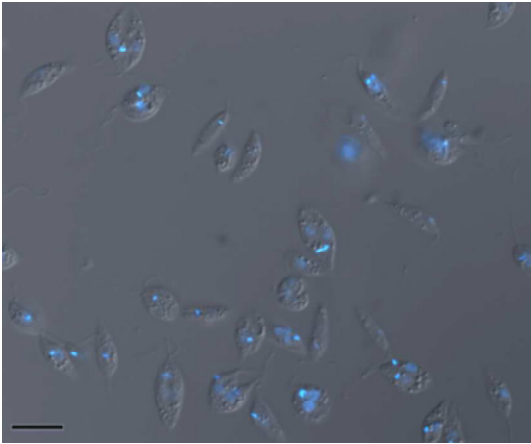
Wt



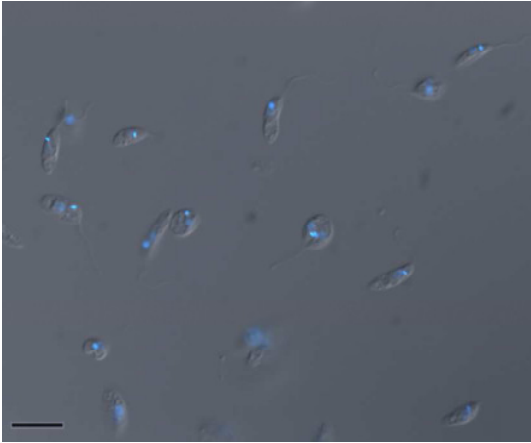
LiCl 25 mM



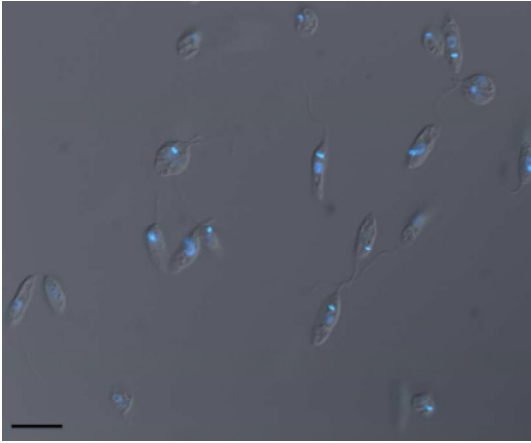
LiCl 50 mM



NaCl 50 mM

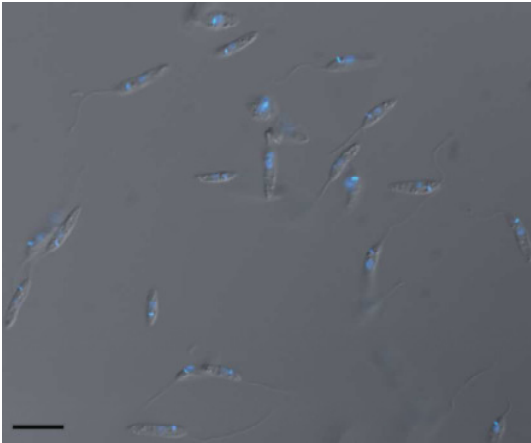


KCl 50 mM

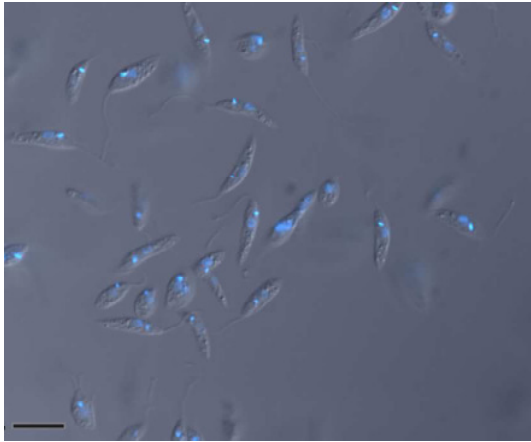


48 h:

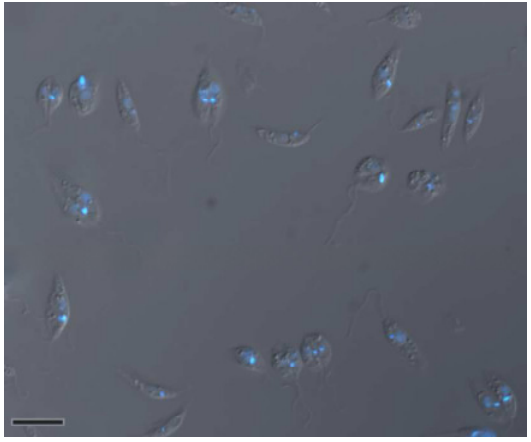
Wt



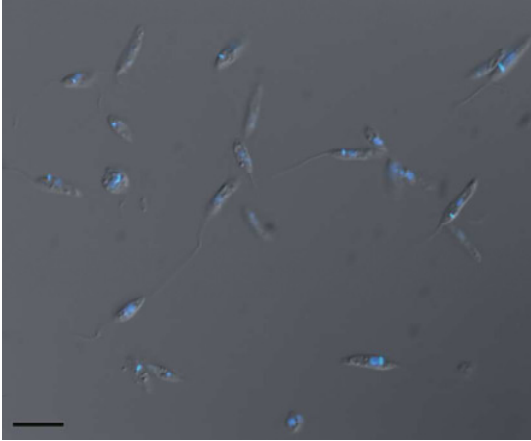
LiCl 25 mM



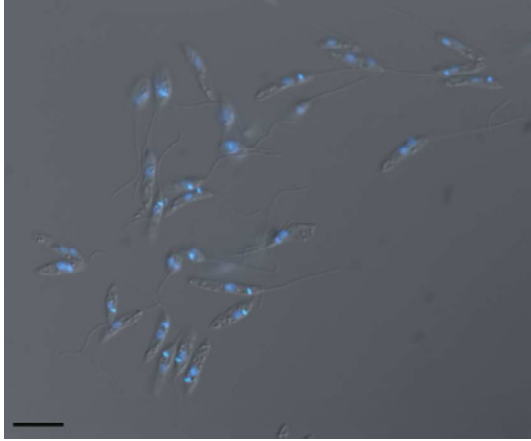
LiCl 50 mM

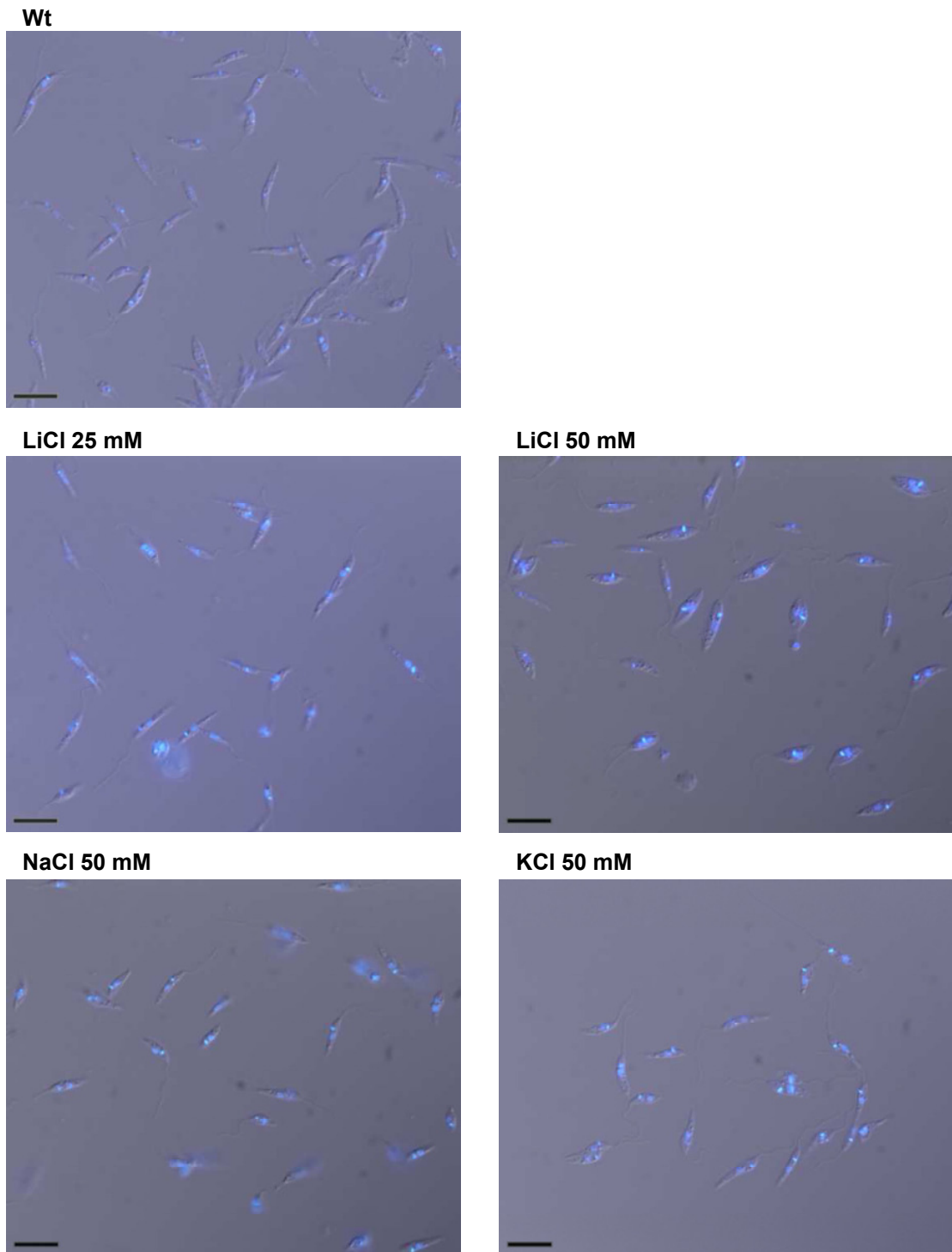


NaCl 50 mM



KCl 50 mM



**96 h:**

**Abb 52:** Fluoreszenzmikroskopie von DAPI gefärbten *Leishmania mexicana*-Promastigoten. Der Wildtyp wurde in Medium ohne und nach Zugabe von 25 mM bzw. 50 mM LiCl, 50 mM NaCl oder 50 mM KCl kultiviert. Die Zelldichte war bei 0 h  $1 \times 10^6$  Zellen/ml. Die Probeentnahme erfolgte nach 24 h, 48 h und 96 h. Dargestellt ist die Überlagerung der Phasenkontrastaufnahme mit der jeweiligen DAPI-Fluoreszenzaufnahme mit 100er Objektiv (Plan APOCHROMAT). Der schwarze Balken entspricht 10 µm (100 pixel).

### 3.2.6.2.2 Wachstumsverhalten von Promastigoten und Lithium induzierter Zellteilungsphänotyp

Die nachfolgenden Auszählungen von Zellen erfolgten unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Zählkammer am Mikroskop. Sich bereits verdoppelte, jedoch strukturell noch eine Verbindung aufweisende Zellen wurden als 1½-Zellen gezählt.

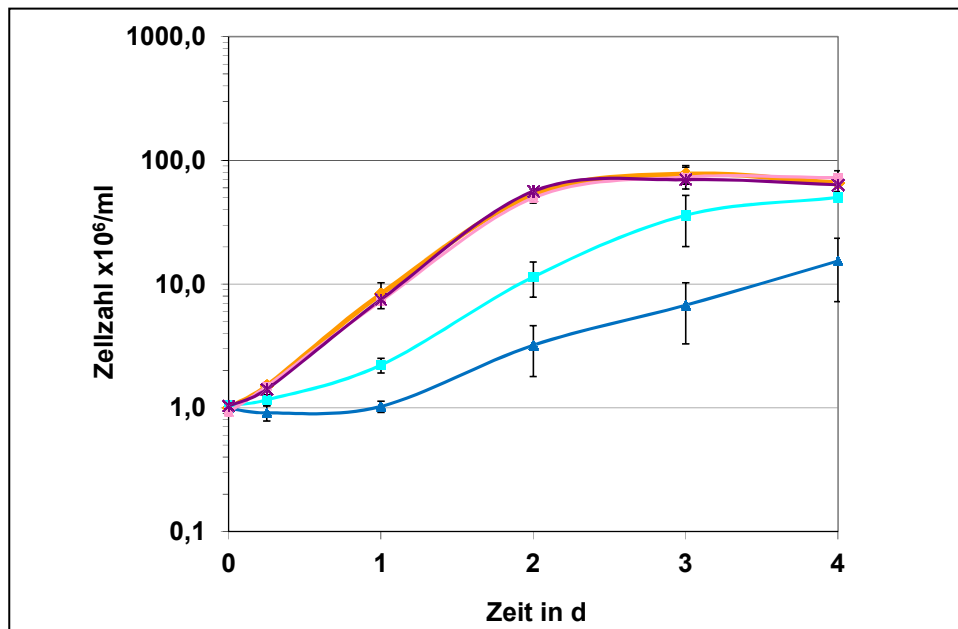
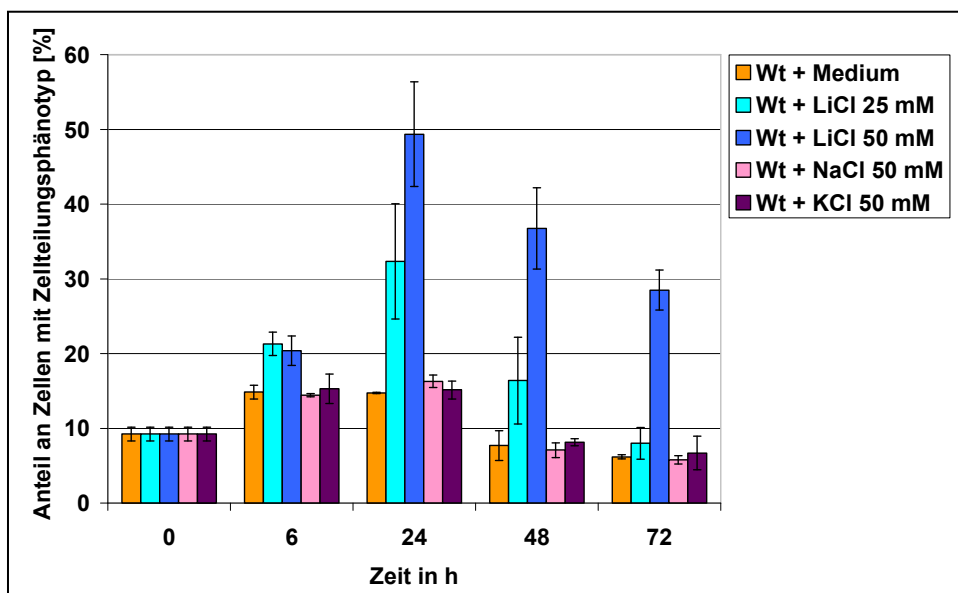
#### Wachstumsverhalten

Wie zu sehen ist, sind die Wachstumskurven von Wildtyp-Promastigoten kultiviert in Standardmedium ohne bzw. mit zusätzlichem NaCl bzw. KCl in einer Konzentration von 50 mM beinahe deckungsgleich (Abb. 53, A). Alle drei Kulturen befinden sich nach 24 Stunden in der logarithmischen Wachstumsphase und weisen die im Kulturverlauf höchste Zellteilungsaktivität mit einer Generationszeit von etwa acht Stunden auf. Nach 48 Stunden ist das Wachstumsverhalten als spät-logarithmisch zu beschreiben und die Generationszeit liegt zwischen acht und neun Stunden. Nach 72 Stunden befinden sich die Kulturen in der stationären Wachstumsphase. Die Wachstumskurven erreichen hier eine Plateauphase und es ist kaum noch Zellteilungsaktivität festzustellen. Nach 96 Stunden ist die Zellzahl bereits leicht rückläufig, vermutlich aufgrund von Zellsterben.

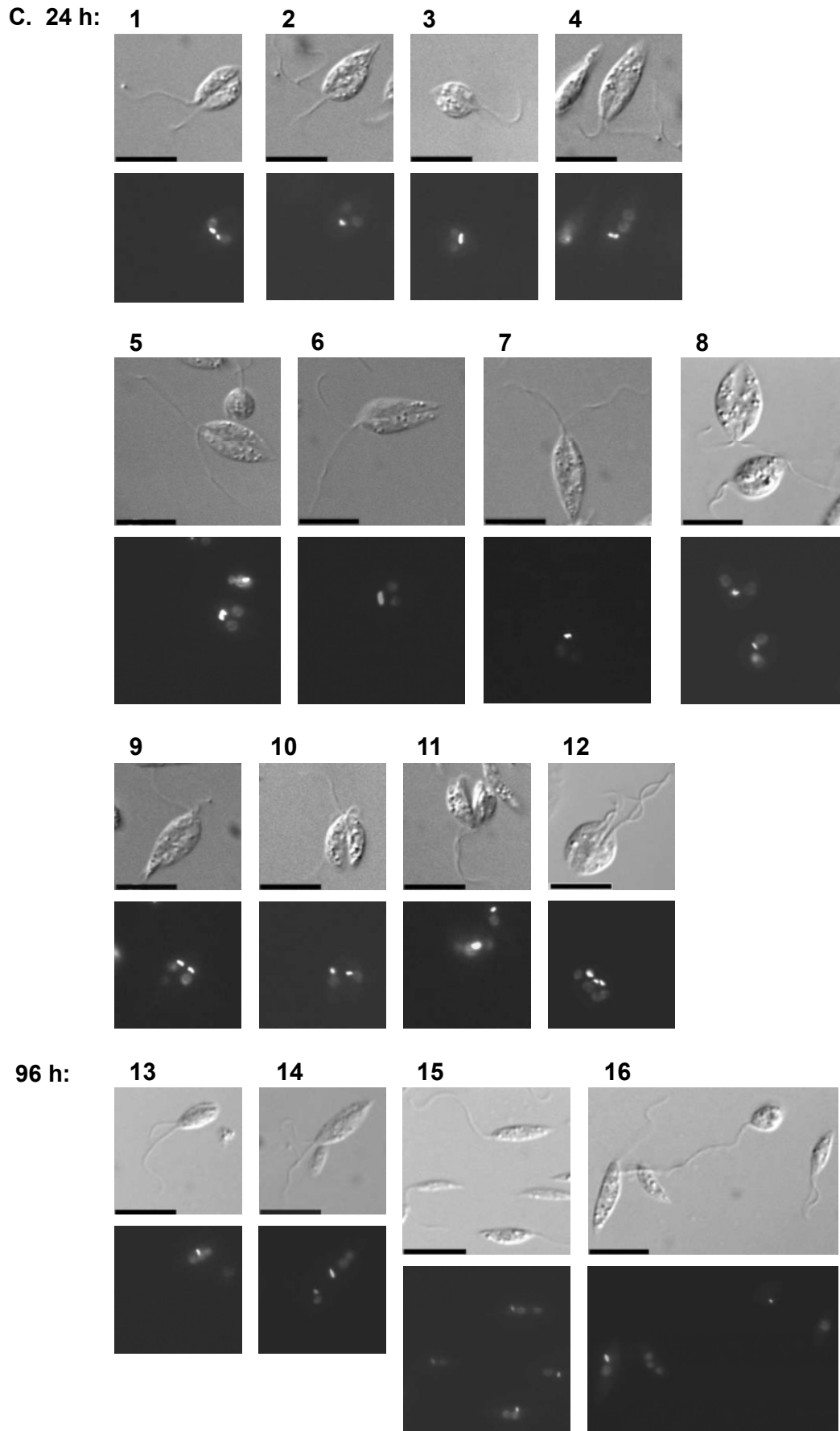
Die Zellvermehrung der Wt-Promastigoten zeigt sich in Gegenwart von LiCl deutlich beeinträchtigt (Abb 53, A). Die Hemmung erfolgt konzentrationsabhängig. Während sich die Zellzahl der Kontrollkulturen nach einem Tag etwa verachtfacht hat, hat sie sich in Kulturen mit 25 mM LiCl lediglich verdoppelt und mit 50 mM LiCl fast gar nicht verändert. Zu Beginn der Kultivierung weist die 25 mM LiCl-Kultur ein deutlich vermindertes Wachstum auf. Nach 24 Stunden wachsen die Zellen mit einer durchschnittlichen Generationszeit von 22 Stunden. Nach 48 Stunden lässt sich für die 25 mM LiCl-Kultur eine Generationszeit von 10 Stunden berechnen. Nach dem dritten Tag beginnt die Wachstumskurve zunehmend abzuflachen und am vierten Tag erreicht die Kultur schließlich annähernd die Zellzahl, wie sie der Wildtyp kultiviert unter Standardbedingungen beim Übergang in die stationäre Phase besitzt. Bei getesteten 50 mM LiCl ist in den ersten 24 Stunden kaum Zellvermehrung festzustellen. Danach scheint sich die Kultur etwas erholt zu haben und bis zum Ende des Experiments ist eine moderate Zunahme der Zellzahl zu verzeichnen. Nach 48 Stunden erreicht die Kultur mit 50 mM LiCl eine Generationszeit von 14,6 Stunden, dies ist ihre niedrigste innerhalb von vier Tagen Kulturverlauf. Der Effekt von Lithium auf die Zellvermehrung scheint zu Beginn der Kulturzeit am stärksten ausgeprägt zu sein – hier ist die Zellteilungsgeschwindigkeit vergleichsweise am meisten vermindert. In den Kulturen versetzt mit LiCl sind offenbar noch potentiell teilungsfähige Zellen vorhanden und es wird unter der eingesetzten Lithium-Konzentration keine vollständige bzw. irreversible Hemmung der Zellteilung erreicht.

**A. Generationszeit [h]:**

Wt	+ Medium	+ 25 mM LiCl	+ 50 mM LiCl	+ 50 mM NaCl	+ 50 mM KCl
6 h	10,3	39,8		8,9	13,5
24 h	7,9	22,1	> 100	8,1	8,4
48 h	9	10,1	14,6	8,7	8,3
72 h		14,5	22,3		
96 h			20,2		

**B.**

**Abb. 53, A und B:** LiCl induzierte Phänomene in *Leishmania mexicana*-Promastigoten. Der Wildtyp wurde in Medium ohne und nach Zugabe von 25 bzw. 50 mM LiCl, 50 mM NaCl oder 50 mM KCl kultiviert. Zelldichte zum Zeitpunkt 0 h:  $1 \times 10^6$  Zellen/ml. **A:** Zellzahl nach 6 h und 1-4 d. Die Generationszeit (g) während der logarithmischen Wachstumsphase wurde berechnet nach der Formel:  $g = 1 / v$ , wobei  $v = m / \log 2$  und  $m = (\log N - \log N_0) / (t - t_0)$ .  $v$  = Teilungsrate;  $N$  = Zellzahl zum Zeitpunkt  $t$ ;  $N_0$  = Zellzahl zum Zeitpunkt  $t_0$ ;  $m$  = Steigung der Regressionsgeraden im Bereich der exponentiellen Wachstumsphase bei halblogarithmischen Skalierung der Grafik. **B:** Prozentsatz des im Text besprochenen Zellteilungsphänotyps an der Gesamtzellpopulation nach 0, 6, 24, 48 u. 72 h. Der Anteil wurde stellvertretend für je 250 Zellen bestimmt. A und B: Die Messwerte entstammen einem Durchlauf bestehend aus zwei, alle Ansätze umfassende Gruppen von Kulturen. Den beiden Gruppen lagen aus unterschiedlichen Mausinfektionen stammende Wildtyp-Kulturen zu Grunde. Dargestellt ist für jeden Ansatz der Mittelwert. In weiteren Durchläufen wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt.



**Abb. 53, C:** Mikroskopie von Promastigoten nach 24 h bzw. 96 h Kultivierung mit 50 mM LiCl. Beispielbilder des nach abnormer Zellteilung resultierenden Phänotyps. Oben: Phasenkontrastaufnahme, unten: Fluoreszenzaufnahme der DAPI-Färbung. Der schwarze Balken entspricht 10  $\mu$ m.

### Auszählung des nach abnormer Zellteilung resultierenden Phänotyps:

In den Übersichtsaufnahmen am Mikroskop konnte für die in Gegenwart von Lithiumchlorid kultivierten Promastigoten eine Anhäufung von Zellen in der Verdopplungsphase beobachtet werden (Abb. 52). Die Erhebung des Anteils dieser Zellen an der Gesamtpopulation objektiviert diesen Eindruck. Die Verdopplung des Flagellums ist ein erstes, in der Phasenkontrastaufnahme sichtbares Anzeichen, dass sich die Zelle in der Phase der Zellteilung befindet (Wheeler et al., 2011). Dieses frühe Kriterium wurde ausgewählt, um den Prozentsatz an Zellen mit „Zellteilungsphänotyp“ zu bestimmen und alle Zellen mit zwei oder mehr Flagellen ausgezählt.

Die höchste Zellteilungsaktivität ist während der logarithmischen Wachstumsphase einer Kultur zu verzeichnen. Die Auszählung der sich teilenden Zellen nach sechs bzw. 24 Stunden ergibt für die Kontrollkultur mit Standardmedium einen Wert von um die 15 %. Zum Zeitpunkt 48 Stunden hat sich dieser Wert etwa halbiert, und in der stationären Phase nach 72 Stunden Kultur zeigen noch um die 6 % der Zellen morphologische Merkmale der Zellteilung (Abb. 53, B). Der Anteil an sich teilenden Zellen in der Kultur versehen mit 50 mM NaCl bzw. KCl verhält sich zu allen Zeitpunkten annähernd wie der, der Kontrollkultur mit Standardmedium. Anders die Kulturen mit Lithiumchlorid. Bereits nach sechs Stunden Kultivierung zeigen sich erste Unterschiede, in der Verdopplungsphase befinden sich bei 25 mM LiCl mehr als 21 % bzw. bei 50 mM LiCl mehr als 20 % der Zellen. Nach 24 Stunden zeigen knapp 50 % der in Anwesenheit von 50 mM Lithiumchlorid gewachsenen Zellen das Bild einer Zellverdopplung, das ist das 3,3-fache der Kontrollkultur mit Standardmedium zu diesem Zeitpunkt. Für die 25 mM LiCl-Kultur liegt nach 24 Stunden der Anteil bei 32 %. Für die Kultur mit 50 mM LiCl nimmt der Anteil an Zellen mit „Zellteilungsphänotyp“ nach 48 bzw. 72 Stunden auf 37 % bzw. 29 % ab. Das sind jedoch immer noch 4,8- bzw. 4,6-mal mehr sich teilende Zellen, als in der Standardkontrollkultur. Die Kultur versehen mit 25 mM LiCl weist nach 48 h das 2,1-fache an sich verdoppelnden Zellen der Kontrolle auf. Nach 72 Stunden übersteigt die Kultur mit 25 mM LiCl mit 8 % an Zellen mit mehr als zwei Flagellen, nur knapp den Anteil dieser Zellen in der Kontrolle.

### Charakterisierung des beobachteten Zellteilungsphänotyps:

Wie die Auszählung bestätigt hat, finden sich in den mit Lithium behandelten Kulturen mehr Zellen in der Phase der Zellteilung. Alle diese Zellen hatten das Flagellum bereits verdoppelt. Außerdem hatten die meisten die Karyokinese – die Verdopplung des Zellkerns und anschließende räumliche Trennung der beiden resultierenden Kerne – und viele der Zellen die Verdopplung des Kinetoplasten bereits abgeschlossen. Folglich stand für die Zellen des besagten Phänotyps im Rahmen der Zellteilung noch die Cytokinese aus. Unter Cytokinese



versteht man die Teilung des Cytoplasmas durch Abschnürung des Zellkörpers unter hervorgehen zweier Zellen.

Eine räumliche Diskriminierung der beiden Tochterkinetoplasten fiel am Mikroskop oftmals schwer, da diese in vielen der Zellen sehr nahe beieinander lagen. Zumeist war der ein- bzw. zweifache Kinetoplast in der Mittellinie der sich verdoppelnden Zelle, zwischen den Zellkernen und dem anterioren Pol anzutreffen. Es macht den Anschein, dass eine Segregation der Kinetoplasten in vielen der betroffenen Zellen (noch) nicht stattgefunden hat, siehe Abb. 53, C 2-8.

Vor der Cytokinese von Promastigoten kommt es zur Verkürzung der Zelllänge von etwa 11  $\mu\text{m}$  auf 6  $\mu\text{m}$ , gleichzeitig wird eine Zunahme der Zellbreite auf etwa 5  $\mu\text{m}$  und eine Abrundung der verdoppelten Zelle festgestellt (Wheeler et al., 2011). In der Lithium exponierten Kultur finden sich teilende Zellen mit rundem, kurzen Zellkörper von weniger als 10  $\mu\text{m}$  Länge, z. B. Abb. 53, C, 1, 3, 10-12. Ein erheblicher Teil der Zellen, welche eine Verdopplung aller Zellbestandteile aufweisen, lässt jedoch keine Verkürzung des Zelleibs erkennen. Es finden sich Doppelzellen mit einer Länge von mehr als 10  $\mu\text{m}$ , die erkennbar länger als breiter sind, z. B. Abb. 53, C, 4-7, 9. Diese Zellen weisen häufig zwei Flagellen mit einer Länge von jeweils deutlich mehr als 10  $\mu\text{m}$  auf, z. B. Abb. 53, C, 5-7.

Bei einigen der sich verdoppelnden Zellen in der Kultur mit Lithium ist eine unvollständige bis vollständige Teilungsfurche von Pol zu Pol der Zelle zu erkennen (Abb. 53, C, 1, 4, 5, 6). Jedoch scheint die Cytokinese bei fast allen gesehen Zellen nicht wie gewohnt vom begeißelten, anterioren Pol, sondern vom posterioren Pol ausgehend fortzuschreiten, Beispiele siehe Abb. 53, C, 8-11.

Außerdem finden sich in der mit 50 mM Lithium behandelten Kultur nicht oder nur teilweise getrennte Zellen mit mehr als 2 Flagellen, mehr als 2 Zellkernen und einer variablen Anzahl von Kinetoplasten, Beispiele siehe Abb. 53, C, 11 und 12. Zu den späteren Zeitpunkten der Kultivierung ist eine Anhäufung von Zellen festzustellen, welche ein irreguläres Nukleus (N) zu Kinetoplast (K) Verhältnis aufweisen. Es können sowohl Einzelzellen als auch Doppelzellen (mit zwei Flagellen) beobachtet werden, welche mehr als die normale Anzahl an Zellkernen besitzen, Abb. 53, C, 9 und 13-16 z. B. Einzelzellen mit 2N1K, 3N0K und Doppelzellen mit 3NxK. Zum Zeitpunkt 96 Stunden treten auch Einzelzellen mit ungewöhnlichen Konstellationen wie 0N1K und xN0K, Abb. 53, C, 16 auf.

Zusammenfassend ist im Vergleich zu den Kontrollkulturen für die Lithium-exponierte Kultur eine konzentrationsabhängige Zunahme an Promastigoten in der Teilungsphase bei gleichzeitig geringerem Zellwachstum festzustellen. Die Charakterisierung der Zellen mit „Zellteilungsphänotyp“ liefert Hinweise auf das Vorliegen eines Cytokinesedefekts. Auch scheinen viele Zellen von einer Beeinträchtigung der Kinetoplasten- und/oder Nukleus-

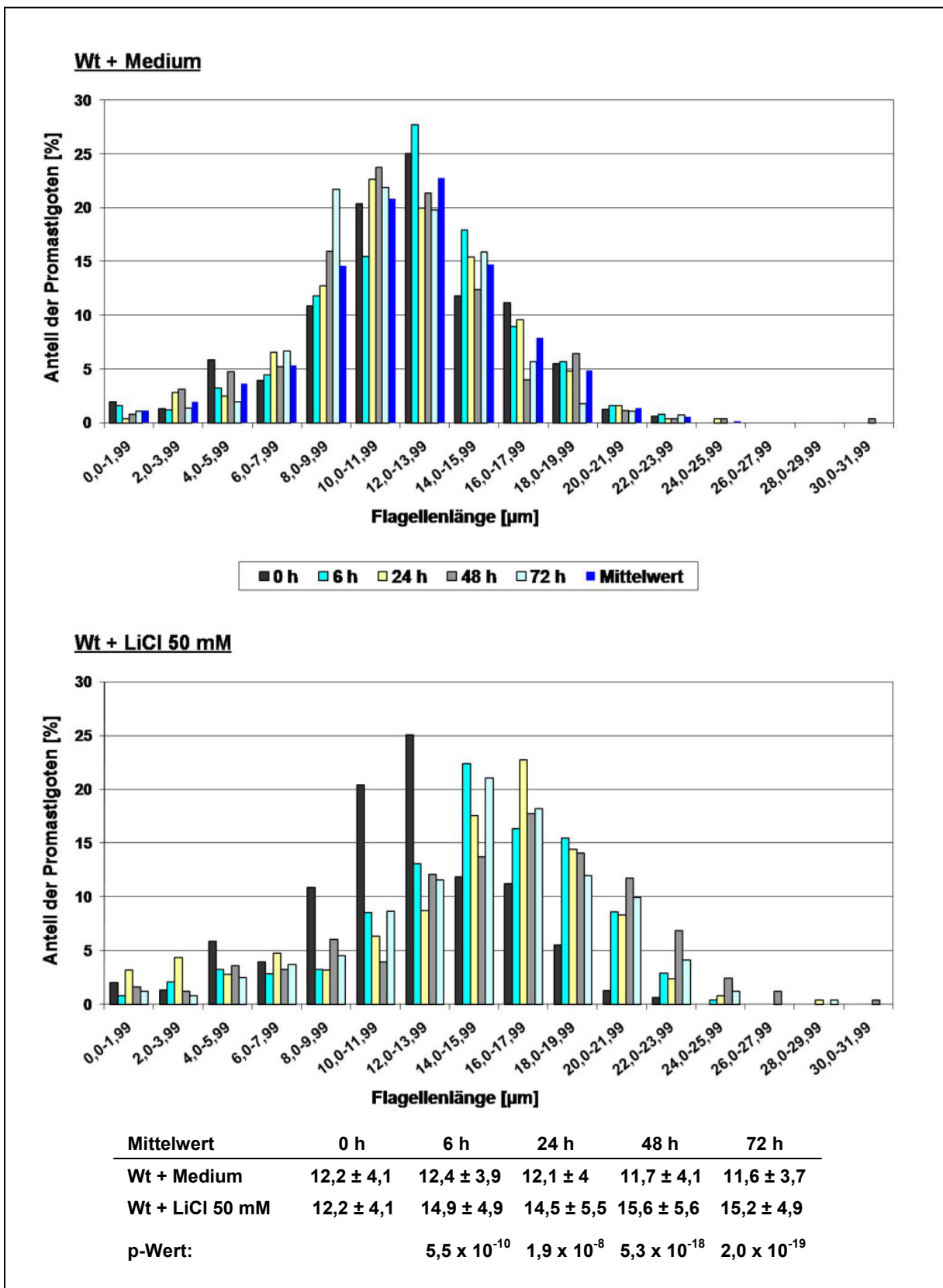
Verteilung betroffen zu sein. Kontrollkulturen mit NaCl oder KCl in gleicher Molarität zeigen keine der genannten Veränderungen.

#### 3.2.6.2.3 Zunahme der Flagellenlänge

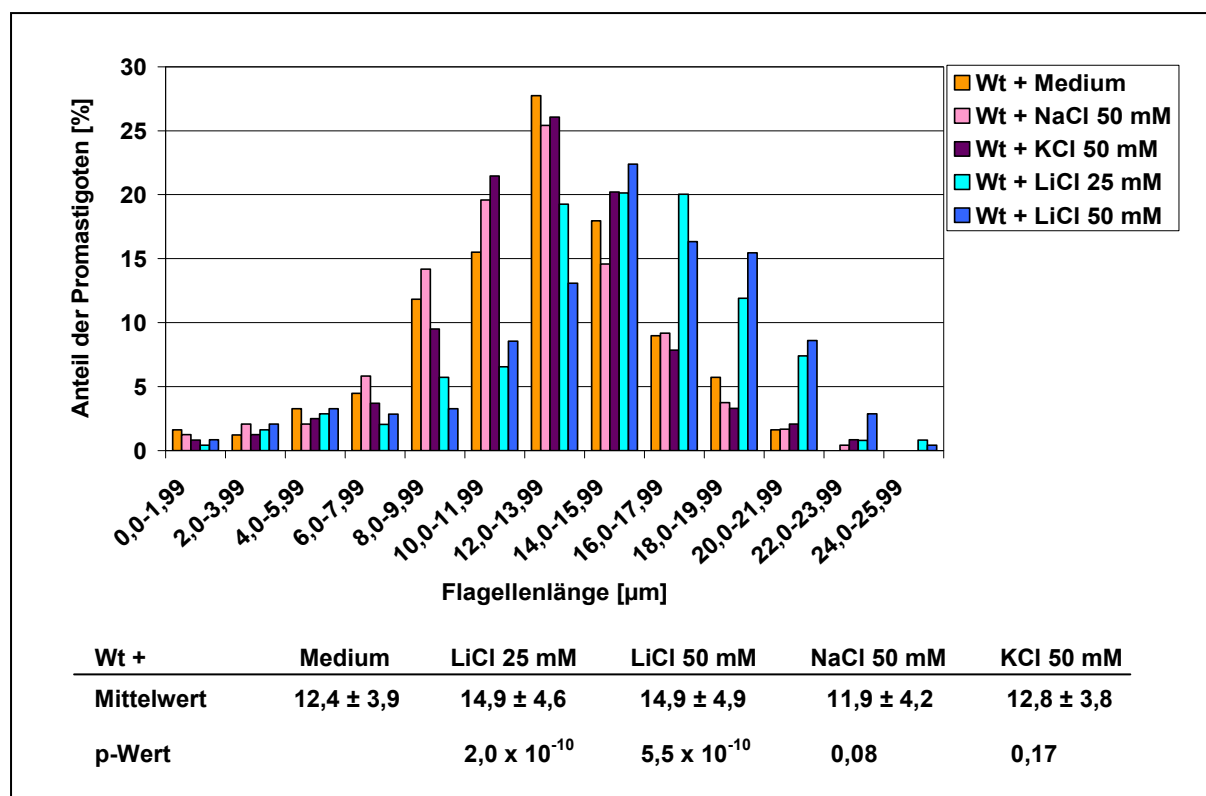
Bei graphischer Darstellung der Flagellenlänge bildet sich für alle Kulturen annähernd eine Normalverteilungskurve ab (Abb. 54). Wildtyp Promastigoten weisen in Kultur im Mittel eine Flagellenlänge von plus/minus 12 µm auf (Tabelle Abb. 54, A). Die fortlaufende Kultivierung von Promastigoten in Gegenwart von 50 mM Lithiumchlorid führt im Vergleich zum Null-Stundenwert (schwarze Balken) zu einer deutlichen Verschiebung der Normalverteilungskurve nach rechts (Abb. 54, A). Bereits nach sechs Stunden Kultivierung ist ein deutlicher Effekt zu erkennen und die durchschnittliche Flagellenlänge um 2,5 µm größer als beim Wildtyp. Nach 24 Stunden besitzen die meisten Zellen der LiCl-Kultur eine Flagellenlänge zwischen 16 und 18 µm. Der Anteil an Zellen mit einer Flagellenlänge von größer als 14 µm beträgt in der Standardwildtypkultur im Mittel 30 %. In der LiCl-Kultur beträgt er nach sechs Stunden 66 %, nach 24 Stunden 67 %, nach 48 Stunden 68 % und nach 72 Stunden 67 %. Eine Konzentration von 25 mM Lithiumchlorid im Kulturmedium führt ebenfalls bereits nach sechs Stunden zu einer deutlichen Zunahme der Flagellenlänge (Abb. 54, B). Beide Kulturen mit LiCl besitzen nach sechs Stunden eine mittlere Flagellenlänge von 14,9 µm. Die Verteilung der Flagellenlänge der mit 50 mM NaCl bzw. KCl versetzten Kontrollkulturen verhält sich wie die der Kontrollkultur ohne Zusatz. Nach 6 Stunden beträgt der Anteil an Zellen mit einer Flagellenlänge größer 14 µm in der Standardkultur 34 %, der NaCl-Kultur 30 %, der KCl-Kultur 35 %, der Kultur mit 25 mM LiCl 62 % und der Kultur mit 50 mM LiCl 66 %. Die Promastigoten der LiCl-Kulturen zeigen sich gut beweglich.

Jeweils zwei Datenreihen wurden einander gegenübergestellt und mit dem Student's t-Test (Gosset, 1908) der p-Wert berechnet. Es wurde von zwei unabhängigen Stichproben mit unterschiedlichen Teilnehmern und ungleicher Varianz ausgegangen und ein einseitiger Test mit gerichteter Hypothese durchgeführt. Es wurde dadurch bestätigt, dass die jeweiligen LiCl-behandelten Kulturen hochsignifikant längere Flagellen als die Standardkultur aufweisen (Abb. 54, Tabellen:  $p < 0,05$ ). Die Promastigoten der mit 50 mM NaCl bzw. KCl versetzten Kulturen besitzen nach sechs Stunden hingegen keine signifikant längeren Flagellen als die Standardkultur (Abb. 54, B Tabelle:  $p = 0,08$  bzw.  $p = 0,17$  und damit  $> 0,05$ ).

## A.



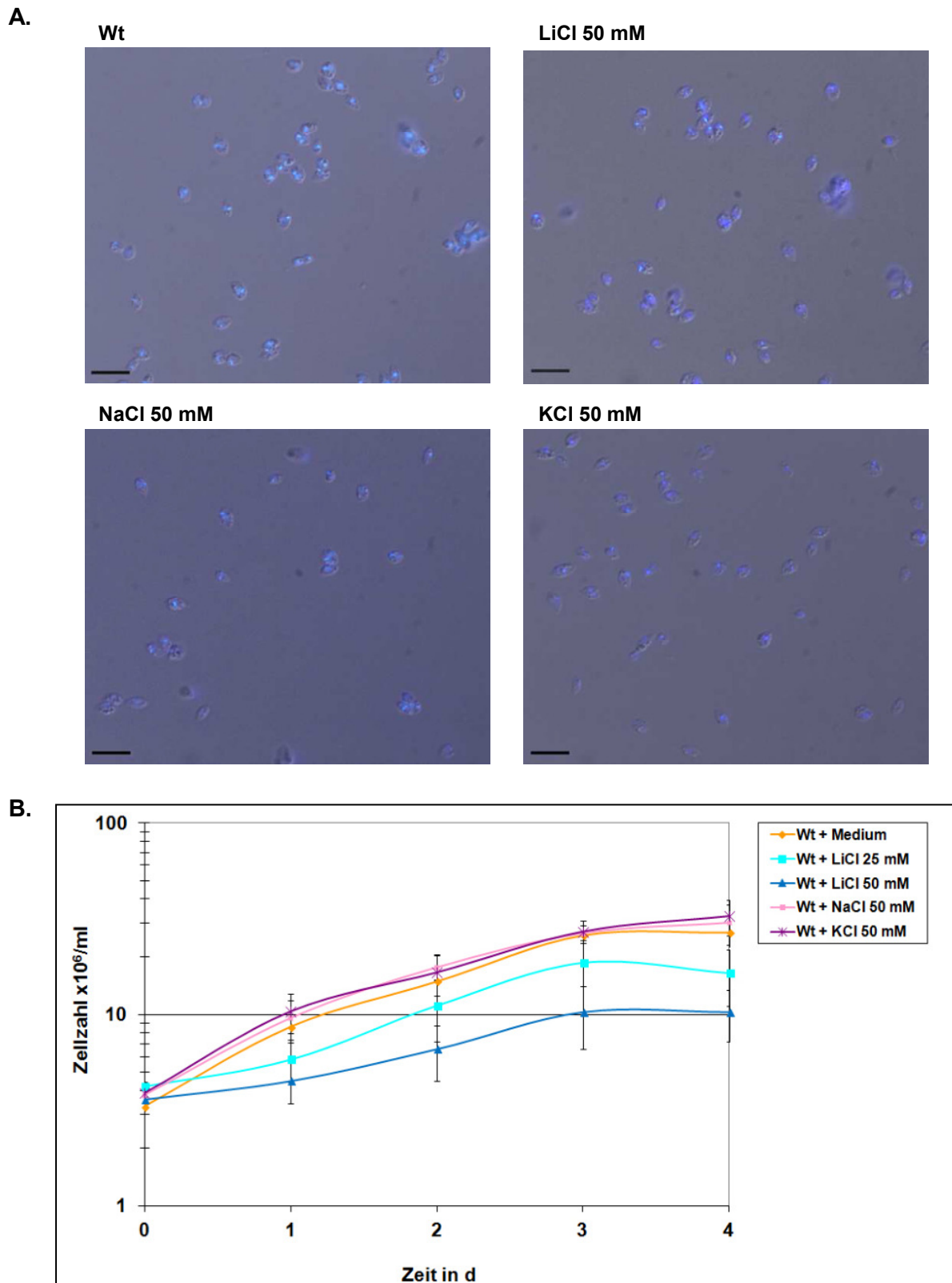
## B.



**Abb. 54:** Histogramm der Flagellenlänge von Wildtyp ohne und nach Zugabe monovalenter Kationen. Der Wildtyp wurde in Medium ohne und nach Zugabe von 25 bzw. 50 mM LiCl, 50 mM NaCl oder 50 mM KCl kultiviert. Zelldichte zum Zeitpunkt 0 h:  $1 \times 10^6$  Zellen/ml. Es wurden die Flagellen von je mindestens 120 Zellen vermessen. **A:** Probenentnahme nach 0, 6, 24, 48 und 72 h und Messung der Flagellenlänge von Wt + Medium und Wt + LiCl 50 mM. **B:** Probenentnahme nach 6 h und Messung der Flagellenlänge aller Kulturen. Für die Berechnung des p-Werts wurde der jeweiligen Datenreihe die des Wildtyps gegenübergestellt. **A** und **B:** Die Messwerte entstammen einem Durchlauf bestehend aus zwei, alle Ansätze umfassende Gruppen von Kulturen. Den beiden Gruppen lagen aus unterschiedlichen Mausinfektionen stammende Wildtyp-Kulturen zu Grunde. Dargestellt ist für jeden Ansatz der Mittelwert aus beiden Gruppen. In mehreren Durchläufen wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt.

#### 3.2.6.2.4 Mikroskopie und Wachstumsverhalten von axenischen Amastigoten

Der Inhibitor LiCl führt zu Veränderungen in axenischen Promastigoten. Nachfolgend wurde untersucht, ob axenische Amastigoten ebenfalls sensibel auf Lithium-Ionen reagieren. Die Umwandlung von Promastigoten zu axenischen Amastigoten erfolgte in Gegenwart von 50 mM Lithiumchlorid. Neben der Standardkultur wurde als Kontrollkultur je ein Ansatz mit zusätzlich 50 mM NaCl bzw. 50 mM KCl geführt. Nach drei Tagen wurde je eine Probe für die mikroskopische Untersuchung entnommen. Die Zellzahl der sich differenzierenden Kulturen wurde über vier Tage verfolgt.



**Abb. 55:** Differenzierung zu axenischen Amastigoten und deren Wachstum in Gegenwart von LiCl. Wildtyp-Promastigoten wurden in Medium ohne bzw. mit 50 mM LiCl, 50 mM NaCl oder 50 mM KCl zu axenischen Amastigoten differenziert. **A:** Mikroskopie DAPI gefärbter Amastigoten nach 3 d Differenzierung. Aufnahmen mit 100er Objektiv (Plan APOCHROMAT). Dargestellt ist die Überlagerung der Phasenkontrast- mit der DAPI-Fluoreszenzaufnahme. Der schwarze Balken entspricht 10  $\mu$ m (100 pixel). **B:** Zellzahl zum Zeitpunkt 0 und 1-4 d. Die Messwerte entstammen drei separaten Durchläufen mit insgesamt vier, alle Ansätze umfassenden Gruppen von Kulturen. Den Gruppen lagen zwei aus unterschiedlichen Mauseinfektionen stammende Wildtyp-Kulturen zu Grunde. Dargestellt ist für jeden Ansatz der Mittelwert. In allen Durchläufen wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt.

Nach morphologischen Gesichtspunkten liegen nach drei Tagen Differenzierung in Gegenwart von LiCl, NaCl bzw. KCl sowie unter Standardkulturbedingungen axenische Amastigoten vor (Abb. 55, A). Während der axenischen Differenzierung von *L. mexicana*-Promastigoten zu Amastigoten ist für alle Kulturen eine Zunahme der Zellzahl festzustellen (Diagramm Abb. 55, B). Wie zu sehen ist, bleibt das Wachstum der mit LiCl versetzten Kulturen allerdings deutlich hinter dem der Kontrollkultur mit Medium, NaCl bzw. KCl zurück. 50 mM LiCl beeinträchtigt die Proliferation der Zellen stärker als 25 mM LiCl. Nach Tag drei wachsen die axenischen Amastigoten der Kontrollkulturen mit verminderter Wachstumsgeschwindigkeit weiter, die Kulturen mit Lithium proliferieren nicht mehr. Die Kultur mit 25 mM LiCl zeigt an Tag vier im Vergleich zum Vortag eine Verminderung der Zellzahl. Der Mittelwert der maximal erreichten Zellzahl beträgt  $1,86 \pm 0,8 \times 10^7$  Zellen/ml für die Kultur mit 25 mM LiCl und  $1,03 \pm 0,3 \times 10^7$  Zellen/ml für die Kultur mit 50 mM LiCl. Für die Kontrollen mit Zusatz von 50 mM NaCl, 50 mM KCl und ohne Zusätze wurde nach vier Tagen Kultivierung Werte von  $3,03 \pm 0,7$ ,  $3,26 \pm 0,7$  und  $2,67 \pm 0,4 \times 10^7$  Zellen/ml erreicht. Die Proliferation von axenischen Amastigoten zeigt sich durch die Anwesenheit von Lithium-Ionen beeinträchtigt.

### 3.2.7 LmxGSK3 $\beta$ im Kinase-Aktivitätstest zusammen mit anderen rekombinant exprimierten Leishmanien-Kinasen

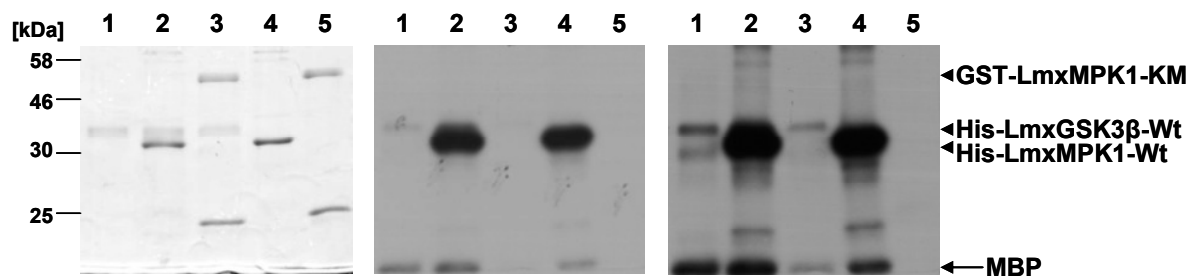
Bei Lithium handelt es sich um einen potentiellen Inhibitor von LmxGSK3 $\beta$  *in vitro*. Die Behandlung von Leishmanienkulturen mit LiCl führt zu einer signifikanten Verminderung des Zellwachstums und einer Verlängerung der Flagellen. Diese Resultate warfen die Frage auf, ob es sich bei LmxGSK3 $\beta$  um einen potentiellen Interaktionspartner von Leishmanien-Kinasen handeln könnte, welche erwiesenermaßen eine Rolle bei der Zellproliferation oder der Regulation der Flagellenlänge spielen? Insbesondere die an der Flagellenlängenregulation beteiligten Kinasen LmxMKK und LmxMPK3 (Erdmann und Scholz et al., 2006) sowie LmxMKK4 waren von Interesse. Die rekombinanten Proteine dieser Kinasen wurden im Kinase-Aktivitätstest auf eine mögliche Wechselwirkung mit LmxGSK3 $\beta$  untersucht. LmxMPK1 ist essentiell für die Zellproliferation im amastigoten Lebensstadium (Wiese, 1998). Mit dem potentiellen GSK3-Inhibitor Lithium exponierte Pro- als auch Amastigoten zeigen eine Beeinträchtigung der Zellteilung, daher wurde LmxMPK1 auf Interaktion mit LmxGSK3 $\beta$  getestet.

Die Kinasen LmxMPK1, LmxMPK3, LmxMKK und LmxMKK4 bevorzugen Mangan als divalentes Kation. LmxGSK3 hingegen benutzt Magnesium als Co-Faktor für die Phosphorylierungsreaktion. Für die kombinierten Kinase-Aktivitätstests wurde daher ein Puffer gewählt, der Mangan und Magnesium bereitstellt. Das rekombinante LmxGSK3 $\beta$ -Protein zeigte in Gegenwart von Mangan und Magnesium eine etwas geringere Aktivität als mit Magnesium

alleine (Siehe Abschnitt 3.2.3.5). In Anbetracht der unterschiedlichen pH-Optima der getesteten Enzyme wurde der pH-Wert des Puffers für den Assay so gewählt, dass er sich in einem von beiden Kinasen toleriertem Bereich befindet.

### 3.2.7.1 LmxGSK3 $\beta$ und LmxMPK1

Die aktive Wildtyp-Kinase (Wt) von LmxGSK3 $\beta$  bzw. LmxMPK1 wurde als His-Fusionsprotein und die inaktive KM-Mutante von LmxMPK1 als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt. Im radioaktiven Kinase-Aktivitätstest wurden beide Kinasen auf gegenseitige Phosphorylierungsaktivität getestet.



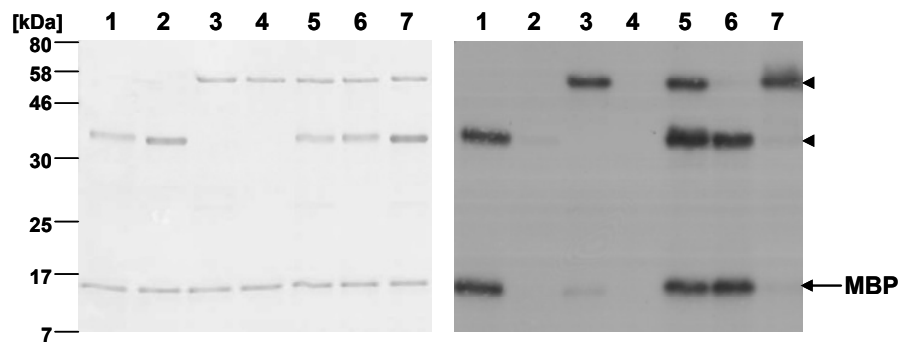
**Abb. 56: Kinase-Aktivitätstest: LmxGSK3 $\beta$  in Kombination mit LmxMPK1.** 1: LmxGSK3 $\beta$ -Wt; 2: in Kombination mit LmxMPK1-Wt bzw. 3: zusammen mit LmxMPK1-KM. 4: LmxMPK1-Wt; 5: LmxMPK1-KM. Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Autoradiogramm nach 4 h (Mitte) und 1 d Exposition (rechts). Inkubation der Kinasen in Gegenwart von MBP für 1 h bei 30° C. Gewählte Pufferbedingungen: pH 7,2, 10 mM Mg<sup>2+</sup>, 2 mM Mn<sup>2+</sup>.

Das LmxMPK1-Wt-Protein (kalkuliertes MW: 41,2 kDa) zeigt eine starke Autophosphorylierungsaktivität (Abb. 56, Spur 4). Die Autophosphorylierungsaktivität des LmxGSK3 $\beta$ -Wt-Proteins (41,5 kDa) fällt verglichen zu LmxMPK1-Wt schwächer aus (Spur 1). Es ist kein zusätzlicher Einbau von radioaktivem Phosphat in die Bande, der auf dem Gel knapp über LmxMPK1 laufenden LmxGSK3 $\beta$  durch LmxMPK1 festzustellen (Spur 2). Für GST-LmxMPK1-KM (Spur 5) ist auch nach Inkubation mit LmxGSK3 $\beta$  keine Schwärzung auf dem Film zu erkennen (Spur 3).

Das *in vitro* Experiment liefert somit keinen Hinweis, dass es sich bei LmxMPK1 und LmxGSK3 $\beta$  um potentielle Interaktionspartner handelt.

### 3.2.7.2 LmxGSK3 $\beta$ und LmxMPK3

Die Nullmutante von LmxMPK3 besitzt kurze Flagellen (Erdmann, Diplomarbeit 2004). Die aktive Wildtyp-Kinase und die inaktive KM-Mutante von LmxMPK3 wurden beide als GST-Fusionsproteine in *E. coli* hergestellt. Anschließend wurden sie zusammen mit dem rekombinanten Protein His-LmxGSK3 $\beta$ -Wt bzw. His-LmxGSK3 $\beta$ -KM und dem artifiziellen Substrat MBP in Gegenwart von radioaktiv markiertem ATP inkubiert.



**Abb. 57: Kinase-Aktivitätstest: LmxGSK3 $\beta$  in Kombination mit LmxMPK3.** 1: LmxGSK3 $\beta$ -Wt; 2: LmxGSK3 $\beta$ -KM; 3: LmxMPK3-Wt; 4: LmxMPK3-KM; 5: LmxGSK3 $\beta$ -Wt zusammen mit LmxMPK3-Wt u. 6: LmxGSK3 $\beta$ -Wt zusammen mit LmxMPK3-KM. 7: LmxGSK3 $\beta$ -KM zusammen mit LmxMPK3-Wt. Pfeilspitzen markieren LmxMPK3 (kalkuliertes MW: 70,1 kDa) und LmxGSK3 $\beta$  (41,5 kDa). Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Rechts: Autoradiogramm nach 20 h Exposition. Inkubation für 1 h bei 30° C. Gewählte Pufferbedingungen: pH 7,0, 5 mM Mg<sup>2+</sup>, 5 mM Mn<sup>2+</sup>.

Die Autophosphorylierungsaktivität von LmxMPK3-Wt fällt stärker aus als die Substratphosphorylierungsaktivität gegenüber MBP (Abb. 57, Spur 3). Die aktive Kinase LmxMPK3-Wildtyp führt zu keiner Zunahme der Schwärzung auf Höhe von LmxGSK3 $\beta$ -Wildtyp (Spur 5) und noch augenscheinlicher der inaktiven Mutante LmxGSK3 $\beta$ -KM (Spur 7). In Gegenwart von aktivem LmxGSK3 $\beta$ -Wildtyp (in Spur 1 alleine) ist kein vermehrter Phosphateinbau in LmxMPK3 nachzuweisen (Spur 5 und 6).

Im *in vitro* Versuch deutet somit nichts darauf hin, dass es sich bei LmxGSK3 $\beta$  und LmxMPK3 um Interaktionspartner handelt.

### 3.2.7.3 LmxGSK3 $\beta$ und LmxMKK

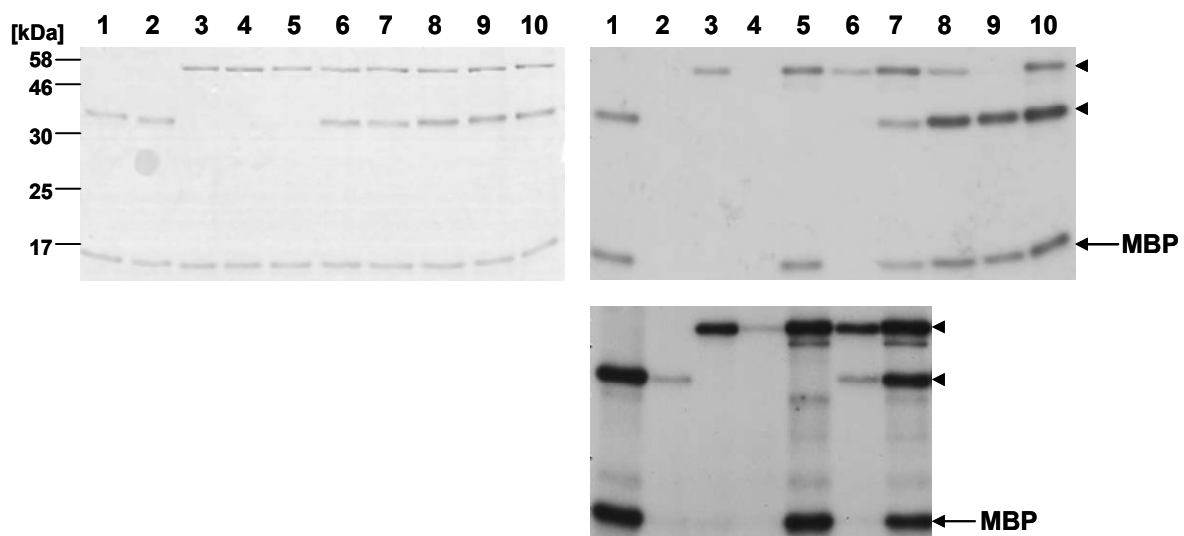
LmxMKK Nullmutanten zeigen kurze Flagellen (Wiese et al., 2003a). Die inaktive Form LmxMKK-KM, der aktive LmxMKK-Wildtyp und die konstitutiv aktivierte Mutante LmxMKK-D, welche die höchste Aktivität zeigt, wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Sie wurden zusammen mit His-LmxGSK3 $\beta$ -Wt und -KM im Kinase-Aktivitätstest getestet.

Der kombinierte Kinase-Aktivitätstest ergibt (Abb. 58): Das aktive LmxGSK3 $\beta$ -Wildtyp-Protein (in Spur 1 alleine) führt zu keinem vermehrten Einbau von radioaktivem Phosphat in die drei Formen von LmxMKK (Autoradiogramm, Spuren 8, 9 und 10 im Vergleich zu den Spuren 3, 4 und 5). Die konstitutiv aktive Mutante LmxMKK-D führt zu einer deutlichen Phosphorylierung von LmxGSK3 $\beta$ -KM (Spur 7) und LmxGSK3 $\beta$ -Wt (Spur 10). Die MBP-Phosphorylierung durch LmxMKK-D fällt in Gegenwart des „Zweit-Substrats“ LmxGSK3 $\beta$ -KM etwas schwächer aus (Spur 7) als im Ansatz ohne LmxGSK3 $\beta$  (Spur 5). LmxMKK-KM phosphoryliert LmxGSK3 $\beta$ -Wt (Spur 9) nicht. Die Zunahme der Schwärzung auf Höhe von LmxGSK3 $\beta$ -Wt bei Inkubation mit LmxMKK-D (Spur 10) ist daher zweifellos auf einen Phosphateinbau durch LmxMKK-D zurückzuführen. Dieser Unterschied an Schwärzung entspricht in seinem Ausmaß in etwa der Schwärzung von LmxGSK3 $\beta$ -KM inkubiert mit LmxMKK-D



(Spur 7). Die MBP-Phosphorylierung im Ansatz LmxMKK-D zusammen mit LmxGSK3 $\beta$ -Wt (Spur 10) nimmt sich in ihrer Stärke, wie eine Addition der MBP-Phosphorylierung durch LmxGSK3 $\beta$ -Wt (Spur 1) und LmxMKK-D (Spur 7) aus. Dies legt nahe, dass eine Phosphorylierung von LmxGSK3 $\beta$  durch LmxMKK-D zu keiner Aktivitätssteigerung der Glykogensynthase-Kinase gegenüber dem Substrat MBP führt.

Die Autophosphorylierungsaktivität von LmxMKK-Wt ist geringer als die der konstitutiv aktiven Mutante LmxMKK-D, und eine Phosphorylierungsaktivität gegenüber MBP ist kaum vorhanden (Spur 3). Ebenso schwach fällt die Zunahme der Phosphorylierung von LmxGSK3 $\beta$ -KM in Gegenwart der LmxMKK-Wt (Spur 6) aus. Diese wird erst bei einer Expositionszeit von vier Tagen als schwaches Signal auf dem Film sichtbar.

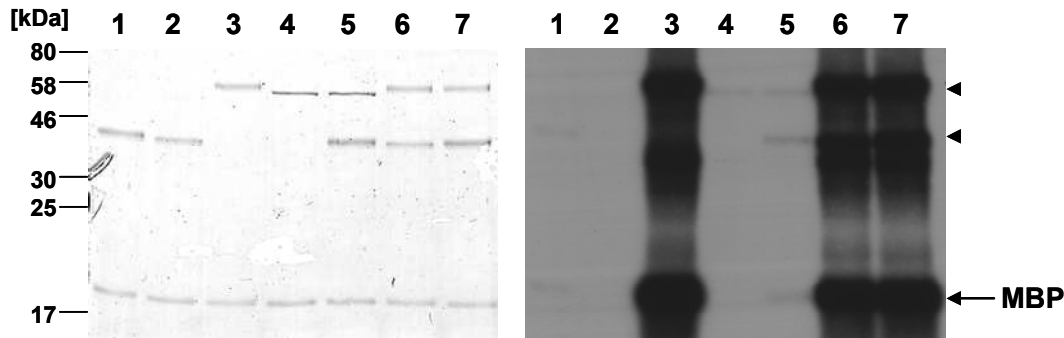


**Abb. 58: Kinase-Aktivitätstest: LmxGSK3 $\beta$  in Kombination mit LmxMKK.** 1: LmxGSK3 $\beta$ -Wt; 2: LmxGSK3 $\beta$ -KM; 3: LmxMKK-Wt; 4: LmxMKK-KM; 5: LmxMKK-D; 6: LmxGSK3 $\beta$ -KM zusammen mit LmxMKK-Wt bzw. 7: mit LmxMKK-D; 8: LmxGSK3 $\beta$ -Wt zusammen mit LmxMKK-Wt bzw. 9: mit LmxMKK-KM bzw. 10: mit LmxMKK-D. Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Autoradiogramm nach 42 h (rechts) und 4 d Exposition (unten). Inkubation der Kinasen in Gegenwart von MBP für 1 h bei 30° C. Pufferbedingungen: pH 7,0, 5 mM Mg<sup>2+</sup> + 5 mM Mn<sup>2+</sup>. Pfeilspitzen markieren LmxGSK3 $\beta$  (41,5 kDa) bzw. LmxMKK (68,9 kDa).

LmxMKK führt zu einer Phosphorylierung von LmxGSK3 $\beta$  – jedoch kann keine hieraus resultierende Aktivierung der Glykogensynthase-Kinase beobachtet werden.

#### 3.2.7.4 LmxGSK3 $\beta$ und LmxMKK4

Die Nullmutante des MAP-Kinase Kinase Homologs LmxMKK4 (vormals LmxPK4) zeigt eine Verlängerung der Flagellen (unveröffentlichte Daten, Wiese). Der aktive LmxMKK4-Wildtyp und die inaktive Mutante LmxMKK4-KM wurden als GST-Fusionsproteine hergestellt. Die aufgereinigten Proteine wurden zusammen mit den His-Fusionsproteinen von LmxGSK3-Wildtyp und LmxGSK3 $\beta$ -KM im radioaktiven Kinase-Aktivitätstest getestet.



**Abb. 59: Kinase-Aktivitätstest: LmxGSK3 $\beta$  in Kombination mit LmxMKK4.** 1: LmxGSK3 $\beta$ -Wt; 2: LmxGSK3 $\beta$ -KM; 3: LmxMKK4-Wt; 4: LmxMKK4-KM; 5: LmxGSK3 $\beta$ -Wt zusammen mit LmxMKK4-KM; 6: LmxGSK3 $\beta$ -KM zusammen mit LmxMKK4-Wt u. 7: LmxGSK3 $\beta$ -Wt zusammen mit LmxMKK4-Wt. Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Rechts: Autoradiogramm nach 6 h Exposition. Inkubation der Kinasen in Gegenwart von MBP für 1 h bei 30° C. Gewählte Pufferbedingungen: pH 7,0, 2 mM Mn<sup>2+</sup> + 5 mM Mg<sup>2+</sup>. Pfeilspitzen markieren LmxGSK3 $\beta$  (41,5 kDa) bzw. LmxMKK4 (66,3 kDa).

LmxMKK4-Wt zeigt eine sehr starke Autophosphorylierungsaktivität (Abb. 59, Spur 3). Auch die Substratphosphorylierungsaktivität gegenüber MBP fällt im Vergleich zu der von LmxGSK3 $\beta$ -Wt (Spur 1) sehr kräftig aus. Außerdem baut LmxMKK4-Wt Phosphat in Banden ein, welche anhand ihrer Größe nicht der Kinase oder MBP zugeordnet werden können. Eine besonders starke Schwärzung zeigt sich auf Höhe von ~35 kDa. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Banden um Abbauprodukte oder verkürzt synthetisierte Formen der Kinase selbst oder um Verunreinigungen aus *E. coli*. Das aktive Protein LmxGSK3 $\beta$ -Wt führt zu keinem vermehrten Einbau von radioaktivem Phosphat in die inaktive LmxMKK4-KM (Spur 5). Anders die aktive LmxMKK4-Wt, sie phosphoryliert LmxGSK3 $\beta$ -KM und LmxGSK3 $\beta$ -Wt auf Höhe von 41,5 kDa kräftig (Spur 6 und 7).

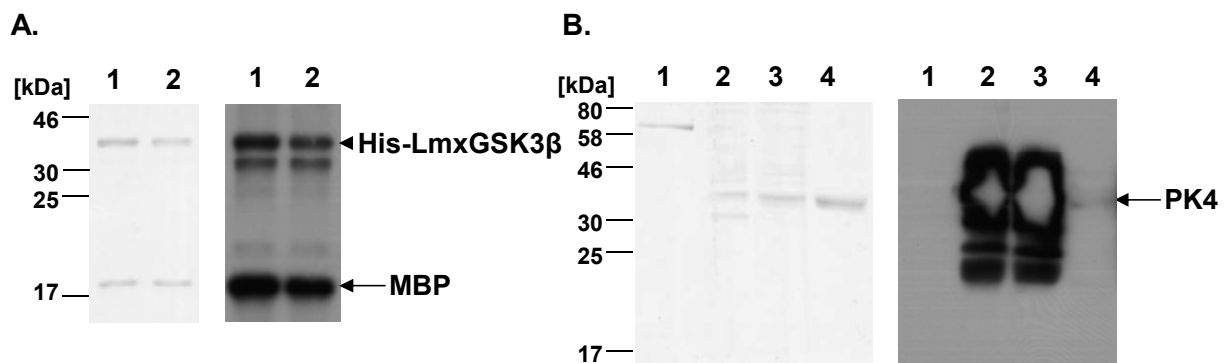
#### 3.2.7.4.1 Co-Expression von LmxGSK3 $\beta$ mit LmxMKK4 in *E. coli*

Das MAP-Kinase Kinase Homolog LmxMKK4 vermag LmxGSK3 $\beta$  *in vitro* zu phosphorylieren. Ob diese Phosphorylierung einen regulatorischen Effekt auf die Kinase-Aktivität von LmxGSK3 $\beta$  besitzt, konnte aufgrund der sehr starken Phosphorylierungsaktivität von LmxMKK4 nicht bestimmt werden. Es wurde deshalb eine Co-Expression von LmxGSK3 $\beta$  zusammen mit LmxMKK4 in *E. coli* angestrebt. Umgesetzt wurde dies durch Klonierung beider Kinasen in das pJCduet-Plasmid. Dieses Plasmid stellt zwei „multi cloning sites“ (MCS) zur Verfügung. Eine MCS nahm die potentiell übergeordnete, aktivierende/inhibierende Kinase LmxMKK4 auf. In die andere MCS wurde die potentiell zu phosphorylierende Kinase LmxGSK3 $\beta$  kloniert und N-terminal mit der Information für den His-Tag versehen. Während der Proteinexpression über Nacht bestand ausreichend Zeit für die Interaktion beider Kinasen unter intrazellulären Bedingungen. Abschließend wurde LmxGSK3 $\beta$  als His-Fusionsprotein aus *E. coli* aufgereinigt und seine Kinase-Aktivität im *in vitro* Assay überprüft.

### Klonierung der Konstrukte und Co-Expression

Das Gen von LmxMKK4 wurde mittels Restriktionsenzymsspaltung mit *Nde*I und *Avr*II aus dem Plasmid pJCMK7MKK4 geschnitten und das gewünschte Fragment durch anschließende Gelextraktion gewonnen. Die Plasmide pJCGSK3bWt und pJCGSK3bKM wurden jeweils mit *Nde*I/*Avr*II geöffnet und das *LmxMKK4*-Fragment einligiert. Die resultierenden Konstrukte pJCGSK3bWtMKK4 (enthält *His-LmxGSK3β-Wt* und *LmxMKK4*) und pJCGSK3bKMMKK4 (enthält *His-LmxGSK3β-KM* und *LmxMKK4*) wurden in den *E. coli* Stamm pAP/*lac* transformiert. Die Plasmidkarten finden sich im Anhang.

Die Co-Expression erfolgte nach Induktion mit 100  $\mu$ M IPTG bei 18° C über Nacht. Unter den gleichen Bedingungen erfolgte die Expression und Synthese des Kontrollproteins His-LmxGSK3 $\beta$ -Wt in den mit pJCGSK3 $\beta$ Wt transformierten pAP/*lac*-Zellen. Das mit His-Tag versehene LmxGSK3 $\beta$ -Protein wurde aus beiden Ansätzen aufgereinigt und im Kinase-Aktivitätstest zusammen mit MBP getestet.



**Abb. 60: Co-Expression von LmxGSK3 $\beta$  mit LmxMKK4.** **A:** Kinase-Aktivitätstest. 1: His-LmxGSK3 $\beta$ -Wt; 2: His-LmxGSK3 $\beta$ -Wt co-exprimiert mit LmxMKK4-Wt. Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Rechts: Autoradiogramm nach 19 h Exposition. Inkubation in Gegenwart von MBP für 1 h bei 30° C. Pufferbedingungen: pH 7,2, 5 mM Mg<sup>2+</sup>. **B:** Immunoblot mit anti-LmxMKK4-Antikörper (Verdünnung: 1 : 500). 1: Eluat pJCduet leer. His-LmxGSK3 $\beta$ -Wt co-exprimiert mit LmxMKK4-Wt; 2: *E. coli* Gesamtzelllysat, 3: Überstand und 4: Eluat der Aufreinigung. Links: Coomassie gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Rechts: Film nach 2 s Exposition.

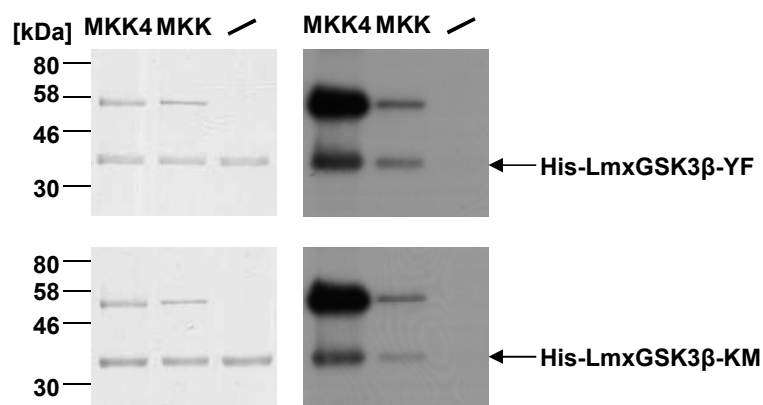
Die Coomassie-Färbung des Proteingels zeigt, dass etwas mehr Kinase in Ansatz 1 als in Ansatz 2 eingesetzt wurde (Abb. 60, A). Berücksichtigt man dies, weisen das Protein von LmxGSK3 $\beta$ -Wt alleine exprimiert (Spur 1) und das von LmxGSK3 $\beta$ -Wt nach Co-Expression mit LmxMKK4-Wt (Spur 2) annähernd die gleiche Auto- und Substratphosphorylierungsaktivität auf. Wie zu erkennen ist, detektiert der anti-LmxMKK4 Antikörper im Immunoblot eine kräftige Bande auf Höhe von ~39 kDa im Gesamtzelllysat (Spur 2) und im Überstand (Spur 4) der Expression (Abb. 60, B). 39 kDa entspricht der Laufhöhe von LmxMKK4. Die gewünschte Co-Expression von LmxMKK4-Wt zusammen mit LmxGSK3 $\beta$ -Wt in *E. coli* fand somit statt. Im Eluat der Aufreinigung ist auf Höhe von LmxMKK4 ein Hauch von einer Bande zu erkennen (Spur 4). Zusammengenommen mit dem Ergebnis des Kinase-Assays ist von keiner nennenswerten Kontamination des His-LmxGSK3 $\beta$ -Wt-Eluats mit LmxMKK4 auszugehen.

Es ist keine Aktivitätszunahme von LmxGSK3 $\beta$ -Wt nach Co-Expression mit LmxMKK4 festzustellen, bei bewiesener Co-Expression von LmxMKK4 in *E. coli*.

### 3.2.7.5 Studium der von LmxMKK4 und LmxMKK phosphorylierten Reste von LmxGSK3 $\beta$

Der Sequenzvergleich zeigt, dass es sich bei LmxMKK4 und LmxMKK um Homologe von MAP-Kinase Kinasen in *L. mexicana* handelt. MAP-Kinase Kinasen sind dualspezifische Kinasen, das heißt, sie sind fähig sowohl Tyrosin- als auch Serin-/Threonin-Reste zu phosphorylieren. In Eukaryonten führen sie typischerweise durch duale Phosphorylierung des TXY-Motivs in der Aktivierungsschleife der untergeordneten MAP-Kinase zu deren Aktivierung. Glykogensynthase-Kinasen weisen kein TXY-Motiv in ihrer Aktivierungsschleife oder andernorts auf. Nachfolgende Untersuchungen dienten der Identifikation der von LmxMKK4 bzw. LmxMKK phosphorylierten Reste von LmxGSK3 $\beta$ .

Der Rest Y186 von LmxGSK3 $\beta$  wurde in Pro- als auch Amastigoten phosphoryliert vorgefunden (Rosenqvist und Wiese, unpublizierte Daten). Für vorangegangene Studien war dieses Tyrosin gegen Phenylalanin ausgetauscht und somit eine YF-Mutante der Kinase erzeugt worden. Eine Phosphorylierung am für die Aktivität der Kinase wichtigen Tyrosin-186 kann in der YF-Mutante nicht mehr erfolgen. Die Inkubation von rekombinantem LmxMKK4 bzw. LmxMKK mit LmxGSK3 $\beta$ -YF in Gegenwart von  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP führt, wie zu sehen ist, zu einem Einbau von radioaktivem Phosphat in die Glykogensynthase-Kinase (Abb. 61, oben). Der Grad an Schwärzung auf dem Film war annähernd gleich, wie er für die Inkubation von LmxGSK3 $\beta$ -KM mit LmxMKK4 bzw. LmxMKK gefunden wird (Abb. 61, unten). In der Mutante LmxGSK3 $\beta$ -KM ist Tyrosin-186 noch vorhanden. Die inaktive YF- und inaktive KM-Mutante alleine inkubiert führen zu keiner Schwärzung auf dem Film. Zu den von LmxMKK4 und LmxMKK phosphorylierten Resten von LmxGSK3 $\beta$  zählt somit nicht Tyrosin-186 in der Aktivierungsschleife der Kinase.



**Abb. 61: Phosphorylierung der inaktiven LmxGSK3 $\beta$ -Mutanten -YF und -KM durch LmxMKK und LmxMKK4.** Inkubation der jeweiligen His-Mutante alleine (/) bzw. zusammen mit GST-LmxMKK4-Wt (MKK4) bzw. GST-LmxMKK-D (MKK). Der Kinase-Aktivitätstest wurde 1 h bei 30 °C inkubiert. Pufferbedingungen: für MKK4 pH 7,0, 4 mM Mn $^{2+}$ ; für MKK pH 7,0, 10 mM Mn $^{2+}$ ; Ansätze ohne MAP-Kinase Kinase pH 7,2, 5 mM Mg $^{2+}$ . Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Rechts: Autoradiogramm nach 6 h Exposition.

Die Tandem-Massenspektrometrie(MS/MS)-Analyse sollte weitere Informationen zur Identität der phosphorylierten Reste liefern. Zu diesem Zweck wurde His-LmxGSK3 $\beta$ -KM nach Co-Expression mit LmxMKK4 bzw. LmxMKK aus *E. coli* aufgereinigt und über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Coomassie-Färbung des Gels wurde die korrespondierende Bande ausgeschnitten und zur Massenspektrometrie gesendet. Die Spektren der MALDI-TOF-MS und MALDI-MS/MS Experimente finden sich im Anhang. Die Sequenz folgender Phosphopeptide wurde mittels MS/MS-Untersuchung für die Probe His-LmxGSK3 $\beta$ -KM nach Co-Expression mit LmxMKK4 bestätigt:

25-MAGQGTFG**p**TVQLGK-38 (m/z 1474,620)

25-MAGQG**p**TFG**p**TVQLGK-38 (m/z 1554,543)

25-MAGQG**p**TFG**p**TVQLGKEK-40 (m/z 1811,721)

Wobei das einfach phosphorylierte Peptid in der Probe stärker repräsentiert war, als die doppelt phosphorylierten. Diese Schlussfolgerung beruht auf dem Vergleich der Intensität der Peaks genannter Phosphopeptide. Da in einer vorangegangenen Analyse für die inaktive His-LmxGSK3 $\beta$ -KM keine Phosphopeptide im MALDI-Experiment nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, dass die Phosphorylierung am Threonin-30 und Threonin-33 auf die Aktivität von LmxMKK4 zurückzuführen ist. Erstaunlicherweise sind beide Threonin-Reste innerhalb der Glycin-reichen Schleife des Phosphat-Ankers der Kinase lokalisiert. Die Möglichkeit der Co-Existenz einer Phosphorylierung am Serin-232 konnte trotz fehlender Bestätigung durch MS/MS-Spektrum nicht vollständig ausgeschlossen werden. Das zugehörige Peptid 229-GDN**p**SAGQLHEIVR-241 führt zu einem Peak mit m/z 1475,68. Dieser Peak und der Peak des an Threonin einfach phosphorylierten Peptids würden sehr nahe beieinander liegen und wären kaum voneinander abzugrenzen. Ein Peptid mit Phosphorylierung an Tyrosin-186 wurde nicht nachgewiesen.

His-LmxGSK3 $\beta$ -KM aufgereinigt nach Co-Expression mit LmxMKK-D lieferte in der Untersuchung durch Massenspektrometrie keine verwertbaren Ergebnisse.

### 3.2.8 Die Suche nach Substraten von LmxGSK3 $\beta$

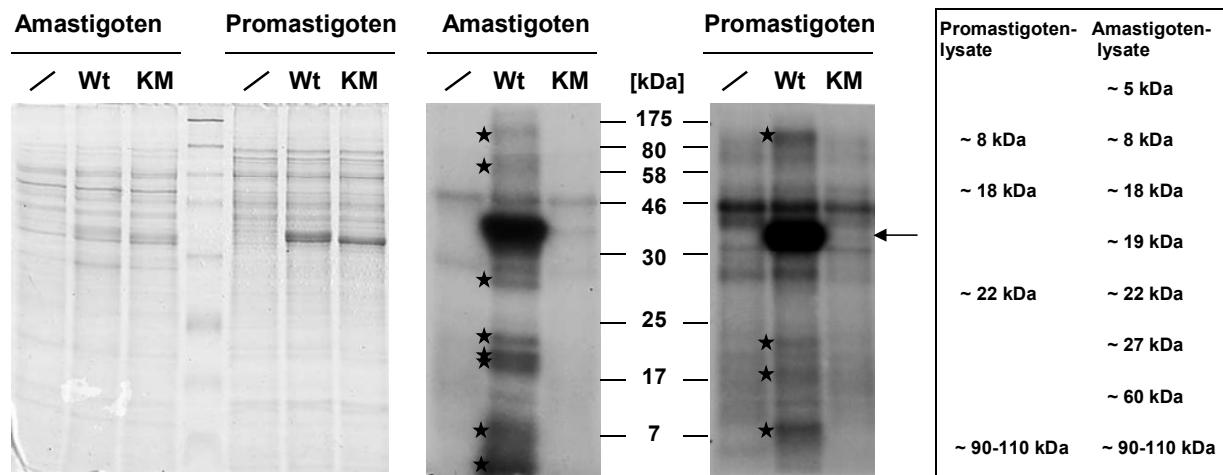
In Eukaryonten kommt GSK3 $\beta$  eine Schlüsselrolle in einer Vielzahl von zellulären Vorgängen zu. Ebenso mannigfaltig sind ihre Substrate, zu welchen Transkriptionsfaktoren, Stoffwechsellzyme, Signalmoleküle und Strukturproteine zählen. In Parasiten steht die Suche nach potentiellen Interaktionspartnern von GSK3 $\beta$  noch ganz am Anfang. Durch die Identifikation von potentiellen Substraten könnte ein entscheidender Beitrag zur Aufklärung der Funktion der parasitären GSK3 geleistet werden. Zwei Methoden kamen in dieser Arbeit bei der Substratsuche zum Einsatz: Um einen direkten Ansatz handelt es sich beim Nachweis von phosphorylierten Proteinen in Zelllysaten, welche mit rekombinantem LmxGSK3 $\beta$  in

Gegenwart von radioaktiv markiertem ATP inkubiert wurden. Als zweite, indirekte Methode wurde die *in silico*-Substratsuche unter Zuhilfenahme des PREDIKIN-Servers eingesetzt. Das Gen eines auf diese Weise vorhergesagten Substrats wurde isoliert, kloniert und das zugehörige Protein rekombinant exprimiert. Anschließend wurde LmxGSK3 $\beta$  auf seine Aktivität gegenüber dem hypothetischen Substrat getestet.

### 3.2.8.1 Phosphorylierung von Leishmanienlysaten durch LmxGSK3 $\beta$

Die Wildtyp-Kinase (-Wt) und die inaktive KM-Mutante von LmxGSK3 $\beta$  wurden als His-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Aus einer spät-logarithmischen Promastigotenkultur und einer für drei Tage differenzierten Kultur von axenischen Amastigoten des Wildtyps wurden Zellysate hergestellt. Mit Hilfe von Sephadex G-25-Säulen wurden die Lysate von zellulärem ATP befreit. Anschließend wurde das Lysatprotein zusammen mit rekombinanter Kinase in Gegenwart von [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP inkubiert. Die Proben wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und ein Autoradiogramm durch Auflegen eines Films auf das zuvor Coomassie-gefärbte, getrocknete Gel erzeugt.

Wie man sehen kann, sind bereits bei Inkubation des Lysats aus Pro- bzw. Amastigoten ohne LmxGSK3 $\beta$ -Protein einige geschwärzte Banden auf dem Autoradiogramm zu erkennen (Abb. 62). Das Vorliegen dieser Banden deutet darauf hin, dass in den Zellysaten aktive Kinasen vorhanden sind, welche unter den gegebenen Bedingungen radioaktives Phosphat in zelluläre Proteine einbauen. Banden, die tatsächlich von der rekombinanten LmxGSK3 $\beta$  phosphoryliert worden sind, konnten durch den Vergleich des mit Wildtyp-Kinase inkubierten Lysats mit den Spuren der Kontrollen identifiziert werden. Ausschlaggebend sind nur phosphorylierte Banden, welche im Kontrolllysate ohne rekombinante Kinase und im Lysat inkubiert mit der inaktiven LmxGSK3 $\beta$ -KM nicht oder wesentlich schwächer phosphoryliert auftreten. Im mit der Wildtyp-Kinase inkubierten Amastigotenlysate können auf diese Weise acht phosphorylierte Banden und im Promastigotenlysate vier phosphorylierte Banden abgegrenzt werden. Die Laufhöhe dieser Banden ist in der Tabelle der Abb. 62 zusammengestellt. Alle in Promastigoten detektierten Phosphoproteinbanden finden sich der Größe nach in Amastigoten wieder. An dieser Stelle wurde nicht weiterverfolgt, ob es sich bei den korrespondierenden Banden um die jeweils gleichen Proteine handelt. Es ist davon auszugehen, dass die stark phosphorylierte Bande auf Höhe von ~42 kDa auf die bekannte Autophosphorylierungsaktivität der Wildtyp-Kinase bzw. die sehr schwach phosphorylierte Bande auf die der KM-Mutante zurückzuführen ist. Eine Phosphorylierung von rekombinantem LmxGSK3 $\beta$ -KM durch aktive Kinasen des Zellysats findet nicht statt. Die vorliegenden Banden wurden in drei separaten Durchläufen bestätigt.



**Abb. 62: Phosphorylierung von Amastigoten- bzw. Promastigotenlysaten durch rekombinante Kinase.** 20 µg Lysatprotein wurde alleine (/) bzw. zusammen mit 2 µg His-LmxGSK3β-Wildtyp (Wt) bzw. His-KM-Mutante (KM) 1 h bei 30° C und Pufferbedingungen von pH 7,2, 5 mM Mg<sup>2+</sup> inkubiert. Die Sterne markieren zusätzlich phosphorylierte Banden. Der Pfeil zeigt die Laufhöhe des LmxGSK3β-Fusionsproteins an. Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Autoradiogramm nach 20 h (Mitte) bzw. 12 h (rechts) Exposition. Die Übersichtstabelle zeigt die anzunehmende Proteingröße der zusätzlich phosphorylierten Banden.

Es hat den Anschein, dass His-LmxGSK3β mehrere potentielle Substrate sowohl in Promastigoten als auch in Amastigoten besitzt.

### 3.2.8.2 In silico Substratsuche mit Hilfe von PREDIKIN

Brinkworth et al. (2003) stellten basierend auf Sequenzanalyse, Untersuchung der Kristallstruktur und Molekulardesign einer Vielzahl von Kinasen und ihrem gebundenem Substrat Vorschriften über die Beschaffenheit des Substratmotivs um die Phosphorylierungsstelle auf. Diese Vorschriften zur Gewährleistung einer optimalen Substratbindung der Kinase liegen dem von Brinkworth et al. entwickeltem Programm PREDIKIN zu Grunde. PREDIKIN ist in der Lage aus einer eingegebenen Aminosäuresequenz anhand von Sequenzmotiven die katalytische Domäne einer Kinase zu identifizieren und auszumachen, welche Reste für die Substratbindung ausschlaggebend sind. Die Natur dieser Substrat-determinierenden Reste bestimmt, welche Reste am wahrscheinlichsten mit ihnen interagieren und somit um den zu phosphorylierenden Aminosäurerest des Substrats angeordnet sind. Darauf basierend kann das Programm eine optimale Sequenz des Substrats in Form eines Heptapeptids, bestehend aus den Resten -3 bis +3 um die Phosphorylierungsstelle, vorhersagen.

Anhand der eingegebenen Sequenz von LmxGSK3β hat das Programm diese als Kinase der CMGC-Familie erkannt. Basierend auf der Wertungsmethode PANTHER liefert das Programm folgende Konsensussequenz der Phosphorylierungsstelle eines möglichen Substrats: G-A-Q-S-G-A-[D/H/P/Q/T/V], dabei steht die eckige Klammer für mehrere mögliche Aminosäuren an dieser Position. Bei dem Serin-Rest handelt es sich um die

Phosphorylierungsstelle. Die Datenbank des *L. major* Genom wurde unter Gene-DB auf Proteine durchsucht, welche die genannte Konsensussequenz tragen. Hierbei wurde das Protein LmjF36.0430 gefunden, welches die Sequenz G-A-Q-S-G-A-T nahe seines C-Terminus besitzt. LmjF36.0430 befindet sich auf Chromosom 36. Es wird als konserviertes, hypothetisches Protein mit unbekannter Funktion ausgewiesen, bestehend aus 290 Aminosäuren, einer kalkulierten Masse von 31,4 kDa und pI von pH 8,3. Mittels TriTrypDB wurden Homologe in anderen Trypanosomatiden identifiziert, wie u. a. in *L. braziliensis* (Lbr.M35.0520) und *L. infantum* (LinJ.36.0460). Es sei erwähnt, dass es sich bei dem Homolog in *T. brucei* (Tb.927.10.4840) um einen putativen Transkriptionsfaktor IIa (TFIIA-2) handelt (Schimanski et al., 2005a).

#### Klonierung des hypothetischen Substrats

Es lag die Annahme zu Grunde, dass ein Homolog von LmjF36.0430 in *L. mexicana* existiert. Zum Zeitpunkt der Klonierung lag noch keine Genomsequenz von *L. mexicana* vor. Daher wurden anhand eines Alignments der Sequenz von LmjF36.0430 und der Sequenz des Homologs LinJ36\_V3.0460 aus *L. infantum* Oligonukleotide für die Amplifikation des Gens generiert. Die PCR mit den Oligonukleotiden LmjF036.0430 2for und LmjF036.0430 2rev war mit *L. mexicana* gDNA als Matrix erfolgreich. Das Produkt der Amplifikation wurde mittels TOPO-Klonierung in das Plasmid pCR2.1 kloniert. Die Basenabfolge des Inserts von pCR2.1hypSubLmx wurde durch Sequenzierung bestimmt. In einer PCR mit den Oligonukleotiden 1344 und 1345 und dem Plasmid pCR2.1hypSubLmx als Vorlage wurden für die nachfolgenden Klonierungsschritte zusätzliche Restriktionsenzymchnittstellen vor dem Start- und nach dem Stopp-Codon des hypothetischen Substrats eingefügt. Nach TOPO-Klonierung des PCR-Produkts entstand das Plasmid pCR2.1ExprhypSub, dieses wurde durch Restriktionsenzymspaltung und Sequenzierung überprüft. Aus ihm wurde der ORF des hypothetischen Substrats durch Spaltung mit *EcoRI/HindIII* geschnitten und über eben diese Schnittstellen in das geöffnete pJCDuet-Expressionsplasmid ligiert. Das entstandene Konstrukt hieß pJCLmxhypSub. Die zugehörige Plasmidkarte findet sich im Anhang.

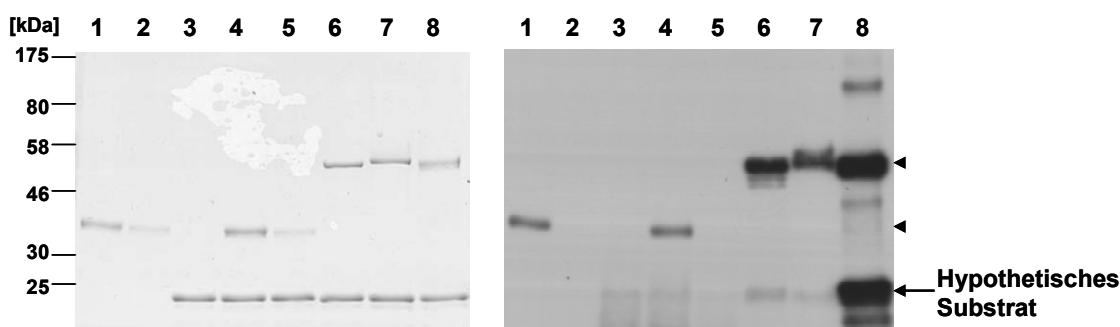
Die Sequenzierung des hypothetischen Substrats von LmxGSK3 $\beta$  liefert ein Gen von 540 bp Länge. Das resultierende Protein besteht aus 179 Aminosäuren und besitzt ein kalkuliertes Molekulargewicht von 19,2 kDa. Nach Veröffentlichung der Resultate des *L. mexicana* Genomprojekts konnte dem hypothetischen Substrat ein Gen auf Chromosom 20 (Basenpaare 115768-116307) mit der Identifikationsnummer LmxM.36.0430 zugeordnet werden. Leider findet sich die in *L. major* vorhandene, von PREDIKIN vorhergesagte Konsensussequenz G-A-Q-S-G-A-T in der *L. mexicana* Sequenz des hypothetischen Substrats nicht wieder. An Stelle dieser findet sich in LmxM.36.0430 die Sequenz G-A-Q-P-G-A-T, welcher das Serin als potentielle Phosphorylierungsstelle fehlt. Trotz fehlender Konsensussequenz



wurde das hypothetische Substrat in *E. coli* exprimiert und verschiedenen *L. mexicana* Kinasen im Aktivitätstest als Substrat angeboten.

#### Proteinexpression des hypothetischen Substrats und Einsatz im Kinase-Aktivitätstest

Das sogenannte hypothetische Substrat wurde als His-Fusionsprotein rekombinant exprimiert und aufgereinigt und in Kombination mit den rekombinant exprimierten Kinasen LmxGSK3 $\beta$ , dem MAP-Kinase Homolog LmxMPK3 und den MAP-Kinase Kinase Homologen LmxMKK und LmxMKK4 im Kinase-Aktivitätstest eingesetzt. Das ~20 kDa große potentielle Substratprotein weist für sich alleine mit [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP inkubiert keinen Phosphateinbau auf (Abb. 63, Spur 3). Die Kinase LmxMPK3 und die konstitutiv aktive Mutante von LmxMKK (LmxMKK-D) führen zu keiner Phosphorylierung des hypothetischen Substrats. Ebenso verhält es sich für LmxGSK3 $\beta$ , wie es in Ermangelung des genannten Konsensusmotivs zu erwarten war. LmxMKK4 führt allerdings zu einem Einbau von Phosphat in das getestete 20 kDa-Protein. Weitere Anstrengungen zur Aufklärung, ob es sich bei dieser Phosphorylierung durch LmxMKK4 um eine *in vivo* verifizierbare Interaktion handelt, wurden nicht unternommen.



**Abb. 63:** Kinase-Aktivitätstest mit hypothetischem Substrat von LmxGSK3 $\beta$ . 1: His-LmxGSK3 $\beta$ -Wt; 2: His-LmxGSK3 $\beta$ -KM; 3: hypothetisches Substrat mit His-Tag. Die Spuren 4-8 zeigen das hypothetische Substrat zusammen mit 4: His-LmxGSK3 $\beta$ -Wt; 5: His-GSK3 $\beta$ -KM; 6: GST-LmxMKK-D; 7: GST-LmxMPK3-Wt; 8: GST-LmxMKK4. Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Rechts: Autoradiogramm nach 20 h Exposition. Die Reaktion erfolgte für 1 h bei 30° C und den Pufferbedingungen pH 7,2, 5 mM Mg<sup>2+</sup>. Pfeilspitzen markieren die jeweiligen Kinasen.

Bei dem Protein LmxM.36.0430 handelt es sich um kein Substrat von LmxGSK3 $\beta$  *in vitro*.

### 3.2.9 Deletion von LmxGSK3 $\beta$ in *Leishmania mexicana*

Das für LmxGSK3 $\beta$  codierende Gen liegt in einfacher Kopienzahl im Genom von *Leishmania mexicana* vor (Nachweis erbracht durch Southern Blot-Analyse). Damit ist die Voraussetzung für eine gezielte Entfernung des Wildtyp-Gens durch homologe Rekombination erfüllt. Bei der Methode der homologen Rekombination zur Erzeugung einer Nullmutante werden beide Allele des codierenden Gens gegen zwei unterschiedliche Resistenzgene ausgetauscht. Auf das Vorliegen dieser, für Antibiotikaresistenzen codierende Gene kann

anschließend durch Zugabe der jeweiligen Antibiotika zum Kulturmedium selektiert werden. Genutzt wurde das Resistenzgen codierend für die Neomycin Phosphotransferase (Neo), für die Hygromycin B Phosphotransferase (Hyg) sowie das des Phleomycin-bindenden Proteins (Phleo). Der *L. mexicana* Wildtyp reagiert auf das Antibiotikum Neomycin, Hygromycin und Phleomycin sensibel.

### 3.2.9.1 Herstellung der Deletionskonstrukte

Es wurden drei DNA-Konstrukte generiert. Jedes enthielt die flankierenden Regionen von *LmxGSK3 $\beta$*  und anstelle des *LmxGSK3 $\beta$* -Gens eines der drei Antibiotikaresistenzgene. In zwei unabhängigen PCR-Ansätzen wurde ein 557 bp langer Bereich stromauf (us) und ein 546 bp langer Abschnitt stromab (ds) des offenen Leserasters von *LmxGSK3 $\beta$*  amplifiziert. Zu diesem Zweck wurden zwei Oligonukleotidpaare bestehend aus je einem Außen- und je einem Innenprimer generiert. Das Primerpaar GSK3bdel\_usEcoRVfor / GSK3bdel\_usBspLU11I\_AvrII\_Nhelrev bzw. GSK3bdel\_dsEcoRVrev / GSK3bdel\_dsBspLU11I\_AvrII\_Nhelfor kam in je einem PCR-Ansatz zum Einsatz. Als Matrix diente das Plasmid pBSKGSK3 $\beta$ 1.2XI, welches das *LmxGSK3 $\beta$*  tragende Phageninsert enthält. Mittels der Außenprimer wurde je eine *EcoRV* Schnittstelle am 5'-Ende der stromauf bzw. am 3'-Ende der stromab-Region eingefügt. Die gegenläufigen Innenprimer binden am 3'-Ende der stromauf bzw. 5'-Ende der stromab-Region und besitzen einen 24 bp langen komplementären Bereich. Durch diesen überlappenden Sequenzabschnitt wurden eine zusätzliche *NheI*-, eine *AvrII*- und eine *BspLU11I*-Schnittstelle zwischen den flankierenden Regionen geschaffen. In einer zweiten PCR-Runde wurden die beiden Produkte aus der ersten Runde als Vorlage zusammen mit den beiden äußeren Primern eingesetzt. Das resultierende Produkt wurde mittels TOPO-Klonierung in das pCR2.1-Plasmid kloniert und das entstandene Plasmid pCR2.1usds(GSK3b) durch Restriktionsenzymsspaltung und Sequenzierung überprüft. Durch Spaltung mit *EcoRV* wurde das stromauf-stromab-Segment aus dem Plasmid pCR2.1usds(GSK3b) geschnitten und in das Plasmid pBSK-BspLU11I über *EcoRV* eingebracht. Bei dem Plasmid pBSK-BspLU11I handelt es sich um das pBSKII(+)-Plasmid, dem als Modifikation die *BspLU11I*-Schnittstelle fehlt. Das Produkt pBusds(GSK3b) wurde mit den Restriktionsendonukleasen *BspLU11I* und *NheI* aufgeschnitten und mit einem, das jeweilige Resistenzgen tragendem Fragment ligiert. Das *phleo*-Fragment wurde mittels *NcoI/AvrII*-Spaltung aus dem Plasmid pCR2.1phleo geschnitten, das *neo*-Fragment bzw. *hyg*-Fragment wurde mittels *BspHI/NheI*-Spaltung und anschließender Aufreinigung aus den Plasmiden pCR2.1neo bzw. pCR2.1hyg gewonnen. Die entstandenen Deletionskonstrukte pBusds(GSK3b)phleo, pBusds(GSK3b)neo und pBusds(GSK3b)hyg wurden durch Restriktionsenzymsspaltung überprüft.

### 3.2.9.2 Transfektion in *L. mexicana* und Überprüfung durch PCR bzw. Southern Blot-Analyse

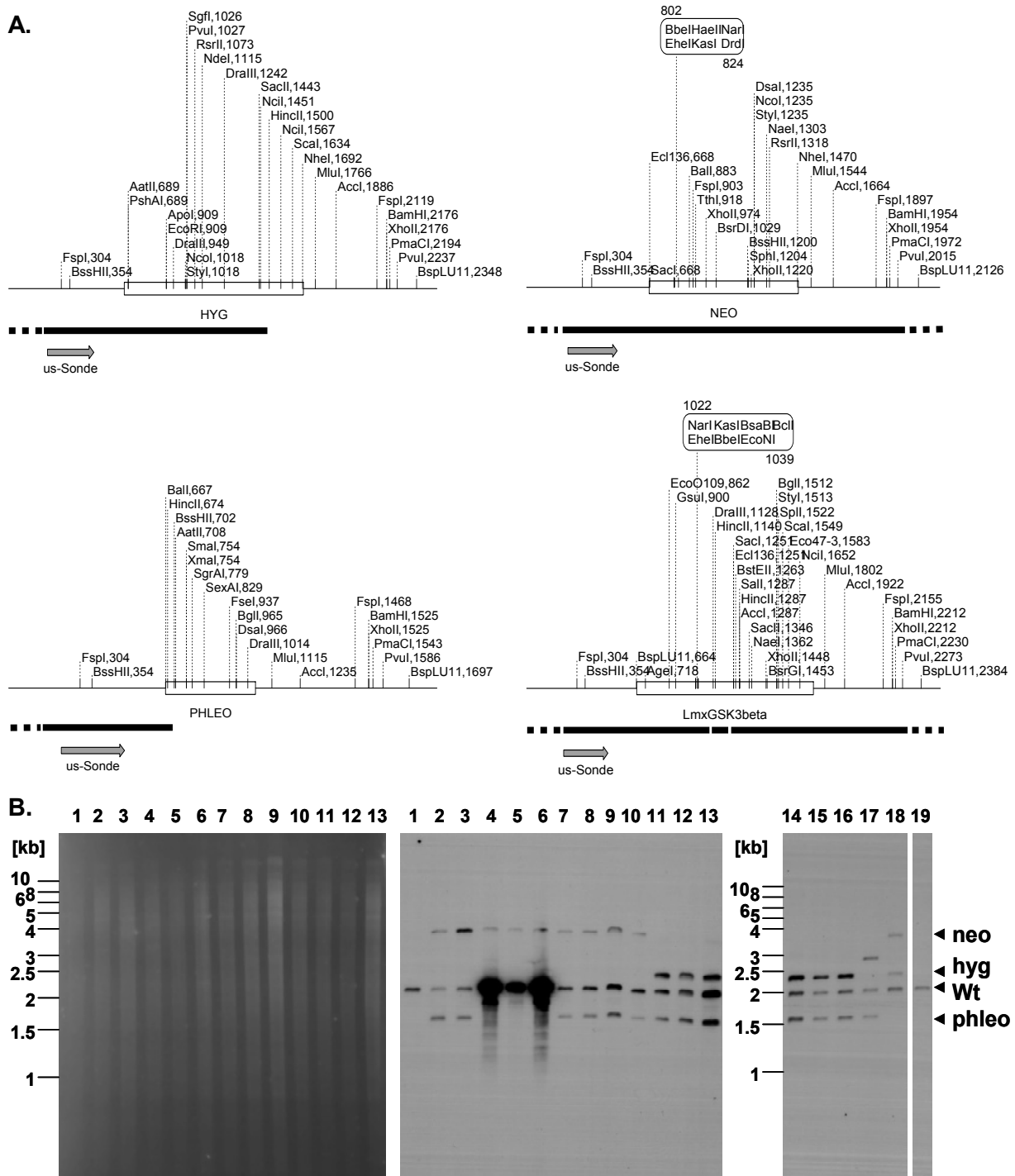
Die Deletionskonstrukte wurden mit *EcoRV* geschnitten und über Gelextraktion jeweils das Fragment isoliert, welches Resistenzgen mit flankierenden Regionen trägt. Die linearen Fragmente *us(GSK3 $\beta$ )ds-hyg*, *us(GSK3 $\beta$ )ds-phleo* und *us(GSK3 $\beta$ )ds-neo* wurden jeweils in den Wildtyp transfiziert. Etwa nach zwei Wochen Kultur unter Selektionsdruck waren für alle drei Resistenzen Mutanten gewachsen. Durch eine PCR mit Oligonukleotiden (GSK3b\_7for und GSK3b\_6rev), die in der stromauf- bzw. stromab-Region von *LmxGSK3 $\beta$*  binden, wurde der erfolgreiche Austausch eines Allels von *LmxGSK3 $\beta$*  gegen das Resistenzgen nachgewiesen. Die PCR erfolgte direkt auf Leishmanienlysaten (Programm: 5 min 94 °C, 30 x [30 s 94 °C, 30 s 41 °C, 3 min 72 °C], 7 min 72 °C, 4 °C).

Je Resistenz wurden zwei getestete, einfachresistente Klone in eine zweite Transfektionsrunde eingesetzt. Durch homologe Rekombination und anschließende Selektion sollte das zweite Allel von *LmxGSK3 $\beta$*  gegen eines der beiden noch nicht vorhandenen Resistenzgene ausgetauscht werden. Aus dieser zweiten Transfektionsrunde gingen 77 zweifachresistente Klone in insgesamt 1152 plattierten Vertiefungen hervor (Siehe Tabelle 4). Von diesen wurden 17 Klone mit drei unterschiedlichen Resistenzgenkombinationen auf ihre genetische Konstellation betreffs *LmxGSK3 $\beta$*  im Southern Blot analysiert (Abb. 64).

Ausgangsklone und DNA-Konstrukte	Anzahl der resultierenden Elektroporationsklone (auf je 2 x 96 wells)
$\Delta LmxGSK3\beta$ +/-hyg + <i>us(GSK3<math>\beta</math>)ds-phleo</i>	28
$\Delta LmxGSK3\beta$ +/-hyg + <i>us(GSK3<math>\beta</math>)ds-neo</i>	1
$\Delta LmxGSK3\beta$ +/-phleo + <i>us(GSK3<math>\beta</math>)ds-hyg</i>	8
$\Delta LmxGSK3\beta$ +/-phleo + <i>us(GSK3<math>\beta</math>)ds-neo</i>	3
$\Delta LmxGSK3\beta$ +/-neo + <i>us(GSK3<math>\beta</math>)ds-hyg</i>	24
$\Delta LmxGSK3\beta$ +/-neo + <i>us(GSK3<math>\beta</math>)ds-phleo</i>	13

**Tab. 4:** Ergebnis der Herstellung von *LmxGSK3 $\beta$* -Doppeldeletionsklonen

Hierzu wurde genomische DNA aus Wildtyp-Leishmanien und den einzelnen Mutanten präpariert und jeweils mit der Restriktionsendonuklease *HincII* über Nacht gespalten. *HincII* schneidet stromauf und stromab von *LmxGSK3 $\beta$* . Zusätzlich finden sich zwei Schnittstellen im *LmxGSK3 $\beta$* -Gen, eine im Hyg- bzw. Phleo-Gen und keine im Neo-Gen. Die Lokalisation der Schnittstellen ist in Abb. 64, A schematisch dargestellt. Der Nachweis der unterschiedlich großen *HincII*-Fragmente erfolgte unter Zuhilfenahme einer DIG-markierten Sonde. Diese Sonde hybridisiert in der stromauf-Region von *LmxGSK3 $\beta$*  (us-Sonde) (Schema Abb. 64, A). In einer ersten PCR auf dem Plasmid pBusds(GSK3b) wurde mit den Oligonukleotiden GSK3b\_7for und GSK3b\_12rev ein 268 bp großes Amplifikat erzeugt. Unter Verwendung dieses PCR-Produkts als Vorlage, der gleichen Primer und des DIG-Kits der Fa. Roche wurde dann in einer zweiten PCR die Digoxigenin markierte DNA-Sonde hergestellt.



**Abb. 64:** Untersuchung potentieller Deletionsmutanten von *LmxGSK3β* mittels Southern Blot-Analyse. **A:** Schematische Darstellung des im Genom von *L. mexicana* integrierten Gens von Hyg, Neo, Phleo und *LmxGSK3β* mit Restriktionsenzymchnittstellen; der Bindungsregion der *LmxGSK3β*-us-Sonde (grauer Pfeil) und der *HincII*-Fragmente (schwarze Balken). **B:** Southern Blot nach Auftrennung *HincII*-gespaltener gDNA potentieller Deletionsklone. Die Detektion erfolgte mit der *LmxGSK3β*-us-Sonde. Spur 1 und 19: *L. mexicana* Wildtyp; Spur 2 und 3: potentielle  $\Delta LmxGSK3\beta(-/-)$  *phleo/neo*-Klone; Spur 4-6: potentielle  $\Delta LmxGSK3\beta(-/-)$  *neo/hyg*-Klone; Spur 7-10: potentielle  $\Delta LmxGSK3\beta(-/-)$  *phleo/phleo*-Klone; Spur 11-13: potentielle  $\Delta LmxGSK3\beta(-/-)$  *phleo/hyg*-Klone; Spur 14-17: potentielle  $\Delta LmxGSK3\beta(-/-)$  *hyg/phleo*-Klone; Spur 18: potentieller  $\Delta LmxGSK3\beta(-/-)$  *hyg/neo*-Klon. Die Expositionszeit der dargestellten Filme (Mitte und rechts) betrug 30 min Links: zum Blot in der Mitte zugehöriges 0,7%-iges Agarose-Gel.

Die unterschiedliche Größe der nachgewiesenen *HincII*-Fragmente lässt Rückschlüsse auf die genomische Situation der Klone zu. Für das Wildtyp-Gen *LmxGSK3β* wird im Southern

Blot eine ~2100 bp große Bande erwartet. Bei erfolgter Integration des Hyg-Resistenzgens sollte eine ~2500 bp große, beim Phleo-Resistenzgen eine ~1650 bp große und beim Neo-Resistenzgen eine ~4000 bp große Bande im Southern Blot erscheinen. Auf dem Film des Southern Blots kann in allen Spuren eine ~2100 bp große Bande nachgewiesen werden (Abb. 64). Somit hatte keiner der Klone das zweite Allel von *LmxGSK3 $\beta$*  verloren. Mit Ausnahme der in Spur 4-6 und 17 gezeigten Klone, können für alle anderen Klone zusätzlich zum Wildtyp-Gen die Resistenzgene aus beiden Transfektionsrunden nachgewiesen werden. Hierdurch lässt sich die zweifache Antibiotikaresistenz dieser Klone in Kultur erklären. Das Banden-Muster des potentiellen Klons  $\Delta LmxGSK3\beta(-/-)-hyg/phleo$  in Spur 17 lässt auf das Vorliegen des Wildtyp-Gens und des Phleo-Resistenzgens schließen. Statt der zu erwartenden ~2500 bp großen *hyg*-Bande ist eine etwa 3 kb große Bande auf dem Film zu sehen. Die DNA wurde womöglich unvollständig mit *HincII* gespalten und dadurch ist der Shift zur detektierten größeren Bande zu erklären. Die potentiellen  $\Delta LmxGSK3\beta(-/-)-neo/hyg$ -Klone in Spur 4-6 zeigen ein Bandenäquivalent zum eingebrachten Neo-Resistenzgen und eine sehr starke, überstrahlende Bande auf Höhe des *LmxGSK3 $\beta$* -Fragments, jedoch keine *hyg*-Bande. Diese Klone lassen sich allerdings in Gegenwart von Hygromycin kultivieren. Eine Erklärungsmöglichkeit für den fehlenden Nachweis des Hygromycin-Resistenzgens wäre seine Integration an einem anderen Genloкус und Entstehen einer Bande, die mit einer anderen Bande deckungsgleich ist.

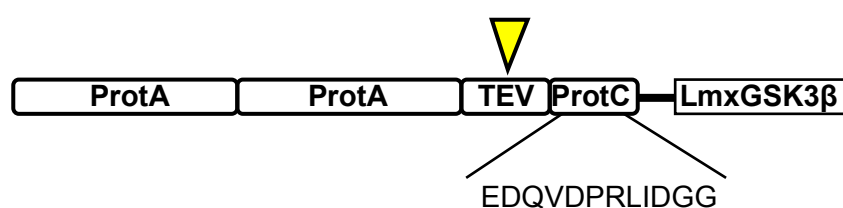
Zusammenfassend ist festzustellen, dass es sich bei keinem der untersuchten Klone um einen Doppeldeletionsklon von *LmxGSK3 $\beta$*  handelt – alle Klone sind falsch positiv.

### 3.2.10 Extrachromosomale Expression von *LmxGSK3 $\beta$* in *L. mexicana* als PTP-Fusionsprotein

Die neben der natürlichen Expression erfolgende, zusätzliche Expression einer Kinase, z. B. vom Plasmid, kann zu einer Erhöhung der Menge an aktiver Kinase in der Zelle führen. Solche überexprimierenden Mutanten können einen veränderten Phänotyp aufweisen. Sie erweisen sich daher häufig als hilfreich bei Aufklärung von Stellenwert und Funktion der Kinase in der Zelle. Desweiteren kann die ersatzweise extrachromosomale Expression einer essentiellen Kinase als Ausgangspunkt für die Entfernung ihrer genomischen Allele dienen.

*LmxGSK3 $\beta$*  wurde als PTP-Fusionsprotein in Leishmanien exprimiert. Der PTP-Tag setzt sich zusammen aus zwei Immunglobulin-G(Ig-G)-bindenden Domänen von Protein A aus *S. aureus* (ProtA) und dem 12 Aminosäuren langen Epitop des humanen Protein C (ProtC). Zwischen ProtA und ProtC befindet sich ein Peptid mit einer TEV-Protease-Schnittstelle (TEV = tobacco etch virus). Erzeugt und erstmals erfolgreich für die Aufreinigung von Proteinen aus *T. brucei* eingesetzt wurde der PTP-Tag von der Arbeitsgruppe um Schiman-

ski (2005b). Die Autoren beschrieben die Aufreinigung über den PTP-Tag als sehr effizient, es konnten hohe Ausbeuten an reinem Protein erzielt werden. Zudem erfolgt die schrittweise Aufreinigung des Proteins unter milden, nichtdenaturierenden Bedingungen, wodurch dessen Funktionalität zumeist erhalten bleibt. Bei Expression von LmxGSK3 $\beta$  gekoppelt an den PTP-Tag besteht die Option zur direkten Aufreinigung von rekombinantem Protein aus Leishmanien. Das so gewonnene Protein könnte auf bestehende posttranslationale Modifikationen untersucht werden und Verwendung im Aktivitätstest finden. Aus der Abspaltung von ProtA durch TEV-Proteaseverdau würde ein ~42,5 kDa großes ProtC-LmxGSK3 $\beta$ -Protein hervorgehen. Dieses wäre nur minimal größer als das Protein ohne Tag, welches eine Größe von ~40,7 kDa besitzt.



**Abb. 65:** Schematische Darstellung des PTP-Fusionsproteins.

#### Klonierung von PTP-LmxGSK3 $\beta$

Der PTP-Tag besteht aus den gleichen Einheiten wie der TAP-Tag (TAP = tandem affinity purification), mit der Ausnahme, dass er anstelle des Calmodulin-bindenden Peptids (CBP) ProtC besitzt. Durch Entfernung der Information für CBP und Einbringen von ProtC, in Form von hybridisierten Oligonukleotiden, sollte der TAP-Tag auf einem bereits vorliegenden Plasmid in einen PTP-Tag umgewandelt werden. Hierfür wurde zuerst ein die Information für den TAP-Tag tragendes Fragment durch Restriktionsenzymsspaltung mit *Bam*HI und *Eco*RV aus dem Plasmid pX9TAP-Tag geschnitten, aufgereinigt und in das über *Bam*HI und *Eco*RV geöffnete Plasmid pBSK-BspLU11I-*Xho*I ligiert. Das Plasmid pBSK-BspLU11I-*Xho*I ging durch Entfernung der *Bsp*LU11I- und *Xho*I-Schnittstelle aus dem pBSKII(+)-Plasmid hervor. Hierzu wurde pBSKII(+) mit *Bsp*LU11I aufgeschnitten, die überhängenden Enden mittels Klenow-Polymerase-Reaktion aufgefüllt und das Plasmid nachfolgend religiert. Das Vorgehen bei der anschließenden Entfernung der *Xho*I-Schnittstelle war deckungsgleich. In das Plasmid pBSKTAP wurden die aufeinanderfolgenden Schnittstellen *Xho*I, *Avr*II und *Bsp*LU11I eingefügt. Die zusätzliche Sequenz lieferten die gegenläufigen, teilweise komplementären Oligonukleotide TAP\_*Xho*I*Avr*II*Bsp*LU11Ifor und TAP\_*Xho*I*Avr*II*Bsp*LU11Irev. Mit je einem der genannten Primer und einem gegenläufigen, bereits die im Plasmid vorhandene *Scal*-Schnittstelle tragenden Primer (*Scal*for bzw. *Scal*rev) wurden in zwei unabhängigen PCR-Reaktionen zwei Fragmente unter Aussparung der CBP-Sequenz amplifiziert. Beide Amplifikate unterliefen eine Doppelspaltung mit *Scal* und *Avr*II. Die resultierenden Fragmente wurden über ein Agarosegel getrennt, die gewünschten Fragmente aufgereinigt und ligiert.

Durch die Ligation wurde das pBSK-Plasmid inklusive TAP-Tag mit der zusätzlichen *XhoI*-*AvrII*-*Bsp*LU111-Schnittstellenfolge nach der TEV-Proteaseschnittstelle, jedoch ohne den für CBP codierenden Bereich, wiederhergestellt. Das resultierende Plasmid pBTAP*xhoIavrII**Bsp*LU111 wurde mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *Bsp*LU111 aufgeschnitten und durch Ligation die für ProtC codierende Sequenz, in Form der hybridisierten Oligonukleotide PTP\_reannPrimerfor und PTP\_reannPrimerrev, eingebracht. Bei der Zusammenlagerung der beiden Oligonukleotide ging am 5'- bzw. 3'-Ende ein Überhang zur Komplementierung der *XhoI*- bzw. *Bsp*LU111-Schnittstelle hervor. Das resultierende Konstrukt pBPTP wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus der Restriktionsenzymsspaltung des Plasmids pCR2.1GSK3beta mit *Bsp*LU111 und *EcoRV* und anschließender Isolierung aus dem Gel ging ein *LmxGSK3β* tragendes Fragment hervor. Dieses Fragment wurde durch Ligation über die *Bsp*LU111 und *EcoRV*-Schnittstelle in das pBPTP-Konstrukt eingebracht. Das erzeugte Plasmid hieß pBGSK3betaNtermPTP. Der PTP-Tag befindet sich am N-Terminus der Kinase. pBGSK3betaNtermPTP wurde durch Doppelspaltung mit *NcoI* und *EcoRV* geschnitten und ein die Information für *PTP-LmxGSK3β* tragendes Fragment nach Gelaufftrennung isoliert. Der *NcoI*-Überhang des Fragments wurde mittels Klenow-Polymerase-Reaktion aufgefüllt. Das Produkt wurde in das jeweils mit *EcoRV* linearisierte pX63polPHLEO- bzw. pX14pol*NcoI*PAC-Plasmid ligiert. Die hervorgegangenen Expressionsplasmide pXPHLEOGSK3bNtermPTP und pXPACGSK3bNtermPTP wurden durch Sequenzierung überprüft und für die Transfektion von Leishmanien verwendet. Die zugehörigen Plasmidkarten befinden sich im Anhang.

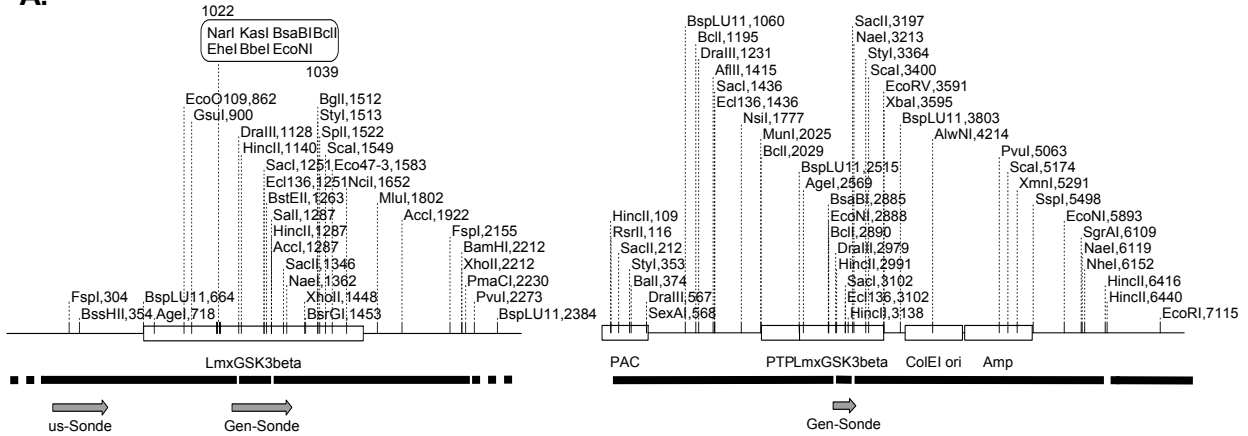
### 3.2.10.1 Episomale Expression und Herstellung einer genomischen Nullmutante

Einzeldelensionsmutanten waren durch den Austausch eines Allels von *LmxGSK3β* gegen ein Resistenzgen entstanden. Sie trugen noch das zweite Allel von *LmxGSK3β*. Es wurde der Versuch unternommen, zwei dieser Mutanten mit dem linearisierten, genomischen Deletionskonstrukt und zeitgleich mit dem episomalen Expressionskonstrukt zu transfizieren. Aus dieser Elektroporation ging als einziger der Klon H4PPAC hervor. Der zugrundeliegende Klon H4 der Einzeldelensionsmutante  $\Delta$ *LmxGSK3β*(+/-)*hyg* trug das Hygromycin-Resistenzgen anstelle von *LmxGSK3β* auf einem Allel im Genom. Bei der Doppel-Transfektion sollte das zweite Allel von *LmxGSK3β* durch das Phleomycin-Resistenzgen ersetzt werden und zudem das Puromycin-Resistenzgen tragende Plasmid pXPACGSK3bNtermPTP zur Expression von *PTP-LmxGSK3β* eingebracht werden. Der Klon H4PPAC zeigte in Kultur eine dreifache Antibiotikaresistenz. Er wurde im Southern Blot hinsichtlich seiner genomischen Situation bezüglich *LmxGSK3β* analysiert.

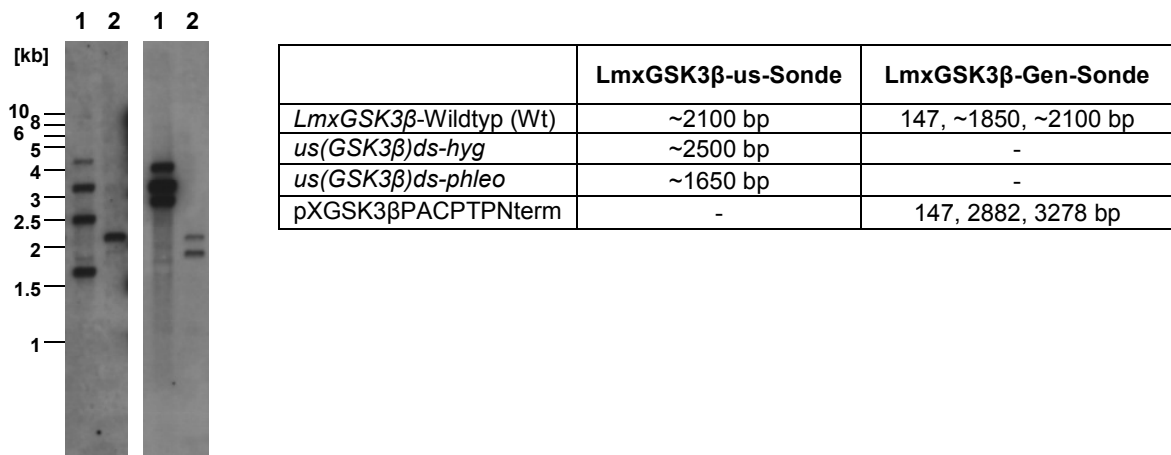
DNA wurde aus Wildtyp und Klon H4PPAC präpariert, mit *HincII* gespalten und über ein Agarose-Gel aufgetrennt. Nach dem Blotvorgang wurde die Membran zuerst mit der

*LmxGSK3 $\beta$* -upstream-Sonde (Erläuterungen zur us-Sonde siehe Kapitel 3.2.9.2) hybridisiert. Nach erfolgter Filmexposition wurde der Southern Blot gestrippt und eine Detektion mit der *LmxGSK3 $\beta$* -Gen-Sonde (Erläuterungen zur Gen-Sonde siehe Kapitel 3.2.10.2) vorgenommen.

**A.**



**B.**



**Abb. 66: Analyse des Klons H4PPAC im Southern Blot.** **A:** Schematische Darstellung von *LmxGSK3 $\beta$*  im Genom (links) und auf dem Plasmid pXPACGSK3bNtermPTP (rechts), des Bindungsbereichs der *LmxGSK3 $\beta$* -Gen- und *LmxGSK3 $\beta$* -upstream-Sonde (graue Pfeile) und der Fragmente nach *HincII*-Spaltung (schwarze Balken). **B:** Southern Blot nach Auftrennung *HincII*-gespaltener gDNA über ein 0,7 %-iges Agarose-Gel. Der links dargestellte Film wurde 24 h exponiert und zeigt das Ergebnis der Detektion mit upstream-Sonde. Der rechte Film zeigt den Nachweis mit Gen-Sonde nach 3 h Exposition. Spur 1:  $\Delta$ *LmxGSK3 $\beta$* (-/-)*hyg/phleo* + pXPAC*LmxGSK3 $\beta$* PTPterm Klon H4PPAC; Spur 2: *L. mexicana* Wildtyp. Die Übersichtstabelle führt die von der *LmxGSK3 $\beta$* -upstream- bzw. *LmxGSK3 $\beta$* -Gen-Sonde zu detektierenden Fragmentgrößen nach *HincII*-Spaltung von genomischer bzw. Plasmid-DNA auf.

Wie auf dem Film zu sehen ist, werden für den Wildtyp Banden bei den zu erwartenden Höhen nachgewiesen (Abb. 66, Spur 2): Mit der upstream-Sonde eine Bande auf Höhe von ~2100 bp und mit der Gen-Sonde Banden bei ~2100 bp und ~1850 bp. Die Bande auf Höhe von 147 bp wurde nicht detektiert. Sie hat aufgrund ihrer geringen Größe das Gel wahrscheinlich beim Lauf bereits verlassen.

Mit der upstream-Sonde lässt sich für den Klon H4PPAC (Spur 1) eine Bande auf Höhe von ~2500 bp und eine auf Höhe von ~1650 bp nachweisen. Dies spricht für eine Integration des

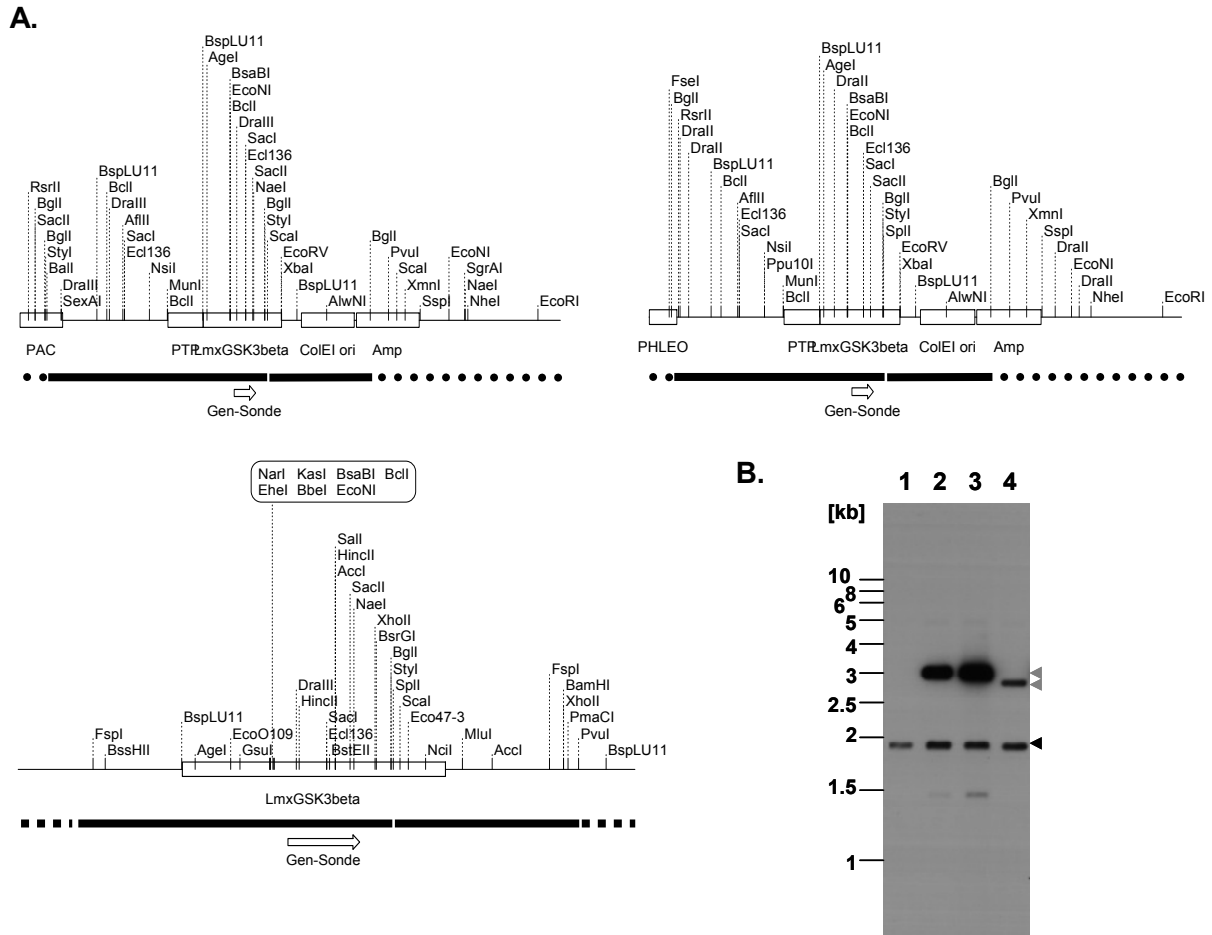


Hyg- bzw. Phleo-Resistenzgens. Außerdem wird eine Bande auf Höhe von ~3200 bp nachgewiesen. Wie ein Sequenzalignment zeigt, besitzen Sonde und Plasmid im Bereich des 3278 bp langen *HincII*-Fragments ein 17 bp langes, mit Ausnahme von drei Basen komplementäres Segment. Möglicherweise wird dieses Fragment, welches der *HincII*-Spaltung des Plasmids entstammt, von der upstream-Sonde mit erkannt. Die Gen-Sonde erkennt in Spur 1 Banden auf Höhe von ~2900 bp, ~3200 bp und etwas größer als 4000 bp. Die beiden ersteren sind ihrer Größe nach *HincII*-Fragmenten des Plasmids zuzuordnen. Sowohl die upstream- als auch Gen-Sonde weisen für H4PPAC je eine Bande bei größer 4 kb nach. Bei dieser Bande könnte es sich um nicht vollständig *HincII*-gespaltete Plasmid-DNA handeln. Für den Klon H4PPAC lässt sich weder mit der *LmxGSK3 $\beta$* -us-Sonde eine Bande auf Höhe von ~2100 bp noch mit der *LmxGSK3 $\beta$* -Gen-Sonde Banden auf Höhe von ~2100 bp und ~1850 bp detektieren. Beides wäre der Fall, wenn *LmxGSK3 $\beta$*  an seinem genomischen Locus vorliegt. Somit handelt es sich bei Klon H4PPAC um eine genomische Doppeldeletionsmutante  $\Delta LmxGSK3\beta(-/-)hyg/phleo$  + pXPACLmxGSK3 $\beta$ PTPNterm, welche *LmxGSK3 $\beta$*  ausschließlich extrachromosomal auf Plasmid trägt.

#### 3.2.10.2 Herstellung einer überexprimierenden Mutante

In *L. mexicana* Wildtyp wurde das Plasmid pXPACGSK3bNtermPTP bzw. pXPHLEOGSK3bNtermPTP transfiziert. Drei der hervorgegangenen Klone wurden vereinzelt. Anschließend wurde für diese drei Klone die Aufnahme des Plasmids im Southern Blot bestätigt. Hierfür wurde ihre und die gDNA von Wildtyp-Zellen präpariert und mit der Restriktionsendonuklease *BglI* gespalten. Die Detektion erfolgte mit der DIG-markierten *LmxGSK3 $\beta$* -Gen-Sonde. Diese Sonde bindet im ORF von *LmxGSK3 $\beta$*  und wurde mit den Oligonukleotiden GSK3b\_1for und GSK3b\_1rev generiert.

Das vorhandene genomische Gen von *LmxGSK3 $\beta$*  liefert auf dem Film in allen Spuren eine Bande auf Höhe von ~1900 bp (Abb. 67). Für die episomale Kopie lässt sich in Spur 2 und Spur 3 das *pac-PTP-LmxGSK3 $\beta$* -Fragment auf Höhe von 3021 bp bzw. in Spur 4 das *phleo-PTP-LmxGSK3 $\beta$* -Fragment auf Höhe von 2835 bp nachweisen. Die Transfektion von Wildtyp-Zellen unter Entstehung der Klone PAC1 (Spur 2), PAC32 (Spur 3) und PHLEO1 (Spur 4) war somit erfolgreich.



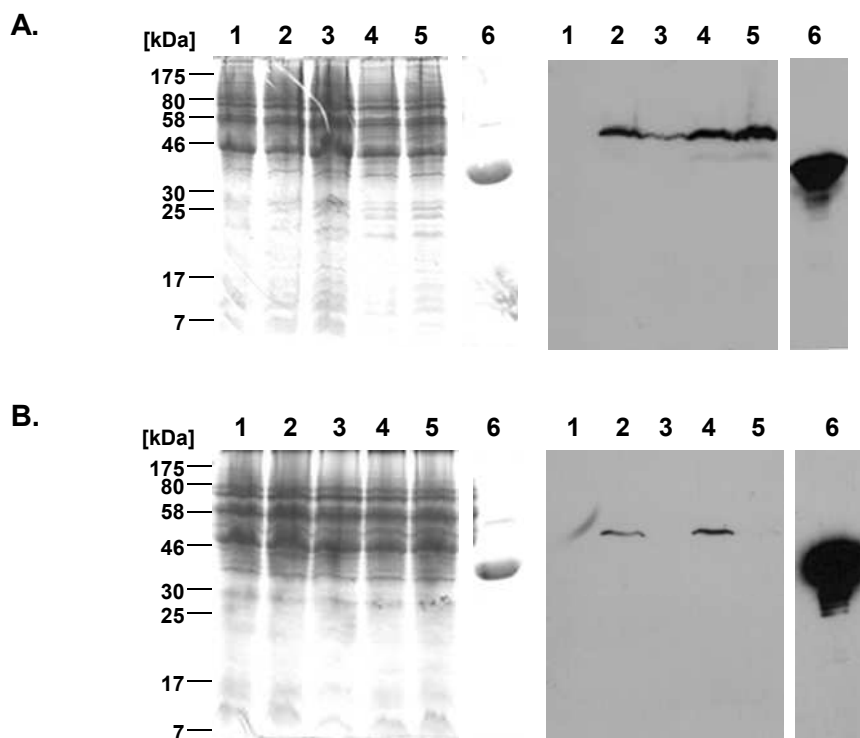
**Abb. 67: Southern Blot-Analyse von Klonen, welche das Plasmid pXPACLmxGSK3 $\beta$ PTPNterm bzw. pXPHEOLmxGSK3 $\beta$ PTPNterm tragen.** **A:** Schematische Darstellung von *LmxGSK3 $\beta$*  als Teil des Plasmids pXPACGSK3bNtermPTP, pXPHEOGSK3bNtermPTP und im Genom. Darstellung des Bindungsbereichs der benutzten *LmxGSK3 $\beta$* -Gen-Sonde (weißer Pfeil) und der Fragmente nach *Bgl*-Verdau (schwarze Balken). **B:** Southern Blot nach Auftrennung *Bgl* verdauter DNA über ein 0,7 %-iges Agarose-Gel. 1: *Lmx*Wildtyp (Wt); 2 bzw. 3: *Lmx*Wt + pXPACLmxGSK3 $\beta$ PTPNterm Klon PAC1 bzw. PAC32; 4: *Lmx*Wt + pXPHEOLmxGSK3 $\beta$ PTPNterm Klon PHLEO1. Die schwarze Pfeilspitze kennzeichnet das *Bgl*-Fragment von genomischer *LmxGSK3 $\beta$* , die grauen Pfeilspitzen von episomaler PTP-*LmxGSK3 $\beta$* .

### 3.2.10.3 Nachweis der Expression von PTP-*LmxGSK3 $\beta$* im Immunoblot

Nachfolgend wurden die Klone H4PPAC, PAC1, PAC32 und PHLEO1 auf Expression und Synthese von PTP-*LmxGSK3 $\beta$*  überprüft. Hierfür wurden Zelllysate von Promastigoten und Amastigoten der entsprechenden Klone und vom Wildtyp präpariert. Die Lysate und rekombinantes His-*LmxGSK3 $\beta$* -Protein wurden über ein SDS-PA-Gel aufgetrennt und ein Immunoblot mit anti-*LmxGSK3 $\beta$* -Peptid-Antikörper durchgeführt. Durch das Vorliegen des PTP-Tags erfährt *LmxGSK3 $\beta$*  rechnerisch eine Größenzunahme von 18,2 kDa im Vergleich zur 40,7 kDa großen Wildtyp-Form. Das His-Fusionsprotein ist 41,5 kDa groß.

In Spur 3 des Gels zur Auftrennung der Promastigotenlysate (Abb. 68, A) scheint etwas mehr Protein aufgetragen worden zu sein als in den übrigen Lysat-Spuren. Ansonsten ergibt die Beurteilung der Coomassie-Färbung, dass von den Zelllysaten annähernd gleiche

Proteinmengen geladen wurden. Wie zu sehen ist, wird das in *E. coli* exprimierte Protein His-LmxGSK3 $\beta$  vom Antikörper auf Höhe von 41,5 kDa erkannt (Spur 6). Der anti-LmxGSK3 $\beta$ -Antikörper erkennt in den Promastigotenlysaten aller Mutanten (Spur 2-5) eine Bande auf Höhe von ca. 52 kDa. Diese Bande wird nicht für den Wildtyp (Spur 1) detektiert. Daraus lässt sich folgern, dass es sich dabei um LmxGSK3 $\beta$  versehen mit dem PTP-Tag handelt. Augenscheinlich läuft das PTP-LmxGSK3 $\beta$ -Protein im Gel etwas niedriger als die kalkulierte Größe von 58,9 kDa. Für den genomischen Doppeldelektionsklon H4PPAC lässt sich eine episomale Expression von PTP-LmxGSK3 $\beta$  in Pro- als auch in Amastigoten nachweisen (Spur 2). Einheitlich fällt für alle drei Überexpressionsklone die Menge an nachgewiesenem Protein PTP-LmxGSK3 $\beta$  im jeweiligen Amastigotenlysat schwächer aus als im Promastigotenlysat. Die drei Klone PAC1, PAC32 und PHLEO1 zeigen eine unterschiedlich starke Expression von PTP-LmxGSK3 $\beta$ . Der Klon PAC32 zeigt in Pro- bzw. Amastigoten eine stärkere Expression als der Klon PHLEO1. Der Klon PAC1 exprimiert PTP-LmxGSK3 $\beta$  am schwächsten. Im Amastigotenlysat von PAC1 ist bei der durchgeführten Expositionszeit keine Bande sichtbar.



**Abb. 68: Immunoblot zum Nachweis von PTP-LmxGSK3 $\beta$ <sup>1)</sup>.** Die Zellysate wurden aus Promastigoten (**A**) und Amastigoten (**B**) präpariert. 1: Wildtyp; 2:  $\Delta$ LmxGSK3 $\beta$ (-/-)hyg/phleo + pXPACLmxGSK3 $\beta$ PTPNterm Klon H4PPAC; 3: u. 4: LmxGSK3 $\beta$ -Wt + pXPACLmxGSK3 $\beta$ PTPNterm, 3: Klon PAC1, 4: Klon PAC32. 5: LmxGSK3 $\beta$ -Wt + pXPHLEOLmxGSK3 $\beta$ PTPNterm Klon PHLEO1; 6: His-LmxGSK3 $\beta$ . Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Rechts: Film nach 10 s (A) bzw. 2 min (B) Exposition. Einsatz von Kaninchen-anti-LmxGSK3 $\beta$ -Peptid-Antiserum 1 : 100 und Schwein-anti-Kaninchen-Antikörper 1 : 1000 in 5 % MP/PBST.

Bei den hier durchgeführten Expositionszeiten lässt sich die schwache LmxGSK3 $\beta$ -Wildtyp-Bande in Spur 1 und Spuren 3-5 auf Höhe von 40,7 kDa nicht detektieren (Abb. 68). Zur

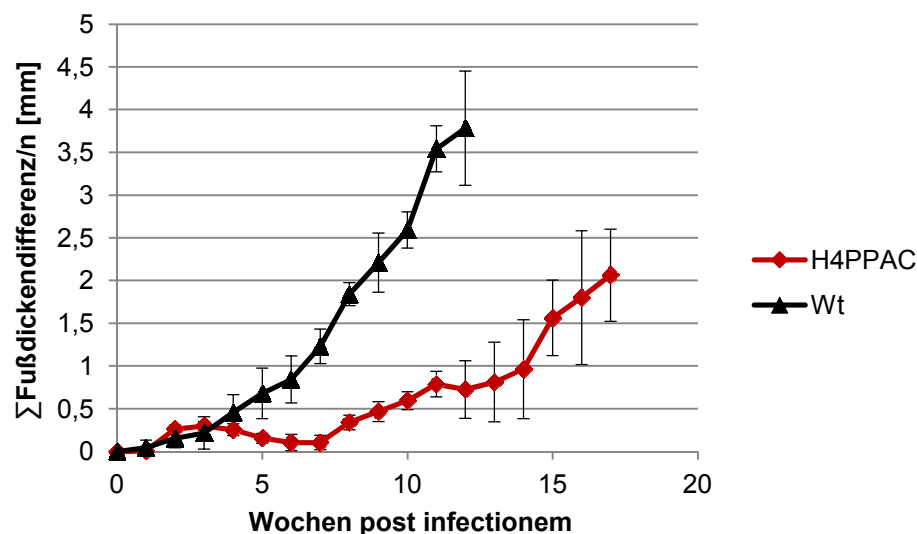
Detektion von endogener Wildtyp-LmxGSK3 $\beta$  in Zelllysaten ist erfahrungsgemäß eine Exposition des Films von mindestens 30 min erforderlich. Es wurde bei diesem Blot vermehrt längere Filmexpositionszeiten zur Darstellung der genomischen Situation durchzuführen. Das sichtbar werden einer Bande auf Höhe von PTP-LmxGSK3 $\beta$  bei kürzeren Expositionszeiten des Films von bis zu zwei Minuten legt nahe, dass das PTP-getaggte Protein in allen Klonen viel stärker exprimiert wird als die endogene LmxGSK3 $\beta$ .

<sup>1)</sup> Ich danke Ms. Laura Munro für Wiederholung und Bestätigung der Immunoblot-Ergebnisse. Die dargestellten Gele und Blots entstammen dem von ihr durchgeführten Durchlauf.

### 3.2.11 Mausinfektionsexperiment mit Klon H4PPAC der Mutante $\Delta$ LmxGSK3 $\beta$ (-/-)hyg/phleo + pXPACLmxGSK3 $\beta$ PTPNterm

Bei Klon H4PPAC handelt es sich um eine genomische Doppelalleldeltionsmutante von LmxGSK3 $\beta$ . Anstelle der genomischen Kopie trägt H4PPAC eine extrachromosomale Kopie von LmxGSK3 $\beta$  auf dem Plasmid pXPACLmxGSK3 $\beta$ PTPNterm. In Zellen von H4PPAC wird die Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$  als PTP-Fusionsprotein exprimiert und synthetisiert.

Je  $5 \times 10^6$  Promastigoten einer spät-logarithmischen Kultur wurden in die Fußsohle des linken Hinterlaufs einer weiblichen BALB/c-Maus injiziert. Es wurden 9 Mäuse mit dem Klon H4PPAC und als Kontrolle 10 Mäuse mit Wildtyp-Leishmanien infiziert. Die Mäuse waren in Gruppen von je 5 (bzw. einmal 4) Mäusen zusammengefasst. Nach Umwandlung zu intrazellulären Amastigoten kommt es zur Vermehrung dieser im Gewebe. Dies und Entzündungsprozesse führen zur Volumenzunahme des betroffenen Fußes und zur Ausbildung von Läsionen. Über mehrere Wochen wurde die Entwicklung der Fußdicke gemessen und so der Infektionsverlauf verfolgt.<sup>2)</sup>



**Abb. 69:** Infektionsverlauf in mit  $\Delta$ LmxGSK3 $\beta$ (-/-)hyg/phleo + pXPACLmxGSK3 $\beta$ PTPNterm Klon H4PPAC infizierten BALB/c-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung wieder. post infectionem = nach Infektion

Nach 12 Wochen wurde die Versuchsreihe des Wildtyps aufgrund der Ausbildung ausgeprägter Läsionen abgebrochen. Die Differenz zur Ausgangsfußdicke betrug zu diesem Zeitpunkt im Schnitt 3,8 mm. Die Mutante H4PPAC zeigte sich ebenfalls infektiös und führte bei allen Mäusen zu einer Läsion am infizierten Fuß. Die Fußdickenzunahme verlief jedoch moderater als beim Wildtyp und zum Ende des Experiments nach 17 Wochen wurde eine durchschnittliche Fußdickendifferenz zum Nullwert von 2,1 mm erreicht (Abb. 69).

---

<sup>2)</sup> Ich danke Herrn Prof. James Alexander und Mrs Adrienne McGachy (University of Strathclyde, Glasgow, UK) für die Durchführung des Mausinfektionsexperiments.

---

### 3.2.12 Herstellung einer inhibitorsensitiven Mutante LmxGSK3 $\beta$ -IS

Der Ansatz, durch Herstellung einer Nullmutante mehr über die Funktion von LmxGSK3 $\beta$  in der Zelle zu erfahren, blieb in Ermangelung an Deletierbarkeit der Kinase erfolglos. Durch Herstellung einer inhibitorsensitiven (IS) Mutante LmxGSK3 $\beta$ -IS sollte ein kurzfristig induzierbares System geschaffen werden, welches es ermöglicht, die Auswirkungen einer Hemmung der Kinase-Aktivität auf die Zelle zu untersuchen.

Die Strategie zur Erzeugung einer IS-Form zielt darauf ab, durch Mutation des „gatekeeper-Rests“ in eine weniger raumfordernde Aminosäure, im Bereich der ATP-Bindetasche zusätzlichen Raum für die Bindung eines spezifischen Inhibitors zu schaffen (Bishop et al., 2001). Für diesen synthetischen Inhibitor gilt die Prämisse, dass er die Wildtyp-Kinase in ihrer Aktivität nicht beeinträchtigen darf. Die Position des gatekeeper-Rests wird zumeist von einer voluminösen Aminosäure belegt. Für LmxGSK3 $\beta$  wurde anhand des Sequenzalignments (Abb. 39, B) ein Methionin an Aminosäureposition 100 (M100) als gatekeeper-Rest identifiziert. Durch Austausch von M100 gegen die kleinere Aminosäure Alanin wurde LmxGSK3 $\beta$ -IS hergestellt. An die IS-Mutante wird die Anforderungen gestellt, dass eine nahezu vollständige Hemmung ihrer Aktivität durch Zugabe eines spezifischen Inhibitors in zellverträglicher Konzentration erreicht werden soll sowie, dass sie hinreichend in der Lage ist die Wildtyp-Kinase in ihrer Aktivität zu ersetzen. Hierfür wurde in einem ersten Schritt LmxGSK3 $\beta$ -IS als rekombinantes Protein exprimiert und *in vitro* auf seine Aktivität getestet. Die Auswahl eines geeigneten Inhibitors wurde ebenfalls im *in vitro* Ansatz getroffen. Schließlich wurde die IS-Mutante in das Genom von *L. mexicana* integriert und dadurch die Wildtypform von LmxGSK3 $\beta$  ersetzt. Abschließend sollte eine Testung der so erzeugten Mutante durch Zugabe von Inhibitor *in vivo* erfolgen.

#### 3.2.12.1 Generierung von LmxGSK3 $\beta$ -IS und Klonierung der Konstrukte

Der Aminosäuren-Austausch M→A wurde durch zielgerichtete Mutagenese in zwei auf-

einanderfolgenden PCR-Reaktionen herbeigeführt. Hierfür wurden die zwei komplementären, gegenläufigen Oligonukleotide GSK3bISfor und GSK3bISrev generiert. Diese Primer tragen im Vergleich zur Originalsequenz die veränderte Basenfolge: ATG→GCG, was zum gewünschten Aminosäure-Austausch führt. Zudem umfasst die Primersequenz eine weitere, translational stumme Mutation, welche eine zusätzliche Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *AcI* in das Gen einführt. Das Fragmentmuster nach *AcI*-Spaltung ermöglicht in nachfolgenden Schritten eine Überprüfung auf das Vorhandensein der IS-Mutation. In der ersten PCR-Runde diente das Plasmid pCR2.1GSK3beta als Vorlage. Mit je einem der genannten, die Mutation tragenden Primer und einem gegenläufigen, weiter außen bindenden Primer (GSK3bExpr\_for bzw. GSK3bExpr\_rev) wurden in zwei unabhängigen PCR-Reaktionen zwei Fragmente amplifiziert. In der zweiten PCR-Runde wurden beide Fragmente als Vorlage zusammen mit den beiden äußeren Primern eingesetzt. Das Produkt wurde mittels TOPO-Klonierung in das Plasmid pCR2.1 kloniert und das entstandene Plasmid pCR2.1GSK3bIS durch Restriktionsenzymspaltung und Sequenzierung überprüft. Für die Expression in *E. coli* wurde ein die IS-Mutation enthaltendes *EcoRI/EcoNI*-Fragment über *EcoRI/EcoNI* in das pJCduet-Plasmid eingebracht. Das resultierende Plasmid hieß pJCGSK3bIS. Die zugehörige Plasmidkarte findet sich im Anhang.

Die Elektroporationskonstrukte wurden wie folgt hergestellt: Das Plasmid pCR2.1usds(GSK3b) wurde mit *NotI* und *XbaI* gespalten. Die überhängenden Enden wurden mittels Klenow-Polymerase-Reaktion aufgefüllt und nachfolgend, das nun als pCR2.1usds(GSK3b)-Aval bezeichnete Plasmid, religiert. Durch dieses Vorgehen wurde die zwischen *NotI* und *XbaI* befindliche *Aval*-Schnittstelle entfernt. Das Konstrukt pBSKGSK3β1.2XI wurde mit *Aval* gespalten und ein 1562 bp großes, u. a. *LmxGSK3β* enthaltendes Fragment isoliert. Das Plasmid pCR2.1usds(GSK3b)-Aval wurde ebenfalls mit *Aval* geschnitten, ein 4528 bp großes Fragment mittels Gelextraktion gewonnen und dieses mit dem 1562 bp-Fragment ligiert. Dadurch entstand das Plasmid pCR2.1usGSK3bds-Aval, welches die stromauf-Region, den offenen Leserahmen und die stromab-Region von *LmxGSK3β* in ebendieser Reihenfolge trug. Dann wurde der genannte Abschnitt durch Spaltung mit *EcoRV* aus dem Plasmid geschnitten, isoliert und in das mit *EcoRV* linearisierte Plasmid pBSK-BspLU11I eingebracht. Das entstandene Plasmid hieß pBusGSK3bds. Im nächsten Schritt wurde die IS-Mutation überführt. Die Spaltung von pCR2.1GSK3bIS mit *EcoNI/BspLU11I* mit anschließender Isolierung aus dem Gel lieferte ein die IS-Mutation tragendes Fragment. Dieses wurde, ein gleich großes Fragment substituierend, in das mit *EcoNI/BspLU11I* geschnittene Plasmid pBusGSK3bds eingebracht. Das resultierende Plasmid hieß pBusGSK3bISds. Abschließend wurde ein das Resistenzgen und die Intergene-Region (IR) tragender Bereich eingebracht. Das Vorliegen der Intergenen Region sollte zur Erhöhung der Translationseffizienz führen; in ihr befindet sich die splice addition

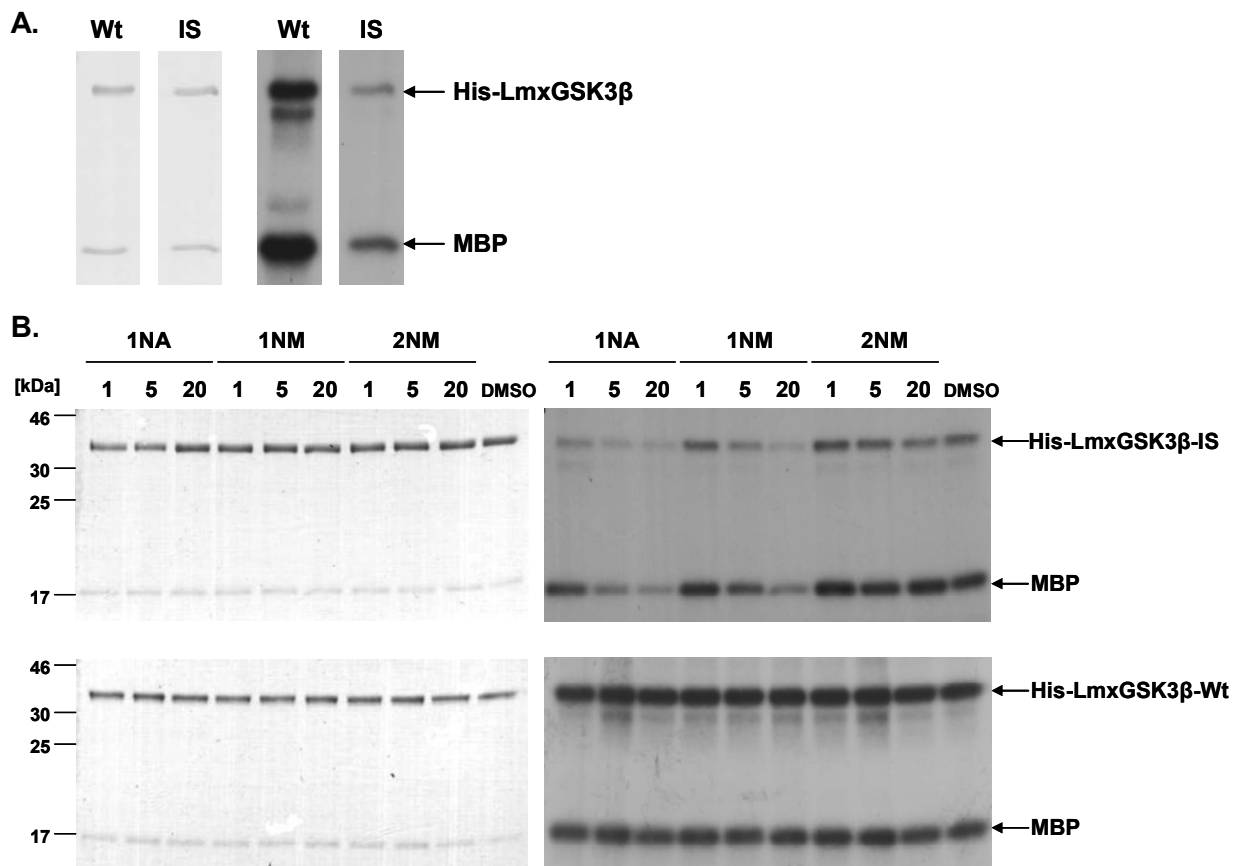
site. Ein 1810 bp großes *Nco*I-Fragment, welches die IR und das für das Phleomycin-bindende Protein codierende Resistenzgen (*phleo*) trug, entstammte dem Konstrukt pXMPK7ISGIyTYCPHLEO+NcoI. Ein 2041 bp großes für die IR und die Puromycin-N-Acetyltransferase (*pac*) codierendes *Nco*I-Fragment entstammte dem Konstrukt pBusdsabMPK7TYPAC. Die Fragmente wurden jeweils in das mit *Bsp*LU11I linearisierte pBusGSK3bISds-Plasmid ligiert und auf ihre Orientierung überprüft. Die entstandenen Endkonstrukte wurden pBusGSK3bISdsIRPHLEO und pBusGSK3bISdsIRPAC genannt. Ersteres wurde neben Schnittmuster-Kontrolle nach Restriktionsenzymspaltung auch durch Sequenzierung überprüft. Die zugehörigen Plasmidkarten finden sich im Anhang.

### 3.2.12.2 Einsatz von rekombinantem LmxGSK3 $\beta$ -IS im Kinase-Aktivitätstest und Inhibitortestung

Die Wildtyp-Kinase LmxGSK3 $\beta$ -Wt und die inhibitorsensitive Form LmxGSK3 $\beta$ -IS wurden als His-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Die aufgereinigte Proteinmenge beider Fusionsproteine fiel hoch aus. Ihre Phosphorylierungsaktivität wurde im Enzymaktivitätstest in Gegenwart von [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP und MBP unter optimalen Bedingungen bestimmt und einander gegenübergestellt (Abb. 70, A). Die Coomassie-Färbung des SDS-PA-Gels zeigt, dass gleiche Proteinmengen sowohl beider Kinase-Formen als auch von MBP eingesetzt wurden. Die auf dem Autoradiogramm nachgewiesene Schwärzung auf Höhe der Kinase als auch auf Höhe des Substrats fällt für die inhibitorsensitive Mutante (IS) schwächer aus als für die Wildtyp-Form (Wt). Das rekombinante LmxGSK3 $\beta$ -IS-Protein erreicht eine Auto- und Substratphosphorylierungsaktivität von etwa 20 % der Aktivität von LmxGSK3 $\beta$ -Wt. Dieser Prozentsatz wurde densitometrisch mit ImageJ bestimmt.

Die Testung des Einflusses der Inhibitoren<sup>3)</sup> 1-NA (1-Naphthyl-pyrazolo(3,4*d*)pyrimidine), 1-NM und 2-NM (1-/2-Naphthylmethylpyrazolo(3,4*d*)pyrimidine) auf die Enzymaktivität erfolgte im Kinase-Test auf gleiche Weise wie oben beschrieben. Die Inhibitoren liegen in DMSO gelöst vor. Um einen Einfluss des Lösungsmittels auszuschließen, wurde eine Kontrolle mit DMSO in gleicher Konzentration wie in den Ansätzen mit Inhibitor durchgeführt. Die Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 20  $\mu$ M getestet (Abb. 70, B). Laut Coomassie-Färbung wurden auf beiden Gelen nahezu gleiche Proteinmengen geladen (Abb. 70, B). Wie zu sehen ist, zeigt sich die Wildtyp-Form in ihrer Aktivität durch die eingesetzten Inhibitoren nicht beeinträchtigt. Die inhibitorsensitive Mutante reagiert auf die Anwesenheit von 1-NA mit der deutlichsten Abnahme ihrer Phosphorylierungsaktivität. Bereits bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M 1-NA ist eine, wenn auch schwache Abnahme der Kinase-Aktivität festzustellen. In Gegenwart von 1-NM ist eine Herabsetzung der Kinase-Aktivität ab einer Konzentration von 5  $\mu$ M und für 2-NM ab 20  $\mu$ M nachweisbar. Das

Ergebnis wurde genauso reproduziert. Auch die Wiederholung des Versuchs bestätigt die Überlegenheit von 1-NA gegenüber den beiden anderen Inhibitoren.



**Abb. 70: Phosphorylierungsaktivität der inhibitorsensitiven Mutante His-LmxGSK3 $\beta$ -IS und Inhibitortestung im Kinase-Aktivitätstest.** Links: Coomassie-gefärbtes 12 %-iges SDS-PA-Gel. Rechts: Autoradiogramm **A:** LmxGSK3 $\beta$ -IS (IS) im Vergleich zum Wildtyp (Wt). Der Film wurde 24 h exponiert. Die gezeigten Spuren entstammen demselben Gel. **B:** Test in Gegenwart von 1, 5 bzw. 20  $\mu$ M Inhibitor 1-NA, 1-NM bzw. 2-NM und DMSO. Oben: IS-Mutante. Der Film wurde 18 h 15 min exponiert. Unten: Wildtyp-Kinase. Autoradiogramm nach 2 h 15 min Exposition. Bei A und B wurden die Ansätze mit Wt bzw. IS-Mutante parallel und unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

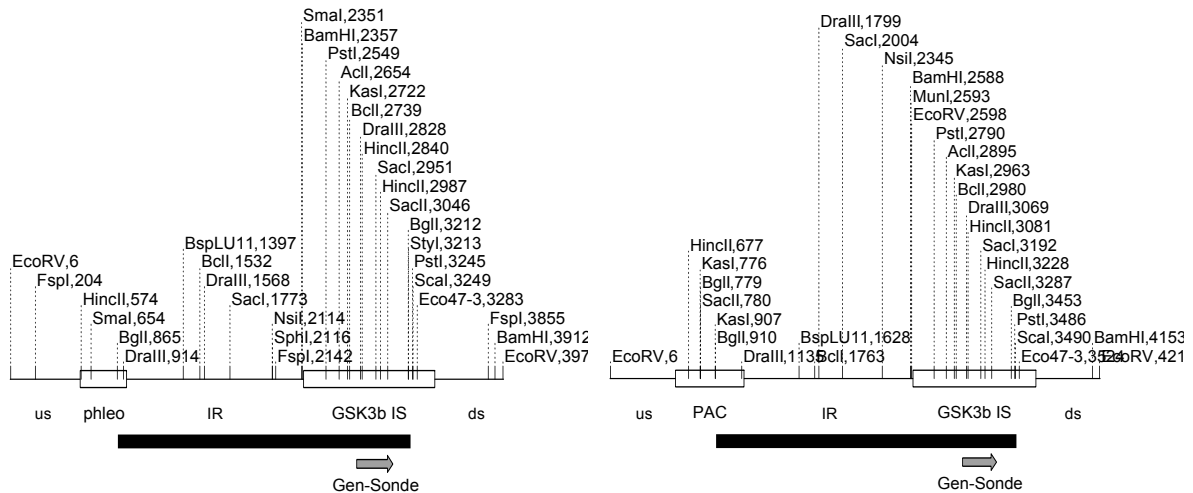
<sup>3)</sup> Die Inhibitoren 1-NA, 1-NM und 2-NM wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Kavita Shah, Purdue University, Department of Chemistry, West Lafayette, USA.

### 3.2.12.3 Transfektion der inhibitorsensitiven Mutante $\Delta$ LmxGSK3 $\beta$ -IS in *L. mexicana*

Für die Elektroporation wurden die Konstrukte pBusGSK3bISdsIRPHLEO und pBusGSK3bISdsIRPAC jeweils mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Hind*III geschnitten und über Gelextraktion das Fragment isoliert, welches das mutierte Gen *LmxGSK3 $\beta$ -IS* zusammen mit der Intergen Region und dem Resistenzgen trägt. Über die ebenfalls enthaltenen flankierenden Regionen (us und ds) sollte die Integration in das Genom mittels homologer Rekombination erfolgen. Die Integration der Fragmente in das Genom führt zu einer Resistenz der Zellen gegenüber Puromycin bzw. Phleomycin. In einer ersten Runde wurde eines, der für eine der beiden Antibiotikaresistenzen codierenden



Fragmente in *L. mexicana* Wildtyp transfiziert. Etwa nach zehn Tagen Kultur unter Selektionsdruck waren für beide Resistenzen Mutanten gewachsen.

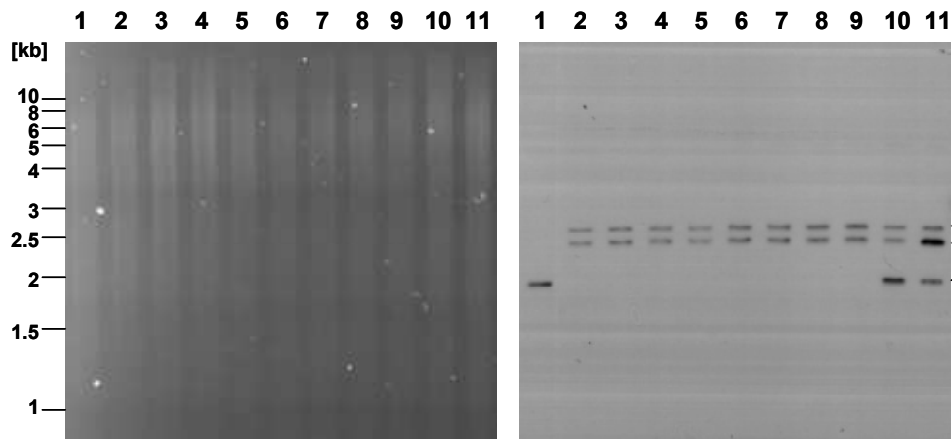


**Abb. 71:** Schematische Darstellung der linearen *LmxGSK3βIS*-Elektroporationskonstrukte. Der zur benutzten Gen-Sonde komplementäre Bereich (graue Pfeile) und die zu erwartenden *BglI*-Fragmente (schwarze Balken) sind ebenfalls dargestellt.

Es wurde die genomische DNA von Wildtyp-Zellen, von je sechs Puromycin- und je sechs Phleomycin-resistenten Klonen präpariert, mit *BglI* gespalten und über ein 0,7 %-iges Agarose-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde ein Southern Blot durchgeführt (nicht abgebildet). Die *LmxGSK3β*-Gen-Sonde wies in allen resistenten Klonen eine Bande korrespondierend zum *LmxGSK3β*-Wildtyp-Gen und eine Bande korrespondierend zur, mit einem der beiden Resistenzgene gekoppelten *LmxGSK3β-IS* nach. Somit war für alle der untersuchten Klone von einem Austausch des Wildtyp-Genes gegen die inhibitorsensitive Mutante auf einem ihrer beiden Allele auszugehen.

Je zwei Puromycin-resistente Klone wurden in einer zweiten Elektroporationsrunde mit dem *usLmxGSK3βISds-phleo*-Konstrukt transfiziert und je zwei Phleomycin-resistente Klone mit dem *usLmxGSK3βISds-pac*-Konstrukt. Hieraus gingen erneut Klone hervor. Einige dieser Klone wurden aufgrund der hohen Zahl an bewachsenen Plattenvertiefungen erfolgreich einer Vereinzellung unterworfen. Nachfolgend wurde die gDNA der Zellen einer Southern Blot-Analyse unterzogen und auf die genomische Integration von *LmxGSK3βIS* untersucht (Abb. 72). Das *BglI*-Fragment der *LmxGSK3β*-Wildtyp-Bande war auf Höhe von ~1900 bp zu erwarten und ist in Spur 1, 10 und 11 zu sehen. In Spur 1 ist die gesplattene gDNA des Wildtyps aufgetragen, in Spur 10 und 11 die zweier Mutanten, welche offensichtlich das Wildtyp-Gen nicht durch die inhibitorsensitive Mutante ersetzt haben. In Spur 2-9 kann mit der *LmxGSK3β*-Gen-Sonde keine Bande korrelierend zum Wildtyp-Gen detektiert werden. Jedoch findet sich in diesen Spuren eine Bande auf Höhe von 2543 bp, welche für die Integration des *pac-IR-LmxGSK3β-IS*-Fragments spricht und eine Bande auf Höhe von 2347 bp, welche eine Aufnahme des *phleo-IR-LmxGSK3β-IS*-Fragments anzeigt. Damit wird

gezeigt, dass *LmxGSK3 $\beta$ -Wt* in den Mutanten gegen die inhibitorsensitive Form substituiert worden ist (Spur 2-9). Es wurden Stickstoff-Stabilate von vier der Klone angelegt (Klon D31, L111V, K23, K24).



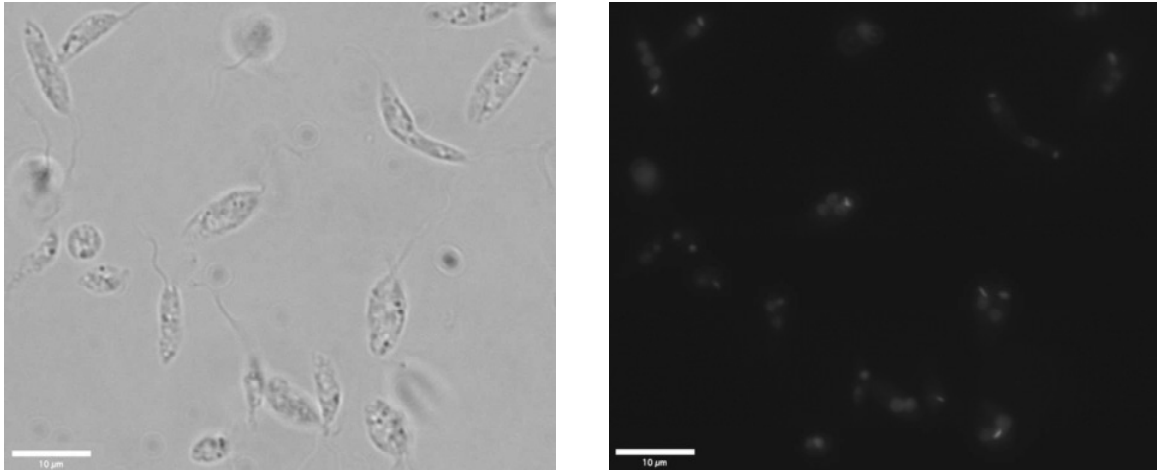
**Abb. 72:** Southern Blot-Untersuchung zum Nachweis der genomischen Integration von *LmxGSK3 $\beta$ -IS* unter Ersatz des Wildtyp-Gens auf beiden Allelen. Spur 1: *Lmx*Wildtyp; Spur 2-6: potentielle  $\Delta$ *LmxGSK3 $\beta$ -IS-pac/phleo*-Mutanten nach der zweiten Transfektionsrunde mit *usLmxGSK3 $\beta$ ISds-phleo*; Klon D31, D32, D33, L111V, L112V; Spur 7-11: potentielle  $\Delta$ *LmxGSK3 $\beta$ -IS-phleo/pac*-Mutanten nach der zweiten Transfektionsrunde mit *usLmxGSK3 $\beta$ ISds-pac*; Klon K23, K24, K25, E521/V, E522/V. Links: Korrespondierendes 0,7 %-iges Agarose-Gel. Rechts: Film nach 15 min Exposition. Die genomische DNA wurde mit *Bgl*I gespalten. Das Fragment von *LmxGSK3 $\beta$ -Wildtyp* (schwarze Pfeilspitze), *LmxGSK3 $\beta$ -IS-pac* bei 2543 bp und *LmxGSK3 $\beta$ -IS-phleo* bei 2347 bp (graue Pfeilspitzen) wurde mit der *LmxGSK3 $\beta$ -Gen*-Sonde detektiert.

#### 3.2.12.4 Erster Inhibortest mit Promastigoten von $\Delta$ *LmxGSK3 $\beta$ -IS*

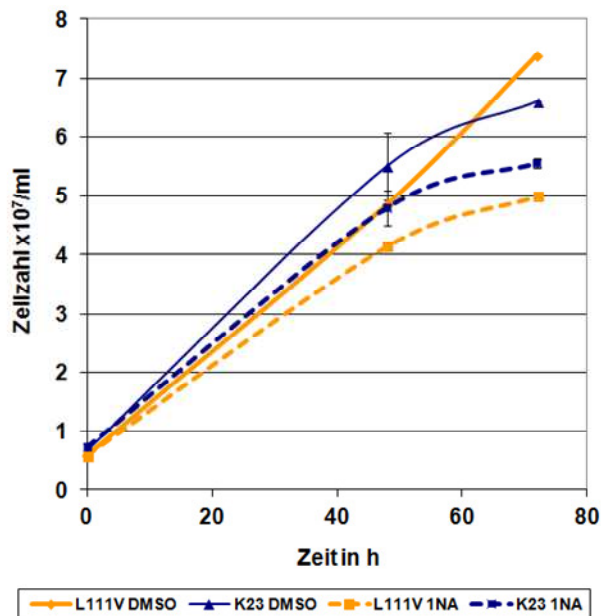
Eine Untersuchung der erzeugten, die inhibitorsensitive *LmxGSK3 $\beta$ -IS* tragenden Leishmanien auf ihr Verhalten gegenüber Inhibitor 1-NA in Kultur konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit leider nicht zum Abschluss gebracht werden. In einem ersten Zellversuch wurden Promastigoten zweier Klone, L111V und K23, der Mutante  $\Delta$ *LmxGSK3 $\beta$ -IS* in Gegenwart von 10  $\mu$ M 1-NA bzw. der entsprechenden Konzentration DMSO kultiviert.

Der Inhibitor 1-NA in einer Konzentration von 1  $\mu$ M besaß keinen Effekt auf das Wachstum und die Flagellenlänge von  $\Delta$ *LmxGSK3 $\beta$ -IS*. Auch zeigten die Promastigoten keinerlei Auffälligkeiten (nicht dargestellt). Nach Erhöhung der Inhibitorkonzentration auf 10  $\mu$ M 1-NA befinden sich etwa doppelt so viele Zellen im Begriff der Zellteilung als in der DMSO-Kontrolle (Abb. 73, C). Es finden sich zudem Zellen mit NK-Missverhältnis (Beispielzellen Abb. 73, A). Die Kulturen mit 10  $\mu$ M 1-NA zeigen auch eine diskrete Verminderung des Zellwachstums (Abb. 73, B) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Zusammengenommen spricht dies für eine Beeinträchtigung der Cytokinese in den mit 1-NA behandelten Leishmanien von  $\Delta$ *LmxGSK3 $\beta$ -IS*. Im Durchlauf mit 10  $\mu$ M Inhibitor wurde die Flagellenlänge nicht vermessen. Auch wurden keine Amastigoten untersucht.

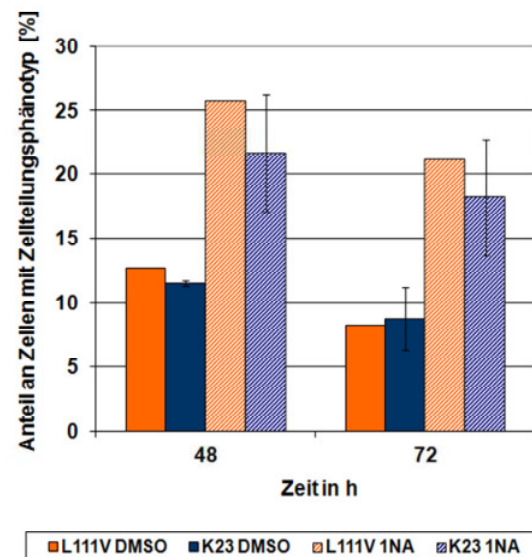
A.



B.



C.



**Abb. 73:** Inhibitortest mit Promastigoten von  $\Delta LmxGSK3\beta$ -IS und 1-NA. Die Klone K23 und L111V von  $\Delta LmxGSK3\beta$ -IS wurden in Gegenwart von 10  $\mu$ M 1-NA bzw. DMSO kultiviert. Es wurden nach 48 und 72 Stunden Proben entnommen. **A:** Mikroskopie von Klon L111V mit 1-NA nach 48 h. Links: Phasenkontrastaufnahme, rechts: Fluoreszenzaufnahme der DAPI-Färbung. Der weiße Balken entspricht 10  $\mu$ M. **B:** Zellzahl. **C:** Prozentsatz der Zellen im Begriff der Zellteilung an der Gesamtzellpopulation. Stellvertretend wurden jeweils >200 Zellen ausgezählt. Für den Klon K23 existieren zwei Versuchsreihen. Für Klon K23 ist in B und C der Mittelwert aus beiden Reihen dargestellt und die Standardabweichung als Fehlerindikatoren angegeben.

## 4. Diskussion

### 4.1 LmxMPK7

#### 4.1.1 Rekombinante Expression von LmxMPK7 und Aktivitätstest

Ziel war es, *LmxMPK7* rekombinant zu exprimieren und das resultierende Protein in ausreichender Menge und Reinheit aufzureinigen. Die aufgereinigte Proteinkinase sollte anschließend einer biochemischen Charakterisierung unterzogen werden und darauf aufbauend, auf Interaktion mit potentiell übergeordneten Kinasen *in vitro* getestet werden.

##### Expression und Aufreinigung:

In vorangegangenen Versuchen wartete das GST-Fusionsprotein von LmxMPK7 aus *E. coli* mit einer schlechten Löslichkeit auf. Auch zeigte das in geringer Konzentration aufgereinigte GST-Protein keine Aktivität im *in vitro* Test (Kruse M.). Daher wurde in dieser Arbeit die Expression und Synthese von LmxMPK7 kombiniert mit dem Hexahistidin- und MalBP-Tag angestrebt. Für eine Vielzahl von rekombinanten Proteinen, welche unlöslich und in *E. coli* in Einschlusskörperchen zu finden sind, konnte durch die Kopplung an den MalBP-Tag eine Verbesserung der Löslichkeit erreicht werden (Sachdev und Chirgwin, 1998). Es besteht für den MalBP-Tag zudem die Möglichkeit, nach der Aufreinigung das Protein von Interesse durch Protease-Verdau mit Faktor Xa vom Tag abzuspalten und zu trennen. Sowohl das MalBP- als auch das His-Fusionsprotein von LmxMPK7 waren überwiegend in der unlöslichen Fraktion des Zellaufschlusses zu finden. Dennoch war es möglich für den nachfolgenden Aktivitätstest, für den etwa 3 µg Kinase benötigt werden, ausreichend lösliches Protein aus dem Überstand aufzureinigen. Die Aufreinigung lieferte für MalBP-LmxMPK7 zwischen 1,3 und 1,6 mg/ml und für His-LmxMPK7 zwischen 150 und 250 µg/ml Protein, wobei in die gemessene Proteinkonzentration von MalBP-LmxMPK7 auch die mitaufgereinigten Verunreinigungen eingingen. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesen Proteinen, deren Größe zwischen der des MalBP-Tags und des MalBP-LmxMPK7-Gesamtlängenproteins liegt, um verkürzt synthetisierte oder abgebaute Varianten von MalBP-LmxMPK7. Es besteht auch die Möglichkeit, dass es sich hierbei um Proteine von *E. coli* handelt. Diese Proteine repräsentierten im Kinase-Aktivitätstest aber keine Proteine mit Phosphorylierungsaktivität.

##### Aktivitätstest:

MalBP-LmxMPK7 und His-LmxMPK7 wurden *in vitro* auf das Vorliegen von Aktivität getestet. Hierbei wurde im radioaktiven Kinase-Aktivitätstest der pH-Wert, die Konzentration und Art der zweiwertigen Kationen und die Temperatur variiert sowie LmxMPK7 unterschiedliche artifizielle Substrate angeboten. MalBP-LmxMPK7 zeigte unter den getesteten Bedingungen keine nennenswerte Kinase-Aktivität. Es wurde davon Abstand genommen, den 40 kDa-

großen MalBP-Tag von LmxMPK7 durch Faktor Xa-Verdau abzuspalten. Stattdessen wurde das His-Fusionsprotein von LmxMPK7 einer ausführlichen Analyse unterzogen. Der His-Tag besteht aus sechs Histidinresten und besitzt im Vergleich zum MalBP-Tag den Vorteil, dass er aufgrund seiner Zusammensetzung und geringen Größe weniger störanfällig bezüglich Modifikationen ist. Auch ist die Wahrscheinlichkeit einer sterischen Beeinträchtigung des katalytischen Zentrums durch den kleinen His-Tag sehr viel geringer. Allerdings war für His-LmxMPK7 unter den getesteten Bedingungen ebenfalls keine Phosphorylierungsaktivität gegenüber sich selbst oder einem der angebotenen Substrate festzustellen.

#### In silico-Analyse der Aminosäuresequenz:

LmxMPK7 weist eine 52 Aminosäuren lange N-terminale Extension auf. C-terminal schließen sich der katalytischen Domäne 90 Aminosäuren an. Die normalerweise rund 300 Aminosäuren lange katalytische Domäne fällt aufgrund von drei Sequenzeinschüben in LmxMPK7 länger aus (Wiese, 2007). Innerhalb der N-terminalen Verlängerung hat LmxMPK7 mit LmxMPK3, LmxMPK4 und LmxMPK5 das Motiv K-x-Y-x-V-x-G-x-x-F-E/D-V/I gemeinsam. Seine Aufgabe ist noch unbekannt (Saravanan et al., 2010). Die sich der katalytischen Domäne C-terminal anschließende Einheit scheint in einigen der bereits untersuchten MAPKs von Trypanosomatiden eine regulatorische Funktion zu besitzen. So kommt allem Anschein nach dem langen C-Terminus der ERK-ähnlichen, CDK-ähnlichen Proteinkinase TbECK1 von *T. brucei* eine negativ autoregulatorische Rolle zu. Die Expression einer C-terminal verkürzten Form von TbECK1 unter Nutzung eines induzierbaren, episomalen Systems beeinträchtigte das Wachstum von Prozyklischen und führte zu einer Anhäufung von Zellen mit abnormalem Karyotyp (Ellis et al., 2004). Anders führte die episodale Expression einer C-terminal verkürzten Form von LmxMPK6, dem Homolog von TbECK1, zu keinem verändertem Phänotyp in *L. mexicana*. Jedoch wurde hier kein induzierbares Expressionssystem benutzt. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass eine Selektion von transfizierten Promastigoten stattgefunden hat, welche eine irreguläre LmxMPK6-Aktivität und damit verbundene potentielle Wachstumsnachteile umgangen haben (John von Freyend, Dissertation 2010). In Leishmanien wird für die MAP-Kinase MPK10 der Mechanismus einer negativen Autoregulation durch ihren C-Terminus vorgeschlagen. Eine Verkürzung des C-Terminus um 46 Aminosäuren führte zu einer Erhöhung der Kinase-Aktivität von MPK10, gemessen sowohl für rekombinantes Protein LmjMPK10 $\Delta$ C als auch für GFP-LmjMPK10 $\Delta$ C aus Promastigoten. Während *L. donovani* Promastigoten, welche die überaktive Mutante GFP-LmjMPK10 $\Delta$ C exprimieren, keine Auffälligkeiten zeigten, kam es während der Differenzierung zu Amastigoten zu einem massiven Zellsterben. (Cayla et al., 2014). Der Mechanismus, wie der C-Terminus die Aktivität von MPK10 reguliert, ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass die Phosphorylierung bzw. Dephosphory-

lierung des Serin-Rests 395 in der C-terminalen Extension für die autoinhibitorische Regulation der Aktivität von LmjMPK10 von Bedeutung ist. Von Horjales et al. wurde 2012 die Kristallstruktur von LmjMPK10 ermittelt. Hier ergaben sich erste Hinweise, dass die C-terminale Extension sehr flexibel ist und möglicherweise direkt die ATP-Bindestelle behindert. Die TSA-Analyse (Fluorescence-based thermal shift assay) hat darüber hinaus gezeigt, dass das Protein bei Vorhandensein der C-terminalen Extension thermal stabiler ist (Horjales et al., 2012). Könnte LmxMPK7 ebenso einer Inhibition durch den C-terminalen Bereich unterliegen und dies die fehlende Kinaseaktivität von rekombinantem LmxMPK7 erklären? Der sich der Kinasedomäne anschließende C-terminale Bereich ist mit 90 Aminosäuren in LmxMPK7 und 88 Aminosäuren in *Leishmania*-MPK10 ähnlich lang. Viele MAPKs weisen eine der katalytischen Domäne C-terminal folgende  $\alpha$ -Helix zur Stabilisierung auf, so auch LmjMPK10 ( $\alpha$ 11-Helix lt. Röntgenstrukturanalyse) und LmxMPK7 (lt. Vorhersage). Eine Vorhersage von Sekundärstrukturelementen für die 46 Aminosäuren, welche der  $\alpha$ 11-Helix von LmjMPK10 folgen, bestätigte mit hoher Konfidenz das Vorliegen einer die ersten rund zwanzig Aminosäuren umfassenden  $\alpha$ -Helix. Dieser schließt sich wahrscheinlich einer Schleife folgend eine zweite kürzere  $\alpha$ -Helix an (Horjales et al., 2012). Für LmxMPK7 werden für diesen Sequenzbereich ebenfalls zwei  $\alpha$ -Helices vorhergesagt. Ein Sequenzvergleich liefert für LmxMPK7 jedoch keinen zum Serin-395 von MPK10 korrespondierenden Rest, obgleich zu den letzten 46 C-terminalen Aminosäuren von LmxMPK7 sieben Serin- bzw. Threonin-Reste zählen. Das Gesamtlängenprotein von LmjMPK10 lieferte für die Strukturanalyse Kristalle mit schlechten Beugungseigenschaften, während das Protein ohne C-terminale Extension Kristalle von weitaus besserer Qualität lieferte (Horjales et al., 2012). Minderwertige Kristalle und nachfolgend das Fehlen einer befriedigenden Elektronendichte in der Röntgen-Kristallographie kann ein Hinweis auf das Vorliegen eines Proteinbereichs mit flexibler räumlicher Konformation sein. Dies deckt sich insofern, dass mit dem Algorithmus DISOPRED3 die letzten 42 C-terminalen Aminosäuren von LmjMPK10 als „disordered“ vorhergesagt werden (Analyse nicht gezeigt). Bereiche die als „disordered“ vorhergesagt werden, fehlt eine fixierte dreidimensionale Struktur. Solche dynamischen Elemente finden sich in Proteinen z. B. in Linker-Regionen, Loops und Bereichen zur funktionellen Interaktion mit Biomolekülen (Dunker et al., 2001). Sie sind gekennzeichnet durch einen niedrigen Anteil an voluminösen, hydrophoben Aminosäuren und einem hohen Anteil an polaren und geladenen Aminosäuren (Romero et al., 2001). Für LmxMPK7 werden mit DISOPRED3 lediglich die letzten 17 C-terminalen Aminosäuren als „disordered“ vorhergesagt. Zur Klärung, ob dieser kurze, flexible Bereich ausreicht, um die Kinase in eine die Aktivität beeinträchtigende Konformation zu versetzen, wären weitere Untersuchungen, wie die Ermittlung der räumlichen Struktur, notwendig.

#### LmxMPK7 ohne lip-loop:

Interessanterweise wurde mittels DISOPRED3 ebenfalls der Sequenzabschnitt Aminosäureposition 284-327 von LmxMPK7 als „disordered“ vorhergesagt. Dieser Bereich deckt sich mit dem des zusätzlichen Sequenzeinschubs, den LmxMPK7 in der Aktivierungslippe aufweist. Diese Insertion stellt eine von dreien dar, welche LmxMPK7 im Vergleich zu anderen MAP-Kinase-Homologen von Leishmanien innerhalb ihrer Kinasedomäne besitzt (Wiese, 2007). Alle drei Insertionen finden sich in gleicher Länge und einem hohen Maß an Sequenzübereinstimmung im LmxMPK7-Homolog von *L. major*, *L. infantum* und *L. braziliensis* wieder. Die Aktivierungslippe der 15 MAP-Kinasen von *L. mexicana* besitzt eine Länge zwischen 25 und 34 Aminosäuren. Ausnahmen stellen LmxMPK7 und LmxMPK8 dar, deren Aktivierungssegment 76 bzw. 96 Aminosäuren lang ist. Die hierfür jeweils verantwortliche Insertion, der „lip-loop“, fügt sich als zusätzliche Schleife zwischen die Sekundärstrukturelemente der Subdomäne VII und VIII ein (Wiese, 2007). In Anlehnung an die Vorhersage, dass es sich bei dem lip-loop höchstwahrscheinlich um ein flexibles Element handelt und aufgrund seiner Lage in der Aktivierungslippe der Kinase, wurde folgende Hypothese aufgestellt: Es wäre denkbar, dass der lip-loop in der rekombinant hergestellten Kinase in einer räumlichen Konformation vorliegt, in der er eine korrekte Interaktion zwischen Kinase und Substrat behindert. Daher wurde eine Mutante LmxMPK7-loop erzeugt, welcher der lip-loop fehlt und diese auf ihre Aktivität untersucht. *LmxMPK7-loop* wurde erfolgreich als His- bzw. MalBP-Fusionsprotein exprimiert. Das zugehörige Protein konnte jeweils in einer ähnlichen Konzentration wie das der ungekürzten Variante von LmxMPK7 aufgereinigt werden. Sowohl His-LmxMPK7-loop als auch MalBP-LmxMPK7-loop zeigten im Kinase-Aktivitätstest keine Phosphorylierungsaktivität gegenüber sich selbst bzw. den artifiziellen Substraten MBP und Histon H1. Der im Vergleich zu den anderen MAPK vorhandene, zusätzliche lip-loop von LmxMPK7 scheint nicht für die fehlende Aktivität der Kinase *in vitro* verantwortlich zu sein. Die Funktion des lip-loop bleibt unbekannt. Vorstellbar wäre, dass diese strukturelle Besonderheit von LmxMPK7 aufgrund ihrer Lage in der Aktivierungslippe einen Beitrag zur Bindungspräferenz der Kinase liefert.

#### Fehlen spezifische Interaktionspartner?

Rekombinantes Protein von LmxMPK7 zeigte keine Aktivität gegenüber MBP, Histon H1 und  $\alpha$ -Casein im Kinasetest mit radioaktiv markiertem ATP. Die genannten drei artifiziellen Substrate werden häufig erfolgreich als universelle Kinase-Substrate im *in vitro* Aktivitätstest eingesetzt, so auch für Kinasen von Trypanosomatiden. Möglicherweise kommt die fehlende Phosphorylierungsaktivität gegenüber den artifiziellen Substraten dadurch zustande, dass LmxMPK7 diese nicht akzeptiert und nur ihr natürliches Parasiten-spezifisches Substrat als solches erkennt. Dem widerspricht, dass GFP-LmjMPK7, welches mittels Immuno-

präzipitation aus Leishmanien isoliert worden war, offenbar in der Lage war MBP im Kinase-Aktivitätstest zu phosphorylieren. Zwei Kinase-tote Formen von LmjMPK7 exprimiert in *L. major* waren hierzu nicht in der Lage (Morales et al., 2007). Entweder unterliegt MPK7 im Parasiten Modifikationen, welche dem rekombinaten Protein bei der Expression und Synthese in *E. coli* fehlen oder es sind weitere Interaktionspartner für die Kinasefunktion notwendig und diese fehlen in *E. coli*, oder sie kommen vor, werden jedoch nicht zusammen mit der Kinase aufgereinigt. Vorstellbar wären in diesem Zusammenhang assistierende Proteine, welche MPK7 in einem Komplex positiv in seiner Aktivität unterstützen oder Proteine, welche die Kinase vorab in eine aktive Konformation überführen. Bei letzterem wäre natürlich zuallererst an eine Phosphorylierung von MPK7 durch eine übergeordnete MAPKK zu denken. Assistierende Proteine, welche das Kinasesystem regulieren, könnten zum Beispiel Faltungshelfer, sogenannte Chaperone, Strukturproteine, Adaptorproteine u. a. sein. So sind in vielen Eukaryonten beispielsweise die Chaperone Hsp90 und Hsp70 Bestandteile eines multimeren Proteinkomplexes, in welchem sie die Funktion und den Abbau von Signalproteinen wie Steroidrezeptoren oder Proteinkinasen regulieren (Pratt et al., 2008). Bei der Aufreinigung von LmjMPK7, LmjMPK4 bzw. LmjMPK10 nach Überexpression in Leishmanien wurde jeweils Hsp70 co-präzipitiert (Morales et al., 2007). Es ist jedoch noch nicht bewiesen, ob diese Co-Aufreinigung von Hsp70 spezifisch erfolgt und dem eine biologische Relevanz zu Grunde liegt. Die Hauptklassen der Hitzeschockproteine werden in Leishmanien konstitutiv exprimiert, obgleich eine Temperaturerhöhung, wie sie der Umwandlung von Pro- zu Amastigoten vorangeht, zu einer vorübergehenden Erhöhung der Synthese von Hsp70 und Hsp90 (Hsp83) und anhaltenden Erhöhung von Hsp100 führt (Wiesgigl und Clos, 2001). Die quantitative 2D-DIGE Analyse von *L. donovani*-Extrakten zeigte für axenische Amastigoten im Vergleich zu Promastigoten eine Zunahme von Phosphoproteinen, welche zur Klasse der Chaperone zählen, darunter waren auch Vertreter der Hsp90- und Hsp70-Familie (Morales et al., 2010b). Welche Bedeutung der Phosphorylierung von Hitzeschockproteinen durch Proteinkinasen in Trypanosomatiden zukommt, ist noch nicht abschließend geklärt und auch nicht, welche Kinasen hierfür im Speziellen verantwortlich sind.

#### Phosphorylierung von LmxMPK7 durch übergeordnete Kinasen:

Immunopräzipitiertes GFP-LmjMPK7 wurde von Morales et al. (2007) mit Pro-Q<sup>®</sup>-Diamond, einem Fluoreszenzfarbstoff mit welchem Phosphorylierung an Serin-, Threonin- und Tyrosin-Resten detektiert werden kann, gefärbt. GFP-LmjMPK7 aus *L. major*, kultiviert für 12 Stunden und *L. donovani*, kultiviert für zwei Tage unter amastigoten Bedingungen wurde von der Pro-Q<sup>®</sup>-Diamond-Färbung erfasst, nicht jedoch GFP-LmjMPK7 aus den jeweiligen Promastigoten. Eine Aussage, an welchen Resten das episomale GFP-LmjMPK7 potentiell



phosphoryliert vorliegt, bleibt die genannte Studie schuldig. Eine Übertragung auf die Situation der endogenen MPK7 steht aus. In diversen Phosphoproteomstudien konnten bis dato keine phosphorylierten Peptide MPK7 zugeordnet werden. Mittels LC-MS/MS-Analyse wurden 13 MAP-Kinasen in Zellysaten von *L. mexicana* phosphoryliert vorgefunden, davon 11 in ihrem TxY-Motiv (Rosenqvist, Dissertation 2011) – ohne dass LmxMPK7 eine von ihnen war. Auch in Phosphoproteomstudien von *L. donovani* zeigte sich LdMPK7 nicht (Tsigankov et al., 2013). Über die Gründe hierfür kann spekuliert werden: In den meisten Phosphoproteomstudien dienten Promastigoten im logarithmischen Wachstumsstadium oder ausdifferenzierte Amastigoten als Untersuchungsmaterial. Es besteht die Möglichkeit, dass eine Phosphorylierung von MPK7 in einem davon verschiedenen Stadium, wie in Metazyklischen oder während der Differenzierungsinitiation, nur vorübergehend präsent ist und deshalb keine Phosphopeptide erfasst wurden. Abgesehen davon, dass es keine Gewährleistung gibt alle Phosphopeptide in einer Phosphoproteomstudie zu erfassen, können methodische Probleme existieren. So kann ein aus dem Trypsinverdau resultierendes, phosphoryliertes Peptid, eine für die MS/MS-Analyse ungünstige Masse aufweisen. Obgleich nach Trypsinverdau von LmxMPK7 ein das TDY-Motiv tragendes Peptid zu erwarten ist, mit einer günstig erscheinenden Masse von 2505,7462 Da (Aminosäure 319-342). Oder sein MS-Spektrum wird von dem eines anderen, ähnlich großen Peptids überlagert und entzieht sich dadurch der Erfassung.

Die klassische Aktivierung von MAP-Kinasen sieht die Phosphorylierung von beiden, Threonin- und Tyrosin-Rest des TxY-Motivs in der Aktivierungslippe der MAPK durch eine dualspezifische MAPKK vor, der eine MAPKKK übergeordnet ist. Acht von 15 MAPKs in Leishmanien besitzen ein TDY-Motiv – darunter auch LmxMPK7 (Wiese, 2007). Das rekombinante Protein der meisten MAPK-Homologen von Leishmanien weist im *in vitro* Test eine von der Anwesenheit einer MAPKK unabhängige Autophosphorylierungsaktivität und eine basale Aktivität gegenüber artifiziellen Substraten unterschiedlichen Ausmaßes auf – so auch das von LmxMPK3 und LmxMPK4. Die Autophosphorylierung von nicht-aktivierter LmxMPK3 und LmxMPK4 findet ausschließlich am Tyrosin-Rest des TxY-Motivs statt. Die für LmxMPK4 vermutete und für LmxMPK3 *in vivo* bestätigte übergeordnete MAPKK vermag neben dem Tyrosin-, auch den Threonin-Rest des TxY-Motivs zu phosphorylieren und hinterlässt so eine in ihrer Aktivität deutlich gesteigerte MAPK (John von Freyend, Dissertation 2010; Erdmann, Dissertation, 2009). Die erste in Leishmanien bestätigte Paarung von Homologen einer MAPK und einer übergeordneten MAPKK heißt: LmxMPK3 – LmxMCK (Erdmann und Scholz et al., 2006). Eine fehlende LmxMPK3-Aktivität führte zu verkürzten Flagellen in Promastigoten, dieser Phänotyp stimmte mit dem nach Deletion von *LmxMCK* überein. Das Vorhandensein von Homologen auf allen Ebenen der MAPK-Aktivierungskaskade, die bereits nachgewiesene Interaktion zwischen MAPK- und MAPKK-

Homologen, die Konservierung des TxY-Motivs in allen MAPK-Homologen und der Nachweis von Regulation der Kinase-Aktivität durch Phosphorylierung von TxY sind substantielle Anhaltspunkte dafür, dass die klassische MAPK-Aktivierungskaskade, zumindest zum Teil, in Leishmanien konserviert ist. Es besteht die Möglichkeit, dass LmxMPK7 erst nach Phosphorylierung durch eine spezifische MAPKK in den aktiven Zustand überführt wird. Deshalb wurde LmxMPK7 zusammen mit zwei, zum damaligen Zeitpunkt in rekombinanter Form zur Verfügung stehenden MAPKK-Homologen von *L. mexicana* im Kinase-Aktivitätstest auf Interaktion getestet. Für die Aktivierung des MAPK-Homologs Pfmap-2 von *P. falciparum* scheint kein Homolog mit einer hinreichenden Sequenzhomologie zu bekannten MAPKKs, sondern alternativ die NIMA-verwandte-Kinase Pfnek-1 von Bedeutung zu sein (Dorin et al., 2001). In Trypanosomatiden wurden allerdings noch keine alternativen Wege der MAPK-Aktivierung gefunden. Die Tatsache, dass sich unter den Substraten der humanen Glykogensynthase-Kinase 3 auch Kinasen befinden, war Grund genug, das rekombinante Protein beider GSK3-Homologe von Leishmanien in den Test auf Phosphorylierungsaktivität gegenüber LmxMPK7 einzuschließen. Die MAPKK-Homologen LmxMKK und LmxMKK4 und die GSK-3-Homologen LmxGSK3 $\alpha$  und LmxGSK3 $\beta$  nutzen LmxMPK7 im *in vitro* Test nicht als Substrat. Die Kombination von LmxMPK7 mit den anderen fünf in *L. mexicana* identifizierten MAPKK-Homologen stand am Ende dieser Arbeit noch aus.

Fazit: Obgleich für die Katalyse zentrale Reste mit identischen Aminosäuren besetzt sind, wie in anderen nachweisbar aktiven MAPKs von Leishmanien, weist rekombinante, in *E. coli* synthetisierte LmxMPK7 keine Aktivität auf. Mögliche Erklärungen hierfür könnten in den zusätzlichen Sequenzinsertionen der Kinase oder dem Fehlen von spezifischem Substrat, Aktivator oder anderen Interaktionspartnern zu finden sein. Die Überlegung, dass es sich bei MPK7 womöglich um eine „Pseudokinase“ handeln könnte, deren biologische Relevanz nicht mehr oder nur noch partiell durch eine rudimentäre Kinaseaktivität begründet ist, wird verworfen, da GFP-LmjMPK7 isoliert aus Leishmanien offensichtlich eine Phosphorylierungsaktivität aufwies (Morales et al., 2007).

#### 4.1.2 Deletion von LmxMPK7 in *Leishmania* – die Erste

Welche biologische Relevanz besitzt LmxMPK7 in Leishmanien? Welche zelluläre Funktion übernimmt die Kinase und zu welchem Zeitpunkt des komplexen Lebenszyklus des Parasiten ist diese von Bedeutung? Als erster Schritt sollte eine Nullmutante von *LmxMPK7* generiert werden. Hierzu wurde eines der beiden Allele von *LmxMPK7* mittels homologer Rekombination über die flankierenden, nicht-codierenden Bereiche gegen ein für eine Antibiotika-Resistenz codierendes Gen ausgetauscht. In mehreren unabhängigen Durchläufen war es jedoch nicht gelungen, das zweite Allel von *LmxMPK7* in der heterozygoten

Einzelalleldeletionsmutante  $\Delta LmxMPK7(+/-)$  zu ersetzen. Bei dem Versuch des Gen-Knockout hatten die Promastigoten, wie die Southern Blot-Analyse zeigte, mit einer Verdopplung der betreffenden Genregion reagiert. Dadurch war es den Zellen möglich, das lebenserhaltende Resistenzgen unter Beibehaltung des *LmxMPK7*-Gens in das Genom zu integrieren. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass Leishmanien als Anpassungsreaktion an veränderte und widrige Bedingungen eine Veränderung der Genzahl herbeiführen. Dies geschieht zumeist durch Vervielfältigung einzelner Chromosomen (Rogers et al., 2011). Im Rahmen eines Deletionsversuchs scheint dieses Verhalten dafür kennzeichnend zu sein, dass das auszuschaltende Zielgen eine potentiell essentielle Funktion in dem Lebensstadium übernimmt (Cruz et al., 1993). Die fehlende Deletierbarkeit von *LmxMPK7* macht es sehr wahrscheinlich, dass die Kinase für das promastigote Stadium essentiell ist.

#### Umgehen der fehlenden Deletierbarkeit durch Einbringen einer episomalen Kopie der Kinase:

Nachfolgend wurde *LmxMPK7* zusammen mit einem Teil der sich anschließenden stromab-Region auf einem Plasmid in die heterozygote Einzelalleldeletionsmutante  $\Delta LmxMPK7(+/-)$  eingebracht und anschließend versucht, die verbliebene genomische Kopie von *LmxMPK7* gegen ein Resistenzgen auszutauschen (Kruse und Wiese, unpublizierte Daten). Trotz Anwesenheit der episomalen Kopie war es nicht möglich *LmxMPK7* genomisch zu deletieren. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich innerhalb der auf dem Plasmid befindlichen, rund 1500 bp langen 3'-Region von *LmxMPK7* Elemente befinden, die die Expression der Kinase einer Regulation unterwerfen. Die Regulation der Genexpression läuft in Leishmanien überwiegend auf post-transkriptionaler Ebene ab (Clayton, 2002). Vor allem Sequenzabschnitte innerhalb der 3'-untranslatierten Region von mRNAs, welche die RNA-Stabilität oder Translationseffizienz beeinflussen, scheinen hierfür von Bedeutung zu sein (McNicoll et al., 2005). Solche regulatorischen Elemente könnten auch in der stromab-Region von *LmxMPK7* vorhanden sein und zu keiner ausreichenden episomalen Expression der Kinase in Promastigoten führen.

Daher wurde im nächsten Schritt ein Plasmid erzeugt, welches ausschließlich den ORF von *LmxMPK7*, ohne jegliche flankierenden Bereiche, trägt. Dieses wurde erfolgreich in Promastigoten von  $\Delta LmxMPK7(+/-)$  transfiziert. Episomale *LmxMPK7* sollte zum einen ohne und zum anderen mit N-terminalem bzw. C-terminalem TY-Tag in Leishmanien exprimiert werden. Klone, für welche eine Expression und Synthese von episomalem *LmxMPK7*-TY im Immunoblot mittels anti-TY-Antikörper bestätigt werden konnte, wurden erneut transfiziert, um die eine verbliebene genomische Kopie von *LmxMPK7* zu eliminieren. Insgesamt wurden in 12 verschiedenen Ansätzen sieben unterschiedliche Klone mit zweierlei Resistenzgenen transfiziert, mit dem Resultat, dass lediglich drei Einzelklone erzeugt werden konnten,

welche laut Ergebnis der Southern Blot-Analyse die genomische Kopie von *LmxMPK7* verloren hatten und *LmxMPK7* ausschließlich extrachromosomal trugen. Alle drei Klone (B10, D3, H8) der Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6MPK7TYC-ds stammten vom gleichen Vorgängerklon (4TYC 2A4) ab. Die Mutante besaß die Fähigkeit *in vitro* zu differenzieren. Die Morphologie von axenischen Pro- und Amastigoten war unauffällig.

#### 4.1.3 Proteinnachweis von LmxMPK7 in Pro- und Amastigoten von Wildtyp-Leishmanien und Proteinniveau unterschiedlicher Mutanten

Das in Kaninchen hergestellte, gegen ein C-terminales Peptid von Leishmanien-MPK7 gerichtete Antiserum erkannte das in *E. coli* generierte rekombinante His- bzw. MalBP-Fusionsprotein von LmxMPK7. In Gesamtzelllysaten von *L. mexicana*-Promastigoten, drei Tage alten axenischen Amastigoten und Amastigoten präpariert aus Mausfußläsionen erkannte das Antiserum, jedoch nicht das zugehörige Präimmunserum, im Immunoblot eine Bande auf der zu erwartenden Laufhöhe von endogenem LmxMPK7. Die Zuordnung zu LmxMPK7 wurde dadurch gesichert, dass eben jene Bande in Lysaten der LmxMPK7-Nullmutante fehlte. Die Existenz der Nullmutante wird hier vorweggenommen, ihre Entstehung wird noch unter 4.1.5 besprochen. LmxMPK7 scheint sowohl im promastigoten als auch amastigoten Lebensstadium exprimiert zu werden und somit höchstwahrscheinlich eine Aufgabe zu erfüllen. Die LmxMPK7-Bande war in den Spuren von Zelllysaten aus Wildtyp-Leishmanien schwach zu erkennen und nach längerer Filmexposition von 20 bis 45 Minuten erst wahrnehmbar. Dies legt nahe, dass es sich bei endogenem LmxMPK7 um ein physiologisch eher in geringen Mengen produziertes zelluläres Protein handelt. Die Gegenüberstellung von Wildtyp-Lysaten unterschiedlicher Stadien muss im selben Immunoblot erfolgen, um die Proteinmenge von LmxMPK7 vergleichen zu können. Dies wurde allerdings nicht ausreichend oft wiederholt, um eine verlässliche Aussage über etwaige stadienabhängige Unterschiede der endogenen Kinasemenge machen zu können. Die mRNA-Menge von *LmxMPK7* ist in Amastigoten höher als in Promastigoten (Wiese et al., 2003b). Einen Hinweis darauf, dass die Aktivität von MPK7 für das amastigote Lebensstadium eine Rolle spielt, meinte Morales et al. (2007) für episomal exprimiertes, durch Immunpräzipitation gewonnenes GFP-LmjMPK7 gefunden zu haben. So zeigte GFP-LmjMPK7 eine erhöhte Phosphorylierungsaktivität gegenüber MBP, wenn die Kinase aus Zellen von *L. major* stammte, welche für 12 Stunden bzw. *L. donovani*, welche für zwei Tage unter amastigoten Bedingungen kultiviert worden waren. Dies wurde mit Isolaten aus Promastigoten verglichen.

##### Vergleich der episomalen Überexpressoren:

Das Plasmid pX6LmxMPK7TYC-ds, welches den ORF von LmxMPK7-TY trägt, wurde in Wildtypzellen transfiziert. Die entstandene Mutante *LmxMPK7(+/+)* + pX6MPK7TYC-ds

wurde nachfolgend für einige wenige Vergleiche zu anderen Mutanten herangezogen. Promastigotengesamtzelllysate von *L. mexicana* Wildtyp und von verschiedenen Mutanten wurden einander im Immunoblot gegenübergestellt. Der Nachweis erfolgte mit monoklonalem anti-TY-Antikörper (BB2) und anti-LmxMPK7-Antiserum (5109). Das Expressionsniveau von LmxMPK7-TY war im Vergleich wie folgt zu bewerten:  $\Delta LmxMPK7(-/-) + pX6LmxMPK7TYC-ds \gg LmxMPK7(+/) + pX6LmxMPK7TYC-ds > LmxWildtyp$ . In Promastigoten, welche pX6LmxMPK7TYC-ds tragen, überstieg das Niveau von LmxMPK7-TY das der endogenen Kinase, sprich bei diesen Mutanten handelte es sich nachweislich um episodale Überexpressoren. Bei Bewertung des Ergebnisses der Gegenüberstellung der beiden episodalen Überexpressoren muss berücksichtigt werden, dass von beiden Mutanten je nur ein Klon in die Untersuchung einging. Für die einzelnen Klone der Mutante  $LmxMPK7(+/) + pX6LmxMPK7TYC-ds$  wurden Unterschiede im Expressionsniveau der Kinase beobachtet. Allerdings handelte es sich bei dem für den Vergleich herangezogenen Klon C3 um einen Klon, für den eines der höchsten Expressionsniveaus in Voruntersuchungen im Immunoblot nachgewiesen worden war. Der Klon C3 zeigte im Vergleich eine etwas mehr als doppelt so starke Expression von *LmxMPK7* als der Wildtyp. Alle drei Klone der Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-) + pX6LmxMPK7TYC-ds$  zeigten eine sehr starke Expression und Synthese von LmxMPK7-TY. Die des Klons, welcher in die Gegenüberstellung einging, überstieg laut Immunoblot mittels anti-MPK7-Antiserum die Menge an endogener LmxMPK7 von Wildtyp-Promastigoten um mindestens das 16-fache. Es wäre denkbar, dass die Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-) + pX6LmxMPK7TYC-ds$  das Fehlen der genomischen Kopie von *LmxMPK7* durch eine erhöhte Expression der Kinase vom Plasmid auszugleichen versucht. Diese Vermutung drängt sich auf, wenn man im Vergleich das sehr viel niedriger ausfallende episodale Expressionsniveau des mit dem Plasmid transfizierten Wildtyps betrachtet, der noch auf beide genomische Kopien von *LmxMPK7* zurückgreifen kann.

#### Kein Nachweis von LmxMPK7 in Amastigotenlysaten der Mutanten:

In Lysaten aus drei Tage differenzierten, axenischen Amastigoten war keine LmxMPK7-TY-Bande im Immunoblot zu sehen weder mit dem anti-TY-Antikörper noch nach Strippen des Blots mit dem anti-MPK7-Antiserum. Für die episodalen Überexpressoren erstaunte dies weniger, da diese offensichtlich die Menge an episodaler LmxMPK7-TY im Kulturverlauf reduzieren. Dieser Sachverhalt wird nachfolgend noch genauer beleuchtet. Allerdings wäre zu erwarten gewesen, dass die Wildtyp-Situation abgebildet wird und das anti-MPK7-Antiserum die endogene LmxMPK7 im Lysat axenischer Amastigoten erkennt. Dass dem nicht so war, könnte darauf zurückzuführen sein, dass es während des Waschvorgangs zur Entfernung des anti-TY-Antikörpers zu Proteinverlusten gekommen war und dadurch die Nachweisgrenze des anti-MPK7-Antiserums im Immunoblot unterschritten wurde. Das mit

anti-TY-Antikörper erzeugte kräftige Signal für den episomalen Überexpressor fiel nach Strippen und Nachweis mit anti-MPK7-Antiserum, trotz gleicher Expositionsdauer des Films, um einiges schwächer aus. Zum einen könnte dies daran liegen, dass der anti-TY-Antikörper eine höhere Bindungsaffinität als das anti-MPK7-Antiserum besitzt, zum anderen könnte diese Beobachtung auch durch Proteinverlust erklärt werden. Für einen Proteinverlust spricht, dass das anti-MPK7-Signal in Promastigotenlysaten des Wildtyps auf dem Blot nach Strippen um ein Vielfaches schwächer ausfiel, als von vorangegangenen Durchläufen gewohnt. Das Fehlen der für das anti-LmxMPK7-Antiserum normalerweise vorhandenen Kreuzreaktionsbande auf Höhe von ~48 kDa untermauert diese Annahme. Allem Anschein nach bewegt sich der Nachweis von LmxMPK7 bei der in Zelllysaten vorhandenen, vermutlich geringen endogenen Kinasemenge nahe der Detektionsgrenze des anti-MPK7-Antiserums im Immunoblot.

#### Leishmanien-spezifische Kreuzreaktion von BB2:

Vom verwendeten anti-TY-Antikörper BB2 wurde im Immunoblot zudem eine sehr starke Kreuzreaktionsbande auf Höhe von ~33 kDa erkannt. Diese überstrahlte bei maximaler Exposition des Films den Größenbereich ~28-42 kDa beinahe vollständig. Die Suche in der *L. mexicana* Datenbank nach dem Peptid HTNQDP, welches vom BB2-Antikörper im 10 Aminosäuren langen TY-Epitop erkannt wird (Brookman et al., 1995), ergab keinen Treffer mit hundert Prozent Übereinstimmung. Es fand sich jedoch das Peptid HNQDP in LmxM.16.1390, dessen Protein als putative EMG1/NEP1-Methyltransferase ausgewiesen wird. Mitglieder dieser Familie sind essentiell für die Biogenese von 40s-Ribosomen und sind im Nukleolus anzutreffen (Thomas et al., 2011). Das vorhergesagte Molekulargewicht von 32,6 kDa würde zur Laufhöhe der Kreuzreaktionsbande passen. In Protozoen kam der TY-Tag zuerst in *T. brucei* zum Einsatz. Die in Leishmanien-Lysaten erkannte Kreuzreaktion wurde jedoch für *T. brucei*-Protein nicht gefunden (Bastin et al., 1996). Das Homolog des kreuzreaktiven Proteins in *T. brucei* Tb927.8.5040 (~31,1 kDa) besitzt anstelle von HNQDP das Peptid YKQDP, welches noch weniger Übereinstimmung mit dem erkannten Epitop zeigt. Dies könnte der Grund sein, warum der anti-TY-Antikörper keine Kreuzreaktion in Lysaten von *T. brucei* besitzt.

Dass sich die Kreuzreaktionsbande im Vergleich zur LmxMPK7-TY-Bande überaus stark ausnimmt, lässt vermuten, dass es sich bei dem BB2-Antikörper um einen potenten, bindungsaffinen Antikörper handelt und bestärkt die Hypothese, dass LmxMPK7 in der Zelle in sehr geringer Menge synthetisiert wird.

#### 4.1.4 Episomale Expression von LmxMPK7-TY und ihre Folgen – Potentielle Bedeutung der Kinasemenge

##### Klonale Unterschiede der Expression auf Gesamtzelebene:

Vergleicht man die Klone der Mutante  $\Delta LmxMPK7(+/-)$  + pX\_LmxMPK7TY\_-ds und  $LmxMPK7(+/+)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds jeweils untereinander, so fällt auf, dass die mit anti-TY-Antikörper im Immunoblot des aufgetrennten Promastigotenlysats nachgewiesene LmxMPK7-TY-Bande von Klon zu Klon unterschiedlich stark ausfällt. Für alle Klone von  $\Delta LmxMPK7(+/-)$  + pX10LmxMPK7TYN-ds ist in der Southern Blot-Analyse die Anwesenheit des, die episodale Kopie von  $LmxMPK7-TY$  tragenden Plasmids bestätigt worden. Trotzdem fanden sich im Immunoblot Klone, für die kein korrespondierendes Protein detektiert werden konnte. Das Expressionslevel von LmxMPK7-TY dieser Klone ist vermutlich unterhalb der Detektionsgrenze des Antikörpers anzusiedeln.

Beim Versuch die genomische Kopie von  $LmxMPK7$  in der Mutante  $\Delta LmxMPK7(+/-)$  + pX\_LmxMPK7\_-ds zu deletieren fiel die Transfektionseffizienz sehr niedrig aus. Vom Ausgangsklon 4TYC 2A4 gingen alle drei Klone der Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds hervor. Interessanterweise zeigte 4TYC 2A4 im Immunoblot auf Promastigotenlysaten, im Vergleich zu den anderen transfizierten Klonen 3TYC 2B11, 3TYC 2G7, 4TYN 1B2 und 3TYN 1E9 das niedrigste Expressionsniveau an episomalem LmxMPK7-TY. Man könnte meinen, je mehr LmxMPK7-Protein der Zelle durch Expression vom Plasmid ersatzweise zur Verfügung steht, desto eher ist sie bereit die genomische Kopie von  $LmxMPK7$  aufzugeben. Dass dem nicht so war, könnte ein Indiz dafür sein, dass LmxMPK7 in zu hohen Mengen nicht so einfach von Leishmanien toleriert wird. Diese Hypothese wird im weiteren Verlauf der Diskussion noch durch andere Fakten gestützt. Möglicherweise ist das epismal erzeugte Proteinniveau von LmxMPK7 im Klon 4TYC 2A4 dem niedrigen Niveau der endogenen Kinase von Wildtyp-Zellen am ähnlichsten und dies eine gute Ausgangsposition für Promastigoten die genomische Kopie der Kinase zu verlieren.

##### Heterogenität auf Einzelzelebene:

Im Immunoblot kann lediglich die durchschnittliche LmxMPK7-TY-Menge in der Gesamtpopulation ermittelt werden. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie ist es hingegen möglich, das Expressionsniveau von LmxMPK7-TY auf Einzelzelebene aufzuschlüsseln. Benutzt wurde der anti-TY-Antikörper BB2, welcher nicht nur für den Einsatz im Immunoblot, sondern auch für die Immunfluoreszenzmikroskopie geeignet ist (Brookman et al., 1995). Die Kontrolle mit Wildtyp-Zellen ergab kein Signal. Demnach kann die Fluoreszenzfärbung der Bindung des Antikörpers LmxMPK7-TY zugeordnet werden und leitet sich nicht von der, in Mutanten als auch im Wildtyp, im Immunoblot abgebildeten Kreuzreaktion ab. Auch eine

unspezifische Reaktion des, den grünen Fluoreszenzfarbstoff tragenden Zweitantikörpers wurde ausgeschlossen. Warum zeigt der BB2-Antikörper eine starke Kreuzreaktivität im Immunoblot, jedoch nicht in der Immunfluoreszenz? Vielleicht ist das von ihm erkannte Epitop im kreuzreaktiven Protein nur unter stark denaturierenden Bedingungen zugänglich, wie sie bei der dem Immunoblot vorangehenden Probenaufbereitung für SDS-PAGE vorliegen.

Für Promastigoten der Mutante  $\Delta LmxMPK7(+/-)$  + pX\_LmxMPK7TY\_-ds sowie Promastigoten und axenische Amastigoten der Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds lieferte die Immunfluoreszenzmikroskopie ein Spektrum an unterschiedlich stark leuchtenden Zellen. Die Mehrheit der Zellen zeigte eine mittlere bis schwache Färbung, daneben fanden sich aber auch kräftig gefärbte Zellen. Die stark leuchtenden Zellen waren keinem bestimmten Stadium zuzuordnen, zu ihnen zählten sowohl Zellen, die sich in der Zellteilung befanden als auch Zellen in einem morphologisch davon unterschiedlichen Zellzyklusstadium. In drei Tage alten Amastigoten fiel der Nachweis von LmxMPK7-TY in der Fluoreszenzmikroskopie insgesamt um einiges schwächer aus als in den zugehörigen Promastigoten einer logarithmischen Kultur. Bereits in früheren Untersuchungen wurde in Trypanosomatiden die Beobachtung gemacht, dass die Expression und Synthese eines Proteins von einem Episom innerhalb einer transfizierten klonalen Zellpopulation sehr heterogen ausfallen kann (z. B. in *T. cruzi*, Taylor und Kelly, 2006). So auch beispielsweise die Expression von *LmxMBAP* vom Plasmid in transfizierten Leishmanien des Wildtyps (Benzel et al., 2000). Offensichtlich machte es für die Expression hierbei keinen Unterschied, dass das genutzte Plasmid pXPHLEOLmxMBAP zusätzlich zum Gen 1,7 kb der 3'UTR enthielt (Wiese et al., 1996). Es wird davon ausgegangen, dass eine heterogene Expression in der Gesamtpopulation auf Unterschieden in der Kopienzahl des Plasmids pro Zelle beruht. Erwartungsgemäß wächst eine Zellpopulation von einem einzigen transfizierten Einzelklon ausgehend hoch. Somit entstehen Unterschiede in der Plasmidkopienzahl im Laufe der Kultivierung entweder durch autonome Replikation des Plasmids (Papadopoulos et al., 1994) und/oder während der Zellteilung durch ungleichmäßige Verteilung der vorliegenden Kopien auf die Tochterzellen. Zudem wird vermutet, dass die Subpopulation an Zellen, welche das vorteilhafteste episomale Expressionsniveau aufweist einen Selektionsvorteil besitzt und es mit zunehmender Kulturzeit zur Dominanz dieser in der Gesamtpopulation kommt (Ubeda et al., 2014). Interessanterweise kann es zu Unterschieden im Expressionsmuster kommen, abhängig davon, ob ein Expressionskonstrukt in zirkulärer oder linearer Form eingebracht wird. Die lineare Version eines, die Information für das Zielprotein tragenden induzierbaren Konstrukts führte in damit transfizierten *L. tarentolae* zu einer homogenen, kräftigen Synthese des Zielproteins, während dies für weniger als 20 % der mit der zirkulären Form transfizierten Zellen der Fall war (Kushnir et al., 2011). Die Klone mit



heterogenem Expressionsmuster zeigten sich offenbar in Anzahl und Größe des zirkulären Plasmids sehr variabel. pX\_LmxMPK7TY\_-ds wurde in zirkulärer Form in *L. mexicana* eingebracht. Das Vorliegen eines heterogenen Expressionsmusters in einer klonalen Zellpopulation kann Vor- und Nachteile für weitere zellbiologische Untersuchungen haben. Potentielle Effekte einer LmxMPK7-Überexpression könnten durch das Vorliegen von vielen, die Kinase nur sehr schwach exprimierenden Zellen in der Gesamtpopulation durch Mittelung abgeschwächt werden. Andererseits könnten Vorhaben für welche eine bestimmte Menge des Zielproteins günstig ist durch das Vorliegen von Zellen mit unterschiedlichem Expressionsniveau überhaupt erst ermöglicht werden. Hierzu könnte die Deletion der genomischen Kopie von *LmxMPK7* zählen.

#### Abnahme von LmxMPK7-TY im Kulturverlauf:

Weiter wurde untersucht, wie sich die Menge an LmxMPK7-TY im Kulturverlauf verhält. Frisches Medium, versetzt mit dem Selektionsantibiotikum Puromycin, wurde mit einer niedrigen Zahl an Promastigoten angeimpft. Es sollten alle Wachstumsphasen einer Kultur von Promastigoten bzw. nach Differenzierung von axenischen Amastigoten abgebildet werden. Hierfür wurden Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen. Anhand der Zellzahl wurde eine Wachstumskurve erstellt. Dieser wurde, nach Auftrennung des Gesamtzellproteins und Detektion mittels anti-TY-Antikörper BB2 im Immunoblot, die nachgewiesene Menge an LmxMPK7-TY zu den verschiedenen Zeitpunkten gegenübergestellt. Es zeigte sich für die untersuchten Klone der Mutante  $\Delta LmxMPK7(+/-)$  + pX\_LmxMPK7TY\_-ds als auch für Klone der Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds eine deutliche Abnahme der nachgewiesenen Proteinmenge von LmxMPK7-TY mit Zunahme der Zelldichte und Dauer der Kultur. Das Phänomen setzte für Promastigoten nach einer Kulturdauer von ungefähr 48 Stunden ein. Die Zelldichte betrug zu diesem Zeitpunkt je nach Mutante zwischen 3 und  $5 \times 10^7$  Zellen pro ml. Bei einer Zelldichte von  $6 \times 10^7$  Promastigoten pro ml war auf dem Film nur noch eine schwache Bande zu erkennen. Bei Zelldichten von  $8 - 10 \times 10^7$  Z/ml nach 72 Stunden Kultivierung bewegte sich die Proteinmenge von LmxMPK7-TY schließlich unterhalb der Nachweisgrenze der Methode. Die nachgewiesene Menge an LmxMPK7-TY war in axenischen Amastigoten ab 24 Stunden nach Beginn der Differenzierung deutlich rückläufig. Nach zwei Tagen in Kultur schlug der Nachweis von LmxMPK7-TY im Immunoblot in Amastigoten der Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds fehl. Aus der Verminderung der Kinasemenge könnte man ableiten, dass LmxMPK7 für das weniger teilungsaktive, spät-logarithmische bzw. stationäre Wachstumsstadium physiologisch keine Rolle spielt. Dagegen sprechen jedoch die folgenden Ergebnisse: Wenngleich auch sehr schwach, konnte mittels Immunfluoreszenzmikroskopie LmxMPK7-TY noch in drei Tage alten Amastigoten der Mutante, welcher *LmxMPK7* ausschließlich episomal zur Verfügung steht,

nachgewiesen werden. Für den Nachweis von LmxMPK7-TY unter Einsatz des anti-TY-Antikörpers BB2 scheint die Immunfluoreszenzmikroskopie offenbar eine höhere Sensitivität als der Immunoblot zu besitzen. Zudem konnte, wie zuvor besprochen, endogenes LmxMPK7 in Promastigoten einer spät-logarithmischen Kultur und drei Tage alten Amastigoten des Wildtyps unter Einsatz des anti-MPK7-Antiserums im Immunoblot nachgewiesen werden.

Die Abnahme der zellulären Proteinmenge von LmxMPK7-TY im Laufe der Kultur könnte zum einen auf eine rückläufige Expression bzw. Synthese der Kinase zurückzuführen sein und zum anderen an einem vermehrten Abbau des Proteins liegen – oder beides? Beispielsweise wird die zelluläre Proteinmenge und somit Aktivität von ERK7 in Säugerzellen unter anderem vermutlich über den Abbau der Kinase auf dem Ubiquitin-Proteasomen-Weg reguliert (Kuo et al., 2004). Es fällt auf, dass es sich für die Mutanten  $\Delta LmxMPK7(+/-)$  + pX\_LmxMPK7TY\_-ds und  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds gleich verhält, dass die Menge von episomalem LmxMPK7 abnimmt. Offenbar scheint dies unabhängig davon zu geschehen, ob endogene Kinase genomisch exprimiert wird. Auf dem Plasmid sind durch das Fehlen von UTRs von *LmxMPK7* keine regulatorischen Elemente vorhanden, welche potentiell die exprimierte Kinasemenge spezifisch steuern könnten. Beides legt nahe, dass ein Zusammenhang bestehen könnte zwischen der zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultur episomal exprimierten Kinasemenge und der Art und Weise, wie das gewählte Expressionssystem des pX63polPAC-Plasmids im Allgemeinen arbeitet. Alle zur episomalen Expression von LmxMPK7-TY befähigten Klone zeichnen sich durch eine vom Plasmid codierte Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Puromycin (PAC) aus. Der für die Expression in Leishmanien benötigte Anteil von pX63polPAC ist im Wesentlichen wie folgt aufgebaut: Das PAC-Resistenzgen (Freedman und Beverley, 1993) wird von der stromauf- und stromab-Intergenen Region (IR) des DHFR-TS-Gens flankiert. Die Spleißerkennungssequenz und Polyadenylierungsstelle sind in den IRs enthalten (LeBowitz et al., 1990). Die stromab-IR von *DHFR-TS* stellt darüber hinaus die Spleißerkennungssequenz für die Transkription des an ihrem 3'-Ende in das Plasmid pXLmxMPK7TY-ds eingebrachten *LmxMPK7-TY* zur Verfügung. Eine Erhöhung der Kulturkonzentration des Selektionsantibiotikums führte zu einer Erhöhung der Kopienzahl des pX-Plasmids und nachfolgend Erhöhung der Expression von getesteten Reporter-Genen (LeBowitz et al., 1990). Es besteht somit eine gewisse Abhängigkeit der synthetisierten Proteinmenge des episomal exprimierten Gens von der Wirkung des Selektionsantibiotikums. Puromycin wird zu Beginn der Kultivierung zugesetzt. Es wäre vorstellbar, dass seine Wirkkonzentration im Laufe der Kultivierung und mit Zunahme der Zellzahl abnimmt. Dieser Umstand könnte auf einen Zerfall des Glycopeptidantibiotikums oder Akkumulation in der Zelle zurückzuführen sein. Eine Abhängigkeit der Puromycinwirkung von der Zelldichte wurde für kultivierte Schweine-

nierzellen demonstriert (Cass, 1972). Diese Zellen zeigten sich in hoher Zelldichte resistent gegenüber einer normalerweise tödlichen Konzentration an Puromycin und wuchsen weiter. Es wäre denkbar, dass die im Immunoblot nachgewiesene Abnahme der produzierten LmxMPK7-TY-Menge auf eine Verminderung der wirksamen Puromycin-Konzentration über die Kulturdauer bzw. bei hoher Zelldichte zurückzuführen ist. Eine Abnahme der wirksamen Puromycin-Konzentration könnte zu einer Verminderung der Plasmidkopienzahl geführt haben. Vermutlich erfolgt die Expression von *PAC* und *LmxMPK7* aufgrund der polycistronischen Transkription gekoppelt und liefert prozessierte reife mRNA in äquivalenter Menge. Folgendes Experiment könnte Aufschluss geben, ob die Verminderung der exprimierten Kinasemenge im Zusammenhang mit einer Abnahme der wirksamen Puromycinkonzentration in Kultur steht: Eine Leishmanienkultur wird nach zwei Tagen Kultivierung in mit Puromycin in der Ausgangskonzentration versetztes Medium überführt und beobachtet, ob ein Abfall der Proteinmenge an episomalem LmxMPK7-TY dadurch aufgehalten werden kann.

Gegen die Annahme, die Verminderung der vom Plasmid exprimierten Kinasemenge sei alleinig auf ein Nachlassen der Puromycinwirkung zurückzuführen, sprechen die folgenden Erkenntnisse. Für eine episodale Komplementation der Nullmutante von LmxMPK9 wurde das gleiche Ursprungsplasmid pX63poPAC benutzt (Bengs et al., 2005). Im Immunoblot mit anti-LmxMPK9-Antiserum wurde kein Verschwinden der LmxMPK9-Bande in stationären Promastigoten im Vergleich zu einer logarithmisch wachsenden Kultur beobachtet. LmxMPK9 scheint für die Flagellenmorphogenese von Bedeutung zu sein und kommt ausschließlich im promastigoten Lebensstadium vor. Die Menge an LmxMPK9 nahm nicht ab, wie dies für LmxMPK7-TY bei fortgeschrittener Kulturdauer der Fall war. Möglicherweise ist der Unterschied darin zu finden, dass LmxMPK9 in Promastigoten, unabhängig von Kulturdauer bzw. Wachstumsstadium, generell eine Rolle zukommt. Deshalb wird durch den Bedarf in der Nullmutante getriggert, sowohl die LmxMPK9-Expression vom Plasmid in unverminderter Stärke über die Kulturzeit aufrechterhalten als auch das Protein nicht in den Abbau geschickt. Dies könnte sich für die Überexpression von LmxMPK7-TY anders verhalten. Womöglich wird LmxMPK7 nicht in der großen Menge, wie sie durch die PAC-Resistenz getriggert produziert wird, im Allgemeinen oder speziell im stationären Stadium benötigt. Dafür spricht die nachgewiesene schwache Expression und Synthese von endogener LmxMPK7. Sollte Puromycin als möglicher Auslöser der starken MPK7-Expression im Kulturverlauf zu irgendeinem Zeitpunkt in den Hintergrund treten, könnte dies eine Reduktion der unverhältnismäßig hohen MPK7-Menge zur Folge haben. Es obliegt weiteren Untersuchungen hierüber Aufschluss zu geben.

Endogene LmxMPK7 konnte in stationären Promastigoten und drei Tage alten Amastigoten des Wildtyps nachgewiesen werden. Dies macht es unwahrscheinlich, dass das Ergebnis,

dass episomales LmxMPK7-Protein bei höheren Zelldichten reduziert wird, direkt auf die Wildtyp-Situation übertragen werden kann.

#### Verminderung der Virulenz im Mausinfektionsexperiment:

Drei Klone der Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds sowie der diesen Klonen zugrundeliegende Klon 4TYC2A4 der Mutante  $\Delta LmxMPK7(+/-)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds lieferten im Mausinfektionsexperiment folgendes Ergebnis: Vier von 13 infizierten Mäusen bildeten bis zur 68. Woche keine Läsion am mit Leishmanien infizierten Hinterlauf aus. Während Promastigoten des *L. mexicana* Wildtyps in der Regel bereits innerhalb der ersten vier Wochen p. i. zu Fußläsionen führen, kam es in neun der 13 Mäuse infiziert mit Promastigoten der Mutanten erst zwischen der 36. und 60. Woche p. i. zur Ausbildung und Progression einer Leishmanienläsion. Dies verhielt sich für beide, *LmxMPK7* episomal überexprimierenden Mutanten gleich. Womöglich stört LmxMPK7 in unnatürlich hoher Menge, wie sie potentiell in den Überexpressoren zu finden ist, das Infektionsverhalten von Promastigoten.

Von Morales et al. (2010a) wurde dieser Phänotyp bestätigt und für Überexpressoren von *LmjMPK7*, dem Homolog von *LmxMPK7* in *L. major*, ebenso eine Verminderung der Virulenz im Mausinfektionsexperiment beobachtet. Für Promastigoten von *L. major*, welche zusätzlich zum Wildtyp-Hintergrund GFP-*LmjMPK7* episomal exprimierten, war erstmals nach sieben Wochen, und damit vier Wochen später als der Wildtyp, die Entstehung von Fußläsionen zu beobachten. Die Infektion mit Mutanten, welche episomal eine Kinase-tote-Version von *LmjMPK7* exprimierten, lief mit zum Wildtyp vergleichbarer Virulenz ab. Dies zeigte, dass die beeinträchtigte Virulenz von *L. major* auf die Aktivität der überexprimierten Kinase *MPK7* zurückzuführen war. Der Überexpression von *LmjMPK7* lag ein anderes als das in dieser Arbeit genutzte Expressionsplasmid zu Grunde, das Plasmid pXG+GFP+2'. Dieses trägt neben der Information für GFP, als Abkömmling vom pX63NEO-Plasmid, auch die der Neomycin-Resistenz (Ha et al., 1996). Welcher Mechanismus hinter der Verzögerung der Infektion mit dem *L. major*-MPK7-Überexpressor steckt, wurde nicht weiter aufgeklärt. Somit bleibt unklar, ob die Leishmanien, welche mit Verspätung zu einer Läsion geführt hatten, ihr *LmjMPK7*-Expressionsniveau z. B. durch Verlust des Plasmids vermindert und dadurch die Infektiosität wiederhergestellt haben. Oder ob es sich um Zellen handelte, welche alternative Wege zur Kompensation der überhöhten Aktivität von *LmjMPK7* eingeschaltet haben.

Wie bereits besprochen, ist die Menge an episomalem LmxMPK7-TY bei hoher Zelldichte bzw. stationärem Wachstumsstadium stark vermindert. Dies wirft die Frage auf, wie viel LmxMPK7 in den stationären Promastigoten der Überexpressionsmutante zum Zeitpunkt der Einbringung in die Maus tatsächlich vorhanden war? Auch zeigte sich, dass die Protein-

menge von episomalem LmxMPK7-TY im Laufe der Differenzierung und nach Abschluss dieser in Amastigoten rückläufig ist. Aufgrund der Einschränkung, dass Protein in zu geringer Menge einem Nachweis im Immunoblot entgeht, ist nicht bekannt, auf welche Menge im unteren Bereich sich die episodale Expression von *LmxMPK7-TY* nach Abnahme einpendelt. Bedenkt man zudem, dass kein Selektionsdruck durch Antibiotikum in der Maus herrscht, erscheint es naheliegend, dass auch in Läsionsamastigoten die Tendenz besteht, die initial unphysiologisch hohe Menge an LmxMPK7 zu reduzieren. Insbesondere, wenn zu viel MPK7 für den Parasiten nicht vorteilhaft ist. Wenn es sich so verhält, dann wäre die fehlende Virulenz nach Einbringung in die Maus initial der Überexpression von MPK7 zuzuschreiben und würde im Verlauf, nach erfolgter Reduktion der episodalen Proteinmenge, zu Lasten der Expression vom genomischen Locus und somit der vorliegenden genomischen Situation gehen. Dies könnte erklären, warum die MPK7-Überexpressoren mit Wildtyp-Hintergrund von *L. major* (Morales et al., 2010a) nach bereits wenigen Wochen Verzögerung in der Lage waren eine Infektion in der Maus zu etablieren, während die MPK7-Überexpressoren von *L. mexicana* mit Einzelallel- bzw. Doppelalleldeletions-Hintergrund erst nach 36 bis 60 Wochen oder überhaupt nicht dazu im Stande waren. Sollte die gescheiterte Infektionsetablierung in der Maus nicht einer initial zu hohen Menge von LmxMPK7-TY anzulasten sein, wäre in Betracht zu ziehen, dass das Fehlen von LmxMPK7 auf einem bzw. beiden Allelen und eine daraus resultierende Veränderung des Expressionsniveau der Kinase bereits schwerwiegende Auswirkungen hat. Eine dritte Erklärung wäre, dass die festgestellte LmxMPK7-Überexpression zu einer Veränderung der Zellphysiologie der Mutanten führt und dass diese Veränderung, trotz bereits verminderter Menge an LmxMPK7 bei Einsatz der stationären Promastigoten in das Mausinfektionsexperiment, noch anhält. Da die tatsächliche Menge von episomal exprimiertem MPK7 in Läsionsamastigoten unbekannt ist, behält dies seinen spekulativen Charakter. Neben Unterschieden im Expressionssystem, der Leishmanien-Spezies, der Anzahl an inokulierten Parasiten wurden darüber hinaus von Morales et al. (2010a) aufgereinigte metazyklische Promastigoten zur Mausinfektion benutzt, während in der vorliegenden Arbeit die Infektion mit Promastigoten einer spät-logarithmischen Kultur der *LmxMPK7* episodale exprimierenden Mutanten erfolgte. Verschiedene Klone von *L. major* bildeten mit einer Verzögerung von sieben Wochen Läsionen aus, wenn  $1 \times 10^6$  Promastigoten einer logarithmisch wachsenden Kultur anstelle von aufgereinigten axenischen Metazyklischen für die Mausinfektion benutzt wurden (Da Silva und Sacks, 1987). Die aufgezählten methodischen Unterschiede erlauben keine direkte Gegenüberstellung der Ergebnisse des MPK7-Überexpressors von Morales et al. und dem in dieser Arbeit vorgestellten. Durch die unterschiedliche experimentelle Umsetzung in beiden Arbeiten erhöht sich in gewissen Maßen aber auch die Belastbarkeit von gleichen Ergebnissen und dass übereinstimmende Beobachtungen mit dem zugrundeliegenden gemein-

samen Gegenstand beider Untersuchungen, der Kinase MPK7, in Zusammenhang stehen. Es war interessant zu beobachten, dass Zellen der LmxMPK7-Überexpressoren in der Lage waren, zwischen neun und 15 Monaten in der Maus zu überleben, ohne eine Infektion zu etablieren. Schlussendlich scheint es einigen wenigen Zellen gelungen zu sein die fehlende Infektiosität, verursacht durch die unnatürliche LmxMPK7-Menge, wiederherzustellen, hochzuwachsen und eine Leishmanienläsion zu etablieren. Hierzu nötige Anpassungsreaktionen können zurückzuführen sein auf Mutagenese oder eine Veränderung der Genomzusammensetzung, wie man sie in Leishmanien aufgrund ihrer hohen genomischen Plastizität häufig findet, beides mit dem Ziel, Umgehungswege auf Proteinebene zu etablieren. Die lange Latenz bis zur Ausbildung von Läsionen lässt eine alleinige Reduktion der Plasmidkopienzahl zur Wiederherstellung der Virulenz als Erklärung nicht ausreichend erscheinen. Da graduell Tochterzellen entstehen, die das Plasmid verloren haben (Boucher et al., 2004), wäre andernfalls zu erwarten gewesen, dass es frühzeitig Einzelzellen ohne Plasmid und hierdurch wiederhergestellter Virulenz gelingt eine Infektion zu etablieren. Wie schafften es die LmxMPK7-Mutanten in der Maus zu überleben und erst nach so langer Zeit eine Infektion zu etablieren? Es wurde anhand von klinischen Isolaten gezeigt, dass Leishmanien zur Persistenz in der Lage sind und auch nach Ausheilung einer Primärinfektion im Säugetierwirt überleben können. Bei solchen latenten Infektionen wurde eine Persistenz des Erregers in von Gewebsmakrophagen unterschiedlichen Zellen nachgewiesen, wie: Fibroblasten, Hepatozyten und Vorläuferzellen und Makrophagen des Knochenmarks (Bogdan, 2008). Diese Zellen vermögen den Parasiten zumeist nicht mit ausreichender Effizienz zu bekämpfen. Späth et al. (2004) schlugen vor, dass eine geringe Zahl persistierender Leishmanien im Säugetierwirt immer wieder die sichere Wirtszelle verlässt. Im Anschluss würden die freien Amastigoten mit Makrophagen konfrontiert und diesen gegenüber bezüglich ihrer Infektionsfähigkeit auf die Probe gestellt. Der vorgeschlagene Ablauf könnte sich durchaus förderlich auf die Ausbildung von zellulären Strategien zur Kompensation des herrschenden Defekts in LmxMPK7-Mutanten auswirken. Von Späth et al. wurde eine Subpopulation von Zellen der *L. major* Nullmutante *lpg2<sup>-</sup>* untersucht (dieser fehlt der Golgi-GDP-Mannose-Transporter LPG2), welche ihre Infektiosität nach einer Latenz von über vier Monaten wiederhergestellt hatte. Ein ähnliches Bild zeichnete sich in Mausinfektionsexperimenten mit der Nullmutante von LmxMCK (Wiese et al., 2003a) bzw. von LmxMCK4 (Kuhn und Wiese, 2005) ab. Beide führten erst nach mehrmonatiger Latenz in einigen Mäusen zu Läsionen. Die Nullmutanten von LmxMPK1 (vermag nicht in Makrophagen zu proliferieren; Wiese, 1998), LmxMPK4 (John von Freyend, Dissertation 2010) und LmxMPK5 (Wanders, Dissertation 2004) konnten nach Einbringung in die Maus hingegen in eineinhalb Jahren keine Infektion hervorrufen. Auch ohne eine progrediente Infektion zu etablieren, konnten für die Nullmutanten von LmxMCK4, LmxMPK4 und LmxMPK5 eineinhalb Jahre p. i. lebende Leishmanien aus der

Maus isoliert und somit ihre Persistenz nachgewiesen werden.

Nachfolgend wurden Läsionsamastigoten aus der Maus isoliert und auf das Vorhandensein des Plasmids pX6LmxMPK7TYC-ds untersucht. Dadurch wollte man zum einen Anhaltspunkte erhalten, welche Vorgänge zur Beeinträchtigung der Virulenz der LmxMPK7-Überexpressoren geführt haben könnten, und zum anderen sollte die initiale Fragestellung geklärt werden, ob MPK7 im amastigoten Lebensstadium *in vivo* essentiell ist.

#### 4.1.5 Retention versus Verlust der episomalen Kopie von *LmxMPK7* und Erzeugung einer Nullmutante – die Zweite

##### Nachweis der episomalen Kopie von *LmxMPK7* in Läsionsamastigoten:

Aus zwei Mäusen infiziert mit dem Klon H8 bzw. D3 der Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds sowie einer Maus infiziert mit Klon 4TYC2A4 der Mutante  $\Delta LmxMPK7(+/-)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds wurden um die 60. Woche p. i. Leishmanien aus der Läsion isoliert und mit Hilfe von FACS-Analyse je 10 gefärbte Zellen pro well sortiert (Wang et al., 2005). Mittels PCR-Analyse mit interner Kontrolle wurden die Amastigoten auf das Vorliegen von pX6LmxMPK7TYC-ds überprüft. Durch die unmittelbare Sortierung der gewonnenen Läsionsamastigoten konnte verhindert werden, dass die Zellen bei der Anzucht und Rückdifferenzierung zu Promastigoten das möglicherweise vorhandene Plasmid verlieren. Hypothetisch wäre es ausreichend, wenn lediglich eine bis wenige Zellen pro well das Plasmid tragen, damit der Nachweis positiv ausfällt. Die Immunfluoreszenzuntersuchung hatte gezeigt, dass sich die Gesamtpopulation aus Zellen mit höchstwahrscheinlich unterschiedlicher Plasmidkopienzahl zusammensetzt. Da vergleichende Untersuchungen angestellt wurden, wurde darauf verzichtet festzustellen, bei welcher Plasmidkopienzahl die Nachweisgrenze dieser Methode liegt. Von Wang et al. (2005) wurde ermittelt, dass mindestens 10 Zellen pro well sortiert werden müssen, um einschließlich der internen Kontrolle auf genomischer DNA zuverlässige Ergebnisse in der PCR zu erzielen.

Werden extrachromosomale Elemente, welche z. B. für ein Resistenzgen codieren, nicht mehr benötigt (z. B. bei Wegfall des Selektionsdrucks), verlieren Leishmanien diese. Beinahe alle (94 %, 16/17 „wells“) untersuchten Amastigoten von Klon 4TYC2A4 aus der Maus hatten das Plasmid verloren. Dieser Mutante steht *LmxMPK7* noch auf einem Allel an seinem genomischen Locus zur Expression zur Verfügung. Insofern ist der Verlust der episomalen Kopie nachvollziehbar und unterstreicht erneut, dass die episomale Überexpression für die Zellen unvorteilhaft ist. Im Vergleich dazu hatten die beiden *LmxMPK7* ausschließlich episomal exprimierenden Klone das Plasmid pX6LmxMPK7TYC-ds mit viel höherer Häufigkeit behalten. Der Nachweis des *LmxMPK7* tragenden Plasmids fiel für knapp die Hälfte (48 %, 16/33 wells) der wells mit Amastigoten von Klon H8 und für 18 % der wells (6/34

wells) befüllt mit Klon D3 positiv aus. Erstaunlicherweise wurde für beide Klone der Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds eine Mischpopulation an Läsionsamastigoten aus der Maus isoliert. Bei einem Teil der Zellen handelte es sich um Zellen, welche *LmxMPK7* auf Plasmid tragen und somit die ursprüngliche Konstellation beibehalten haben. Beim anderen Teil der Zellen handelte es sich offensichtlich um Nullmutanten  $\Delta LmxMPK7(-/-)$ . Laut PCR-Nachweis waren beide Zelltypen in der mit Klon D3 bzw. Klon H8 infizierten Maus vorhanden, wenn auch anteilig unterschiedlich stark vertreten. Beide Klone hatten in der untersuchten Maus nach 44 Wochen p. i. zu einer Läsion geführt.

Es wird vermutet, dass der beobachteten Latenz der Läsionsentwicklung folgendes Szenario zu Grunde liegt (aufbauend auf dem Vorschlag von Späth et al., 2004 und Bogdan, 2008): Leishmanien der Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds scheitern in der Maus eine Infektion hervorzurufen und zu unterhalten, der Großteil der Parasiten wird von Makrophagen abgeräumt, einem kleinen Teil der Leishmanien gelingt es in anderen Zellen zu persistieren. Wie kamen nachfolgend die aus der Läsion gewonnenen, vermutlich virulenten Zellen mit dem genetischen Hintergrund  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds bzw.  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  zustande? Im Folgenden werden Erklärungsansätze besprochen, die zum größten Teil noch ihre experimentelle Bestätigung suchen. Die Überexpression von MPK7 führte, wie gesehen, zu einer Beeinträchtigung der Virulenz des Parasiten im Säugetierwirt. Als logische Konsequenz wäre vorstellbar, dass die Zellen versuchen die überhöhte Menge an MPK7 zu reduzieren. Daher kommt es nachfolgend zu einer Verminderung der Plasmidkopienzahl bzw. einem Verlust des Plasmids. Ein Großteil der Zellen, welcher im Besitz einer genomischen Kopie von *LmxMPK7* war, hatte sich nach den 60 Wochen von der episomalen *LmxMPK7* getrennt. Dies schien für Zellen, welche ausschließlich auf die episomale Kopie zurückgreifen konnten nicht so ohne weiteres möglich zu sein. Hierfür spricht der viel höhere Anteil an Zellen, welcher die episomale Kopie behalten hat. Allem Anschein nach bereitet ein vollständiger Verlust von *LmxMPK7* den Leishmanien in der Maus, zumindest initial, ebenso Probleme. Wie ist daher der Anteil an Nullmutanten unter den isolierten Läsionsamastigoten zu erklären? Es sei hier zum besseren Verständnis folgendes vorweggenommen: Nullmutanten von *LmxMPK7* sind in ihrer Virulenz beeinträchtigt. Sie waren jedoch in der Lage in der Maus zu überleben und nach unterschiedlicher Latenz in einigen Mäusen Läsionen hervorzurufen. Durch Reinfektionsexperimente konnte gezeigt werden, dass Läsionsamastigoten von  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  ihre Virulenz wiederhergestellt hatten, was auf die Anschaltung von Kompensationsmechanismen schließen lässt. Folgende Abfolge wäre also vorstellbar: Einige der persistierenden Leishmanien von  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds haben das Plasmid verloren. Unter der so entstandenen Nullmutante gab es Zellen, welche mit einer Verzögerung von vielen Wochen den Verlust von *LmxMPK7* auf anderem Wege kompensierten und so die Fähigkeit erwarben, sich in Makrophagen zu



vermehren und schlussendlich die Ausbildung einer Läsion voranzutreiben. Die zweite Population an Läsionsamastigoten war den Weg gegangen die episomale Kopie von *LmxMPK7* zu behalten. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch in diesen Zellen Kompensationsmechanismen zum Tragen kamen, um mit der überhöhten Kinasemenge zurechtzukommen, erscheint es wahrscheinlicher, dass zuallererst das überhöhte Expressionsniveau von *LmxMPK7* in diesen Zellen vermindert wurde. Vorstellbar wäre eine Abnahme der Plasmidkopienzahl mit dem Ziel die Expression an ein niedriges Niveau, welches eher dem der natürlichen Proteinmenge von *LmxMPK7* entspricht, heranzuführen und so gegebenenfalls die Etablierung einer Infektion zu ermöglichen. Rechtfertigt dies aber die lange Verzögerung bis zur Läsionsbildung? Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Zellen mit ihrer unflexiblen Expression vom Plasmid weitere Probleme zu bewältigen hatten. Vielleicht wird *MPK7* in Amastigoten zu unterschiedlichen Zeitpunkten in unterschiedlicher Menge benötigt, was eine episomale Expression ohne potentiell regulatorische Elemente nicht leisten kann. Auch lässt sich nicht mit abschließender Sicherheit sagen, ob es sich bei den isolierten Zellen mit episomaler *LmxMPK7* tatsächlich um virulente Zellen handelte. Alternativ könnte es sich bei diesen Zellen um Überreste der injizierten Zellen der Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6*LmxMPK7TYC*-ds gehandelt haben, welche ohne eine Infektion zu verursachen persistierten. Wäre dies zutreffend und die Ausbildung von Läsionen würde alleinig von der Population  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  getragen, würde man erwarten, dass die PCR Läsionsamastigoten mit Plasmid nicht in so hoher Frequenz nachweist, wie es für den Klon H8 der Fall war. Für diesen fiel der Plasmidnachweis in knapp der Hälfte der „wells“ positiv aus. Daraus wird gefolgert, dass vermutlich beide isolierten Zelltypen einen Beitrag zur Läsionsausbildung geleistet und ihre Virulenz wiederhergestellt haben. Auf eine Reinfektion von Mäusen mit den isolierten Amastigoten zur Klärung ihrer Virulenz wurde verzichtet. Dies hätte u. a. eine klonale Anreicherung der Zellen mit episomaler *LmxMPK7* vorausgesetzt. Bei der Kultivierung hätte jedoch die Gefahr bestanden, dass es zur Veränderung der Plasmidkopienzahl kommt und die Zellen nicht mehr den ursprünglichen Isolaten aus der Maus entsprechen.

#### Vitalitätstestung der Läsionsamastigoten:

Von den Aspiraten der Leishmanienläsionen wurden zur Überprüfung der Vitalität der Zellen zudem Kulturen angelegt. Diese wurden aufgeteilt, eine Hälfte der Kultur wurde in Gegenwart des Selektionsantibiotikums Puromycin kultiviert, eine Hälfte ohne. Für alle Kulturansätze konnte eine Rückdifferenzierung der Amastigoten zu Promastigoten beobachtet werden. Die Kulturansätze von 4TYC2A4, D3 und H8 ohne Puromycin wuchsen schneller heran als die zugehörigen versetzt mit Puromycin. Für die Mutante  $\Delta LmxMPK7(+/-)$  + pX6*LmxMPK7TYC*-ds Klon 4TYC2A4 hatte die PCR bereits gezeigt, dass beinahe alle

Amastigoten das für die Puromycinresistenz codierende Plasmid verloren hatten. PCR-Ergebnis und Verhalten in Kultur sind konsistent, die resultierenden Promastigoten wuchsen erwartungsgemäß viel schneller ohne als mit Puromycin. Die Kulturen der Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds Klon D3 und H8 wuchsen in Gegenwart von Puromycin an. Hierzu sind nur die Zellen der Mischpopulation fähig, welche das Plasmid behalten haben. Demnach handelte es sich bei diesen um vitale Zellen, mit der Fähigkeit zu Promastigoten zu differenzieren und im Anschluss zu proliferieren. Die zugehörigen Kulturen ohne Selektionsantibiotikum wuchsen vergleichsweise schneller heran. Dies wird als Indiz gewertet, dass die laut PCR mehrheitlich vorkommenden Zellen mit der Konstellation  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  ebenfalls vital, differenzierungs- und im promastigoten Stadium teilungsfähig waren.

#### Vergleich zu anderen MAPK-Homologen:

Amastigoten, welche lediglich eine episomale Kopie von *LmxMPK4* besaßen, hatten das *LmxMPK4* tragende Plasmid auch nach längerem Aufenthalt in der Maus ohne Selektionsdruck alle behalten (Wang et al., 2005). Gleiches galt für *LmxMPK2* (Mandal et al., 2012). Beide Kinasen werden als essentiell im amastigoten Lebensstadium eingestuft. Der episomalen Expression dieser beiden Kinasen lag derselbe Vektor pX63polPAC (Wiese, 1998) zu Grunde wie für *LmxMPK7*. Die episomale Expression von *LmxMPK4* bzw. *LmxMPK2* bei bestehendem Deletionshintergrund führte zu unauffälligen Promastigoten und virulenten Amastigoten. Dies verhielt sich, wie wir wissen, für *LmxMPK7* anders. Die Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds war nicht in der Lage in allen Mäusen eine Läsion hervorzurufen und in den Mäusen in denen sie es tat, geschah dies nur mit ausgedehnter Latenz. Der Unterschied von *LmxMPK7* zu *LmxMPK2* bzw. *LmxMPK4* könnte darin bestehen, dass sich die vom Plasmid erzeugte Kinasemenge unterschiedlich auswirkt. Während episomale Überexpressoren von *LmxMPK7* vermutlich eine für die Virulenz der Zellen ungünstige Mengen an *LmxMPK7* erzeugen, ergeben sich für Leishmanien, welche *LmxMPK2* bzw. *LmxMPK4* episomal exprimieren, hieraus keine Schwierigkeiten und die episomale Expression komplementiert die genomische Deletion suffizient. Dieser Vergleich liefert einen weiteren Hinweis, dass es sich bei *LmxMPK7* um eine Kinase handeln könnte, für welche Abweichungen in ihrer Menge bzw. Aktivität im Rahmen der Etablierung einer Infektion zellulär nicht gut toleriert werden.

#### Verzögerte Läsionen nach Infektion mit Mutante $\Delta LmxMPK7(+/-)$ + pX6LmxMPK7TYC-ds:

Zuletzt bleibt noch zu besprechen, wie die stark verzögerte Läsionsentwicklung der Mutante  $\Delta LmxMPK7(+/-)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds Klon 4TYC2A4 zu erklären ist. Vermutlich hat die überhöhte Expression von *LmxMPK7*, genauso wie für die Promastigoten der Mutante

$\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds, initial die Etablierung einer Infektion verhindert und die Leishmanien der Vernichtung durch Makrophagen preisgegeben. Was wissen wir über die verbliebenen, persistierenden Zellen, welche letztendlich die Infektion herbeigeführt hatten? Gemäß dem PCR-Nachweis hatten diese beinahe alle die episomale Kopie von *LmxMPK7* nach über einem Jahr verloren. Der zeitliche Rahmen hierzu passt. Es dauert im Allgemeinen 100-200 Zellteilungen bis Leishmanien ein extrachromosomales Element codierend für ein Resistenzgen in Abwesenheit von Selektionsdruck vollständig verlieren (Boucher et al., 2004). Für intrazelluläre Amastigoten von *L. mexicana* in Makrophagen *ex vivo* wurde eine Verdopplungszeit zwischen 3 – 4 Tagen festgestellt (Wanders Dissertation, 2004; Castanys-Muñoz et al., 2012). Aus der Mausfußläsion wurden beinahe ausschließlich Einzeldelentionsmutanten  $\Delta LmxMPK7(+/-)$  isoliert. Es kommt häufiger vor, dass sich bereits für die Einzeldelentionsmutante eines Gens eine Veränderung des Phänotyps bemerkbar macht, so z. B. für die Thymidin-Kinase (Thiel et al., 2008). Leider wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt, ob  $\Delta LmxMPK7(+/-)$  von Natur aus die volle Virulenz besitzt. Ein Anhaltspunkt dafür, dass die Einzeldelentionsmutante nicht im vollen Umfang dem Wildtyp gleichzusetzen ist, könnte sein, dass eine erzeugte „add-back“-Mutante von *LmxMPK7* auf einem Allel nicht in der Lage war den Wildtyp-Phänotyp wiederherzustellen. Bei der Besprechung der add-back-Mutante wird dies noch genauer erörtert. Der Grund, warum der Klon 4TYCA4 der Mutante  $\Delta LmxMPK7(+/-)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds diese starke verzögerte Läsionsbildung aufweist, wurde im Zuge dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

#### Erzeugung von $\Delta LmxMPK7$ in Promastigoten:

Ein Teil der Population der Läsionsamastigoten von  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds hatte die episomale Kopie von *LmxMPK7* verloren. Wie verhält sich das für Promastigoten der Mutante, wenn der Selektionsdruck wegfällt – halten diese an der einzigen Kopie der Kinase fest? Zu diesem Zweck wurden Promastigoten über vier Wochen (neun Passagen) ohne das Selektionsantibiotikum Puromycin kultiviert und vereinzelt. Nach dieser Zeit hatte grob die Hälfte der Klone die Fähigkeit in Gegenwart von Puromycin zu wachsen verloren und die Southern Blot-Analyse bestätigte, dass auf diesem Wege Nullmutanten von *LmxMPK7* erzeugt worden waren. Die episomale Kopie von *LmxMPK7* bietet Promastigoten keinen Überlebensvorteil und die Zellen verlieren die Kinase ohne Selektionsdruck. Die resultierende Nullmutante wurde weiter untersucht.

### 4.1.6 Phänotypische Charakterisierung der Nullmutante $\Delta LmxMPK7$

#### Unauffällige Morphologie:

$\Delta LmxMPK7$  präsentierte sich *in vitro* in beiden Lebensstadien und während der Differenzierung in der Lichtmikroskopie morphologisch unauffällig. Auch nach Anfärbung der DNA-haltigen Organellen und Beurteilung in der Fluoreszenzmikroskopie war kein Unterschied zum *L. mexicana* Wildtyp zu erkennen.

#### Beschleunigung des Wachstums:

Trotz unauffälliger Zellmorphologie unterschied sich die Nullmutante vom Wildtyp deutlich in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit. Für Promastigoten von  $\Delta LmxMPK7$  wurde eine erhöhte Proliferationsrate bei gleichbleibendem Wachstumsverlauf, d. h. ohne Verlängerung der replikativen Phase beobachtet. Die Promastigotenkultur der Nullmutante erreichte beim Übergang in die stationäre Phase eine im Durchschnitt knapp 40 % höhere Zelldichte als die Wildtyp-Kultur.

Ebenso erreichten axenische Amastigoten der Nullmutante im Kulturverlauf zu den unterschiedlichen Zeitpunkten deutlich höhere Zellzahlen als Amastigoten des Wildtyps und besaßen beim Übergang in die stationäre Phase eine Zellzahl von mehr als  $4,5 \times 10^7$  Zellen/ml. Axenische Amastigoten des Wildtyps zeigten eine weitaus höhere Tendenz zur Ausbildung von Zellklumpen. Das Zellwachstum könnte innerhalb dieser Zellhaufen, aufgrund von vermindertem Nährstoffangebot beeinträchtigt sein. Doch auch in der Versuchsreihe, in welcher die Amastigotenkultur bei Bedarf täglich mittels Passage durch eine Kanüle vereinzelt wurde, blieb das Wachstum des Wildtyps deutlich hinter dem der Nullmutante zurück (Ergebnisse 3.1.2.9).

Der Verlust von *LmxMPK7* führte in Promastigoten zu keiner Herabsetzung der Fähigkeit in Peritonealmakrophagen aus der Maus zu gelangen. Nach Inkubation der Phagozytenprimärkultur mit Promastigoten über Nacht, war sowohl für Wildtyp als auch Nullmutante eine initiale Infektionsrate von um die 60 % festzustellen. Auffallend war jedoch, dass Leishmanien von  $\Delta LmxMPK7$  im Vergleich zum Wildtyp in Mausmakrophagen eine beschleunigte intrazelluläre Proliferation zeigten. Die für axenische Amastigoten gemachte Beobachtung der gesteigerten Zellteilung, bestätigte sich somit auch für intrazelluläre Amastigoten der Nullmutante. Hieraus resultiert die Annahme, dass es sich bei *LmxMPK7* um einen negativen Regulator der Proliferation handeln könnte, dessen Wegfall, wie für die Nullmutante *in vitro* beobachtet, zu einer überschießenden Proliferation von Pro- und Amastigoten führt. Hinweise hierfür fanden auch Morales et al. (2010a) als sie GFP-*LmjMPK7* in Leishmanien episomal überexprimierten. Die transgenen Parasiten zeigten als axenische Amastigoten und intrazellulär in Mausmakrophagen ein vermindertes Wachstum.

Allerdings wurde keine Veränderung des Proliferationspotentials für GFP-LmjMPK7 exprimierende Promastigoten gefunden.

Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Klon der Mutante *LmxMPK7(+/+)* + pX6MPK7TYC-ds, welche zusätzlich zum Wildtyphintergrund *LmxMPK7* vom Episom exprimiert, zeigte im Promastigoten-Stadium ein ähnliches Proliferationsverhalten wie der gegenübergestellte Wildtyp. Auch nach Differenzierung zu axenischen Amastigoten wurde annähernd die Wachstumsrate der Wildtyp-Kultur erreicht. Aus der Differenzierung von Promastigoten zu Amastigoten von *L. mexicana* Wildtyp gehen unter den in unserem Labor gebräuchlichen Wachstumsbedingungen erfahrungsgemäß Kulturen mit einer Zellzahl von  $2-3 \times 10^7$  Zellen/ml beim Übergang in die stationäre Phase hervor. Wie bereits besprochen, klumpten die Amastigotenkulturen des Wildtyps dieser Wachstumsreihe stark und erreichten eine maximale Zellzahl von nur  $1,6 \times 10^7$  Zellen/ml (Ergebnisse 3.1.2.6.2). Die Zellklumpen dieser Reihe wurden nicht aufgelöst, daher wäre denkbar, dass die Wachstumskapazität der Wildtypzellen nicht voll ausgeschöpft wurde. Für axenische Amastigoten der *LmxMPK7*-episomal exprimierenden Mutante wurde eine maximale Zellzahl von rund  $1 \times 10^7$  Zellen/ml ermittelt. Abschließend kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Wachstum dieser Mutante in Wahrheit deutlich hinter dem des Wildtyps zurückbleibt und das Ergebnis so mit der von Morales et al. gemachten Beobachtung, dass sich die Überexpression von *MPK7* auf das Wachstum von axenischen Amastigoten, jedoch nicht das von Promastigoten auswirkt übereinstimmt. Promastigoten mit zusätzlich episomaler Expression könnten überhöhte Mengen von *MPK7* tolerieren ohne eine Veränderung der Proliferation herbeizuführen. Es wäre durchaus möglich, dass Promastigoten sich hierbei Mechanismen bedienen, welche dem amastigoten Stadium nicht zur Verfügung stehen.

#### Wachstumshemmung durch MPK7:

Während Differenzierungsprozessen innerhalb des komplexen Lebenszyklus von Leishmanien kommt es zu umfangreichen Änderungen im Phosphorylierungsmuster von Proteinen (Tsigankov et al., 2013). Hierfür spielt die stadienabhängige Aktivität von Kinasen und Phosphatasen eine wichtige Rolle. Für eine Reihe von Mitgliedern der MAPK-Familie in Trypanosomatiden wurde bereits festgestellt, dass ihr Fehlen zu einer zumeist stadienspezifischen Beeinträchtigung der Proliferation bzw. Differenzierung führt. So zeigt die Nullmutante von *LmxMPK1* eine Beeinträchtigung der Proliferation im amastigoten Stadium (Wiese, 1998). Eine Verminderung der Kinaseaktivität von *LmxMPK4* wirkt sich hemmend auf das axenische Wachstum während der Differenzierung zu Amastigoten und während des promastigoten Stadiums aus (John von Freyend, Dissertation 2010). Die bis dato in Leishmanien identifizierten MAP-Kinasen-Homologe mit wachstumsregulierender Funktion besitzen durchweg einen positiven Effekt auf die Proliferation und ihr Fehlen führt zu einem

Wachstumsarrest unterschiedlichen Ausmaßes. Anders verhält es sich für LmxMPK7, ein Wegfall der Kinase hatte ein verstärktes Wachstum im promastigoten und amastigoten Stadium zur Folge, demzufolge wurde mit MPK7 das erste MAPK-Homolog identifiziert, bei dem es sich allem Anschein nach um einen negativen Wachstumsregulator in Leishmanien handelt. Mit Einschränkung ist, als weiteres Beispiel einer Kinase mit potentiell negativem Einfluss auf das Wachstum von Trypanosomatiden, TcMPK2 zu nennen. TcMPK2, das Homolog von LmxMPK2 in *T. cruzi*, führte bei Überexpression zu einer Abschwächung des Wachstums von Epimastigoten (Bao et al., 2010). Ausführliche Untersuchungen zur Funktion von TcMPK2 liegen jedoch nicht vor. Auch bei TbECK1, dem Homolog von LmxMPK6 in *T. brucei*, könnte es sich um einen möglichen Wachstumsregulator handeln (Ellis et al., 2004). TbECK1 besitzt ähnlich wie ERK7 eine lange C-terminale Erweiterung. Während ERK1 und ERK2 in vielen Säugetierzellen zu Proliferation bzw. Differenzierung führen, scheint es sich bei ERK7 um einen negativen Wachstumsregulator zu handeln (Abe et al., 1999). Für LmxMPK7 konnte allerdings keine hinreichende Sequenzähnlichkeit zu ERK7 festgestellt werden.

Wofür könnte in Leishmanien eine negative Regulation des Wachstums sinnvoll sein? Am ehesten förderlich wäre dies an Übergängen des parasitären Lebenszyklus, an denen Umwandlungsprozesse gegenüber dem Wachstum Vorrang haben. So kommt es bei der Einleitung des Differenzierungsprozesses von Promastigoten zu Amastigoten zum Wachstumsarrest durch Zellzyklusstop in G1 (Barak et al., 2005). Im Lebenszyklus von Leishmanien wechseln sich proliferative und nicht-proliferative Formen ab. Initial entstehen in der Sandmücke aus den aufgenommenen Amastigoten replizierende prozyklische Promastigoten, dieser Form schließen sich an: nicht-replizierende Nektomonaden, die Zellteilung wieder aufnehmende Leptomonaden und schlussendlich die sich im Wachstumsarrest befindliche hochinfektiöse Form, die metazyklischen Promastigoten. Mit frisch isolierten, in Kultur zur Differenzierung gebrachten Amastigoten, konnte die aus der Sandmücke bekannte Abfolge an Promastigotenformen *in vitro* morphologisch nachgestellt werden (Gossage et al., 2003). Es wird jedoch vermutet, dass nach wiederholter Subpassage der Promastigoten, wie auch in dieser Arbeit der Fall, die Synchronität und die zeitliche Abfolge der Entwicklung verloren geht (Gossage et al., 2003). Es ist daher nicht bekannt, wie sich die Anteile an verschiedenen Promastigoten Stadien nach mehreren subsequenten Passagen der *in vitro* Kultur verhalten. Bekannterweise kommt es während der stationären Phase in Kultur zur Anhäufung von metazyklischen Promastigoten. Eine Verminderung des Anteils dieser nicht-replikativen Form führte zu einer Abnahme der Invasionseffizienz in Mausmakrophagen (Serafim et al., 2012). Und ist der Anteil an Metazyklischen zu gering, scheint die Differenzierung der Gesamtpopulation zu axenischen Amastigoten unvollständig zu verlaufen

(Cysne-Finkelstein et al., 1998). Die sich einer höheren Zellzahl beim Übergang in die stationäre Phase gegenübersehende Nullmutante  $\Delta LmxMPK7$  führte mit derselben Effizienz zur Invasion von Peritonealmakrophagen wie der Wildtyp, dies spricht dafür, dass in beiden Kulturen eine ähnliche Anzahl an virulenten Zellen vorlag. Auch die *in vitro* Differenzierung zu axenischen Amastigoten verlief unauffällig. Für die LmjMPK7 überexprimierenden Parasiten fanden Morales et al. keinen Unterschied in der Anzahl an metazyklischen Promastigoten im Vergleich zum Wildtyp. Das Fehlen von LmxMPK7 lässt keinen Einfluss auf die Promastigoten des späten Kulturverlaufs, welche durch eine verminderte Synthese- und Teilungsaktivität charakterisiert sind (Mallinson und Coombs, 1989), erkennen.

Zum einen wäre denkbar, dass LmxMPK7 als Regulator negativ in den Zellzyklus eingreift und womöglich für einen Zellzyklusstop in einer der nicht proliferierenden Formen verantwortlich ist. Zum anderen wäre es möglich, dass die Kinase das Wachstum auf Ebene des Zellstoffwechsels reglementiert und z. B. die Substrataufnahme, den Substratumsatz bzw. die Stoffwechselaktivität oder die Biosynthese von Makromolekülen beeinflusst. Das Fehlen von LmxMPK7 machte sich vor allem in der logarithmischen Wachstumsphase bemerkbar, so erreichten die Pro- und Amastigotenkulturen der Nullmutante bereits nach einem Tag des Wachstumsversuchs und danach fortlaufend höhere Zellzahlen als die Wildtyp-Kultur. Die Promastigotenkultur ging zeitgleich wie der Wildtyp, die Amastigotenkultur mit leichter Verzögerung in die stationäre Phase über. Zusammengenommen spricht das eher für eine Einflussnahme der Kinase auf Ebene des Stoffwechsels als für die Einleitung einer spezifischen Zellzyklusblockade. Zu einem ähnlichen Schluss kamen Morales et al. (2010a): Die LmjMPK7 episomal überexprimierenden Leishmanien durchliefen während der *in vitro* Differenzierung zu Amastigoten scheinbar ganz regulär den bekannten Zellzyklusarrest. Es wurde allerdings eine verminderte Proteinbiosynthese und Proliferation nach Wiederaufnahme des Zellwachstums festgestellt. Für Promastigoten als auch Amastigoten von  $\Delta LmxMPK7$  wurde eine Wachstumsbeschleunigung beobachtet. Dies könnte dafür sprechen, dass ein in beiden Lebensformen vorhandenes Effektorsystem z. B. ein Stoffwechselweg betroffen ist und dass LmxMPK7 in Promastigoten und Amastigoten dasselbe Substrat bedient.

#### Verminderung der Virulenz im Mausinfektionsexperiment:

Alle sechs Klone der Mutante  $\Delta LmxMPK7$  präsentierten sich mit einer deutlich verminderten Virulenz im Infektionsexperiment mit BALB/c-Mäusen. Knapp zwei Drittel (61 %) der 23 infizierten Mäuse wiesen nach über einem Jahr (52. Wochen) keine Leishmanienläsion auf. In über einem Drittel der Fälle führte die Nullmutante zeitlich sehr uneinheitlich zwischen der 8. und 36. Woche zu einer Geschwulst am infizierten Fuß. Das Fehlen von LmxMPK7 scheint *in vivo* zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Virulenz zu führen.

#### Virulenzverlust durch Langzeitkultivierung:

Das Wachstum von Leishmanien in axenischer Kultur über einen längeren Zeitraum kann mit einer Verminderung der Virulenz gegenüber Säugerzellen einhergehen. Die meisten Studien hierzu existieren für *L. major* (Da Silva und Sacks 1987; Segovia et al., 1992; Sádlová et al., 1999) und *L. infantum* (Grimm et al., 1990; Moreira et al., 2012). Für *L. amazonensis* (Magalhães et al., 2014) und für *L. mexicana* (Ali et al., 2013) konnte je eine Studie ausfindig gemacht werden. In einigen Fällen konnte die verlorene Infektiosität der Promastigoten durch Passage durch die Maus (Segovia et al., 1992; Shankar et al., 1993) oder durch *in vitro* Differenzierung zu Amastigoten (Moreira et al., 2012) wiederhergestellt werden. Es kam jedoch auch vor, dass durch Langzeitkultivierung eine avirulente Leishmanienpopulation selektiert worden war, deren Virulenz auch durch Verbleiben in der Maus für neun Monate nicht wiederhergestellt werden konnte (Sádlová et al., 1999). Aufgrund dessen erscheint es angezeigt, die Infektionsexperimente mit den Mutanten von *LmxMPK7* bezüglich der Passagenzahl der hierfür verwendeten Leishmanienkulturen kritisch zu hinterfragen. Die Herstellung der Nullmutante  $\Delta LmxMPK7$  gestaltete sich langwierig und schwierig, so waren u. a. drei konsekutive Transfektionsschritte notwendig. Eine Passage von Zwischenstufen durch die Maus wurde nicht vorgenommen, da bereits überexprimierende Vorgänger-mutanten von  $\Delta LmxMPK7$  eine deutliche Beeinträchtigung der Infektiosität zeigten und wenn, erst nach über 36 Wochen zu Mausfußläsionen führten. Folglich befanden sich die zur Mausinfektion genutzten Leishmanien, seit der letzten Mauspassage vom zugrundeliegenden Wildtyp, bereits längere Zeit in Kultur; die des *LmxMPK7*-Überexpressors ca. 34 Wochen und die der Nullmutante ca. 42 Wochen, bei etwa zweimaliger Kulturpassage pro Woche. Nach 12 Monaten in Kultur führten Promastigoten eines initial virulenten *L. major*-Stammes zu keinen Mausläsionen mehr (Segovia et al., 1992). Nach mehr als 21 Wochen bzw. 30 Passagen zeigten untersuchte Promastigoten von *L. amazonensis* eine verminderte Virulenz gegenüber dem Säugetierwirt (Magalhães et al., 2014). Wenn BALB/c-Mäuse mit *L. major* nach 94 Passagen *in vitro* infiziert wurden, führte dies zu einer Verzögerung der Läsionsentwicklung um 8 Wochen im Vergleich zu einer Kultur nach 14 Passagen. Zudem konnte eine drastische Abnahme an infektiösen, Erdnuss-agglutinin-(PNA-)negativen Metazyklischen in der stationären Kultur nach Langzeitkultivierung beobachtet werden (Da Silva und Sacks 1987). Auch in anderen Studien wurde beobachtet, dass die Virulenz proportional mit Zunahme der Passagenzahl der Kultur abnimmt (Ali et al., 2013; Magalhães et al., 2014). Interessanterweise führte die Mutante  $\Delta LmxMPK7$ , welche nach einer höheren Passagenzahl in die Maus eingebracht wurde als der zugrundeliegende *LmxMPK7*-Überexpressor, in knapp 40 Prozent der Mäuse zwischen acht und 36 Wochen zur Läsion. Die Latenz war kürzer als für den genannten Überexpressor der Fall, bei dem es in 70 Prozent der Mäuse zwischen der 36. und 60. Woche p. i. zur Läsionsausbildung kam. In den



meisten Studien wird beschrieben, dass sich die verminderte Virulenz nach Langzeitkultivierung in Form einer verzögerten Läsionsausbildung in BALB/c-Mäusen manifestiert. Moreira et al. (2012) und auch Magalhães et al. (2014) hingegen schilderten kein verzögertes Angehen der Mauseinfektion, sondern stellten eine verminderte Fußläsionsdicke und/oder Parasitenlast fest. Für  $\Delta LmxMPK7$  wurde nach genannter Verzögerung eine ähnlich schnell fortschreitende Fußdickenzunahme wie für den Wildtyp beobachtet. In keiner der oben genannten Studien war betreffs des Zeitpunkts einer erstmals messbaren Mausfußläsion von einem heterogenen Verlauf die Rede, wie dies für die Mutanten von *LmxMPK7* der Fall war. Für einen Klon von *L. major*, der eine verminderte Virulenz aufwies, konnte ein Zusammenhang zwischen Infektiosität und Expression von LPG der metazyklischen Form hergestellt werden (Shankar et al., 1993). Interessanterweise konnte die für die Infektion mit *L. major* essentielle Funktion von LPG als Virulenzfaktor (Späth et al., 2000) nicht für *L. mexicana* bestätigt werden (Turco et al., 2001). LPG-defiziente Zelllinien von *L. mexicana* zeigten bezüglich ihrer Infektiosität gegenüber Makrophagen und Mäusen keinerlei Unterschied zum Wildtyp (Ilg et al., 2001). Moreira et al. (2012) verglichen 21 bzw. 31 Passagen in axenischer Kultur belassene Promastigoten von *L. infantum* mit einer Kultur nach vier Passagen und stellten im Vergleich zu anderen Untersuchungen keinen direkten Zusammenhang zwischen verminderter Virulenz und Anteil an Metazyklischen fest. Aufgefallen war jedoch eine deutlich verminderte Proliferationskapazität von *in vitro* differenzierenden Amastigoten, wenn diesen eine Promastigotenkultur mit hoher Passagenzahl zu Grunde lag. Ali et al., 2013 konnten für Promastigoten von *L. mexicana*, welche 20 Passagen *in vitro* durchlaufen hatten, innerhalb des Untersuchungszeitraums von 12 Wochen p. i. keine Entwicklung von Fußläsionen in BALB/c-Mäusen feststellen. Zudem wurden die genannten Zellen mit einer deutlich verminderten Effizienz von Makrophagen *ex vivo* aufgenommen als Zellen nach einer Passage. Die intrazellulären Promastigoten waren nicht in der Lage, sich zu Amastigoten zu differenzieren und zu vermehren. Promastigoten von  $\Delta LmxMPK7$  zeigten sich in ihrer Fähigkeit *in vitro* zu Amastigoten zu differenzieren und als diese zu wachsen nicht beeinträchtigt. Auch wurde die Nullmutante von Peritonealmakrophagen *ex vivo* mit hoher Effizienz aufgenommen, differenzierte sich intrazellulär nach morphologischen Gesichtspunkten zu Amastigoten und diese proliferierten fleißig. Leishmanien, die nach längerer Kulturdauer eine Beeinträchtigung der Virulenz gegenüber BALB/c-Mäusen bzw. Hamstern (Grimm et al., 1990) zeigten, führten bei Infektion von Makrophagen *ex vivo* zu vergleichbaren Ergebnissen wie im Wirtstier. Ihre Promastigoten waren in ihrer Fähigkeit aufgenommen zu werden und sich als intrazelluläre Amastigoten in Makrophagen zu vermehren deutlich gestört (Moreira et al., 2012; Ali et al., 2013; Magalhães et al., 2014). Dies konnte für Leishmanien von  $\Delta LmxMPK7$  nach hoher Passagenzahl nicht bestätigt werden.  $\Delta LmxMPK7$  zeigte zwar eine Beeinträchtigung der Virulenz in BALB/c-Mäusen, diese spiegelte sich jedoch nicht im *in vitro* Experiment mit

isolierten Peritonealmakrophagen wieder. Trotz dieser Unterschiede bleibt abschließend festzustellen, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass die lange Zeit in Kultur ohne Passage durch die Maus zur Beeinträchtigung der Virulenz der finalen Mutante  $\Delta LmxMPK7$  beigetragen hat. Dem ungeachtet wird die Aussage, dass der Kinase eine Bedeutung für die Virulenz zukommt dadurch untermauert, dass Leishmanien der  $LmjMPK7$  überexprimierenden Mutante gleichwohl eine beeinträchtigte Virulenz zeigten (Morales et al., 2010a).

#### Kompensation des Virulenzdefekts:

Untersuchungen anderer Kinasen, welche für das intrazelluläre Lebensstadium als notwendig gehandelt werden, legen nahe, dass die im Vergleich zum Wildtyp verspätete Etablierung einer Infektion auf die Ausbildung von Kompensationsmechanismen zur Wiederherstellung der Virulenz zurückzuführen ist. Für die Nullmutante von  $LmxMCK4$  lieferte der Infektionskurs in BALB/c-Mäusen ein ähnlich heterogenes Bild wie für  $LmxMPK7$ . Ein Teil der Mäuse bildete keine Läsion aus. Der andere Teil etablierte verglichen zum Wildtyp verspätet und zu unterschiedlichen Zeitpunkten p. i. eine Infektion bzw. zeigte eine abgeschwächte Läsionsentwicklung (Kuhn und Wiese, 2005). Es wird vermutet, dass die Latenz dadurch zustande kommt, dass es lediglich einer sehr kleinen Population an Zellen gelingt Kompensationsmechanismen einzuschalten. Diese wenigen Zellen müssen anschließend hochwachsen und eine klinisch apparente Läsion ausbilden. BALB/c-Mäuse infiziert mit aus frühen und späten Läsionen isolierten und zu Promastigoten differenzierten Amastigoten zeigten eine einheitliche Läsionsausbildung ohne Verzögerung, ähnlich der von Wildtyp-Promastigoten. Das Reinfektionsexperiment beweist, dass die  $LmxMPK7$ -defiziente Mutante nach Persistenz in der Maus, offenbar zu unterschiedlichen Zeitpunkten, eine vollwertige Kompensation des Virulenzdefekts vollzogen hat. Von Leishmanienläsionen des initialen Mausinfektionsexperiment wurden Gewebsschnitte angefertigt und elektronenmikroskopisch untersucht. Die Amastigoten von  $\Delta LmxMPK7$ , welche den Virulenzdefekt kompensiert hatten und die parasitäre Vakuole die sie umgab, zeigten in der TEM keine morphologischen Auffälligkeiten.

#### Bedeutung der Kinase für den initialen Infektionsprozess:

Es wird angenommen, dass die für diverse Mutanten beobachtete Verzögerung der Läsionsentwicklung im Mausinfektionsexperiment auf eine Beeinträchtigung der initialen Infektionsetablierung zurückzuführen ist und nicht auf einer gestörten Amastigotenproliferation beruht (Späth et al. 2004; Kuhn und Wiese 2005). Initial wichtige Vorgänge sind die Invasion, die Adaption an das Wirtszellmilieu und die Differenzierung zu Amastigoten. Die verzögerte Läsionsentwicklung von  $\Delta LmxMPK7$  lässt vermuten, dass die Kinase neben dem negativen Einfluss auf die Teilungsfähigkeit, für initiale Vorgänge des Infektionsablaufs von Bedeutung

sein könnte. Für die Internalisierung in die Wirtszelle scheint MPK7 keine Rolle zu spielen. Die initiale Infektionsrate von Makrophagen *ex vivo* war für Promastigoten von  $\Delta LmxMPK7$  und Wildtyp gleich. Bewertet nach morphologischen Gesichtspunkten, verhielt sich auch die Umwandlung zu Amastigoten *in vitro* unauffällig. Interessanterweise bestand eine Diskrepanz zwischen dem gestörten Infektionsverhalten *in vivo* und dem beobachteten effektiven Befall von Makrophagen *ex vivo* mit vermutlich überschießender Vermehrung der Amastigoten von  $\Delta LmxMPK7$ . Dieser Unterschied kann möglicherweise Hinweise liefern, in welchem Bereich des Infektionsprozesses die Funktion von LmxMPK7 anzusiedeln ist.

Ein grundlegender Unterschied zwischen der Situation *in vivo* und der Infektion von Makrophagen *ex vivo* besteht darin, dass sich Leishmanien nach Ankunft im Säugetierwirt dem komplexen Netzwerk der Immunabwehr gegenübersehen. Je nach Phase der Infektionsetablierung sind vom Parasiten unterschiedliche immunologische Abwehrmechanismen zu überwinden. In der frühen extrazellulären Phase gilt es eine Komplement-bedingte Lyse abzuwehren. Darüber hinaus modelliert der Parasit die Immunantwort auf verschiedenen Ebenen zu seinen Gunsten. Dies macht sich z. B. anhand einer abweichenden Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen, wie Neutrophilen, Monozyten und Dendritischen Zellen während der Frühphase der Infektion bemerkbar (Peters et al., 2008; Petritus et al., 2012; Sousa et al., 2014). Desgleichen nimmt der Parasit Einfluss, welche Subpopulation an T-Helferzellen, TH1 oder TH2, die Immunantwort beherrscht und führt zu einer Veränderung des Profils an produzierten Zytokinen (Mougneau et al., 2011). In der sensitiven Mauslinie BALB/c ruft *L. mexicana* eine TH2-gerichtete Immunantwort hervor und es bilden sich kutane Läsionen aus (Denise et al., 2003). Im befallenen Makrophagen unterdrücken Leishmanien die Produktion von mikrobiziden Molekülen wie NO, indem sie die Antwort auf das von Lymphozyten produzierte IFN- $\gamma$  unterbinden; auch die Präsentation parasitärer Antigene mittels MHCII gegenüber Immunzellen ist beeinträchtigt (Olivier et al., 2005; Wolfram et al., 1996). Für die Einleitung der Immunevasion sind vermutlich parasitäre Oberflächenmoleküle wie u. a. LPG (Ilg et al., 2001) und an die Wirtszelle abgegebene Effektormoleküle wie z. B. Proteophosphoglykane (Piani et al., 1999) ausschlaggebend. Immunogene Protein- und Kohlenhydrat epitope fehlen in intrazellulären Amastigoten beinahe vollständig. Diese besondere Oberflächenzusammensetzung ist sehr wahrscheinlich für die Aufrechterhaltung der Immunevasion von Bedeutung (Naderer et al., 2004). Es bedarf experimenteller Klärung, ob das Unvermögen der Mutante  $\Delta LmxMPK7$  *in vivo* eine Infektion hervorzurufen auf einer gestörten initialen Immunevasion beruht.

Die Metacaspase (MCA) scheint ebenfalls eine wachstumshemmende Funktion in Amastigoten zu besitzen. Die Nullmutante  $\Delta mca$  proliferierte in Mausmakrophagen als auch in BALB/c-Mäusen deutlich schneller als der *L. mexicana* Wildtyp (Castanys-Muñoz et al., 2012). Das Infektionsverhalten von  $\Delta mca$  war somit in beiden Systemen gleich und nicht wie

für  $\Delta LmxMPK7$  unterschiedlich. Ein ähnliches Verhalten, wie für die LmxMPK7-defiziente Mutante beobachtet, zeigte hingegen die Nullmutante des mitochondrialen Stoffwechsell-enzym Glycin-Decarboxylase (GCVP). Während  $gcvP^-$  Leishmanien ein normales Infektionsverhalten gegenüber Makrophagen *ex vivo* zeigten, erfolgte die Läsionsausbildung verglichen zum *L. major*-Wildtyp signifikant verzögert sowohl in anfälligen BALB/c- als auch in resistenten C57BL/6-Mäusen, in welchen aufgrund der Ausbildung einer TH1-gerichteten Immunantwort (Heinzel et al., 1991) Leishmanien-Läsionen nach ihrer Entstehung ausheilen (Scott et al., 2008). Neben der Möglichkeit, dass dieser Unterschied auf der in der Maus vorhandenen Immunreaktion beruht, diskutieren Scott et al. die Möglichkeit, dass der Mutante  $gcvP^-$  vielleicht *in vivo* die Fähigkeit fehlt, sich der physiologischen Umgebung und dem Nährstoffangebot während der ersten nicht-inflammatorischen Infektionsphase anzupassen. Belkaid et al. (2000) haben den Infektionsverlauf von *L. major* nach Injektion eines kleinen Inokulums von 100 Metazyklischen in die Dermis von C57BL/6-Mäusen verfolgt und zwei Phasen der Infektion charakterisiert. Die erste Phase, 4-5 Wochen nach Injektion, ist durch eine Zunahme der Parasitenzahl bei fehlenden Anzeichen von Inflammation gekennzeichnet. In der zweiten Phase repliziert der Parasit im Makrophagen in einer Umgebung, welche maßgeblich durch die aktive Immunantwort gestaltet wird und es kommt zur Läsionsausbildung. Dass Entzündungsmediatoren Einfluss auf das intrazelluläre Wachstum des Parasiten nehmen können, zeigte sich für das proinflammatorische Zytokin INF- $\gamma$ . INF- $\gamma$  für sich alleine genommen besaß einen positiven Effekt auf die Replikation der amastigoten Lebensform von *L. amazonensis* in Makrophagen (Qi et al., 2004). Ob und inwiefern sich die Zusammensetzung und auch das Nährstoffangebot der parasitären Vakuole während der präinflammatorischen- und inflammatorischen-Phase unterscheidet ist nicht bekannt. Davon, dass ein verändertes Nährstoffangebot Auswirkungen auf das Teilungspotential des Parasiten hat, kann ausgegangen werden. Freie axenische Amastigoten von *L. mexicana* besitzen eine Verdopplungszeit von ~23 Stunden in Nährstoffmedium, während sich intrazelluläre Parasiten in Makrophagen lediglich alle ~90 Stunden verdoppeln (Castanys-Muñoz et al., 2012). Vermutlich ist das begrenzte Nährstoffangebot in der parasitären Vakuole hierfür verantwortlich.

Der beobachtete Unterschied im Infektionsverhalten von  $\Delta LmxMPK7$  legt nahe, dass das *in vitro* System der in Medium kultivierten, isolierten Peritonealmakrophagen nicht alle in Gewebsmakrophagen *in situ* vorherrschenden Bedingungen wiederzugeben vermag. So fehlen *in vitro* potentielle intrazelluläre Veränderungen im Makrophagen, welche durch Wechselwirkung mit anderen Immunzellen bzw. Entzündungsmediatoren hervorgerufen werden.

#### Mögliche Funktion von LmxMPK7: Die Stoffwechselregulation.

Zu den Anpassungsreaktionen des Parasiten an das intrazelluläre Milieu der Wirtszelle gehört die Adaption an ein verändertes Nährstoffangebot. Während der Differenzierung von Promastigoten zu Amastigoten kommt es zu einer Umstellung des Stoffwechsels. Diese Umstellung wurde auch in axenischen Amastigoten beobachtet und scheint folglich, eher von Differenzierungssignalen geleitet als von einem begrenzten Nährstoffangebot getriggert zu werden (Saunders et al., 2014). Promastigote und Amastigote besitzen eine ähnliche Stoffwechselgrundausrüstung. Der Unterschied in der Expression von Genen, deren Produkte am Stoffwechsel teilnehmen, fällt in Amastigoten im Vergleich zu Promastigoten eher moderat aus. Vermutlich sind überwiegend posttranslationale Mechanismen, wie Phosphorylierungsreaktionen durch Kinasen, für die Stoffwechselanpassung von Bedeutung (McConville und Naderer, 2011). Neben dem Katabolismus von Hexose scheinen Amastigoten, im Vergleich zu Promastigoten, stärker vom mitochondrialem Stoffwechsel, wie der  $\beta$ -Oxidation abhängig zu sein (Rosenzweig et al., 2008b; Saunders et al., 2014). Es häufen sich die Hinweise, dass die Differenzierung zu Amastigoten mit einer Verlangsamung des Wachstums einhergeht und die amastigote Lebensform, abgestimmt auf das vermutlich begrenzte Nährstoffangebot in der parasitären Vakuole, bestrebt ist ihren Nährstoffbedarf zu drosseln und einen stärker auf Energieeffizienz ausgelegten Stoffwechsel auszubilden (Saunders et al., 2014). Die LmxMPK7-defiziente Mutante zeichnete sich durch eine Wachstumsbeschleunigung im pro- und amastigoten Stadium aus. Vorstellbar wäre, dass LmxMPK7 an der Stoffwechselregulation teilnimmt und das Fehlen der Kinase zu einem erhöhten Stoffumsatz und Wachstum führt. Die Nullmutante zeigte sich bei der Etablierung einer Infektion *in vivo* beeinträchtigt. Es könnte sein, dass die Funktion von LmxMPK7 insbesondere während der Differenzierung zu Amastigoten von entscheidender Bedeutung ist. Denkbar wäre ein Szenario, bei dem die Kinase im Zuge der Stoffwechselanpassung zum Einsatz kommt und hierbei zu einer Verminderung des Wachstums in Amastigoten führt. Es sollte untersucht werden, ob in  $\Delta$ LmxMPK7 im Vergleich zum Wildtyp Unterschiede im Bereich des Stoffwechsels (des Nährstoffumsatzes bzw. des Metabolitprofils) zu finden sind und ob dadurch das gesteigerte Wachstum und die gestörte Virulenz *in vivo* erklärt werden kann. Dass Stoffwechsellzyme, mit ihnen assoziierte Proteine und Substrattransporter einen Einfluss auf die Infektiosität haben können, lässt sich anhand von vielen Beispielen belegen. So bereitet das Fehlen von Glucosamin-6-Phosphat-Desaminase (GND), einem Enzym, welches zur Umsetzung von Aminosuktern notwendig ist, dem Parasiten anscheinend Probleme sich an die Nährstoffsituation in der Wirtszelle anzupassen. GND-Nullmutanten von *L. major* erzeugten in BALB/c-Mäusen keine oder nur mit Verzögerung kleinere Läsionen, auch vermehrten sie sich nicht in Makrophagen *ex vivo* (Naderer et al., 2010). Der Wegfall der Gene LmxGT1-3 von *L. mexicana*, welche für drei Isoformen von

Glucose-Transportern codieren, legt den Glucose-Transport im Parasiten lahm. Die *Δlmg1*-Zellen zeigten eine stark reduzierte Infektiosität gegenüber Makrophagen *ex vivo* und waren nicht in der Lage als axenische Amastigoten zu wachsen (Burchmore et al., 2003). Das alleinige Fehlen des Glucose-Transporters GT2 führte in Promastigoten von *L. mexicana* zu einer Verminderung der Wachstumsgeschwindigkeit und einer geringeren Zellzahl beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase (Feng et al., 2013). Das Gegenteil war für die LmxMPK7-defiziente Mutante der Fall, die Leishmanien gingen mit einer höheren Zellzahl in die stationäre Phase über als die Wildtyp-Kultur. Ist der mitochondriale Stoffwechsel des Parasiten gestört, scheint dies die Etablierung einer Infektion nach Aufnahme in die Säugierzelle stark zu beeinträchtigen. Die Einzelallelmutante von LMIT1 (einem mitochondrialen Eisentransporter) von *L. amazonensis* zeigte eine gestörte mitochondriale Funktion, was zu einem verminderten Wachstum im promastigoten und einer gestörter Virulenz im amastigoten Stadium führte. Letzteres machte sich dadurch bemerkbar, dass die Mutante nach Aufnahme in Makrophagen *ex vivo* keine Vermehrung zeigte und in C57BL/6-Mäusen zu keinen Läsionen führte (Mittra et al., 2016). Ufm1 (Ubiquitin fold modifier1) interagiert mit dem Mitochondrialen Trifunktionalen Protein, welches die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren zu Acetyl-CoA katalysiert. Der Wegfall von Ufm1, untersucht in *L. donovani*, ging mit einer Verminderung von Acetyl-CoA einher und führte in axenischen Amastigoten zu einem Wachstumsdefekt. Außerdem war es der Ufm1-Nullmutante nach Aufnahme in Makrophagen *ex vivo* nicht möglich eine Infektion zu etablieren (Gannavaram et al., 2012). Auch die Hemmung der mitochondrialen Aconitase, einem Enzym des Citratzyklus, verhindert die Etablierung einer Infektion von *L. mexicana* in Makrophagen (Saunders et al., 2014). Die Idee, dass die Kinase LmxMPK7 an der Stoffwechselregulation teilnehmen könnte, sollte experimentell aufgearbeitet werden.

Die Immunfluoreszenzfärbung mit Hilfe eines gegen den TY-Tag des LmxMPK7-Fusionsproteins gerichteten Antikörpers lässt auf eine cytoplasmatische Lokalisation der Kinase in Promastigoten schließen. Der Zellkern ist deutlich ausgespart und augenscheinlich auch das Flagellum und die Flagellartasche scheinen nicht angefärbt zu werden. LmxMPK7 scheint in sich teilenden Zellen als auch in Zellen, welche sich diesem Zellzyklusstadium nicht zuordnen lassen vorhanden zu sein. Stoffwechsellzyme im Cytoplasma wären somit für eine direkte posttranslationale Modifikation durch die Kinase zugänglich.

#### 4.1.7 Gegenüberstellung des Wachstumsverhaltens der „add-back“-Mutante und weiterer Mutanten

Die Immunfluoreszenzfärbung des TY-Epitops zeigte, dass die Expression von *LmxMPK7* vom Plasmid zu einer Mischpopulation an Zellen führt, welche die Kinase in sehr unterschiedlicher Menge synthetisieren. Die Untersuchung des Infektionsverhaltens von

episomalen Überexpressoren lässt vermuten, dass sich das Vorliegen der Kinase in unnatürlich hoher Menge negativ auf die Virulenz von Promastigoten auswirkt. Da die Expression vom pX-Plasmid zu einer Überexpression von LmxMPK7 führt, plus in der Population ein heterogenes Expressionsmuster zur Folge hat, erschien eine episodale „add-back“-Mutante nicht das System der Wahl zur Reexpression der Kinase. Folglich wurde eine genomische Komplementation der Nullmutante auf einem Allel vorgenommen und ein *LmxMPK7*-tragendes Selektionskonstrukt eingebracht. Die Expression von *LmxMPK7-TY* vom ursprünglichen genomischen Lokus der Kinase wurde in Promastigoten der „add-back“- (+/-)-Mutante bestätigt. Die Immunfluoreszenzfärbung der Promastigotenpopulation der „add-back“-Mutante fiel nahezu homogen aus. Zudem zeigte die Immunfluoreszenzmikroskopie als auch der Nachweis im Immunoblot, dass die Proteinmenge von LmxMPK7 um ein Vielfaches geringer war als in Zellen des episomalen Überexpressors. In der Gegenüberstellung von Promastigotenlysaten von Wildtyp und „add-back“-Mutante war im Immunoblot, unter Verwendung des anti-LmxMPK7-Antiserums, jeweils eine gerade noch als Bande wahrnehmbare Menge von LmxMPK7 festzustellen. Somit konnte durch die Expression der Kinase von ihrem natürlichen genomischen Lokus eine homogene, niedrige Expression erreicht werden, ähnlich der vom Wildtyp. Wie bereits für den episomalen Überexpressor beobachtet, fiel das Proteinniveau von LmxMPK7 in Promastigoten höher aus als in ausdifferenzierten Amastigoten. Für Promastigoten der *LmxMPK7*-„add-back“- (+/-)-Mutante war eine sehr schwache cytoplasmatische Färbung korrespondierend zu *LmxMPK7-TY* festzustellen. Für drei Tage alte axenische Amastigoten lag die Menge an *LmxMPK7-TY* unterhalb der Detektionsgrenze und die Zellen ließen im Vergleich zur Kontrolle unter dem Mikroskop keine Immunfluoreszenz erkennen. Zum einen könnte LmxMPK7 in Amastigoten nach Ausdifferenzierung eine untergeordnete Rolle spielen und deshalb nur in geringer Menge vorhanden sein, zum anderen könnte die insgesamt niedriger ausfallende Proteinsyntheseleistung von Amastigoten der Grund sein.

Die hergestellte *LmxMPK7*-„add-back“- (+/-)-Mutante konnte im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr auf ihre Virulenz getestet werden. Es wäre hilfreich gewesen zu wissen, ob durch Reexpression der Kinase die Infektiosität der Nullmutante wiederhergestellt werden kann. Dies hätte als Bestätigung gewertet werden können, dass der beobachtete Virulenzverlust der Nullmutante direkt auf das Fehlen von *LmxMPK7* zurückzuführen ist. Demungeachtet wurde die „add-back“-Mutante auf ihr Wachstumsverhalten untersucht. Es zeigte sich, dass das für die Nullmutante beobachtete gesteigerte Wachstum auch nach Reexpression von *LmxMPK7* in Pro- und Amastigotenkulturen unvermindert erhalten bleibt. Mögliche Erklärungen hierfür könnten sein: 1. Die Expression der Kinase von lediglich einem Allel reicht nicht aus, um den Wildtyp-Phänotyp wiederherzustellen. Beziehungsweise die Menge

an hergestellter Kinase des „add-back“ ist nicht ausreichend, um Mechanismen zu durchbrechen, welche sich die Nullmutante möglicherweise zur Umgehung der MPK7-Funktion zu Nutze macht. Bereits das Fehlen von *L. donovani* MAPK1 auf einem Allel hatte Veränderungen zur Folge (Garg und Goyal, 2015). Ähnlich verhielt es sich für den Ausfall der alpha-Untereinheit der Casein Kinase II von *L. chagasi*. In der Einzelallelmutante war die Transkriptmenge und Kinaseaktivität von CK II vermindert (Bhatia et al., 1998). 2. Das Fehlen von MPK7 ist nicht für die gesteigerte Proliferationstätigkeit der Nullmutante verantwortlich. Zum einen könnte das gesteigerte Wachstum auf MPK7-unabhängige, unspezifische Effekte zurückzuführen sein, zum anderen könnten Mechanismen zur Kompensation der MPK7-Funktion hierfür ursächlich sein. 3. Das Fehlen der Kinase ist für die gesteigerte Proliferation verantwortlich. Jedoch sind die Zellen der Nullmutante durch die beschriebenen Wege zur Umgehung der MPK7-Funktion dauerhaft in einem MPK7-unabhängigen Zustand fixiert. Eigentlich würde man davon ausgehen, dass ein zur Kompensation einer fehlenden Proteinfunktion beschrittener Umgehungsweg reversibel ist und damit bei Wiederauftreten des fehlenden Proteins aufgehoben wird. Neben vielen Beispielen einer erfolgreichen Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps nach genomischer Reexpression eines Proteins im Deletionshintergrund sind auch Beispiele in der Literatur zu finden, wo der ursprüngliche Phänotyp in komplementierten Mutanten nur zum Teil oder gar nicht wiederhergestellt werden konnte. Beispielsweise wurden bei dem Versuch eine LPG-defiziente Zelllinie zu erzeugen auch Nullmutanten generiert, deren „add-back“-Mutanten sich vom in der Nullmutante bestehenden Virulenzdefekt nicht erholten hatten, obwohl LPG nachweislich reexprimiert wurde (Späth et al., 2000). Ebenso genomische „add-back“-Mutanten der Cyclopropanfettsäuresynthetase von *L. major*, sie exprimierten das Enzym in völlig unterschiedlichen Mengen und zeigten keine Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps (Oyola et al., 2012). Generell könnte ein solches Verhalten auf eine irreversible Veränderung der Zellphysiologie der Nullmutante zurückzuführen sein. Es könnte in den genetisch veränderten Leishmanien beispielsweise eine Subpopulation selektiert worden sein, in der es zu einer sekundären Mutation gekommen ist.

Das Fehlen von MPK7 in der Nullmutante könnte auf unterschiedlichen Ebenen zu Veränderung geführt haben. Auf der Ebene des Aktivators könnte der Verlust von MPK7 zum Beispiel dazu geführt haben, dass die übergeordnete MAPKK nun andere potentielle Substrate oder auch nicht-physiologische Zielproteine vermehrt phosphoryliert. Eine Minderphosphorylierung des oder der natürlichen Substrate von MPK7 wäre ebenso naheliegend. Es wäre auch denkbar, dass alternative Wege beschritten wurden, um die MPK7-Funktion zu umgehen. Ein aberranter, jedoch vorteilhafter Phänotyp könnte sich durch Selektion einer Subpopulation in einer Leishmanienkultur durchsetzen. Eine nach Synthese von MPK7 in „falscher“ Menge erworbene Wachstumsbeschleunigung könnte für das promastigote



Zellstadium von Vorteil sein. Die betroffenen Zellen teilen sich schneller und setzen sich daher in der Kultur durch. Dieser Vorteil könnte nach Einbringung von *LmxMPK7* in diesem Stadium beibehalten worden sein. Als Maßnahme, um mit der erhöhten Kinasemenge zurechtzukommen, könnte es bereits im episomalen Überexpressor von *LmxMPK7*, dem Vorgänger der Nullmutante, zur Anschaltung potentieller Kompensationsmechanismen bzw. dauerhaften Veränderungen gekommen sein. Die Umgehung der MPK7-Funktion könnte hierbei die nachfolgende Generierung der Nullmutante überhaupt ermöglicht haben. Es fällt schwer einzugrenzen, zu welchem Zeitpunkt es zur Etablierung einer potentiellen Kompensation gekommen sein könnte. Leider war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich hier weiter in die Tiefe zu gehen und Veränderungen der Zellphysiologie der unterschiedlichen Mutanten aufzudecken.

Wie verhält es sich mit der Proliferationsgeschwindigkeit der *LmxMPK7* im Überschuss herstellenden Mutanten? Die Mutante *LmxMPK7(+/+)* + pX6MPK7TYC-ds stellte laut Ergebnis des Immunoblot etwa doppelt so viel *LmxMPK7* her wie Wildtyp-Promastigoten. Der untersuchte Klon fiel jedoch nicht durch eine veränderte Proliferationsrate auf. Im Gesamtzelllysat von Promastigoten der Mutante  $\Delta$ *LmxMPK7(-/-)* + pX6MPK7TYC-ds wurde ein Vielfaches mehr an MPK7 nachgewiesen als es für den Überexpressor *LmxMPK7(+/+)* + pX6MPK7TYC-ds der Fall war, nämlich mehr als mindestens das 8-fache. Bei  $\Delta$ *LmxMPK7(-/-)* + pX6MPK7TYC-ds handelt es sich um die Vorläufermutante von  $\Delta$ *LmxMPK7*.  $\Delta$ *LmxMPK7* erreichte in der Gegenüberstellung zu Wildtyp-Leishmanien zu jedem Zeitpunkt eine höhere Zellzahl als diese. Betrachtet man das Wachstumsverhalten des episomalen Überexpressors  $\Delta$ *LmxMPK7(-/-)* + pX6MPK7TYC-ds, fällt Erstaunliches auf. Während die Zellzahl einer Pro- bzw. Amastigotenkultur von  $\Delta$ *LmxMPK7(-/-)* + pX6MPK7TYC-ds die ersten zwei Tage deutlich hinter der von  $\Delta$ *LmxMPK7* zurückblieb, begann sie die erreichte Zellzahl der  $\Delta$ *LmxMPK7*-Kultur ab Tag drei zu überholen. Interessanterweise ging diese Zunahme der Zellteilungsrate mit einer Abnahme an *LmxMPK7*-TY-Protein einher. Eine deutliche Abnahme der *LmxMPK7*-TY-Menge ist in Amastigoten bereits ab 24 Stunden, in Promastigoten ab 48 Stunden zu erkennen. Ab Tag drei ist im Immunoblot *LmxMPK7*-TY in Gesamtzelllysaten beider Zellstadien nicht mehr nachzuweisen. Mögliche Gründe für die Abnahme von *LmxMPK7*-TY im Kulturverlauf wurden bereits unter gleichnamiger Überschrift diskutiert. Das beobachtete Phänomen lässt hinreichend Raum für die Annahme, dass ein direkter Zusammenhang zwischen Wegfall bzw. Fehlen von MPK7 und der plötzlich einsetzenden Beschleunigung des zellulären Wachstums besteht. Dies wirft in der Argumentation bildlich gesprochen Gewicht in die Waagschale, dass die Funktion der Kinase tatsächlich im Bereich der Wachstumshemmung anzusiedeln ist und entkräftet gleichzeitig den unter 2. gemachten Erklärungsversuch, der lautete: Das Proliferations-

verhalten des Wildtyps konnte in der Nullmutante durch Komplementation nicht wiederhergestellt werden, da die gesteigerte Proliferationsaktivität nicht direkt auf ein Fehlen von MPK7 zurückzuführen ist.

#### Mögliche Bedeutung der Kinasemenge:

Dass die Menge an exprimierter Kinase eine Rolle spielen kann zeigen Beispiele, wie das der Sphingosinkinase A. Leishmanien der Nullmutante waren, ähnlich der von MPK7, nicht in der Lage eine Infektion in BALB/c-Mäusen zu etablieren, während eine Infektiosität gegenüber Makrophagen *ex vivo* bestand (Zhang et al., 2013). Die „add-back“-Mutante der Sphingosinkinase A konzipiert als episomaler Überexpressor pXG-SKa rief keine Infektion in Mäusen hervor, hingegen die Reexpression vom genomischen Locus in vermutlich ähnlicher Menge wie im Wildtyp schon.

Es gibt Hinweise, dass sich eine Abnahme der MPK7-Menge direkt auf das Zellwachstum auswirkt. Sowohl die *LmxMPK7* überexprimierende Mutante als auch die Mutante  $\Delta$ *LmxMPK7*, welcher *LmxMPK7* vollständig fehlt, zeigten einen Virulenzdefekt im Mausinfektionsexperiment. Wie bereits besprochen wird angenommen, dass die Kinase physiologisch in sehr geringer Menge vorliegt. Eine starke, episodale Überexpression von *LmxMPK7* scheint für Leishmanien nicht förderlich zu sein und zog ohne Selektionsdruck den Verlust der Kinase nach sich. Diese Beobachtungen zusammengenommen zeigen, dass es Leishmanien Schwierigkeiten bereitet, wenn *LmxMPK7* in unphysiologischer Menge vorliegt. Bei *LmxMPK7* könnte es sich um eine Kinase handeln, welche zeitlich und bezüglich ihrer Aktivität und Menge innerhalb des komplexen Lebenszyklus eine strenge Regulation erfährt. Es wurde zum Beispiel für den Ras/Raf/MEK/ERK-Weg festgestellt, dass die Art der zellulären Antwort vom Kinaseaktivitätsniveau abhängig ist. Eine Überaktivierung von ERK1/ERK2 (Guégan et al., 2013) als auch von Raf (Woods et al., 1997; Sewing et al., 1997) zieht paradoxerweise einen p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-vermittelten Wachstumsarrest in der Zelle nach sich, während eine moderate Aktivität von ERK1/ERK2 bzw. Raf eine normale Zellproliferation vermittelt. Ähnliches könnte für *LmxMPK7* der Fall sein und Veränderungen der Kinase-Menge und folglich Aktivität Auswirkungen auf die zelluläre Funktion besitzen. Generell würde ein dosiertes Auftreten für einen potentiellen Wachstumsinhibitor Sinn machen. Leishmanien durchschreiten im Lebenszyklus Phasen, in denen die Zellteilung zu Gunsten von Differenzierungsvorgängen eingestellt wird. Möglicherweise ist die Aktivität von *LmxMPK7* innerhalb eines solchen Zeitfensters des Lebenszyklus vorteilhaft für die Zelle und wird außerhalb dieses nur bedingt toleriert.

#### 4.1.8 Ist LmxMPK7 für Leishmanien essentiell und ein potentielles „Drug Target“? – Ein Fazit

Die Untersuchung der Funktion essentieller Proteine *in vivo* ist häufig problematisch, da die Generierung einer Nullmutante tödlich ist oder einsetzende Kompensationsmechanismen den Phänotyp maskieren. Erschwerend kommt hinzu, dass es sich allem Anschein nach bei LmxMPK7 um ein endogen in geringer Menge vorkommendes Protein handelt. Anscheinend führt das Vorhandensein von LmxMPK7 in nicht-physiologischer Menge, einschließlich des gänzlichen Fehlens der Kinase, zu einer Störung der Virulenz von Promastigoten im Säugertierwirt. Dies spricht dafür, dass MPK7 für die Infektion von Säugerzellen von Bedeutung ist. Eine Aussage, ob die Kinase für das Leben von Promastigoten und auch über den Infektionsprozess hinaus, für den Fortbestand von intrazellulären Amastigoten essentiell ist, kann anhand der hier zugrundeliegenden Daten nur mit Zurückhaltung getroffen werden. In der Regel werden Gene, welche sich in Promastigoten schwer auf beiden Allelen deletieren lassen als essentiell für dieses Stadium gehandelt – es erscheint wahrscheinlich, dass dies für LmxMPK7 ebenso zutrifft. Die genomische Doppeldelentionsmutante war schwierig herzustellen und es gelang schließlich nur in Gegenwart einer ersatzweisen LmxMPK7-Expression vom Plasmid *LmxMPK7* auf dem zweiten Allel zu deletieren. Der Großteil der Transfektanten hatte die MPK7-Genomregion verdoppelt und dadurch neben der Integration des Resistenzgens die Kinase behalten. Dass Leishmanien eine Vervielfachung des betreffenden Gens vornehmen, wird häufig für Deletionsversuche von essentiellen Genen berichtet (z. B. Feng et al., 2013; Mittra et al., 2016). Dies alles spricht dafür, dass LmxMPK7 in die Gruppe der für das promastigote Stadium essentiellen Proteine einzuordnen ist. Scheinbar im Widerspruch dazu sah man sich schlussendlich jedoch einer Nullmutante gegenüber, die einmal erzeugt, gut in Kultur wuchs, und die sogar zu höheren Zellzahlen heranwuchs als Wildtyp-Leishmanien. Andererseits könnte MPK7 für Promastigoten nicht essentiell sein und es liegen andere Gründe vor, warum eine Entfernung des Gens schwer möglich ist bzw. warum die Zellen sich vom Gen-Knockout nicht erholen. *LmxMPK7* wird nur in geringer Menge exprimiert. Es ist gut möglich, dass das Resistenzgen integriert am genomischen Locus von *LmxMPK7* ebenfalls nur schwach exprimiert wird. Diese schwache Expression könnte möglicherweise nicht ausreichend sein, um dem hohen Selektionsdruck durch das Antibiotikum standzuhalten und die Transfektanten gehen zugrunde.

Der Einsatz der CRISPR/Cas9-Methode in Leishmanien eröffnet ganz neue Möglichkeiten das Erbgut des Parasiten gentechnisch zu verändern (Sollelis et al., 2015). CRISPR steht für „Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats“. Mit Hilfe einer einzelnen Leit-RNA („single guide RNA“) können gezielt Sequenzen im Genom aufgesucht und anschließend von der RNA-abhängigen DNA-Endonuklease Cas9 geschnitten werden (Doudna und Charpentier, 2014; Zhang et al., 2014; Gasiunas et al., 2012). Nachfolgend wird der von

Cas9 erzeugte Doppelstrangbruch durch homologe Rekombination, wenn eine DNA-Vorlage vorhanden ist, bzw. Mikrohomologie-vermittelte Endverbindung („micro-homology mediated end joining“) repariert (Duncan et al., 2017). Nicht-homologe Endverbindung („non-homologous end joining“) scheint in Leishmanien nicht vorhanden zu sein (Passos-Silva et al., 2010). Mit dieser neuen molekulargenetischen Methode ist die Deletion und Insertion von Genen möglich. Ein Zielgen kann beispielsweise durch ein Resistenzgen ersetzt werden oder ein Gen, das für einen Protein-Tag codiert, in das Zielgen integriert werden (Beneke et al., 2017). Das CRISPR-System kann dafür genutzt werden ein essentielles Gen als solches zu identifizieren. Nullmutanten können innerhalb einer einzigen Transfektionsrunde erzeugt werden und Leishmanien können dem nicht, durch beispielsweise Verdopplung einzelner Chromosomen, entkommen (Sollelis et al., 2015). Daher wäre CRISPR-Cas9 für die Herstellung einer Nullmutante von *LmxMPK7* interessant. Da unklar ist, ob die Expression des Resistenzgens am *LmxMPK7*-Lokus für die anschließende Selektion ausreicht, wäre es sinnvoll *LmxMPK7* ohne Selektion zu deletieren. Zhang et al. (2015) haben gezeigt, dass dies mit CRISPR-Cas9 möglich ist. Dazu wurde in *L. donovani* als Vorlage ein Oligonukleotid mit Stop-Codons, flankiert von 25 Nukleotide langen homologen Bereichen, zur Deletion eines Gens eingebracht. Die Zellen mit CRISPR-Cas9-Aktivität können hierbei durch gleichzeitige Mutation des Miltefosin-Transporter Gens selektiert werden. Die Mutation dieses Gens führt zur Miltefosin-Resistenz (Zhang et al., 2017).

Ein interessantes Beispiel stellt der Knockout-Versuch von *LmxGT2*, einem von drei Genen in *L. mexicana*, welches für einen Glucose-/Hexosetransporter codiert, dar (Feng et al., 2013). Obgleich die resultierende *LmxGT2*-Nullmutante lebensfähig war, in Makrophagen *ex vivo* replizierte und sich im Promastigoten-Stadium durch eine geringere Glucose-Aufnahme und ein vermindertes Zellwachstum auszeichnete, war es nicht möglich *LmxGT2* durch gezielte homologe Rekombination zu entfernen. Erst die Überexpression eines, scheinbar für den Glucosetransporter-Genlokus spezifischen, „second site suppressor“-Gens *LmxPIFTC3* machte den Wegfall von *LmxGT2* möglich. Die Expression von „second site suppressor“-Genen resultiert aus einer Zweitmutation an anderer Stelle des Genoms als der des Zielgens, dessen Mutation sie ermöglichen. Für das spätere Überleben der Nullmutante spielte die Überexpression von *LmxPIFTC3* jedoch keine Rolle. Identifiziert wurde *LmxPIFTC3* in diesem Zusammenhang erstmals als Bestandteil eines extrachromosomalen 40 kDa-Elements, welches die zugehörige Mutante im Rahmen des Knockouts des kompletten Genclusters *LmxGT1-LmxGT2-LmxGT3* amplifiziert hatte (Burchmore et al., 2003; Feng et al., 2009). Die Autoren mutmaßen, dass *LmxPIFTC3*, eine Komponente des Intraflagellartransports, kurzzeitig die Umstellung auf einen Glucose-unabhängigen Metabolismus ermöglicht, unter dessen Beibehaltung schlussendlich eine überlebensfähige Mutante erzeugt werden

kann. Es wäre sinnvoll  $\Delta LmxMPK7$  und den vorangegangenen Überexpressor einer Untersuchung auf genetische Aberrationen, wie Genamplifikationen oder -deletionen an von *LmxMPK7* unterschiedlichen Loci zu unterziehen. Eine beibehaltene „second-site“-Mutagenese könnte Zellen von  $\Delta LmxMPK7$  in einer MPK7-unabhängigen Zellphysiologie fixieren. Dies könnte wiederum eine mögliche Erklärung dafür sein, dass der add-back-Versuch zu keiner Revision des Phänotyps geführt hat.

Der Frage, ob es sinnvoll wäre MPK7 als „Drug Target“ zu nutzen und hemmende Substanzen gegen die Kinase zu entwickeln, sollte man sich im speziellen Fall der MPK7 und nach den gemachten Erfahrungen, wenn möglich über den Ansatz einer direkten Inhibition der Kinase nähern. Die Nutzung eines Kinase-spezifischen Medikaments führt in der Regel zu einem plötzlichen Wegfall der Aktivität des Zielproteins. Die Reaktion von Leishmanien auf das plötzliche Fehlen der MPK7-Funktion könnte am ehesten mit Hilfe eines induzierbaren Hemmsystems simuliert werden. Zudem könnte so der lange und wie gesehen problembehaftete Weg bis zur Wegnahme der Kinase durch gentechnische Manipulation vermieden und damit Kompensationsmechanismen umgangen werden.

Für diese Art der Untersuchung wurde MPK7 als inhibitorsensitive-(IS)-Mutante konzipiert. In der IS-Mutante wird durch Austausch des „gatekeeper“-Rests (Threonin-220) eine zusätzliche Tasche im Bereich der ATP-Bindungsstelle geschaffen, an welche nachfolgend ein synthetischer Inhibitor binden und die Kinase in ihrer Aktivität hemmen kann (Bishop et al., 2001). *LmxMPK7-IS* wurde mit Hilfe eines Selektionskonstrukts in den *LmxMPK7*-Genlocus von *L. mexicana* integriert. Leider konnten die so veränderten Parasiten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr getestet werden.

Ein interessantes molekularbiologisches Werkzeug zur regulierbaren Entfernung eines Genprodukts stellt die von Madeira et al. (2009) in Leishmanien etablierte Methode dar. Hier wird das Protein von Interesse mit der destabilisierenden Domäne dd des mutierten FK506-bindenden Proteins fusioniert. Dd führt das modifizierte Protein ohne Rapamycin oder ein Rapamycin-Analogon als stabilisierenden Liganden in den proteasomalen Abbau. Da eine Abhängigkeit der Proteinmenge von der Ligandenkonzentration beobachtet wurde, sehen die Autoren die Möglichkeit die Menge eines Zielproteins in Leishmanien zu titrieren. Für das in *L. major* getestete Reporter-gen konnte ein Verlust des Proteins innerhalb von zwei Stunden nach Entfernung des Liganden beobachtet werden. Die Option, die *LmxMPK7*-Menge vor dem Differenzierungsprozess oder während einer Wachstumsphase der Kultur relativ rasch zu reduzieren bzw. nach Wegfall wieder zu steigern, könnte mehr Erkenntnisse über den Wirkungszeitraum der Kinase während des parasitären Lebenszyklus liefern. Die Regulationsmöglichkeit über Kopplung mit dd könnte daher eine lohnende Ergänzung zu den gemachten Versuchen darstellen.

2016 wurde von Duncan et al. ein induzierbares System zur Gendeletion auf Basis der Aktivität von dimerisierter Cre-Rekombinase und gefloxter CRK3 in Pro- und Amastigoten von *L. mexicana* erfolgreich getestet. Die Expression der Cre-Rekombinase wurde hierbei mittels Rapamycin induziert. Diese Methode ist vor allem interessant, da sie eine stadienspezifische Gendeletion zulässt und könnte auch für Gene wie LmxMPK7 erfolgversprechend sein.

## 4.2 LmxGSK3

### 4.2.1 Charakterisierung von GSK3

#### – Strukturelle und Proteinbiochemische Besonderheiten

Das Gen von LmxGSK3 $\alpha$  bzw. LmxGSK3 $\beta$  wurde aus einer gDNA-Phagenbank von *L. mexicana* isoliert und sequenziert. Anhand der Aminosäuresequenz wurden Ähnlichkeiten und Unterschiede zu den umfassend erforschten humanen Kinasen HsGSK3 $\alpha$  und HsGSK3 $\beta$  herausgearbeitet sowie Vergleiche zu anderen Homologen von Trypanosomatiden angestellt.

#### 4.2.1.1 LmxGSK3 $\alpha$

LmxGSK3 $\alpha$  gehört mit einem Molekulargewicht von 90,9 kDa zu den großen Proteinen. Indessen fallen LmxGSK3 $\beta$  mit 40,7 kDa und die humanen Kinasen hsGSK3 $\alpha$  mit 51 kDa bzw. hsGSK3 $\beta$  mit 47 kDa im Vergleich um einiges kleiner aus. Der Größenunterschied kommt dadurch zustande, dass GSK3 $\alpha$  von *Leishmania spec* drei zusätzliche Insertionen innerhalb der Kinasedomäne und eine deutlich längere CMGC-Insertion besitzt. Es wurden kaum Sekundärstrukturelemente im Bereich der drei Insertionen von LmxGSK3 $\alpha$  vorhergesagt. Möglicherweise handelt es sich bei diesen um zusätzliche Schleifen auf der Oberfläche der Kinase, welche spezifische Wechselwirkungen ermöglichen. Außerdem besitzt LmxGSK3 $\alpha$  ähnlich der humanen GSK3 $\alpha$  einen langen, der Kinasedomäne vorangehenden, N-terminalen Bereich. Die N-terminale Extension von hsGSK3 $\alpha$  ist auffallend reich an Glycinresten. Die Funktion dieses Proteinabschnitts ist unklar (Frame und Cohen, 2001). In der N-terminalen Extension von Leishmanien-GSK3 $\alpha$  ist Glycin nicht überproportional repräsentiert. Ungewöhnlich ist allerdings eine zweimal vorkommende, 4-8 Aminosäuren lange Abfolge, in welcher sich Cystein und Valin abwechseln und für welche eine  $\beta$ -Faltblattstruktur vorhergesagt wird. Die Bedeutung einer solchen Sequenz ist unbekannt.

Den veröffentlichten Genomsequenzen der Spezies *L. major*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. braziliensis*, *T. brucei* und *T. cruzi* wurde die Sequenz der vorhandenen Homologe von LmxGSK3 $\alpha$  bzw. LmxGSK3 $\beta$  entnommen. Die Auswertung der annotierten Aminosäuresequenz lieferte für den C-Terminus von GSK3 $\alpha$  von *L. braziliensis* keine Sequenz. Auch die

Sequenz des Homologs von *L. donovani* ist unvollständig. Für *L. major* (Ivens et al., 2005) ist eine N-terminal verkürzte Sequenz annotiert, wobei das Start-Methionin dem Methionin-121 der LmxGSK3 $\alpha$ -Sequenz entspricht. Das für LmxGSK3 $\alpha$  angenommene Start-Methionin wurde mit Hilfe von reverser Transkription von isolierter mRNA und anschließender Amplifikation unter Einsatz von Oligonukleotiden, welche die Miniexonsequenz bzw. LmxGSK3 $\alpha$  erkennen, experimentell bestätigt. Die Spleißerkennungssequenz und somit das Start-Methionin von LmjGSK3 $\alpha$  wurden hingegen nicht experimentell verifiziert. Das Alignment zeigt, die Sequenz von *L. infantum* bzw. *L. major* besitzt an der Position des Start-Methionins von LmxGSK3 $\alpha$  ebenfalls einen Methionin-Rest. Für LinGSK3 $\alpha$  wurde dieser auch als Start annotiert (Peacock et al., 2007). Für Homologievergleiche wurde die annotierte Sequenz von LmjGSK3 $\alpha$  daher mit der translatierten stromauf-Sequenz ergänzt betrachtet und das Methionin korrespondierend zum Lmx/LinGSK3 $\alpha$ -Start-Methionin als korrekter Start angenommen. LmxGSK3 $\alpha$ , LinGSK3 $\alpha$  bzw. LmjGSK3 $\alpha$  sind mit einer Länge von 843, 844 bzw. 854 Aminosäuren ähnlich groß. LmxGSK3 $\alpha$  und das jeweilige Homolog von *L. major* bzw. *L. infantum* besitzen zu ~83 % gleiche und zu ~86 % ähnliche Aminosäurereste. Unterschiede finden sich hauptsächlich innerhalb der N-terminalen Extension und innerhalb der zusätzlichen Insertionen von GSK3 $\alpha$ . Anders verhält sich der Sequenzvergleich zu den Homologen von *T. brucei* und *T. cruzi*. Diese stimmen in geringerem Maße mit LmxGSK3 $\alpha$  überein. Für sie wurde eine Aminosäuregleichheit von ~25 % und –ähnlichkeit von ~34 % ermittelt. Dies ist sicherlich mit darauf zurückzuführen, dass sich die homologen Proteine von Trypanosomen um einiges kompakter präsentieren, so fehlen ihnen zwei der drei Insertionen der Kinasedomäne. Auch das CMGC-Insert und der N-Terminus fallen um einiges kürzer aus als bei Leishmanien-GSK3 $\alpha$ . Über die Aufgabe von GSK3 $\alpha$  in Trypanosomatiden ist noch nichts bekannt, daher ist es nicht möglich die genannten Unterschiede zwischen den Spezies gezielt zu bewerten. Die große GSK3 von Leishmanien wurde in der vorliegenden Arbeit, unseres Wissens nach, erstmals aus einem Parasiten isoliert, kloniert und untersucht.

#### Leishmanien-GSK3 $\alpha$ besitzt ein Signalpeptid:

Überraschenderweise wurde für den N-Terminus von LmxGSK3 $\alpha$  ein Signalpeptid des sekretorischen Wegs mit Signalpeptidase I-Schnittstelle nach Aminosäureposition 22 mit SignalP vorhergesagt. Dies war auch für GSK3 $\alpha$ -Homologe anderer Leishmanienspezies der Fall, jedoch nicht für potentielle Homologe von Trypanosomen. Eine N-terminale Signalsequenz fand sich für LinGSK3 $\alpha$  mit wahrscheinlichster Schnittstelle nach Aminosäureposition 28 bzw. für LmjGSK3 $\alpha$  nach Aminosäureposition 21 (einen gleich langen N-Terminus wie bei Lmx/LinGSK3 $\alpha$  vorausgesetzt). Eine Transmembrandomäne oder ein GPI-Anker, wie ihn membrangebundene Oberflächenproteine von Leishmanien häufig

besitzen, scheinen in GSK3 $\alpha$  nicht vorhanden zu sein. Ob es sich um ein „echtes“ Signalpeptid handelt und GSK3 $\alpha$  über den sekretorischen Weg aus Leishmanien ausgeschleust wird, sucht noch seine experimentelle Bestätigung. DebRoy et al. (2010) durchsuchten das Genom von *L. infantum chagasi* computergestützt auf Gene, bei deren Produkt es sich um klassisch sekretierte Proteine handeln könnte. Hierbei wurde LinGSK3 $\alpha$  auch aufgeführt, jedoch nicht weiter untersucht. In mehreren Studien wurden Überstände von Leishmanienkulturen auf freigesetzte parasitäre Proteine untersucht. In Überstände von *L. donovani* Promastigoten (Silverman et al., 2008), *L. braziliensis* Promastigoten (Cuervo et al., 2009) und *L. mexicana*-Promastigoten nach vier Stunden Temperaturerhöhung auf 37 °C konnten eine Vielzahl von freigesetzten Proteinen nachgewiesen und unter Einsatz von MALDI-Massenspektrometrie identifiziert werden. Promastigoten in der stationären Wachstumsphase von *L. major* wurden für sechs Stunden bei 35 °C und pH 5,5 inkubiert. Gegen den Kulturüberstand wurden Antikörper generiert und die erkannten Epitope unter Zuhilfenahme einer cDNA-Bank identifiziert (Chenik et al., 2006). Mittels CMAT (Change Mediated Antigen Technology) wurde versucht immunreaktive Moleküle von *L. donovani* bzw. *L. pifanoi* zu identifizieren, welche in die parasitäre Vakuole entlassen werden (Kima et al., 2010). Auf diesem Wege wurden zehn Proteine gefunden. Eines davon besaß eine Signalsequenz. Dem Großteil der in den verschiedenen Studien extrazellulär gefundenen Proteine fehlte eine N-terminale Signalsequenz als Sortierungsmerkmal (Silverman et al., 2008; Cuervo et al., 2009). Es wird vermutet, dass in Leishmanien viele Proteine nicht über den klassischen sekretorischen Weg freigesetzt, sondern alternativ mittels Exosomen aus dem Parasiten ausgeschleust und anschließend von der Wirtszelle aufgenommen werden (Silverman et al., 2010; Hassani et al., 2011). Bei der klassischen Sekretion gelangen die Proteine vom ER über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran, wobei in Trypanosomatiden davon ausgegangen wird, dass die Flagellartasche den Hauptort der Sekretion darstellt (McConville et al., 2002). GSK3 $\alpha$  zählte in keiner der genannten Studien zu den identifizierten freigesetzten Proteinen. Mögliche Gründe hierfür wären, neben dem einer grundsätzlich fehlenden Freisetzung: Die Sequenz der GSK3 $\alpha$ -Homologe von *L. major*, *L. donovani* und *L. braziliensis* wurde nicht vollständig annotiert. Studien die zur Zuordnung von Peptiden der freigesetzten Proteine die Genomdatenbank dieser Spezies heranzogen, könnten GSK3 $\alpha$  dadurch verfehlt haben. In einer Studie wurden Proteine größer 90 kDa ausgeschlossen (Corrales et al., 2010) – zu diesen Proteinen gehört GSK3 $\alpha$ . DebRoy et al. (2010) haben für die Freisetzung von Proteinen stadienabhängige Unterschiede gefunden. Womöglich wurde nicht das Stadium untersucht in welchem GSK3 $\alpha$  potentiell freigesetzt wird. Besonders die Identifizierung von Proteinen, welche vom Parasiten in der Wirtszelle freigesetzt werden gestaltet sich schwierig. In den meisten Studien dienten axenische Promastigoten als Ausgangsmaterial.



Es wird angenommen, dass sekretierte/exkretierte Proteine eine wichtige Rolle für die Immunevasion des Parasiten im Säugetierwirt spielen. Von Leishmanien freigesetzte Proteine wurden im Cytosol und einige auch im Zellkern von infizierten Makrophagen nachgewiesen (Kima et al., 2010). Mit der Charakterisierung einiger dieser vermuteten Virulenzfaktoren, wie z. B. GP63, EF-1 $\alpha$  und Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase, wurde bereits begonnen. Es wurde gezeigt, dass diese mitunter in Signalwege der Wirtszelle eingreifen (Lambertz et al., 2012). In Leishmanien gibt es Hinweise auf extrazelluläre Proteinphosphorylierung. Lebende Promastigoten von *L. major* führten zur Phosphorylierung von Komplementfaktoren (Hermoso et al., 1991). Eine solche Phosphorylierung kann eine Inaktivierung der Komplementkaskade nach sich ziehen (Forsberg et al., 1990). Eine von Promastigoten konstitutiv freigesetzte Proteinkinase, bei welcher es sich wahrscheinlich um ein CK1-Homolog handelt, phosphorylierte beispielsweise C3a (Sacerdoti-Sierra und Jaffe, 1997). Das Leishmanien-Genom codiert für sechs potentielle Casein Kinase 1-(CK1)-Isoformen (Parsons et al., 2005). Zwei davon wurden in Überständen von *L. donovani* Promastigoten nachgewiesen, CK1.2 (Silverman et al., 2008) und CK1.4 (Dan-Goor et al., 2013). CK1.4 ist mit einem potentiellen N-terminalen Signalpeptid ausgestattet. Im Vergleich zum Wildtyp wuchsen Promastigoten, welche CK1.4 überexprimierten zu höheren Zellzahlen heran, brachten mehr Metazyklische hervor und führten zu höheren Infektionsraten bei Infektion von Mausmakrophagen *ex vivo* (Dan-Goor et al., 2013). Der CK1 Inhibitor D4476 führte zu einem verminderten Wachstum von axenischen und intrazellulären Amastigoten (Rachidi et al., 2014). Es ist noch nicht viel über die Zielproteine, an welchen die freigesetzten parasitären Moleküle in der Wirtszelle angreifen bekannt. Die Phosphorylierung der Untereinheit IFNAR1 des Typ I Interferon-Rezeptors zog nach Ubiquitinierung den Abbau des Rezeptors nach sich und führte so zu einer Abnahme des IFN- $\alpha/\beta$ -Signals. Ähnlich wie IFN- $\gamma$  erhöht IFN- $\alpha$  die iNOS-Menge, und ist damit im Makrophagen für die Abwehr intrazellulärer Erreger von Bedeutung. Die humane Casein Kinase 1 $\alpha$  scheint die für die Phosphorylierung von IFNAR1 hauptverantwortliche Kinase zu sein (Liu et al., 2009). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass auch das Leishmanien-Homolog CK1.2 potentiell in der Lage ist IFNAR1 zu phosphorylieren und dadurch den Typ I Interferon-Rezeptor in den Abbau zu schicken. Eine der möglichen Aufgaben der von Leishmanien freigesetzte Casein Kinase 1 könnte es sein, den IFN $\alpha/\beta$ -Signalweg in der Wirtszelle negativ zu beeinflussen. Die Casein Kinase 1 besitzt eine Reihe von Substraten in Säugetierzellen. In einigen dieser Substrate, wie dem Transkriptionsfaktor NFAT1 oder dem Protein des zirkadianen Rhythmus mPER2, scheint F-X-X-X-F für CK1 als „Docking“-Motiv zu dienen (Okamura et al., 2004). Ein F-X-X-X-F-Motiv findet sich auch in IFNAR1 oder C3a. An die Kinasedomäne von GSK3 $\alpha$  von Trypanosomatiden schließt sich ein F-X-X-X-F-Motiv an. Dessen Funktion und ob es zur Interaktion mit CK1 dienen könnte, wurde noch nicht untersucht.

#### LmxGSK3 $\beta$ phosphoryliert LmxGSK3 $\alpha$ im Kinase-Aktivitätstest:

Für das LmxGSK3 $\alpha$ -Fusionsprotein mit His-Tag konnte keine Expression in *E. coli* nachgewiesen werden. Das Signalpeptid von LmxGSK3 $\alpha$  hatte sehr wahrscheinlich zu einer Sekretion des Proteins geführt. Das Fusionsprotein mit MalBP- bzw. GST-Tag war möglicherweise aufgrund seiner geringen Löslichkeit einer Ausschleusung aus der Zelle entgangen und konnte daher aufgereinigt werden.

Der Kinase-Aktivitätstest mit rekombinantem Protein zeigte, dass LmxGSK3 $\alpha$  sich selbst und artifizielle Substrate wie MBP phosphoryliert und dass die Kinase Magnesium als Co-Faktor benötigt. LmxGSK3 $\beta$  phosphorylierte LmxGSK3 $\alpha$  *in vitro*. Die beiden rekombinanten Proteine wurden in Gegenwart von radioaktiv markiertem Phosphat und dem artifiziellen Substrat MBP zusammen inkubiert. Während das Ausmaß an Autophosphorylierung von LmxGSK3 $\beta$  in Gegenwart von LmxGSK3 $\alpha$  unverändert blieb, wurde deutlich weniger radioaktives Phosphat in das vorhandene MBP eingebaut. Daraus lässt sich folgern, dass LmxGSK3 $\beta$  die Kinase LmxGSK3 $\alpha$  als Substrat gegenüber dem artifiziellen Substrat MBP bevorzugt. Ob die Phosphorylierung durch LmxGSK3 $\beta$  zu einer Änderung der Aktivität von LmxGSK3 $\alpha$  führt, könnte durch Co-Expression beider Kinasen mit anschließender Aufreinigung von LmxGSK3 $\alpha$  und Aktivitätstest geklärt werden. Wo phosphoryliert LmxGSK3 $\beta$  LmxGSK3 $\alpha$ ? Es konnte ausgeschlossen werden, dass LmxGSK3 $\beta$  Phosphat in den MalBP-Tag, mit dem LmxGSK3 $\alpha$  versehen ist, einbaut. Bei GSK3 handelt es sich um eine dual-spezifische Kinase. Für LmxGSK3 $\beta$  wurde *in vitro* und *in vivo* (Rosenqvist, Dissertation 2011) eine Phosphorylierung an Tyrosin-186 nachgewiesen. Für das rekombinante Protein wurde gezeigt, dass die Kinase selbst diese Phosphorylierung vornimmt. Es gibt Anhaltspunkte, dass die Autophosphorylierung von LmxGSK3 $\beta$  auch durch intermolekulare Protein-Protein-Interaktion zustande kommen kann. Damit besteht zum einen die Möglichkeit, dass LmxGSK3 $\beta$  LmxGSK3 $\alpha$  an Tyrosin-499, dem Pendant zu Tyrosin-186, phosphoryliert. Die Phosphorylierung des zentralen Tyrosin-Rests in der Aktivierungsschleife führt in der Regel zur Aktivitätssteigerung der Kinase. Im Falle einer Phosphorylierung von Tyrosin-499, wäre es vermutlich zu einer deutlichen Steigerung des Phosphateinbaus in MBP gekommen. Außerdem wird vermutet, dass lediglich die unreife GSK3 zur Autophosphorylierung an Tyrosin fähig ist, während die reife Kinase ausschließlich Serin-/Threonin-Kinase-Aktivität gegenüber Substraten besitzt (Lochhead et al., 2006). Dies macht die zweite Möglichkeit wahrscheinlicher, dass LmxGSK3 $\beta$  LmxGSK3 $\alpha$  an Serin- bzw. Threonin-Resten phosphoryliert. Ob es sich bei LmxGSK3 $\alpha$  auch *in vivo* um ein Substrat von LmxGSK3 $\beta$  handelt, bleibt zu bestätigen. Bis dato konnten in Leishmanienlysaten keine Phosphopeptide LmxGSK3 $\alpha$  zugeordnet werden. Sollte die Kinase aufgrund des Signalpeptids tatsächlich sekretiert werden, ist dies nicht verwunderlich. Allerdings wurde in Prozyklischen von *T. brucei* das dem GSK3 $\alpha$ -Homolog zuordenbare Peptid 274-NVPpYIFSR-281 im ange-

reicherten Gemisch Tyrosin-phosphorylierter Peptide mittels LC-MS/MS identifiziert (Nett et al., 2009a). Das phosphoryliert vorgefundene Tyrosin-277 von TbGSK3 $\alpha$  entspricht Tyrosin-499 in der Aktivierungsschleife von LmxGSK3 $\alpha$ . In der Literatur wird nicht erwähnt, dass sich die einander sehr ähnlichen Isoformen der humanen GSK3 gegenseitig phosphorylieren. Allerdings ist anzumerken, dass sich in Homologievergleichen LmxGSK3 $\alpha$  von LmxGSK3 $\beta$  und den beiden humanen Kinasen stärker unterscheidet als diese drei es untereinander tun. Interessant wäre zu wissen, ob die humane GSK3 LmxGSK3 $\alpha$  zu phosphorylieren vermag. Besonders im Hinblick darauf, dass LmxGSK3 $\alpha$  aufgrund des Signalpeptids möglicherweise sekretiert wird und es Hinweise gibt, dass freigesetzte Leishmanienproteine scheinbar über den PI3K/Akt-Signalweg zur Inaktivierung von GSK3 $\beta$  in der Wirtszelle führen (Lambertz et al., 2012). Die verminderte GSK3-Aktivität zieht eine Abnahme der IL-12- und Zunahme der IL-10-Produktion in der Wirtszelle nach sich, was wiederum die Aufrechterhaltung einer Leishmanien-Infektion begünstigt.

Während sich hsGSK3 $\alpha$  und hsGSK3 $\beta$  in einigen Signalwegen gegenseitig vertreten können, erscheint es in Leishmanien aufgrund der Andersartigkeit von LmxGSK3 $\alpha$  eher unwahrscheinlich, dass LmxGSK3 $\alpha$  und LmxGSK3 $\beta$  in ihrer Funktion deckungsgleich sind. Auch wurde für LmxGSK3 $\beta$  kein Signalpeptid gefunden. Der Versuch des Gen-Knockouts von LmxGSK3 $\alpha$  steht allerdings noch aus. Für eine unterschiedliche Funktion beider GSK3-Homologe von *T. brucei* sprechen RNAi-Experimente (Ojo et al., 2008). Im Rahmen einer Hochdurchsatz-Phänotypisierung aufbauend auf RNAi wurde festgestellt, dass die Herunterregulation der langen TbGSK3 $\alpha$  zu keiner Beeinträchtigung der Blutbahn- bzw. prozyklischen Form führt (Alsford et al., 2011). Ojo et al. (2008) beobachteten hingegen in der Blutbahn-Form einen schwache Wachstumsminderung unter RNAi der langen GSK3. Bei Verminderung von TbGSK3 $\alpha$  während der Differenzierung der Blutbahn- zur prozyklischen Form, kam es allerdings zu einem gesteigerten Überleben („gain of fitness“) (Alsford et al., 2011). Für einige wenige weitere Genprodukte von *T. brucei* wurde ein ähnliches Verhalten beobachtet. Zu diesen gehört auch eine Zinkfingerkinase, welche bereits als differenzierungshemmende Kinase eingestuft wurde (Vassella et al., 2001).

#### 4.2.1.2 LmxGSK3 $\beta$

Um ein Protein für eine Testung im großen Maßstab zugänglich zu machen, z. B. der Testung von potentiellen Inhibitoren bei essentiellen Proteinen, ist es wichtig es in ausreichender Menge, Reinheit und guter Aktivität zur Verfügung zu stellen. Dies setzt eine biochemische Charakterisierung voraus. LmxGSK3 $\beta$  wurde rekombinant exprimiert und als His-Fusionsprotein aus *E. coli* aufgereinigt. GSK3 wird in der Literatur als Magnesium-abhängige Kinase beschrieben. Die Präferenz für Mg<sup>2+</sup> als Cofaktor bestätigte sich auch für Leishmanien-GSK3. Bei den getesteten Temperaturen 27 °C, 30 °C und 34 °C war für GSK3

kein Aktivitätsunterschied festzustellen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Aktivität von LmxGSK3 $\beta$  physiologisch sowohl im promastigoten als auch amastigoten Lebensstadium von Bedeutung ist. Das Insektenstadium ist an eine Umgebungstemperatur von etwa 27 °C adaptiert, das Säugetierstadium an 34 °C für kutane bzw. 37 °C für viszerale Spezies. Für LmxGSK3 $\beta$  wurden für den Kinase-Aktivitätstest pH 7,2, 5 mM Mg<sup>2+</sup>, 1 h bei 30 °C als optimale Reaktionsbedingungen ermittelt. Die Kinase zeigte sowohl eine ausgeprägte Auto- als auch Substratphosphorylierungsaktivität. Das Myelin Basische Protein (MBP), welches nachweislich ein ausgezeichnetes *in vitro* Substrat für Proteinkinase A und C, MAP-Kinasen und GSK3 $\beta$  ist (Kawakami et al., 2008), schnitt unter den getesteten artifiziellen Substraten  $\alpha$ -Casein und Histon H1 am besten ab.

#### 4.2.1.2.1 Phosphorylierung von LmxGSK3 $\beta$ und die Bedeutung für die Kinase-Aktivität

Um eine inaktive Form der Kinase zu erzeugen, wurde in LmxGSK3 $\beta$ -KM der für den Phosphatgruppentransfer notwendige Lysinrest K49 gegen Methionin ersetzt. Der Kinase-Aktivitätstest bewies, dass auf diesem Wege eine Mutante erzeugt wurde, deren rekombinantes Protein verglichen zur Wildtyp-Kinase nur noch eine sehr geringe Auto- und Substratphosphorylierungs-Aktivität aufweist. Die beobachtete schwache Restaktivität der KM-Mutante könnte darauf zurückzuführen sein, dass in direkter Nachbarschaft des ausgetauschten Lysin-Rests ein weiterer Lysin-Rest anzutreffen ist (Sequenz: V-A-I-**K49**-K-V). Dieser bildet womöglich ersatzweise, wenn auch nicht suffizient, eine Salzbrücke zur Seitenkette von Glutamat-61 aus.

#### Phosphorylierung an Serin-232 und Tyrosin-186

Die MS/MS-Analyse wies in rekombinantem aktivem LmxGSK3 $\beta$ -Protein eine Phosphorylierung an Serin-232 und Tyrosin-186 nach. Das GSK3-Homolog MCK1 aus Hefe liegt ebenfalls an Tyrosin und Serin phosphoryliert vor. Die inaktive KM-Mutante von MCK1 wies lediglich eine Phosphorylierung an Serin auf. Daraus wurde gefolgert, dass die Phosphorylierung an Tyrosin maßgeblich auf Autophosphorylierung beruht, während die Phosphorylierung an Serin auf die Aktivität anderer zellulärer Proteinkinasen zurückzuführen ist (Lim et al., 1993). Für die rekombinant hergestellte inaktive KM-Mutante von LmxGSK3 $\beta$  lieferte die MS/MS-Analyse keine Phosphopeptide. Dies legt nahe, dass nicht *E. coli*-Kinasen für die Phosphorylierung an Serin-232 und Tyrosin-186 verantwortlich sind, sondern die aktive LmxGSK3 $\beta$  selbst diese vornimmt. Rosenqvist (Dissertation, 2011) verifizierte die genannten Phosphorylierungsstellen von LmxGSK3 $\beta$  *in vivo*. Beide Phosphopeptide, 229-GDN**p**SAGQLHEIVR-241 und 177-LSPSEPNVA**p**YICSR-190, fanden sich in Zelllysaten von axenischen Promastigoten, axenischen Amastigoten und Amastigoten präpariert aus Mausfußläsionen. Die in der MS/MS-Analyse identifizierte Phosphorylierung an Tyrosin-186

und Serin-232 wurde durch Selected Reaction Monitoring (SRM) bestätigt und quantifiziert. Die zugehörigen Peptide waren jeweils in annähernd gleichen Mengen in beiden Lebensstadien vorhanden (Rosenqvist, Dissertation 2011 und persönliche Kommunikation).

Ojo et al. (2011) fanden die rekombinante kurze LmjGSK3 aus *E. coli* ebenfalls an Tyrosin-186 und Serin-232 phosphoryliert vor. Mittels LC/MS/MS wurde darüber hinaus eine Phosphorylierung an Serin-2, Tyrosin-264 und Tyrosin-305 gefunden. LC-MS/MS-Analyse von angereicherten cytosolischen Phosphopeptiden der Blutbahn-Form von *T. brucei* bestätigte für das kurze GSK3 $\beta$ -Homolog eine Phosphorylierung an Serin-2 (Nett et al., 2009b). Beide humanen Isoformen von GSK3 werden durch Phosphorylierung eines Serin-Rests nahe dem N-Terminus negativ reguliert. Hierfür wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem im Sinne einer Autoinhibition der N-Terminus umklappt und das Phospho-Serin die Substratbindungsstelle blockiert (Dajani et al., 2001). In Trypanosomatiden ist der, der Kinasedomäne vorangehende N-terminale Bereich der kurzen GSK3 mit 19 Aminosäuren weniger als halb so lang wie der von hsGSK3 $\beta$  (55 AS). Es ist unklar ob Flexibilität und Länge der N-terminalen Polypeptidkette ausreichen, damit der N-Terminus mit phosphoryliertem Serin-2 räumlich das aktive Zentrum der Kinase erreicht. Nachweise fehlen, ob der Phospho-Serin-Hemmmechanismus auch in GSK3 von Trypanosomatiden zum Tragen kommt.

#### Phosphotyrosin-186 ist für die Kinase-Aktivität wichtig

Für die Ausbildung der vollen Aktivität ist die Phosphorylierung des zentralen Tyrosin-Rests in der Aktivierungsschleife von GSK3 von großer Bedeutung. Dieser Tyrosin-Rest korrespondiert mit dem Tyrosin des TXY-Motivs von MAPKs. Die Phosphorylierung an Tyrosin bzw. Threonin spielt für die katalytische Aktivität von MAPKs eine wichtige Rolle. Ein Pendant zum Threonin-Rest gibt es in GSK3 nicht. Neben *L. mexicana* wurde in einer Vielzahl von Organismen das endogene Protein von GSK3 am zentralen Tyrosin-Rest phosphoryliert vorgefunden. Durch Austausch von Tyrosin-186 gegen die nicht phosphorylierbare Aminosäure Phenylalanin wurde eine YF-Mutante von LmxGSK3 $\beta$  erzeugt. Das rekombinante Protein von LmxGSK3 $\beta$ -YF zeigte im Kinase-Aktivitätstest eine sehr schwache Auto- und Substratphosphorylierung, vergleichbar mit der, der nahezu inaktiven Mutante LmxGSK3 $\beta$ -KM. Dies beweist, dass der phosphorylierbare Tyrosin-Rest in der Aktivierungsschleife von Leishmanien-GSK3 für die Ausbildung der vollen Kinase-Aktivität von zentraler Bedeutung ist. Von Buch et al. (2010) wird vermutet, dass Phosphotyrosin-216 von hsGSK3 $\beta$  durch Wechselwirkung mit Arginin-220 und Arginin-223 die Aktivierungsschleife stabilisiert und dabei die katalytische Furche erweitert. Dies würde die Substratzugänglichkeit verbessern. Die Überexpression einer YF-Mutante der humanen GSK3 in HEK293 Zellen hatte eine verminderte Phosphorylierung und damit Degradierung des natürlichen Substrats  $\beta$ -Catenin

zur Folge (Hagen et al., 2002). Eine YF-Mutante vom GSK3 Homolog Shaggy in *Drosophila melanogaster* war genau so wenig wie eine Kinase-tote KM-Mutante in der Lage, die Letalität als Folge des Fehlens der Kinase in der Nullmutante aufzuheben (Papadopoulou et al., 2004). Allerdings legen Untersuchungen der räumlichen Struktur der humanen GSK3 $\beta$  nahe, dass die Aktivierungsschleife auch ohne Tyrosin-216-Phosphorylierung eine aktive Konformation annehmen kann (Dajani et al., 2001). Dies könnte die beobachtete schwache Restaktivität der Mutante LmxGSK3 $\beta$ -YF erklären.

#### Autophosphorylierung an Tyrosin-186

Das rekombinante Protein von LmxGSK3 $\beta$ -Wildtyp wies bereits direkt aus *E. coli* im Immunoblot mit anti-phospho-Tyrosin-Antikörper eine sehr starke Phosphorylierung an Tyrosin auf. Dies war für die kaum aktive KM- bzw. YF-Mutante von GSK3 $\beta$  nicht zu beobachten, beide Mutanten waren nur sehr schwach an Tyrosin phosphoryliert. Die inaktive KM-Mutante besitzt zwar einen phosphorylierbaren Tyrosin-186-Rest, jedoch keine funktionale ATP-Bindungsstelle. Die ausgeprägte Phosphorylierung an Tyrosin setzt offenbar das Vorliegen von aktiver GSK3 voraus, dies ist als Anhaltspunkt für Autophosphorylierung zu werten. Während für Säugetier-GSK3 ebenso die Meinung vorherrscht, dass der Phosphorylierung am zentralen Tyrosin Autophosphorylierung zu Grunde liegt (Cole et al., 2004), wurde für das GSK3-Homolog von *Dictyostelium* eine aktivitätssteigernde Phosphorylierung an Tyrosin durch die Tyrosin-Kinasen ZAK1 und ZAK2 nachgewiesen (Kim et al., 2011).

Die Inkubation des rekombinanten Proteins von LmxGSK3 $\beta$ -Wildtyp zusammen mit LmxGSK3 $\beta$ -KM in Gegenwart von ATP, lieferte eine schwache Phosphorylierung der inaktiven KM-Mutante durch die aktive Wildtyp-Kinase. LmxGSK3 $\beta$ -Wildtyp wurde als GST-Fusionsprotein, LmxGSK3 $\beta$ -KM als His-Fusionsprotein verwendet. Die Phosphorylierung an LmxGSK3 $\beta$ -KM fällt schwächer aus als an LmxGSK3 $\beta$ -Wildtyp, daraus lässt sich schließen, dass die Autophosphorylierung der reifen Kinase überwiegend einem intramolekularen und nur zu einem kleinen Teil einem intermolekularen Mechanismus folgt. Dieser Annahme liegt zu Grunde, dass Moleküle der KM-Mutante für eine Phosphorylierung durch aktive GSK3-Moleküle gleichermaßen räumlich zugänglich sind wie Moleküle der Wildtyp-Kinase. Ob die KM-Mutation allerdings die Konformation der Kinase verändert, ist nicht bekannt.

Lochhead et al. (2006) gehen davon aus, dass Tyrosin-Phosphorylierung von Säugetier-GSK3 maßgeblich als intramolekulare Autophosphorylierung, vermutlich von einer Vorstufe der reifen Kinase während der Proteinfaltung vorgenommen wird. Hierfür scheint die Assistenz des Chaperons Hsp90 notwendig zu sein. Zu dieser Annahme passt, dass reife GSK3 isoliert aus Säugetierzellen in hohem Maße, wenn nicht gar vollständig am zentralen Tyrosin-Rest phosphoryliert vorliegt und sich offenbar *in vitro* nicht weiter an Tyrosin

phosphoryliert (Hughes et al., 1993; Wang et al., 1994). Anders scheint es sich für GSK3 zu Verhalten, welche rekombinant in bakteriellen Expressionssystemen, in Insektenzellen bzw. im zellfreien *in vitro* Translationssystem wie RRL (Kaninchen Retikulozyten Lysat) hergestellt wurde. Die aufgereinigte Kinase lag zwar ebenfalls bereits kräftig an Tyrosin phosphoryliert vor, jedoch wurde nach Inkubation mit ATP eine Zunahme der Tyrosin-Phosphorylierung beobachtet (Wang et al., 1994; Cole et al., 2004; Lochhead et al., 2006). LmxGSK3 $\beta$  aus *E. coli* autophosphoryliert sich im Kinase-Aktivitätstest. Ob es sich dabei um zusätzliche Phosphorylierung an Tyrosin handelt, ist nicht klar. Aufgrund des sehr starken Signals, welches die Wildtyp-Kinase bereits direkt nach Aufreinigung im Immunoblot mit anti-phospho-Tyrosin-Antikörper lieferte, war nicht beurteilbar, ob die Tyrosin-Phosphorylierung nach Inkubation mit ATP zunimmt. Für LmxGSK3 $\beta$  nach einstündiger Inkubation mit ATP wies die MS/MS-Analyse allerdings keine zusätzlichen Phosphorylierungsstellen nach, sondern fand dieselben, Phospho-Tyrosin-186 und Phospho-Serin-232 tragenden Peptide wie für das rekombinante Protein direkt aus *E. coli*. Der im Kinase-Aktivitätstest beobachtete Phosphat einbau in die Kinase beruht demnach höchstwahrscheinlich auf einer Zunahme an Molekülen, welche an Tyrosin-186 bzw. Serin-232 phosphoryliert sind.

Als matures, am zentralen Tyrosin-Rest phosphoryliertes Protein scheint GSK3 alleinig als Serin-/Threonin-Kinase aufzutreten (Lochhead et al., 2006). So war die humane GSK3 $\beta$  nicht in der Lage inaktive Mutanten von GSK3 am zentralen Tyrosin-216 intermolekular zu phosphorylieren (Cole et al., 2004). Auch sind keine Substrate bekannt, welche die reife GSK3 an Tyrosin phosphoryliert. Bei der intermolekularen Phosphorylierung von LmxGSK3 $\beta$ -KM durch LmxGSK3 $\beta$ -Wildtyp wird daher eine Phosphorylierung an Serin/Threonin vermutet. Zusammengenommen wäre denkbar, dass sich die womöglich nicht vollständig an Tyrosin phosphorylierte LmxGSK3 $\beta$  aus *E. coli* weiter intramolekular an Tyrosin-186 autophosphoryliert und zudem, wie die schwächere Phosphorylierung der inaktiven KM-Mutante vermuten lässt, intermolekular an Serin-232. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um diese Hypothese zu bestätigen, so sollten die genauen Reste bestimmt werden, an welchen die KM-Mutante von der Wildtyp-Kinase phosphoryliert wird.

#### Phosphorylierung von LmxGSK3 $\beta$ -KM und -YF

Im Kinase-Aktivitätstest kommt es zum Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in die KM- und YF-Mutante von GSK3 $\beta$ . Diese Autophosphorylierung fällt für beide Mutanten sehr schwach aus. Sie könnte an Tyrosin-186, an einem anderen Tyrosin-Rest oder an einem Serin-/Threonin-Rest der Mutanten erfolgen. Im Immunoblot mittels anti-phospho-Tyrosin-216-Antikörper wurde keine Phosphorylierung am zentralen Tyrosin in inaktiven Mutanten der humanen GSK3 $\beta$  festgestellt, in denen der für die Aktivität notwendige Lysin-Rest der ATP-Bindetasche (K85) mutiert worden war (Cole et al., 2004). LmxGSK3 $\beta$ -KM zeigte nach

einstündiger Inkubation mit ATP das gleiche Ausmaß an Tyrosin-Phosphorylierung im Immunoblot wie LmxGSK3 $\beta$ -KM direkt aus *E. coli*. Dies spricht für eine stattgefundene Tyrosin-Phosphorylierung in *E. coli* und dagegen, dass sich die Mutante als matures Protein weiter an Tyrosin phosphoryliert. Jedoch ist dabei zu berücksichtigen, dass die Autoradiographie nach Kinase-Aktivitätstest um einiges sensitiver ist als der Immunoblot mit anti-phospho-Tyrosin-Antikörper. Das Fehlen von Tyrosin-186 in LmxGSK3 $\beta$ -YF schließt eine Autophosphorylierung an diesem Rest, zumindest für diese Mutante aus. Zusammengenommen wird eine Autophosphorylierung an einem Serin- bzw. Threonin-Rest der aktivitäts-geminderten Mutanten im Kinase-Aktivitätstest vermutet. Beweise hierfür sind noch zu erbringen. Der anti-phospho-Tyrosin-Antikörper 4G10 fand LmxGSK3 $\beta$ -YF aufgereinigt aus *E. coli* im Vergleich zu Wildtyp-LmxGSK3 $\beta$  sehr schwach an Tyrosin phosphoryliert. Da die YF-Mutante Tyrosin-186 nicht mehr besitzt, kann der Phosphateinbau nur an einem davon unterschiedlichen Tyrosin-Rest erfolgt sein. Die LC/MS/MS-Analyse fand LmjGSK3 $\beta$  präpariert aus *E. coli* an Tyrosin-264 und Tyrosin-305 phosphoryliert (Ojo et al., 2011). Beide Tyrosin-Reste sind Leishmanien-spezifisch und finden sich nicht in der humanen GSK3 $\beta$ . Möglicherweise wurde einer dieser beiden Reste in LmxGSK3 $\beta$ -YF phosphoryliert. Jedoch wurden, falls dem so wäre, in der MS/MS-Analyse keine passenden Phosphopeptide für LmxGSK3 $\beta$ -Wildtyp gefunden. Darüber hinaus bleibt unklar, ob die Restaktivität der Kinase selbst oder eine Kinase von *E. coli* für die Tyrosin-Phosphorylierung der Mutanten verantwortlich ist. Wenngleich auch Tyrosin-Phosphorylierung selten in *E. coli* vorkommt. Bei einer Analyse des Phosphoproteoms von *E. coli* wurden 79 Proteine phosphoryliert vorgefunden, mit einer Verteilung der Phosphorylierung an Serin/Threonin/Tyrosin von 68%/23%/9% (Macek et al., 2008).

#### GSK3 $\beta$ in Trypanosomatiden liegt am zentralen Tyrosin phosphoryliert vor

LmxGSK3 $\beta$  wurde gleichermaßen in Zelllysaten von Promastigoten als auch Amastigoten unter Einsatz des anti-LmxGSK3 $\beta$ -Antikörpers im Immunoblot nachgewiesen. Die der vollen Aktivität von LmxGSK3 $\beta$  zu Grunde liegende Phosphorylierung an Tyrosin-186 wurde in beiden Lebensstadien vorgefunden (Rosenqvist, Dissertation 2011). Das zugehörige Phosphopeptid mit der hochkonservierten Sequenz EPNVApYICSR wurde mit deutlicher Präsenz in allen untersuchten Trypanosomatiden mittels Massenspektrometrie nachgewiesen. So fand sich die Phosphorylierung am zentralen Tyrosin-Rest in beiden Lebensstadien von *L. donovani* (pY186), in der prozyklischen und Blutbahn-Form von *T. brucei* (pY187) und in Epimastigoten von *T. cruzi* (pY187) (Hem et al., 2010 und Tsigankov et al., 2013; Nett et al. 2009a und 2009b; Nakayasu et al., 2009). Dies unterstreicht, dass die Phosphorylierung am zentralen Tyrosin von GSK3 auch in Trypanosomatiden von essentiellen Charakter ist und spricht dafür, dass es sich um eine konstitutiv aktive Kinase



handeln könnte. Ähnliches wird für die humane GSK3 angenommen, diese wurde anders als die meisten Proteinkinasen auch in ruhenden Zellen in der aktiven, phosphorylierten Konformation vorgefunden (Hughes et al., 1993).

#### 4.2.2 Aufklärung der Funktion von LmxGSK3 $\beta$

Die humane GSK3 phosphoryliert eine große Zahl von Substraten. Zu diesen gehören Stoffwechselproteine, Strukturproteine, Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren. Die Mannigfaltigkeit an Substraten macht deutlich, dass es sich bei GSK3 um eine multifunktionale Kinase in Säugetieren handelt. Erste Erkenntnisse zur Aufgabe von GSK3 in Leishmanien erhoffte man sich von der Substratsuche. Desweiteren sollte der Phänotyp nach Hemmung der Kinase-Aktivität mittels geeigneter Inhibitoren Aufschluss über den oder die Aufgabenbereich(e) der Kinase liefern.

Es gibt kaum Erkenntnisse zu Substraten von GSK3 in Parasiten. Lediglich ein Substrat ist bekannt, so gibt es Anhaltspunkte, dass PfGSK3 die cytoplasmatische Domäne des Apikalen Membranantigens 1 (AMA1) phosphoryliert (Prinz et al., 2016). Das Typ-I-Transmembranprotein AMA1 ist von zentraler Bedeutung für die Erythrozyteninvasion von *P. falciparum*. Es findet sich jedoch kein Homolog zu AMA1 in Trypanosomatiden.

##### 4.2.2.1 Substratsuche

Um einen Eindruck von Anzahl bzw. Größe potentieller Substrate zu bekommen, wurde rekombinante LmxGSK3 $\beta$  zusammen mit Zelllysaten von axenischen Promastigoten bzw. Amastigoten in Gegenwart von radioaktiv markiertem ATP inkubiert. Im Promastigotenlysat lieferte LmxGSK3 $\beta$  vier phosphorylierte Proteinbanden. Vier der phosphorylierten Banden im Amastigotenlysat stimmten in ihrer Laufhöhe mit diesen überein. Bei diesen vier Proteinen könnte es sich um Substrate handeln, welche in beiden Lebensstadien exprimiert und von LmxGSK3 $\beta$  phosphoryliert werden. Darüber hinaus phosphorylierte LmxGSK3 $\beta$  vier weitere Proteine ausschließlich im Amastigotenlysat. Bei diesen könnte es sich um Substrate handeln, deren Phosphorylierung stadienspezifisch von Bedeutung ist. Dass die gefundenen phosphorylierten Banden der Aktivität von GSK3 $\beta$  zuzuordnen sind, belegte die Kontrolle ohne LmxGSK3 $\beta$  bzw. mit inaktiver KM-Mutante. Die genannte Versuchsanordnung lieferte einen ersten entscheidenden Hinweis, dass GSK3 $\beta$  auch in Leishmanien mehrere Substrate besitzen und somit mehrere Aufgaben innehaben könnte. Die gefundenen phosphorylierten Proteine müssen allerdings noch identifiziert und *in vivo* verifiziert werden.

Die weitere Substratsuche baute auf die Vorhersage der Phosphorylierungsstelle eines potentiellen Substrats von LmxGSK3 $\beta$  mit Hilfe des Programms PREDIKIN. Anhand der ermittelten Konsensussequenz wurde das Protein LmjF36.0430 identifiziert. Bei seinem *T. brucei*-Homolog Tb927.10.4840 handelt es sich um einen putativen Transkriptionsfaktor

TFIIa, welcher an der Transkription von SL-RNA beteiligt ist (Schimanski et al., 2005a). In Säugetieren gehören Transkriptionsfaktoren zu den Substraten von GSK3 $\beta$ . Das Gen seines Homologes LmxM.36.0430 von *L. mexicana* wurde kloniert und exprimiert, das resultierende Protein jedoch nicht von LmxGSK3 $\beta$  phosphoryliert. Die Sequenzierung zeigte, dass LmxM.36.0430 anstelle des phosphorylierbaren Rests eine nicht phosphorylierbare Aminosäure in der Konsensussequenz trägt. Obgleich LmxGSK3 $\beta$  in Leishmanienlysaten mehrere Proteine im Größenbereich 17-25 kDa phosphorylierte, handelt es sich bei dem ~19 kDa großen Protein LmxM.36.0430 um kein Substrat der Kinase.

#### **4.2.2.2 Lithium hemmt die Aktivität von LmxGSK3 $\beta$ *in vitro* und führt zu einer Beeinträchtigung von Leishmanien**

Lithium nimmt seit Jahrzehnten einen festen Platz in der Therapie von bipolaren Störungen ein. Genutzt wird seine antimanische und phasenprophylaktische Wirkung, wenn auch der Wirkungsmechanismus noch nicht abschließend geklärt ist (Karow und Lang-Roth, 2010). Lithium ist ein bekannter Inhibitor von GSK3, der bereits an allerlei Homologen der Kinase, angefangen von Säugetieren, anderen höheren Eukaryonten, *Drosophila*, bis hin zu *Dictyostelium* und *Chlamydomonas in vitro* bzw. *in vivo* getestet wurde (Muñoz-Montaño et al., 1997; Klein und Melton, 1996; Stambolic et al., 1996; Wilson und Lefebvre, 2004). Lithium hemmt GSK3 in Säugetieren entweder auf direktem Wege oder indirekt durch Steigerung der Akt-vermittelten inhibitorischen Phosphorylierung am N-terminalen Serin von GSK3 (Chalecka-Franaszek und Chuang, 1999; Beaulieu et al., 2008). Lithium führt durch direkte Inhibition von GSK3 zur nukleären Ansammlung des Substrats  $\beta$ -Catenin, wodurch Zielgene des Wnt-Signalwegs aktiviert werden. Hierfür fand sich auch *in vivo* Evidenz, so führte Lithium zu einer intrazellulären Erhöhung von  $\beta$ -Catenin im frontalen Kortex von Ratten (Gould et al., 2004). Auch für andere bekannte GSK3-Substrate, wie Tau und MAP-1B, konnte eine verminderte Phosphorylierung bei Behandlung des Organismus mit Lithium gezeigt werden (Muñoz-Montaño et al., 1997; Lucas et al., 1998). Bei den meisten Kinaseinhibitoren handelt es sich um komplexe heterozyklische Komponenten mit effektiven Hemmkonzentrationen im Bereich von wenigen Mikromol bzw. Nanomol. Lithium fällt als einfaches Kation, welches GSK3 in einer Konzentration im millimolaren Bereich hemmt, aus dem Rahmen. GSK3 benötigt das divalente Kation Magnesium für den Phosphatgruppen-transfer von ATP. Monovalente Lithium-Kationen hemmen die Aktivität der Kinase indem sie mit Mg<sup>2+</sup> um die Metallionen-Bindungsstelle konkurrieren (Ryves und Harwood, 2001).

##### **4.2.2.2.1 Hemmung der Kinase-Aktivität durch LiCl *in vitro***

Rekombinantes Protein von LmxGSK3 $\beta$  wurde *in vitro* auf Lithium-Sensitivität untersucht. Es zeigte sich, dass LiCl konzentrationsabhängig die Aktivität von LmxGSK3 $\beta$  vermindert. 25 mM bzw. 50 mM LiCl beeinträchtigten die Kinase-Aktivität, während sich die Kontroll-

substanzen NaCl und KCl bis zu einer Konzentration von 100 mM nicht hemmend auswirkten. Auf die Ermittlung der genauen Hemmkonzentration wurde verzichtet und LiCl-Konzentrationen kleiner 25 mM nicht getestet. Eine LiCl-Konzentration von 25 mM erscheint auf den ersten Blick hoch, jedoch wurde die  $Mg^{2+}$ -Konzentration im Test nicht an die in Leishmanien vorkommende Konzentration an freiem  $Mg^{2+}$  angepasst, sondern so gewählt, dass das Erreichen einer maximalen Kinase-Aktivität gewährleistet war. Im Kinase-Aktivitätstest von LmxGSK3 $\beta$  wurden 5 mM  $MgCl_2$  und 0,1 mM ATP eingesetzt. Bei  $Li^+$  handelt es sich bezüglich  $Mg^{2+}$  um einen kompetitiven Inhibitor der Kinase, daher hängt die zur Hemmung benötigte Lithium-Konzentration von der vorliegenden  $Mg^{2+}$ -Konzentration ab (Ryves und Harwood, 2001). Wenn die  $Mg^{2+}$ -Konzentration im *in vitro* Testsystem zu hoch gewählt wird sehen Ryves und Harwood die Gefahr, dass die zur Hemmung von GSK3 benötigte  $Li^+$ -Konzentration *in vitro* höher ausgewiesen wird als die zur Hemmung der Kinase unter zellulären Bedingungen tatsächlich benötigte. Es wird in Säugetierzellen von einer  $Mg^{2+}$ -Gesamtkonzentration von 5-10 mM ausgegangen, wobei der Großteil des Metallions in von ATP und anderen Phosphonukleotiden gebundener Form vorliegt und nur ein kleiner Teil, nämlich 0,6-1,2 mM, als freies  $Mg^{2+}$  zur Verfügung steht (Ryves und Harwood, 2001; Romani 2007). Die zelluläre ATP-Konzentration wird im Bereich von 1 mM angesiedelt. Davies et al. (2000) stellten für hsGSK3 $\beta$  in Gegenwart von 10 mM  $Mg^{2+}$  und 0,1 mM ATP eine halbmaximale inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) von 15 mM LiCl fest. Nach Anpassung der  $Mg^{2+}$ -Konzentration auf 0,5 mM bei isotonischer KCl-Konzentration (150 mM) lag für hsGSK3 $\beta$  die  $IC_{50}$  von LiCl bei 2 mM. Zwei weitere Labore hatten zuvor für die Inhibition von Säugetier- bzw. *Drosophila*-GSK3 $\beta$  in Gegenwart von 10 mM  $Mg^{2+}$  für Lithium eine  $K_i$  von  $2,1 \pm 0,6$  mM bzw. 1-2 mM ermittelt (Klein und Melton sowie Stambolic et al, 1996). Die genannten Hemmkonzentrationen liegen an bzw. etwas über der oberen Grenze des therapeutisch relevanten Bereichs von LiCl, welcher beim Menschen Serumspiegel von 0,5 bis 1,5 mM zulässt. Fazit: Bei Lithium handelt es sich um eine geeignete Substanz zur direkten Hemmung von LmxGSK3 $\beta$ . Anschließend wurde untersucht, zu welchen Veränderungen es in einer Leishmanienkultur in Gegenwart von 25 mM bzw. 50 mM LiCl kommt und welche Rückschlüsse auf die potentielle Funktion der Kinase hieraus gezogen werden können.

#### 4.2.2.2 Lithium-Effekte in Leishmanien

Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* wird gerne als Modellorganismus für flagellen-spezifische Fragestellungen herangezogen. Bei *Chlamydomonas* handelt es sich wie bei Leishmanien um einen einzelligen Organismus der sich mit Hilfe von Flagellen fortbewegt, allerdings mit dem Unterschied, dass die Grünalge statt einem zwei gleichlange Flagellen an ihrem apikalen Pol trägt. Das einzelne GSK3-Homolog von *Chlamydomonas* wird ebenfalls durch Lithiumchlorid in seiner Kinase-Aktivität gehemmt (Wilson und Lefebvre, 2004). Es war

nicht möglich das single-copy Gen durch Knockout zu entfernen, dies spricht für eine essentielle Funktion von GSK3 in *Chlamydomonas*. 25 mM Lithiumchlorid im Kulturmedium führten nach einer Stunde zu einer signifikanten Verlängerung der Flagellen. Dieser Phänotyp hielt bis zu 12 Stunden an. Bei längerer Inkubation bis zu drei Tagen kehrte sich der Phänotyp ins Gegenteil, die Flagellenlänge nahm ab und die Kultur wurde von Zellen mit kurzen bzw. fehlenden Flagellen dominiert (Wilson und Lefebvre, 2004). Wie bei Langzeitbehandlung mit LiCl, führte eine Verminderung der GSK3-Proteinmenge um 20-40 % bei Induktion im RNAi-Experiment in der Mehrheit der Zellen zu einem flagellenlosen Phänotyp. Die Anwesenheit von Tyrosin-phosphorylierter GSK3 in Flagellen konnte mittels Immunoblotanalyse nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse sprechen für eine Beteiligung der Kinase GSK3 an der Flagellenlängenregulation in *Chlamydomonas*.

*Leishmania mexicana* wurde in Gegenwart von 25 mM bzw. 50 mM LiCl, 50 mM KCl, 50 mM NaCl oder in Standardmedium ohne Zusatz eines der genannten Salze kultiviert. Die in Anwesenheit von Lithium gewachsenen Zellen zeigten deutliche Auffälligkeiten. Lithium hemmte das Wachstum von Pro- und Amastigoten. Zu den Lithium-induzierten Effekten in Promastigoten gehörte eine deutliche Verlängerung des singulären Flagellums. Zudem wurde ein Cytokinesedefekt festgestellt und nach längerer Kultivierung fielen zunehmend Zellen mit abnormem NK-Verhältnis auf. Auch fanden sich Promastigoten, welche sich vom falschen Pol her teilten. Anschließend werden die Auffälligkeiten im Einzelnen diskutiert. Die Kontrollkulturen mit NaCl bzw. KCl zeigten keinerlei Veränderungen. Damit handelte es sich bei den gemachten Beobachtungen um Lithium-spezifische Effekte und nicht um unspezifische Reaktionen als Folge einer erhöhten Menge an Chlorid-Anionen, monovalenter Kationen bzw. einer erhöhten Osmolarität.

#### Flagellenverlängerung in Promastigoten:

Die Anwesenheit von Lithium führte bereits nach sechs Stunden zu deutlich längeren Flagellen in *L. mexicana*. Die durchschnittliche Flagellenlänge in Gegenwart von Lithium betrug über eine Kulturdauer von 72 Stunden bei jeder Probenentnahme das 1,2-1,3fache der Flagellenlänge des Wildtyps. Während knapp ein Drittel der Normalkultur eine Flagellenlänge größer 14 µm aufwies, traf dies in der Lithiumkultur auf mehr als zwei Drittel der Promastigoten zu. Eine LiCl-Konzentration von 25 mM führte nach sechs Stunden zu einer Flagellenverlängerung ähnlichen Ausmaßes wie 50 mM. Dies spricht dafür, dass der Effekt Lithiums auf die Flagellenlänge bei 25 mM bereits im Sättigungsbereich des Möglichen anzusiedeln ist. Im Vergleich dazu führte die Konzentrationssteigerung auf 50 mM LiCl zu einer deutlichen Zunahme der Anzahl an Zellen mit Cytokinesedefekt und zu einer Steigerung der Wachstumshemmung. Die unterschiedliche Konzentrationsabhängigkeit der genannten Effekte könnte zum einen dadurch erklärt werden, dass Lithium unterschiedliche Zielproteine

hemmt, oder zum anderen, dass sich eine Hemmung desselben Zielproteins nicht in gleichem Maße auf unterschiedliche Reaktionswege in die es eingebunden ist auswirkt. Im Rahmen der Zellteilung bleibt bei Leishmanien das alte Flagellum in seiner Länge erhalten und wird nicht wie bei *Chlamydomonas* abgebaut, um dann zusammen mit einem zweiten Flagellum neu ausgebildet zu werden. Das neu synthetisierte Flagellum von Promastigoten ist zum Zeitpunkt der Zellteilung mit einem den Zellkörper überragenden Teil von etwa 5 µm Länge deutlich kürzer als das alte (Wheeler et al., 2011). Nachfolgend nimmt seine Länge über mehrere Zellzyklen hinweg zu. Während die wachstumshemmende Wirkung von LiCl über die Kulturdauer abnahm, kam es nicht zur Zunahme an Zellen mit normaler Flagellenlänge, sondern der Trend zu langen Flagellen blieb in der Gesamtpopulation erhalten. Hierin unterschied sich die Lithium-behandelte Leishmanienkultur von einer Chlamydomonaskultur. In *Chlamydomonas* nahm die Flagellenlänge in Gegenwart von 25 mM LiCl innerhalb der ersten zwölf Stunden zu. Darüber hinaus gehende Inkubationszeiten bis zu 72 Stunden führten hingegen zu einer zunehmenden Verkürzung der Flagellen (Wilson und Lefebvre, 2004). Ob dieser Unterschied im Zusammenhang mit dem unterschiedlichen Modus der Flagellenneubildung in beiden Spezies steht ist unklar.

Flagellen und Zilien sind konservierte eukaryontische Zellorganellen. Sie teilen denselben auf Mikrotubuli basierenden Grundaufbau, unterscheiden sich allerdings in ihrer Länge. Während kurze Zilien häufig in hoher Zahl auf der Zelloberfläche vorkommen, beispielsweise ist die Oberfläche des einzelligen Pantoffeltierchens (*Paramecium*) von einigen Tausend Zilien bedeckt, kommen lange Flagellen in einstelliger Zahl vor, ein Beispiel wäre das ein Flagellum tragende Säugetierspermium. Ein einzelnes Zilium wird auf einer Vielzahl von Säugetierzellen gefunden. Diesen auch als „primäre Zilien“ bezeichneten Strukturen kommt überwiegend sensorische Funktion zu, da ihnen im Gegensatz zu beweglichen Flagellen/Zilien Motorproteine fehlen. Zu den Aufgaben von Flagellen in Trypanosomatiden zählen neben der Fortbewegung, die Anheftung an das Wirtsgewebe und die Aufnahme von Umweltreizen. Daneben scheinen Flagellen bzw. damit assoziierte Strukturen auf die Zellmorphogenese und die Zellteilung Einfluss zu nehmen. (Ginger et al., 2008; Kohl und Bastin 2005). Neben *L. mexicana* und *C. reinhardtii* konnte auch für verschiedene zilientragende Zellarten von Säugetieren, wie neuronalen Zellen, Nierenzellen und Fibroblasten, eine Verlängerung des primären Ziliums in Gegenwart von Lithium beobachtet werden (Ou et al., 2009; Miyoshi et al., 2011). In Mausfibroblasten NIH3T3 führten 50 mM LiCl, aber auch KCl bzw. NaCl zu einer Zunahme der Zilienlänge (Miyoshi et al., 2011). Eine Behandlung mit den GSK3-Inhibitoren TDZD-8 bzw. SB216763 führte in NIH3T3-Zellen zu keinen längeren primären Zilien (Miyoshi et al., 2011). Auch Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten (FLC) reagierten auf Lithium, jedoch nicht auf GSK3-Inhibitoren mit einer Zilienverlängerung (Ou et

al. 2009). Es zeigten jedoch chemische Inhibitoren der Adenylatcyclase III Wirkung, wengleich auch die hervorgerufene Zilienverlängerung hinter der von Lithium zurückblieb. Die Adenylatcyclase synthetisiert den Botenstoff cAMP, die Phosphodiesterase (PDE) baut cAMP wieder ab. In Nierenepithelzellen führte der Zusatz von Dibutyryl-cAMP bzw. Forskolin, beides Aktivatoren der Adenylatcyclase, zu längeren primären Zilien (Low et al., 1998). In *Chlamydomonas* konnte durch den Einsatz von IBMX, einem Phosphodiesterasehemmstoff, eine Flagellenverkürzung erreicht werden (Wilson et al., 2008). Die Adenylatcyclase wurde bereits als direktes oder indirektes (über G-Proteine vermittelt) potentiell Zielprotein von Lithium diskutiert (*Dictyostelium*: Peters et al., 1992; neuronale Zellen: Jope 1999). Die Ergebnisse über die Bedeutung der intrazellulären cAMP-Menge für die Flagellenlänge sind teils widersprüchlich und lassen eine Abhängigkeit vom Organismus bzw. der Zellart vermuten. Es gibt keine Erkenntnisse, ob parasitäre Adenylatcyclasen (AC) durch Lithium in ihrer Aktivität gehemmt werden können. Die AC-Homologe von Trypanosomatiden besitzen eine einzelne Transmembrandomäne. Als Ausnahme wurde eine freie, Häm-enhaltende AC gefunden, welche in *L. major* in ihrer Aktivität als sauerstoffabhängig charakterisiert wurde (Sen Santara et al., 2013). Liganden, welche an die variable extrazelluläre Domäne von ACs gleich einem Rezeptor binden und zur intrazellulären cAMP-Katalyse führen, sind keine bekannt (Gould und de Koning, 2011). Interessanterweise sind ACs, PDEs und PKA als potentielle Komponenten eines cAMP-Signalwegs im Bereich des Flagellums zu finden. Über Interaktionspartner und Zielstrukturen des cAMP-vermittelten Signals in Kinetoplastiden ist wenig bekannt. Die AC-Aktivität in Trypanosomatiden scheint durch Calcium stimuliert werden zu können (Gould und de Koning, 2011). Möglicherweise sind MAPK-Homologe in der Lage mit dem cAMP-Signalweg in Wechselwirkung zu treten. So wurde für *T. cruzi* eine Interaktion des rekombinanten Proteins von TcMAPK2, dem Homolog von LmxMPK2, mit TcPKAc bzw. TcPDEC2 gefunden (Bao et al., 2008 bzw. 2010). TcPDEC2 spielt für die Osmoregulation des Parasiten eine Rolle (Schoijet et al., 2011). Bei Überexpression von PDEA in *L. donovani* kommt es zur verminderten Resistenz gegenüber oxidativem Stress während der Differenzierung zu Amastigoten (Bhattacharya et al., 2009). TbPDEB1 und TbPDEB2 sind essentiell für die Blutbahn-Form von *T. brucei*. Die Verminderung beider Proteine durch RNAi hatte ein Absterben der Zellen und ähnlich wie der Knockout der nicht essentiellen ESAG4-Subfamilie von Adenylatcyclasen, einen Cytokinesedefekt der Blutbahn-Form zur Folge (Oberholzer et al., 2007; Salmon et al., 2012). In den bis dato in Trypanosomatiden durchgeführten Untersuchungen von Homologen des cAMP-Signalwegs wurden keine Veränderungen des Flagellums beschrieben. Experimente mit membranlosen Flagellen regen an, dass cAMP eine Rolle für Richtungsänderungen in der Schwimmbewegung von Leishmanien spielen könnte (Mukhopadhyay und Dey, 2016). Auf der anderen Seite wiesen Thoma et al. (2007) nach, dass GSK3 $\beta$  zusammen mit seinem

Substrat pVHL (Hergovich et al., 2006) für den Erhalt von primären Zilien von Bedeutung sind. Das Produkt des von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgens pVHL scheint cytoplasmatische Mikrotubuli zu stabilisieren. Anders als für einige Arten von Säugetierzellen mit primärem Zilium beobachtet, führten spezifische GSK3-Inhibitoren, wie 6-Bromoindirubin-3'-oxime (6-BIO) und Indirubin-3-monoxime (Meijer et al., 2003), innerhalb einer Stunde zu einer vollständigen Verkürzung der Flagellen in *Chlamydomonas* und in Säugetierzellen ependymalen Ursprungs (Kong et al., 2015). 6-BIO ist als Inhibitor auch in der Lage Leishmanien-GSK3 $\beta$  effizient in seiner Kinase-Aktivität zu hemmen (Xing et al., 2009).

Der Konstruktion eines Flagellums liegt das koordinierte Zusammenspiel von cytoplasmatischer Expression der benötigten Bausteine, deren Transport zum Flagellum sowie dem intraflagellaren Weitertransport zum Ort ihres Einbaus an der Flagellenspitze (Johnson und Rosenbaum, 1992) zu Grunde. Es wäre denkbar, dass GSK3 in einen oder mehrere dieser Prozesse regulierend eingreift. Der Intraflagellare Transport (IFT) stellt ein Schlüsselement für den dynamischen Charakter der Flagellenmorphogenese dar. Es gibt Hinweise, dass die Flagellenlänge auf Ebene des IFT kontrolliert wird (Kohl und Bastin, 2005). An der Flagellenbasis werden die IFT-Partikel zusammengesetzt. Sie bewegen sich mit Hilfe des heterotrimeren Motorproteins Kinesin 2 entlang der polarisierten Mikrotubuli des Axonems anterograd Richtung Flagellenspitze. Dort wird ein Teil ihrer Ladung freigesetzt. Neben den Bausteinen des Axonems gelangen über den IFT Proteine der Flagellenmatrix und in Trypanosomatiden des PFR, an die Flagellenspitze (Qin et al., 2004; Kohl und Bastin, 2005). Transportiertes cytoplasmatisches Dynein 2 (IFT-Dynein), das Motorprotein des retrograden Transports, bildet zusammen mit anderen Proteinen IFT-Partikel für den Rücktransport zur Flagellenbasis aus. Nicht benötigtes Material aus dem Flagellenabbau wird so dem Recycling zugeführt (Rosenbaum und Witman, 2002; Absalon et al., 2008). Für das Genom von Trypanosomatiden werden zwei Gene, DHC2.1 und DHC2.2, vorhergesagt, welche für die schweren Ketten von IFT-Dynein codieren (Blisnick et al., 2014). Die Deletion von DHC2.2 in *L. mexicana* führte zu unbeweglichen Promastigoten mit winzigen Flagellen. DHC2.1 ist essentiell für den Parasiten (Adhiambo et al., 2005). Neben den Motorproteinen scheinen eine Vielzahl von Komponenten des IFT für den Flagellenaufbau essentiell zu sein (Morga und Bastin, 2013). Wurde der anterograde Transport durch Knockdown beteiligter IFT-Komponenten, z. B. IFT-88, gestört, so wurde die Flagellenneubildung blockiert (Kohl et al., 2003). Handelte es sich um Proteine des retrograden Transports, wie IFT-140, wurden typischerweise Mutanten mit kurzen neuen Flagellen und intraflagellarer Anhäufung von IFT-Material beschrieben (Absalon et al., 2007). Obgleich IFT-Komponenten im neuen und alten Flagellum nachgewiesen wurden, blieb unter RNAi von IFT-Proteinen die Länge des alten Flagellums von *T. brucei* unverändert (Absalon et al., 2008). Wurde die Menge an funktio-

nalem Kinesin 2 durch Kultivierung einer thermosensitiven Mutante von *Chlamydomonas* unter restriktiven Temperaturen teilweise reduziert, führte das zu Flagellen von mittlerer Länge (Marshall und Rosenbaum, 2001). Dieser Nachweis und Experimente mit markierten Flagellenbausteinen (Song und Dentler; 2001; Marshall und Rosenbaum, 2001) zeigten, dass Flagellen einem ständigen Auf- und Abbau unterliegen und legen nahe, dass der IFT nicht nur für die Flagellenneubildung, sondern auch für den Unterhalt bestehender Flagellen von zentraler Bedeutung ist. Eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen anterogradem und retrogradem IFT würde zu einer Veränderung der Flagellenlänge führen. Die Flagellen einer Promastigotenkultur fielen in Gegenwart von Lithium länger aus. Dies könnte auf einen gesteigerten anterograden Transport und Einbau von Flagellenbausteinen oder auf einen verminderten Flagellenabbau und retrograden Transport zurückzuführen sein. In *Chlamydomonas* wurde nach einer Stunde Kultivierung in Gegenwart von 25 mM LiCl eine Zunahme der 90 kDa-Untereinheit des anterograden Motorproteins Kinesin 2 in der Flagellenfraktion nachgewiesen (Wilson und Lefebvre, 2004). Die Flagellenverkürzung im Rahmen der Differenzierung vom promastigoten zum amastigoten Lebensstadium wurde wenig untersucht. Es ist anzunehmen, dass der retrograde Transport für diesen Prozess von entscheidender Bedeutung ist. Eine sich in Differenzierung zu Amastigoten befindliche Promastigotenkultur bildete in Gegenwart von 50 mM LiCl ihre Flagellen vollständig zurück. Lithium scheint sich in Leishmanien nicht störend auf die Flagellenresorption und den retrograden IFT im Rahmen der Differenzierung auszuwirken. Das lässt eine Steigerung des anterograden IFT unter LiCl-Behandlung in Leishmanien wahrscheinlicher erscheinen.

Geht man davon aus, dass der Flagellenverlängerung in Gegenwart von Lithium ursächlich eine Hemmung der GSK3-Aktivität zu Grunde liegt, scheint die Kinase für die Begrenzung des Flagellenwachstums verantwortlich zu sein. Die aktive, Tyrosin-phosphorylierte Form von GSK3 wurde nicht nur im Zellkörper, sondern auch im Flagellum von *Chlamydomonas* nachgewiesen (Wilson und Lefebvre, 2004). GSK3 könnte durch direkte Phosphorylierung einer IFT-Komponente die Interaktion zwischen Cargo und Motor verändern und so die Zusammensetzung oder Größe von Transporteinheiten modulieren. In langen Flagellen wurden weniger Kopien eines GFP-markierten IFT-Proteins pro Partikel und damit kleinere Transporteinheiten gefunden als in kurzen Flagellen (Engel et al., 2009). Denkbar wäre auch, dass die Hemmung von GSK3 durch LiCl zu einer verstärkten Bereitstellung von Tubulin-Einheiten als Baustein der Flagellen führt. Dies scheint jedoch nicht an einer zusätzlichen Tubulin-Synthese zu liegen. Auch in Gegenwart des Proteinsynthesehemmers Cycloheximid führte LiCl zu einer Verlängerung der Flagellen in *Chlamydomonas* (Wilson und Lefebvre, 2004). Möglicherweise beeinflusst GSK3 den Transport von Tubulin zum oder im Flagellum. Zu den Substraten von Säugetier-GSK3 gehören verschiedene Struktur-



proteine wie Neurofilamente, Dystrophin,  $\beta$ -Adducin bzw. Mikrotubuli-assoziierte Proteine wie CRMP2, MAP1B, VHL, Tau oder der Mikrotubuli-depolymerisierende Faktor Stathmin u. a. (Cole, 2012; Kaidanovich-Beilin und Woodgett, 2011; Eira et al., 2016). Auch Motorproteine wie Dynamin oder die Kinesinleichtkette gehören zu den GSK3-Substraten. In Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen trägt eine gesteigerte GSK3-Aktivität zur Fehlregulation der Mikrotubulistabilität, z. B. durch Tau-Phosphorylierung (Flaherty et al., 2000), und zur Störung des axonalen Transports bei. Eine Behandlung mit Lithium führte zur Verminderung der Tau-Phosphorylierung (Sudduth et al., 2012). Mitglieder der Kinesin-13-Familie besitzen Mikrotubuli-depolarisierende Eigenschaften und sind u. a. während der Mitose im Einsatz. Homologe von Kinesin-13 wurden auch in Flagellen verschiedener Einzeller nachgewiesen. Die Überexpression des *LmjKin13-2*-Gens in *L. major* führte zu kurzen Flagellen und der RNAi-Knockdown des Orthologs in *T. brucei* zu langen Flagellen (Blaineau et al., 2007). Die Induktion einer episomal exprimierten Mutante von Kinesin-13, welche nicht in der Lage ist ATP zu hydrolysieren, führte ebenso zu einer deutlichen Verlängerung der acht Flagellen des Darmparasiten *Giardia intestinalis* (Dawson et al., 2007). In *Chlamydomonas* scheint CrKinesin-13 nicht nur am Flagellenabbau beteiligt zu sein. Zwar verhinderte die Verminderung von CrKinesin-13 durch RNAi eine Verkürzung der Flagellen, allerdings werden diese nach Deflagellation auch erst verzögert wieder aufgebaut (Piao et al., 2009). Mitglieder der Kinesin-13 Familie scheinen in ihrer Aktivität durch spezifische Phosphorylierung reguliert werden zu können (Mennella et al., 2009). Das Kinesin-13 Homolog von *C. reinhardtii* wurde nach Induktion der Flagellenregeneration im phosphorylierten Zustand vorgefunden (Piao et al., 2009). Proteine, welche für den dynamischen Auf- und Abbau von Mikrotubuli (Mt) verantwortlich sind und der Phosphorylierung unterliegen, wie z. B. Mitglieder der Kinesin-13 Familie, stellen potentielle Zielstrukturen von Kinasen dar, welche an der Flagellenlängenregulation mitwirken. So wurden in *C. reinhardtii* über 80 Flagellenbestandteile identifiziert, die einer Phosphorylierung unterliegen (Piperno et al., 1976 und 1981). Der Zusatz von Proteinkinaseinhibitoren vor Einsatz der Flagellenregeneration beeinträchtigte den Flagellenaufbau in der Grünalge (Harper et al., 1993). Neben einer direkten Einflussnahme durch Phosphorylierung eines Mt-assoziierten Proteins wäre vorstellbar, dass GSK3 z. B. durch Phosphorylierung einer anderen Kinase in die Signaltransduktion eingreift.

#### Testung von LmxGSK3 $\beta$ mit Kinasen der Flagellenlängenregulation

Neben GSK3 scheinen Mitglieder verschiedener PK-Familien am Regulationsprozess der Flagellenmorphogenese beteiligt zu sein: MAPKs, Aurora Kinasen, NIMA-verwandte Kinasen (Mahjoub et al., 2002; Bradley und Quarmby, 2005) und CDKs bzw. CDK-ähnliche Kinasen. Die Aurora-ähnliche Proteinkinase CALK lag in *Chlamydomonas* bei normaler Flagellenlänge

im nicht phosphoryliertem Zustand vor und wurde kurz nach Deflagellation phosphoryliert (Luo et al., 2011). Welche Kinase für die Phosphorylierung zuständig ist, ist nicht bekannt. Das Aurora-Kinase Homolog LdAIRK von *L. donovani* konnte *in vitro* effektiv mit Hesperadin in seiner Aktivität gehemmt werden. Amastigoten und Promastigoten zeigten in Gegenwart von Hesperadin ein deutlich beeinträchtigt Wachstum. In Promastigotenkulturen resultierten aufgeblähte Zellen mit verkürztem Flagellum und 2N2K-Konstellation (Chhajer et al., 2016). Nach Verminderung durch RNAi des Aurora Kinase B-Homologs TbAUK1 von *T. brucei* wurde jedoch keine Veränderung der Flagellenlänge beobachtet (Tu et al., 2006). In *Chlamydomonas* wurden fünf Gene (*If1-If5*) identifiziert, deren Mutation zu abnormal langen Flagellen führt. Mutanten von *If1-If4* besaßen bis zu zwei- bis dreimal so lange Flagellen wie der Wildtyp. Die Nullmutante von *If5* besaß etwa 1,3- bis 1,5-mal so lange. Beim Genprodukt von *If2*, *If4* und *If5* handelt es sich um Proteinkinasen (Tam et al., 2007; Tam et al., 2013). Bei LF2 scheint es sich um ein Mitglied der CDK-Familie zu handeln (Tam et al., 2007) und die Kinasedomäne von LF5 zeigt deutliche Sequenzhomologie zur humanen CDK-ähnlichen Kinase CDKL5 (Tam et al., 2012). Außerdem sprach vieles für eine cytoplasmatische Interaktion von LF2 mit beiden, LF1 und LF3 (Tam et al., 2007). *Lf4* codiert für ein MAPK-Homolog (Berman et al., 2003). Für die Nullmutante von LmxMPK13, dem Homolog von *Lf4* in *L. mexicana* (Wiese 2007), fiel ebenfalls eine im Schnitt diskrete Verlängerung der Flagellen auf (Scholz, Dissertation 2008). In *L. mexicana* konnten diverse MAPK-Homologe und auch potentiell übergeordnete Kinasen in Verbindung mit der Flagellenlängenregulation gebracht werden. Mit LmxMPK3 und LmxMCK wurde erstmals eine Paarung MAPK und übergeordnete MAPKK in Leishmanien charakterisiert. Die jeweiligen Nullmutanten wiesen kurze Flagellen auf (Erdmann und Scholz et al., 2006). LmxMPK3-Nullmutanten waren nicht in der Lage eine Infektion im Vektor *Lutzomyia longipalpis* zu etablieren. Vermutlich war es den Promastigoten aufgrund des kurzen Flagellums nicht möglich, sich an das Darmepithel anzuheften bzw. sich Richtung Vorderdarm zu bewegen (Erdmann, Dissertation 2009). Es wird angenommen, dass der Aufgabenbereich von LmxMPK3 und LmxMCK im Bereich des intraflagellaren Transports zu finden ist (Erdmann, Dissertation 2009). Die Nullmutanten von LmxMPK3 bzw. LmxMCK waren in der Lage die Differenzierung von Promastigoten zu Amastigoten zu vollziehen und dabei das Flagellum zu resorbieren (Erdmann und Scholz et al., 2003; Wiese et al., 2003a). Das Fehlen der jeweiligen Kinase scheint sich nicht auf den retrograden IFT auszuwirken. Die Menge an LmxMPK3 und LmxMCK nahm im Rahmen der Differenzierung zu Amastigoten stetig ab. In Gegenrichtung, während der Differenzierung von Amastigoten zu Promastigoten, wurde LmxMCK innerhalb der ersten 10 Stunden gebildet. LmxMPK3 war erstmals nach 16 Stunden nachweisbar. Zu dieser Zeit waren die Flagellen kurz, danach verlängern

sie sich zunehmend (Erdmann und Scholz et al., 2003). Beide Signalmoleküle könnten für die Förderung des anterograden IFT von Bedeutung sein.

Weitere Kandidaten aus der Gruppe der MAPK-Homologe, deren Deletionsmutanten sich mit langen Flagellen präsentierten sind neben LmxMPK13, LmxMPK9 und LmxMPK14 (Bengs et al., 2005; Scholz, Dissertation 2008). Diese drei Kinasen sind sich ähnlich und bilden in einem phylogenetischen Baum der 15 MAPKs von *L. mexicana* einen eigenen Ast (Wiese, 2007). LmxMPK9 wird im promastigoten Stadium exprimiert. Die episodale Überexpression von LmxMPK9 führte zu einer Subpopulation von Zellen mit kurzen bis keinen Flagellen (Bengs et al., 2005). Die Deletion des in der MAPK-Aktivierungskaskade übergeordneten MAPKK-Homologs LmxMKK4 (LmxPK4) führte zu langen Flagellen (Kuhn, Dissertation 2005). LmxMKK4 wurde im promastigoten Stadium gefunden und während der Differenzierung zu Amastigoten, konnte jedoch nicht in Amastigoten selbst nachgewiesen werden (Kuhn und Wiese, 2005). Die Überprüfung auf Interaktion ergab, das LmxMKK4 zwar LmxMPK13, jedoch nicht LmxMPK14 *in vitro* phosphoryliert. Auch LmxMPK9 wurde von LmxMKK4 im Aktivitätstest phosphoryliert, jedoch durch die Phosphorylierung nicht aktiviert. Anders LmxMPK13, welches durch Phosphorylierung von LmxMKK4 auch eine Aktivierung erfährt (Scholz, Dissertation 2008). Dass es sich bei LmxMKK4 und LmxMPK13 um eine *in vivo* existente Paarung handelt, wäre aufgrund des ähnlichen Phänotyps der Deletionsmutanten vorstellbar, muss allerdings noch bewiesen werden.

Die Substrate von GSK3 in Kinetoplastiden sind noch nicht bekannt. Man weiß jedoch, dass sich unter den Substraten von Säugetier-GSK3 auch verschiedene Proteinkinasen befinden. Da die Behandlung mit dem GSK3-Inhibitor LiCl in Promastigoten zu langen Flagellen führt, wurde LmxGSK3 $\beta$  auf Wechselwirkung mit bekannten an der Flagellenregulation beteiligten Kinasen untersucht. Die Untersuchung beschränkte sich auf MAPKs bzw. MAPKKs, von denen zu diesem Zeitpunkt ein rekombinantes Protein zur Verfügung stand. LmxGSK3 $\beta$  akzeptierte LmxMPK3, LmxMKK und LmxMKK4 nicht als Substrat und phosphorylierte diese *in vitro* nicht. LmxMPK3 ließ LmxGSK3 unangetastet. LmxMKK phosphorylierte LmxGSK3 $\beta$  *in vitro* zwar, diese Phosphorylierung führte jedoch zu keiner Änderung der Kinase-Aktivität von GSK3 $\beta$ . LmxMKK4 phosphorylierte das rekombinante Protein von LmxGSK3 $\beta$  sehr stark. Die Co-Expression beider Kinasen mit konsekutiver Aufreinigung und Aktivitätsprüfung zeigte, dass sich die Kinase-Aktivität von LmxGSK3 $\beta$  durch diese Phosphorylierung nicht verändert. LmxMKK doppelphosphoryliert sein stromab Substrat LmxMPK3 an TDY in der Aktivierungsschleife, LmxMKK4 LmxMPK13 an TEY. Beide führen dadurch zu einer Aktivitätssteigerung der jeweiligen MAPK (Erdmann, Dissertation 2009; Scholz, Dissertation 2008). Das Phosphopeptid von LmxGSK3 $\beta$ , welches Phospho-Tyrosin-186 trägt, war in beiden Lebensstadien von Wildtyp bzw. LmxMKK4-Nullmutante in ähnlicher Menge vertreten. Lediglich in der Nullmutante von LmxMKK war das Phospho-Tyrosin-tragende Peptid

in viel geringerem Umfang anzutreffen (Rosenqvist, Dissertation 2011). Weder LmxMKK, noch LmxMKK4 scheinen LmxGSK3 $\beta$  jedoch *in vitro* am für die Aktivität essentiellen Tyrosin-186 in der Aktivierungsschleife zu phosphorylieren. In  $\Delta$ LmxMKK könnte es sich bei der verminderten Phosphorylierung an Tyrosin-186 um einen indirekten Effekt auf LmxGSK3 $\beta$  handeln. Wäre die Aktivitätsverminderung von LmxGSK3 $\beta$  in  $\Delta$ LmxMKK führend, wären höchstwahrscheinlich überlange Flagellen zu erwarten.

LmxMPK13 erfährt neben der Phosphorylierung am zentralen TXY-Motiv durch LmxMKK4 auch eine Phosphorylierung nahe des N- bzw. C-Terminus (Scholz, Dissertation 2008). Die N-terminale Phosphorylierung findet interessanterweise an Threonin-14 innerhalb des Glycin-reichen Motivs GEGpTFSEV der ATP-Bindungsstelle statt (unterstrichen sind invariante und beinahe invariante Aminosäurereste). LmxMKK4 scheint für diese Art von Phosphorylierung eine Vorliebe zu besitzen, denn auch die Phosphorylierung von LmxGSK3 $\beta$  scheint innerhalb dieses konservierten Motivs zu erfolgen. So wurde ein einfach- bzw. doppelt phosphoryliertes Peptid, das die Sequenz GQGTFGpTV bzw. GQGpTFGpTV trägt, massenspektrometrisch nachgewiesen. Wenngleich eine zusätzliche Phosphorylierung innerhalb der Subdomäne X von LmxGSK3 $\beta$ , aufgrund einer möglichen Überlagerung mit einem Phosphopeptid ähnlicher Größe, in der MALDI-Analyse nicht ausgeschlossen werden kann. Eine Phosphorylierung innerhalb des konservierten G-x-G-x-x-G/A-Motivs ist in der Welt der Proteinkinasen zwar nicht weit verbreitet, aber auch nicht gänzlich unbekannt. So führte die Phosphorylierung an GKGpSFA in der Phosphatbindungsschleife der Atg1-Kinase zur Hemmung der Kinase und zur Verminderung der Autophagieaktivität von *S. cerevisiae* (Yeh et al., 2011). Die Brassinosteroid-insensitive-Rezeptor-Kinase 1 (BRI1) von *Arabidopsis* wurde durch Phosphorylierung an GpSGGFG ebenfalls inaktiviert (Oh et al., 2012). Die bedeutsamste Gruppe an Kinasen, welche durch Phosphorylierung innerhalb des Glycin-reichen Motivs in ihrer Aktivität gehemmt werden, sind die CDKs. In Abhängigkeit des Zellzyklusstadiums werden die humane CDK1 bzw. CDK2 an Tyrosin-15 und/oder Threonin-14 phosphoryliert (Morgan, 1997; Solomon und Kaldis, 1998; Welburn et al., 2007). Ob die Phosphorylierung innerhalb des Glycin-reichen Motivs durch LmxMKK4 auch *in vivo* relevant ist und welche Bedeutung diese Art von Phosphorylierung für LmxMPK13 oder auch GSK3 $\beta$  in Leishmanien haben könnte, ist unklar. Allerdings führte die Phosphorylierung innerhalb dieses Motivs im Kinase-Aktivitätstest zu keiner Aktivitätsabnahme von LmxMPK13 bzw. LmxGSK3 $\beta$ , wie dies für andere Kinasen beobachtet worden war. Lithium im Kulturmedium hemmt die Zellproliferation. LmxMPK1 ist essentiell für die Zellproliferation im amastigoten Lebensstadium. Der *in vitro* Test ergab keine Anhaltspunkte, dass LmxMPK1 und LmxGSK3 $\beta$  interagieren.

#### Cytokinesedefekt und Verminderung der Zellteilungsaktivität:

Neben der Zunahme der Flagellenlänge in Lithium behandelten Promastigoten, fielen diese durch eine gehemmte Cytokinese und verminderte Zellvermehrung auf. Darüber hinaus waren in der Kultur Zellen vorhanden, welche die Zellteilung vom falschen Ende her initiierten und/oder ein Missverhältnis der Zellkern-/Kinetoplastenzahl aufwiesen. In Mutationsstudien fallen Phänotypen mit aberranter Cytokinese auf, wenn es sich um Zielproteine handelt, welche mit Mikrotubuli assoziiert sind bzw. an deren dynamischen Auf- und Abbau mitwirken, in Trypanosomatiden Proteinen der FAZ (flagellar attachment zone) und bei Steuerelementen der Cytokinese wie Kinasen (Aurora-Kinase, Polo-Kinase).

Mikrotubuli (Mt) sind verantwortlich für die Ausbildung der mitotischen Spindel, Zellform, den intrazellulären Transport und als zentrale Komponente von Flagellen und Zilien für die Fortbewegung (Hawkins et al., 2010). Das Zellgerüst von Trypanosomatiden besteht aus subpellikulär gelegenen Mikrotubuli, welche longitudinal durch den ganzen Parasiten verlaufen. Der Pluspol der Mikrotubuli befindet sich am posterioren Ende (Ambit et al., 2011; Portman und Gull, 2014). Im Bereich der Membraneinstülpung der Flagellartasche fehlt das subpellikuläre Mikrotubuligerüst. Daneben existieren Mt im Basalkörper und ein spezialisiertes Mikrotubuliquartett, welches bei *T. brucei* mit dem FAZ assoziiert ist (Vaughan und Gull, 2016). Zusätzlich finden sich in *L. mexicana* einzelne, cytoplasmatische Mikrotubuli, welche im Bereich der Flagellartasche beginnen (Wheeler et al., 2016). Eines von diesen steht wahrscheinlich mit dem Lysosomen in Verbindung (Weise et al., 2000). Leishmanien wie auch Trypanosomen unterliegen innerhalb ihres komplexen Lebenszyklus tiefgreifenden Anpassungsprozessen. Das morphologische Spektrum von *L. mexicana* umfasst ovoide, 2-5 µm große Amastigoten mit in der Flagellartasche verborgenem Flagellum und verschiedene Stadien von Promastigoten, welche je nach Stadium eine sehr unterschiedliche Länge des Zellkörpers (6,5-25 µm) und Flagellums (bis zu 20 µm) aufweisen. Die Größe des Zellkörpers verändert sich auch in Abhängigkeit vom Zellzyklusstadium. Nach Verdopplung der Länge des Zellkörpers in G1, kommt es vor der Zellteilung zur raschen Abnahme der Zelllänge und Zunahme der Breite von *L. mexicana*-Promastigoten (Wheeler et al., 2011). Die Organisation und Regulation der Mt des Cytoskeletts und auch der spezialisierten Mt, wie die des Flagellums, sind für die morphologische Anpassung von zentraler Bedeutung. Untersuchungen an *T. brucei* haben gezeigt, dass die Integrität des subpelliculären Mt-Gerüsts während der Zellteilung erhalten bleibt. Das Längenwachstum des Zellkörpers beruht auf dem Einbau von Tubulin-Einheiten am posterioren Zellpol, die Dickenzunahme auf dem Einschub kurzer Mikrotubuli, wodurch sich der Abstand zwischen den bereits bestehenden Mikrotubuli vergrößert (Sherwin und Gull, 1989; Wheeler et al., 2013; Portman und Gull, 2014). In *T. brucei* gehen Längen- und Dickenzunahme der Zellteilung voran.

Für verschiedene Mt-assoziierte Proteine wurde gezeigt, dass sie für die Cytokinese von Bedeutung sind. Möglicherweise ist die gestörte Cytokinese in Lithium-behandelten Promastigoten darauf zurückzuführen, dass eines dieser Mt-assoziierten Proteine nicht mehr von GSK3 phosphoryliert wird? Das AIR9-ähnliche Protein TbAIR9 und die Proteine CAP51 bzw. sein Paralog CAP51V von *T. brucei* sind mit dem Cytoskelett assoziierte Proteine, welche mit den Mt des subpellikulären Gerüsts vergesellschaftet sind. TbAIR9 und CAP51/V besitzen je ein Homolog in Leishmanien. War TbAIR9 in Prozyklischen nicht ausreichend vorhanden, kam es zur Zunahme der Zelllänge durch Mt-Verlängerung am posterioren Ende. Außerdem störte die TbAIR9-Verminderung die Positionierung von Zellkern und Kinetoplast, was eine aberrante Cytokinese zur Folge hatte (May et al., 2012). Die Verminderung von CAP51 bzw. CAP51V mittels RNAi hatte einen Cytokinesedefekt mit Abnahme der Wachstumsrate zur Konsequenz. Durch Fehlsegregation der DNA-haltigen Zellorganellen kam es nach 72 Stunden zur Akkumulation von Zellen mit 0N1K-Konstellation (Zoide) sowie multinukleären Zellen (Portman und Gull, 2014). Coronine sind weitverbreitete eukaryontische Proteine, welche Aktin- bzw. Mikrotubuli binden. Das Coronin CRN12 von *L. donovani* interagiert in zellzyklusabhängiger Weise, vermutlich über das Motorprotein Kinesin K39, mit Mt am posterioren Pol und wurde auch im Bereich des Basalkörpers gefunden. Eine heterozygote Mutante mit verminderter Expression von CRN12 fiel durch einen Cytokinesedefekt auf (Sahasrabudde et al., 2009). Die beiden Tochterzellen trennten sich nicht vollständig voneinander und blieben am posterioren Ende über die gesamte Zellbreite hinweg miteinander cytoplasmatisch verbunden. Dieser Phänotyp unterscheidet sich damit aber deutlich von dem Lithium-behandelter Promastigoten. Keines, der bis dato in Trypanosomatiden beschriebenen Mt-assoziierten Proteine ist ein Homolog eines Mt-assoziierten Proteins von Säugetieren, welches von GSK3 phosphoryliert wird.

Die durch Lithium verursachten Veränderungen zeigten sich bereits früh, nach sechs Stunden Kultur. Die Unterschiede zur Kontrollkultur waren am stärksten in Zellen, welche sich in der Wachstumsphase befanden. In einer Kultur versetzt mit 50 mM LiCl fanden sich nach sechs Stunden ein Drittel mehr Promastigoten mit 2F2N1K- bzw. 2F2N2K-Konstellation. Nach 24 Stunden lag der Anteil dieser Zellen an der Gesamtpopulation bei 50 Prozent, und betrug somit das Dreifache wie in der Kontrollkultur ohne Lithium. Da es gleichzeitig zur Abnahme der Zellzahl kam, ist davon auszugehen, dass die Zunahme an sich teilenden Zellen nicht auf eine erhöhte Zellteilungsaktivität zurückzuführen ist, sondern auf eine Störung der Cytokinese. Bei einer Kulturdauer >48 Stunden nahm der Anteil an 2F2N1K-/2F2N2K-Zellen progredient ab und die Zellvermehrung zu. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass die Cytokinese nicht irreversibel blockiert ist, sondern lediglich verzögert abläuft. Die Hemmung der Zellteilungsaktivität weist eine deutliche Abhängigkeit von der

Lithium-Konzentration im Medium auf. Alternativ wäre vorstellbar, dass Lithium-Ionen in Zellen akkumulieren und dadurch aus dem Medium entfernt werden. Eine sinkende Lithium-Konzentration über die Kulturdauer könnte es einigen Zellen ermöglichen, sich wieder normal zu teilen und die Gesamtkultur zu überwachsen. Eine Verzögerung der Cytokinese, jedoch keine vollständige Unterbindung dieser, wurde auch bei RNAi von MOB1 beobachtet. Die Kultur wurde dominiert von sich verdoppelnden Zellen mit erkennbarer Teilungsfurche. „Mps One Binder“-Proteine (MOB) binden und aktivieren NDR-Proteinkinasen der AGC-Gruppe. In *T. brucei* wurden MOB1-A und MOB1-B identifiziert (Hammarton et al., 2005). Die Verminderung von MOB1 führte in der Blutbahn-Form zu einer Cytokinese-Verzögerung und wirkte sich negativ auf die Kinetoplasten-Replikation bzw. -Segregation aus. In Prozyklischen beeinträchtigte die Verminderung von MOB1 ebenfalls die Cytokinese. Nach fünf Tagen besaßen 20 % der Zellen eine abnorme N-K-Konstellation, u. a. fanden sich Zoide (Hammarton et al., 2005). MOB1-A scheint mit der NDR-PK TbPK50 vergesellschaftet zu sein. Die Verminderung von TbPK50 führte ebenfalls zur Cytokineseverzögerung in der BF von *T. brucei*. Jedoch war TbPK50 auch ohne Wechselwirkung mit MOB1 *in vitro* aktiv (Ma et al., 2010).

*L. mexicana* vermehrt, wie auch *L. donovani*, von den in einfacher Kopie vorliegenden Organellen Flagellum (F), Zellkern (N) und Kinetoplast (K) zuerst das Flagellum (2F1N1K), gefolgt von der Mitose (2F2N1K) und dann der Kinetoplastenteilung (2F2N2K). Letztere beginnt nach einsetzen der nukleären Anaphase (Wheeler et al., 2011). Die Zellkern-segregation ist bereits deutlich fortgeschritten, wenn die Segregation des verdoppelten Kinetoplasten beginnt. Anders in *T. brucei* oder *L. tarentolae*, hier geht die Kinetoplasten-segregation der Zellkernverdopplung voran (Woodward und Gull, 1990; Ambient et al., 2011). Der Mikrotubuli-abhängige Prozess der Mitose war in den Lithium-behandelten Zellen nicht gestört. Ist die Ausbildung der mitotischen Spindel beeinträchtigt, gehen *L. mexicana*-Promastigoten hervor mit mehreren Flagellen, mehreren Kinetoplasten, jedoch nur einem Zellkern (Dagger et al., 2013). Dies war in der Lithiumkultur nicht der Fall. Auch wurden Zellen beobachtet, welche unbeeindruckt von der ausbleibenden Cytokinese erneut eine Mitose durchlaufen hatten. Dies führte zu Zellen mit multiplen Flagellen, Zellkernen und Kinetoplasten. Eine erneute Zellverdopplung vor Abschluss der Cytokinese wurde bereits beschrieben und der entstandene Phänotyp in *T. brucei* als „monster cells“ bezeichnet (Hammarton et al., 2007b). Eine Besonderheit von Trypanosomatiden ist, dass Mitose und Cytokinese voneinander entkoppelt ablaufen können (Ploubidou et al., 1999). Vermutlich ist dies auf das Fehlen eines funktionellen Kontrollpunkts zurückzuführen, welcher das Ende der Cytokinese markiert und die Fortsetzung des Zellzyklus erlaubt. Es ist bekannt, dass in Trypanosomatiden einige wichtige Kontrollpunkte des Zellzyklus fehlen, wie man sie aus anderen Eukaryonten kennt (Hammarton et al., 2003).

Die Verdopplung der singulären Zellorganellen schien in den Lithium-exponierten Promastigoten an sich nicht gestört zu sein. Womöglich aber ihre Verteilung auf die beiden Tochterzellen. Dafür spricht, dass bei längerer Inkubation mit Lithium vermehrt Zellen auffielen, welche ein N-K-Missverhältnis aufweisen. Beispielsweise fanden sich Zellen mit einem oder zwei Flagellen und 2N1K, 3N1K, 3N0K, 1N0K aber auch 0N1K (Zoide). Die Zellen mit gestörter Zellteilung wiesen nach 24 Stunden bereits eine deutliche räumliche Trennung der Zellkerne auf. Allerdings hatte die Kinetoplastenverteilung auf die beiden Tochterzellen oftmals noch nicht stattgefunden und beide Kinetoplasten wurden räumlich nahe beieinander vorgefunden. Der Kinetoplast ist über Filamente des „Tripartite attachment complex“ (TAC) mit der Verankerung des Flagellums, dem Basalkörper, verbunden. Mit der Trennung des verdoppelten Basalkörpers geht die Segregation und Positionierung des verdoppelten Kinetoplasten einher (Ogbadoyi et al., 2003). Eine Verzögerung der Verteilung von Basalkörper und Kinetoplast im Rahmen der Zellverdopplung fand man beispielsweise in der ADF/Cofilin-Nullmutanten *COF*<sup>-/-</sup> von *L. donovani* (Tammana et al., 2010). ADF/Cofilin steht mit Aktin-dynamischen Prozessen in Verbindung. *COF*<sup>-/-</sup>-Promastigoten fielen durch eine gestörte Cytokinese und Zellvermehrung auf, besaßen jedoch anders als Lithium-behandelte Zellen sehr kurze Flagellen. Welche Proteine die Organellen-Segregation steuern und wie die, sich der Kinetoplastensegregation anschließende Cytokinese genau eingeleitet wird, ist nicht bekannt. Auch ist unklar, ob eine gestörte Kinetoplastensegregation ein Ausbleiben der Cytokineseinitiation nach sich zieht.

Eine zweite Möglichkeit, Zellen mit irregulärem N-K-Verhältnis zu erzeugen, besteht in einer falschen Positionierung der Teilungsfurche zu den duplizierten Organellen. Dies wurde in einigen Zellen mit Cytokinesedefekt von *T. brucei* als Grund für die Entstehung von Zellen mit N-K-Missverhältnis identifiziert (Hammarton et al., 2005). Allerdings unterscheiden sich *T. brucei* und Leishmanien in ihrem Teilungsmodus insofern, dass in *T. brucei* die Teilung der Tochterzellen asymmetrisch verläuft und sich die Teilungsfurche seitlich beginnend entlang der Längsachse fortsetzt, während sich in Leishmanien die Teilung symmetrisch, longitudinal entlang der Mittellinie vollzieht (Wheeler et al., 2013 und Wheeler et al., 2011).

In der Literatur sind unterschiedliche Phänotypen beschrieben, denen ein Cytokinesedefekt zu Grunde liegt. Die unterschiedlichen Erscheinungsbilder spiegeln das Erliegen der Cytokinese zu unterschiedlichen Zeitpunkten wider. Zu Beginn der Cytokinese bildet sich longitudinal eine Teilungsfurche zwischen den Zellkörpern der beiden Tochterzellen aus (Wheeler et al., 2013). Störungen der Cytokineseinitiation führen zu verdoppelten Zellen, deren Zellleiber zusammenhängen. Häufig ist keine Teilungsfurche zu erkennen. Dieser Phänotyp wurde beispielsweise bei RNAi folgender Proteine in der Blutbahn-Form von *T. brucei* beobachtet: TbMAPK6, dem Homolog von LmxMPK2 (Wei und Li, 2014), dem



Homolog des Rezeptors für aktivierte C-Kinase-1 TRACK (Rothberg et al., 2006) oder Metacaspase (Helms et al., 2006). Nachfolgend trennen sich die Tochterzellen entlang der Teilungsfurche. Die Trennung der Zelleiber beginnt in Leishmanien in der Regel am anterioren Zellpol (Ambit et al., 2011). Bei einem Cytokinesedefekt in diesem Stadium kommt es zur Anhäufung von Zellen, welche bereits eine Teilungsfurche mit begonnener Trennung der Zelleiber aufweisen, so z. B. in der Blutbahn-Form bei RNAi von MOB1 (Hammarton et al., 2005) oder der Polo-ähnlichen Kinase PLK (Hammarton et al., 2007a) bzw. in Prozyklischen bei RNAi von TbMAPK6 (Wei und Li, 2014). Kurz vor Ende der Cytokinese sind die beiden Tochterzellen an ihrem posterioren Pol noch über eine cytoplasmatische Brücke miteinander verbunden. Durch Trennung dieser Verbindung wird die Cytokinese abgeschlossen (Hammarton et al., 2007b). Dieser Vorgang wird Abszission genannt. Das Mikrotubuli-schneidende Protein Spastin scheint für die Abszission in der Blutbahn-Form von *T. brucei* essentiell zu sein (Benz et al., 2012). In einer mit Lithium behandelten Promastigotenkultur fanden sich duplizierte Zellen, deren Zellkörper zusammenhingen und noch keine Trennung erkennen ließen. Oftmals war aber eine longitudinale Einbuchtung bzw. Abgrenzung zwischen beiden Zellkörpern entlang der Mittellinie zu sehen. Hypothetisch erfolgt entlang dieser Furche die fortschreitende Trennung von anterior nach posterior, wie bei einem Reißverschluss. Hierbei scheint es sich um einen schnell ablaufenden Prozess zu handeln, da Zellen, welche gerade erst die Trennung entlang ihrer Längsachse begonnen haben, nur selten in Kultur beobachtet werden. Die Anhäufung der zusammenhängenden Doppelzellen spricht dafür, dass das Problem im Bereich der Cytokineseinitiation anzusiedeln ist. Es wird zudem von einer Cytokineseverzögerung ausgegangen. Dies impliziert, dass die beiden Tochterzellen in der Lage sind, sich auf irgendeine Art voneinander zu trennen. Tatsächlich wurde für einen kleinen Teil der Zellen beobachtet, dass sie begonnen hatten, sich von ihrem posterioren Pol her zu trennen. Bei dieser Trennung von der „falschen Seite“ könnte es sich um einen alternativen, ineffektiveren Weg handeln, den Leishmanien nutzen, wenn die Möglichkeit, die Trennung regulär vom flagellentragenden anterioren Pol zu vollziehen, blockiert ist. Ob diese Art der Abtrennung erfolgreich ist und hieraus die Zellen mit N-K-Missverhältnis resultierten, lässt sich anhand der gemachten Beobachtungen nicht sagen. Es fanden sich vervielfältigte Zellen mit fortgeschrittener Trennung, welche anterior noch miteinander verbunden waren. Dies wirft die Frage auf, ob die Abszission auch am anterioren Pol möglich ist. Auch nach Depletion von Cytokineseinitiationsfaktor 1 bzw. 2 (CIF1 bzw. CIF2) in Prozyklischen von *T. brucei* wurden Zellen mit Blockade der normalen Cytokinese beobachtet, welche sich vom posterioren Ende her teilten (Zhou et al., 2016a; Zhou et al., 2016b). Die Zellteilung von posterior geschah in diesen Zellen so langsam, dass nach mehreren Runden des Zellzyklus Zellen mit multiplen Zellkernen vorlagen.

Intrazelluläre Amastigoten der Kharon1-Nullmutante von *L. mexicana* replizierten Zellkern, Kinetoplast und rudimentäres Flagellum. Sie endeten jedoch, vermutlich aufgrund einer Störung der Cytokinese, als multinukleäre Zellen und wurden abgetötet (Tran et al., 2015). Die Funktion von Kharon1 im amastigoten Lebensstadium ist unbekannt. Dieser Defekt machte sich nur in der Wirtszelle bemerkbar und wurde für axenische Amastigoten nicht beobachtet. Die Differenzierung von Promastigoten zu axenischen Amastigoten wurde durch LiCl nicht beeinträchtigt. Die Zellvermehrung von Amastigoten in Gegenwart von Lithium war jedoch deutlich vermindert. Die Hemmung erfolgte konzentrationsabhängig. Eine Akkumulation von verdoppelten Amastigoten wurde nicht beobachtet. Eine vorhandene Cytokinseverzögerung fiel möglicherweise sehr diskret aus und war aufgrund der generell schwächeren Zellvermehrung von Amastigoten und dem fehlenden Merkmal des, den Zellleib überragenden verdoppelten Flagellums schlechter auszumachen. Oder die Hemmung der Zellteilung durch LiCl hat einen anderen Ursprung als in Promastigoten und ein anderer für die Zellteilung notwendiger Prozess ist in Amastigoten betroffen. Da GSK3 in Säugetieren und höchstwahrscheinlich auch in Leishmanien unterschiedliche Zielproteine bedient, schließt dies in Amastigoten GSK3 als Zielprotein von Lithium nicht aus.

Für eine Vielzahl von Flagellenproteinen wurde beschrieben, dass eine Verminderung durch RNAi einen indirekten Cytokinesedefekt zur Folge hat (Broadhead et al., 2006; Hammarton et al., 2007b). LiCl führte in Promastigoten zu Veränderungen auf Ebene der Flagellen und Cytokinese. Der mechanische Zug auf den Zellkörper, welcher durch den Flagellenschlag zustande kommt, scheint für das Cytokinesestadium der Abszission von *T. brucei* essentiell zu sein. Fehlte das PFRA Protein in der Blutbahn-Form, gingen Zellen mit unbeweglichem neuen Flagellum hervor, die nach Beginn der Cytokinese die zelluläre Verbindung am posterioren Pol nicht auflösen konnten (Kohl und Bastin, 2005). Ähnliches wurde auch für andere Flagellenproteine beobachtet, welche für die Flagellenmotilität von *T. brucei* essentiell sind. Es ist unwahrscheinlich, dass das Flagellum von Leishmanien einen ähnlichen Stellenwert für die Cytokinese einnimmt wie für *T. brucei*. Nullmutanten von LmxMKK bzw. LmxMPK3 besaßen nur sehr kurze Flagellen und waren schwimmunfähig (Wiese et al., 2003; Erdmann und Scholz et al., 2006). Trotzdem zeigten ihre Promastigoten keine Anzeichen eines Cytokinesedefekts. Der maßgebliche Unterschied liegt darin, dass das Flagellum von *T. brucei* über die FAZ mit der konvexen Seite des Zellkörpers langstreckig verbunden ist, während das Flagellum von Leishmanien nur mit dem anterioren Pol des Zellkörpers in Kontakt steht.

Die komplexe Struktur der „flagellar attachment zone“ (FAZ) umfasst Filamente, spezialisierte Mt und Membranverbindungen. Die FAZ verbindet die Gerüststruktur des Flagellums mit dem Cytoskelett des Zellkörpers durch die Flagellen- und Zellmembran

hindurch (Sunter und Gull, 2016). Die FAZ-Struktur wird in Rahmen der Zellteilung ebenfalls verdoppelt, wobei die Entstehung der neuen FAZ entlang der alten FAZ beginnt (Kohl et al., 1999). Es gibt Anhaltspunkte, dass die FAZ-Struktur die Position und Ausrichtung der Teilungsfurche im Rahmen der Cytokinese definiert, diese initiiert am anterioren Ende der neuen FAZ (Vaughan et al. 2008; Kohl et al., 2003). Eine große Anzahl von Genen wurde bis dato identifiziert, welche für Bausteine der FAZ-Struktur codieren. Eine Zusammenfassung dieser findet sich im Übersichtsartikel von Sunter und Gull, 2016. Knockdown-Experimente legen nahe, dass die FAZ-Struktur nicht nur für die Anheftung des Flagellums von Bedeutung ist, sondern auch für die Segregation/Positionierung von Zellkern und Kinetoplast und auch die Zelllänge (z. B. Vaughan et al., 2008; Sun et al., 2013; Moreira et al., 2017; Cooper et al., 1993). Interessanterweise wurden Komponenten der FAZ nicht nur in *T. brucei* und *T. cruzi* gefunden. Von vielen FAZ-Proteinen wurden Homologe in Leishmanien nachgewiesen, welche sich im Bereich der Flagellartasche zu einer FAZ-ähnlichen Struktur organisieren (Wheeler et al., 2016). Diese FAZ-Homologe wurden noch nicht charakterisiert. Auch über die Funktion der diskreten Struktur mit Ähnlichkeiten zur FAZ ist in Leishmanien noch nichts bekannt. Die FAZ-ähnliche Struktur liegt im Bereich, in dem die Teilungsfurche während der Zellteilung beginnt. Es kann daher spekuliert werden, ob die Struktur in Leishmanien für die Cytokineseinitiation eine Rolle spielt und/oder die Ausrichtung ihrer Bestandteile, wie die des konservierten Mt-Quartetts, Orientierung für die Verteilung der Zellorganellen gibt. Die Behandlung von *T. brucei* mit 5 mM LiCl führte zu Zellen mit längeren Flagellen und zu einer Verlängerung der FAZ (Sun et al., 2013). Es wäre interessant zu wissen, ob sich die Ausdehnung der FAZ-ähnlichen Struktur während der Lithium-Exposition von Leishmanien-Promastigoten ebenfalls verändert und ob dies Auswirkungen auf die Cytokinese hat. In *T. brucei* bestand die Korrelation zwischen Flagellenverlängerung und FAZ-Verlängerung jedoch nur, wenn das Flagellum regulär am Zellkörper adaptiert vorlag. War das Flagellum-Adhäsionsprotein 1- (FLA1)-bindende Protein FLA1BP nicht in ausreichender Menge vorhanden, kam es zu Zellen mit abgelöstem Flagellum, welche in Gegenwart von LiCl zwar das Flagellum verlängerten, jedoch nicht die FAZ (Sun et al., 2012). Ein Homolog von FLA1BP ist auch in Leishmanien vorhanden (Wheeler et al., 2016).

Daneben scheint die FAZ-Struktur eine Plattform für Signaltransduktionsprozesse darzustellen, welche für die Einleitung der Cytokinese von zentraler Bedeutung sind. Verschiedene Signalproteine, deren Verminderung durch RNAi zu einem Cytokinesedefekt führt, wurden in der Nähe der FAZ-Struktur lokalisiert, so z. B. die Polo-ähnliche Kinase PLK, das Homolog der Aurora Kinase B und CIF1 bzw. CIF2. Die Lokalisation von PLK scheint vom Zellteilungsstadium abhängig zu sein (Ikeda und de Graffenried, 2012). Kurz vor Beginn der Cytokinese befand sich TbPLK an der anterioren Spitze der wachsenden FAZ-Struktur (Kumar und Wang, 2006; Ikeda und de Graffenried, 2012). Die Depletion des einzigen PLK-Homologs

TbPLK von *T. brucei* störte in Prozyklischen die Trennung des verdoppelten Basalkörpers und daran gekoppelt fand keine Kinetoplastensegregation statt. Es wurde darüber hinaus die Flagellartasche und die FAZ-Struktur nicht regelgerecht dupliziert. Im Gegensatz zu Säugetier-PLKs spielt TbPLK für die Mitose keine Rolle. Durch die Blockade der Cytokinese entstanden schließlich mehrkernige Zellen mit Flagellen, die häufig nicht am Zelleib adaptiert waren (Hammarton et al., 2007a; Ikeda und de Graffenried et al., 2012). Als zweite Kinase wird das Aurora Kinase Homolog TbAUK1 im Bereich der neuen FAZ und im Bereich der Teilungsfurche rekrutiert. Es existieren drei Homologe der Aurora Kinase in *T. brucei*, TbAUK1, TbAUK-2 und TbAUK-3 (Tu et al., 2006) und ein Homolog in Leishmanien, LmAIRK in *L. major* (Siman-Tov et al., 2001) bzw. LdAIRK in *L. donovani* (Chhajer et al., 2016). TbAUK1 ist Teil eines „chromosomal passenger complex“ CPC, zu welchem auch zwei Kinesin-Homologe und die Proteine CIF1 und CIF2 gehören (Li et al., 2008). Der CPC ist notwendig für die Ausbildung der Mitosespindel und die Segregation der Chromosomen. TbAUK1 ist insbesondere für den Übergang von Metaphase zu Anaphase wichtig und zusammen mit CIF1/2 für die sich anschließende Initiation der Cytokinese (Li et al., 2008; Li et al., 2009). Die Verminderung von TbAUK1 durch RNAi führte in Prozyklischen zur Anhäufung von 1N2K-Zellen mit vergrößertem Zellkern, jedoch klar separierten Kinetoplasten und zwei normal langen Flagellen (Tu et al., 2006). Die Blutbahn-Form teilte trotz fehlender Cytokinese weiter ihre Organellen und es resultierten Zellen mit Riesenzellkernen und multiplen Kinetoplasten und Flagellen (Li und Wang, 2006). Es war in den Zellen sowohl die Mitose als auch Cytokinese blockiert.

Der GSK3-Inhibitor LiCl hemmt in *L. mexicana*-Promastigoten die Einleitung der Cytokinese. Möglicherweise nimmt LmxGSK3 $\beta$  an dem beschriebenen Zusammenspiel von Cytokinese-initiiierenden Signalmolekülen teil. Für die Aktivität von TbAUK1 scheint die Phosphorylierung an T184-x-x-x-T188 in der Aktivierungsschleife der Kinase essentiell zu sein (Hu et al., 2014). Es ist nicht bekannt, welche Kinase für die Phosphorylierung der beiden Threonin-Reste verantwortlich ist. Säugetier-GSK3 bevorzugt Phosphorylierungsmotive wie dieses. Die Überexpression von TbAUK1-Mutanten, in welchen die genannten Threonin-Reste gegen Alanin ausgetauscht worden waren, führte zu 1N2K-Zellen. Wurden *L. donovani*-Promastigoten mit dem Aurora-Kinase-Inhibitor Hesperadin behandelt, besaßen nur 18% der entstehenden 2N2K-Zellen einen getrennten Zellkern. Im Kulturverlauf nahm die Anzahl an Zellen mit mehreren Chromosomensätzen zu und es entstanden große ungeformte Zellen mit Riesenzellkernen (Chhajer et al., 2016). Lithium-exponierte Promastigoten von *L. mexicana* ließen jedoch keinen Mitosedefekt erkennen und zeigten klar separierte Zellkerne. Es erscheint daher eher unwahrscheinlich, dass die Beeinträchtigung von LiCl-behandelten Leishmanien auf Ebene der Aurora-Kinase stattfindet.

Das Protein CIF1, auch „Tip of the extending FAZ Protein 1“ TOEFAZ1 genannt (Sinclair-Davis et al., 2017), stellt einen interessanten Kandidaten für eine Testung auf Phosphorylierung durch GSK3 $\beta$  dar. Es gibt Hinweise, dass CIF1, wie auch CIF2, für die Cytokineseinitiation in *T. brucei* eine Rolle spielen (Zhou et al., 2016a; Zhou et al., 2016b). CIF1 besitzt *in vivo* 29 Phospho-Serin/Threonin-Reste und liegt damit hoch phosphoryliert vor. CIF1 scheint sowohl von TbPLK (Zhou et al., 2016a; Sinclair-Davis et al., 2017) als auch TbAUK1 (Zhou et al., 2016a) phosphoryliert zu werden. Eine Verminderung durch RNAi von CIF1 bzw. CIF2 in Prozyklischen führte anfangs zur Anhäufung von 2N2K Zellen und im späteren Kulturverlauf zu mehrkernigen Zellen. Außerdem zeigte sich, dass beide Faktoren vermutlich für die Lokalisation von TbPLK und TbAUK1 an der Spitze der neuen FAZ notwendig sind. Neben dem Cytokinesedefekt fiel im RNAi-Experiment auf, dass sich ein Teil der Zellen, welche nicht in der Lage waren die Trennung korrekt von anterior zu initiieren, begannen von posterior zu teilen. Auch fanden sich unvollständig getrennte Zellen, welche am anterioren Ende noch über eine Cytoplasmabrücke verbunden waren und mehrere Zellkerne aufwiesen. Nach 48 Stunden RNAi von CIF1 bzw. CIF2 zeigten an die 40 bzw. 20 Prozent der 2N2K Zellen eine Trennung von posterior. Unter den Zellen mit mehreren Zellkernen war der Prozentsatz nach 48 Stunden sogar noch höher (Zhou et al., 2016a und b). Interessanterweise wurde ähnliches für andere Proteine, welche für die Cytokineseinitiation eine Rolle spielen wie TbPLK und TbAUK1 nicht beschrieben. Wenngleich in der LiCl-behandelten Kultur solche Zellen mit „alternativer Zellteilung“ nicht so häufig beobachtet wurden, wie für Zellen unter RNAi von CIF der Fall, stellt diese Beobachtung eine interessante Gemeinsamkeit dar. Für das Homolog von CIF1 in *L. mexicana* LmxM.31.2610 wird ein Molekulargewicht von 107,2 kDa vorhergesagt. Rekombinante LmxGSK3 $\beta$  phosphorylierte in Promastigoten- und Amastigotenlysaten ein Protein von ähnlicher Größe.

#### Können die beobachteten LiCl-Effekte auf eine Hemmung von GSK3 $\beta$ zurückgeführt werden? - Eine kritische Auseinandersetzung -

LiCl ist kein völlig spezifischer Inhibitor von GSK3, sondern kann auch die Aktivität anderer Enzyme beeinflussen. Es kann daher eine direkte Hemmwirkung auf Komponenten der Cytokineseinitiation nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Cohen und Arbeitsgruppe haben die Spezifität verschiedener gängiger Inhibitoren von humanen Proteinkinasen getestet, darunter auch LiCl. Dabei reduzierten 10 mM LiCl die Kinase-Aktivität von GSK3 $\beta$  auf ca. 30 %, jedoch auch die Aktivität von PLK auf ca. 75 % bzw. Aurora B auf ca. 57 % (Bain et al., 2007). Es ist nicht bekannt, inwieweit LiCl die Homologe der humanen PLK bzw. Aurora B Kinase von Leishmanien zu hemmen vermag. Von einer Hemmung der Aurora-Kinase, wird in LiCl-exponierten Promastigoten, wie bereits besprochen, eher nicht ausgegangen. Der Defizienz-Phänotyp von PLK in Leishmanien ist unbekannt. Und damit auch, wie sich ein möglicher Cytokinesedefekt bei Verminderung der PLK-Aktivität genau präsentieren würde.

Weitere Tests mit anderen GSK3-Inhibitoren bzw. Untersuchungen bei denen die GSK3-Aktivität auf andere Art und Weise reduziert wird sind notwendig, um die beobachteten Effekte von LiCl auf Leishmanien, einer GSK3-Inhibition endgültig zuordnen zu können. Bei 6-BIO und 5-Me-6-BIO handelt es sich um Indirubinderivate und potentielle Inhibitoren von GSK3 $\beta$  und CRK3 von *L. donovani*, wobei 5-Me-6-BIO eine höhere Spezifität für GSK3 $\beta$  zu besitzen scheint. In Promastigoten kam es in Gegenwart dieser Inhibitoren ebenfalls zu einer Veränderung der Flagellenlänge. Zudem akkumulierten die mit 5-Me-6-BIO behandelten Zellen in der S und G2/M-Phase. Bereits nach 24 Stunden fanden sich deutliche Anzeichen, dass die Zellkernintegrität nicht mehr erhalten war und es wurde ein Apoptose-ähnlicher Zelltod beschrieben (Xingi et al., 2009). Von einem Cytokinesedefekt war nicht die Rede. Von Efstathiou et al., 2014 wurden an den benutzten 6-Bromo-Indirubinderivaten weitere Modifikationen vorgenommen, um die Selektivität der Inhibitoren gegenüber GSK3 $\beta$  zu erhöhen. Daneben können Untersuchungen von GSK3 $\beta$  in *T. brucei* herangezogen werden, um Aufschluss über die Funktion der Kinase zu erhalten. In *T. brucei* führte eine Behandlung mit 5 bzw. 10 mM LiCl zu einer Wachstumshemmung und längeren Flagellen in Prozyklischen (Sun et al., 2013). Anzeichen eines Cytokinesedefekts wurden nicht berichtet. Allerdings war die LiCl-Konzentration der Prozyklischen-Kultur um einiges niedriger gehalten als in unseren Experimenten (25 bzw. 50 mM LiCl). Die Verminderung von GSK3 $\beta$  durch RNAi demonstrierte ein drastisch vermindertes Wachstum der Blutbahn-Form (Ojo et al., 2008). Darüber hinaus hatte die Verminderung von GSK3 $\beta$  durch RNAi in der Blutbahn-Form eine leichte Zunahme an 1N2K und 2N2K Zellen zur Folge und es fand sich eine kleine Zahl von Zellen mit abnormen Konstellationen wie 2N1K und 0N1K (Zoide) (Jones et al., 2014). Es wird davon ausgegangen, dass die DNA-Replikation nicht gestört war, es aber unter RNAi möglicherweise zu einer Verzögerung der Mitose und/oder Cytokinese gekommen war.

#### 4.2.2.3 Cytokinesedefekt in $\Delta$ LmxGSK3 $\beta$ -IS

Als weiterer Ansatzpunkt zur Klärung der GSK3-Funktion sollte ein induzierbares System dienen, in dem die Kinase-Aktivität durch Zugabe eines Inhibitors abgeschaltet werden kann. Hierzu wurde eine inhibitorsensitive Mutante (IS) von LmxGSK3 $\beta$  hergestellt. Beide Allele von *LmxGSK3 $\beta$*  wurden erfolgreich gegen *LmxGSK3 $\beta$ -IS* ersetzt. Rekombinantes LmxGSK3 $\beta$ -IS-Protein zeigte bereits bei einer Inhibitor-Konzentration von 1  $\mu$ M 1-NA eine Verminderung der Kinase-Aktivität. Im in vitro-Test zeigte sich jedoch auch, dass die Mutante LmxGSK3 $\beta$ -IS lediglich 20 % der Aktivität der Wildtyp-Kinase erreicht. Der Austausch des „Gatekeeper“-Rests Methionin gegen Alanin wirkt sich somit auf die Kinase-Aktivität aus. Promastigoten, welche LmxGSK3 $\beta$ -IS trugen, zeigten sich lebendig. Ein erster Inhibitortest mit einer Promastigotenkultur der IS-Mutante zeigte, dass 10  $\mu$ M 1-NA zu einer verminderten Zellteilung und Störung der Cytokinese führen. Beide Effekte fielen schwächer aus als bei

Kultivierung von Wildtyp-Promastigoten mit 50 mM LiCl. Nach 48 bzw. 72 Stunden befanden sich in der Kultur mit 1-NA im Mittel 23 bzw. 19 % der Zellen im Stadium der Zellverdopplung. Dies waren jeweils doppelt so viele Zellen wie in der Kontrolle mit DMSO. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die verminderte Aktivität von LmxGSK3 $\beta$ -IS bereits ohne Inhibitor in der Mutante bemerkbar macht. So befanden sich nach 48 Stunden ~12 % der Zellen von  $\Delta$ LmxGSK3 $\beta$ -IS kultiviert mit DMSO im Stadium der Zellteilung. In den Kontrollkulturen mit Wildtyp-Leishmanien der LiCl-Versuchsreihen waren dies ~8,5 % der Zellen. Allerdings gibt es keine Versuchsreihe in der  $\Delta$ LmxGSK3 $\beta$ -IS ohne DMSO direkt dem Wildtyp gegenübergestellt wurde. Dieser erste Inhibitortest untermauert die Annahme, dass die beobachtete Störung der Cytokinese und Wachstumshemmung in den mit Lithium behandelten Promastigoten tatsächlich auf eine Hemmung von LmxGSK3 $\beta$  zurückzuführen ist. Der Inhibitortest mit der  $\Delta$ LmxGSK3 $\beta$ -IS-Mutante sollte bei Wiederholung um Zeitwerte erweitert und zudem die Flagellenlänge gemessen werden. Darüber hinaus sollten axenische Amastigote von  $\Delta$ LmxGSK3 $\beta$ -IS erzeugt und ihr Wachstum in Gegenwart von 1-NA untersucht werden.

#### **4.2.3 LmxGSK3 $\beta$ ist essentiell für Leishmanien und ein potentielles Drug-Target**

Der GSK3-Inhibitor Lithium hemmt in beiden Lebensstadien die Zellvermehrung. Von der Gegenwart von LiCl unbeeinträchtigt blieb jedoch die Fähigkeit von Promastigoten sich zu Amastigoten zu differenzieren. Der Deletionsversuch von LmxGSK3 $\beta$  führte dazu, dass Promastigoten die betreffende Genregion duplizieren. Zu dieser Anpassungsreaktion kommt es in der Regel, wenn das betroffene Protein für das Lebensstadium des Parasiten essentiell ist. Die fehlende Deletierbarkeit liefert den entscheidenden Hinweis, dass LmxGSK3 $\beta$  für Promastigoten lebensnotwendig ist. Nachdem eine ersatzweise episomale Expression von LmxGSK3 $\beta$  in den Zellen etabliert worden war, war es möglich, eine Mutante zu erzeugen, die kein Allel und somit keine genomische Expression der Kinase mehr besaß – den Klon H4PPAC. Der Klon H4PPAC exprimiert LmxGSK3 $\beta$  mit PTP-Tag. Das Expressionsniveau der Kinase in H4PPAC überstieg das des Wildtyps. Dies wurde allerdings nicht auf Einzelzellebene untersucht, sondern dem lag ein Immunoblot auf Zelllysats unter Einsatz des anti-LmxGSK3 $\beta$ -Antikörpers zu Grunde. Der Klon H4PPAC wurde zur Infektion von BALB/c-Mäusen eingesetzt. H4PPAC zeigte sich in allen Tieren der Versuchsgruppe infektiös und führte zu einer Dickenzunahme des injizierten Fußes. Allerdings lief die Ausbildung der Leishmanienläsion moderater ab als bei der Kontrollgruppe, welche mit Wildtyp-Leishmanien infiziert worden war. Dass sich Promastigoten von H4PPAC infektiös zeigten spricht dafür, dass die Umwandlung zu Amastigoten stattgefunden hat. Die verlangsamte Fußdickenzunahme könnte auf eine beeinträchtigte Vermehrung der Amastigoten von H4PPAC und

daraus resultierend, einer nicht so ausgeprägten und zur Schwellung führenden immunologischen Abwehrreaktion zurückzuführen sein. Das *in vitro*-Experiment mit LiCl zeigte, dass LmxGSK3 $\beta$  für die Zellvermehrung von Amastigoten von Bedeutung sein könnte. LmxGSK3 $\beta$  ist in H4PPAC zwar vorhanden, wird jedoch nicht in der gleichen Menge synthetisiert wie im Wildtyp, außerdem ist die Kinase mit einem Protein-Tag versehen. Eine veränderte Kinase-Menge bzw. -Aktivität kann Auswirkungen auf die Zellvermehrung und auf das Infektionsverhalten haben. Im Anschluss an diese Arbeit war es möglich, Amastigoten aus den Mausfußläsionen zu isolieren und zu untersuchen, ob sie das GSK3-tragende Plasmid verloren hatten (Munro, Dissertation 2013). Dem war nicht so. Munro kam zu dem Schluss, dass LmxGSK3 $\beta$  auch für das amastigote Lebensstadium essentiell ist. Bei GSK3 $\beta$  handelt es sich somit um eine generell essentielle Kinase in Leishmanien. GSK3 $\beta$  wäre aus diesem Grund ein hervorragender Ansatzpunkt für die Entwicklung eines Medikaments zur Bekämpfung der Leishmaniose. Auch in anderen Protozoen wie *T. brucei* scheint das GSK3 $\beta$ -Homolog essentiell zu sein (Ojo et al., 2008; Jones et al., 2014).

Eine große Herausforderung liegt darin, eine geeignete Substanz zu finden, welche die parasitäre Kinase effektiv zu hemmen vermag, die Aktivität der humanen Kinase jedoch nicht oder wenig beeinträchtigt. Die Hemmung der humanen Kinase scheint, wie der klinische Einsatz von Lithium bzw. dem Antiepileptikum Valproat (Chen et al., 1999) in der Therapie von bipolaren Störungen beweist, in einem gewissen Rahmen systemisch toleriert zu werden. Im Mausexperiment erweist sich die Hemmung von GSK3 jedoch als embryotoxisch. Dadurch ergeben sich für nicht-selektive Inhibitoren Einschränkungen für Kinder und Schwangere (Oduor et al., 2011). Siehe dazu auch Kontraindikationen von Lithium und Valproat. Wäre Lithium eine geeignete Substanz, um Protozoeninfektionen zu bekämpfen? Wurden mit *Plasmodium berghei* infizierte Mäuse mit LiCl behandelt, kam es zu einer signifikanten Reduktion der Parasitämie (Nurul Aiezzah et al., 2010). Auch das Homolog von *P. falciparum* PfGSK3 $\beta$  konnte durch LiCl *in vitro* gehemmt werden (Droucheau et al., 2004). p85 $\alpha^{-/-}$ BALB/c-Mäuse sind normalerweise resistent gegenüber einer Infektion mit *L. major*. Wurde jedoch zwei Tage nach Infektion LiCl in den infizierten Fuß injiziert, waren die Tiere nicht mehr in der Lage die Infektion zu kontrollieren und der Fuß zeigte eine Dickenzunahme (Ohtani et al., 2008). Ohtani et al. (2008) gehen davon aus, dass es durch Hemmung der humanen GSK3 in den Dendritischen Zellen zu einer nicht ausreichenden Verstärkung der TH1-Antwort kam, weshalb die Leishmanien nicht von Immunzellen abgetötet wurden. Ein ähnlicher Effekt auf das Immunsystem, wäre bei dem Versuch Leishmaniose mit Lithium zu behandeln nicht auszuschließen. Die Bemühungen gehen in die Richtung, einen spezifischen Inhibitor der parasitären GSK3 $\beta$  zu entwickeln. TbGSK3short und LmxGSK3 $\beta$  besitzen beide an der Position des „Gatekeeper“-Rests der ATP-Bindetasche Methionin



(M101 bzw. M100), die humane GSK3 $\beta$  hingegen Leucin (L132). Der „Gatekeeper“-Rest scheint in GSK3 $\beta$  für die Spezifität von Inhibitoren eine maßgebliche Rolle zu spielen (Oduor et al, 2011). Verschiedene Substanzen befinden sich bereits in der Erprobung. Beispielsweise läuft an der Universität von Dundee unter der Leitung von Prof. Paul Wyatt ein Programm zur Erprobung und Entwicklung neuer selektiver Inhibitoren von TbGSK3short. Ein potentes Aminopyrazol-derivat wurde 2014 vorgestellt (Ulrich et al.). Der Tyrosinkinase-Inhibitor Lapatinib, der u. a. bei der Therapie von Brustkrebs zum Einsatz kommt, tötete *in vitro* die Blutbahn-Form von *T. brucei* effektiv ab. Lapatinib hemmt Rezeptortyrosinkinasen wie den humanen EGFR / VEGFR. Diese kommen in Trypanosomen jedoch nicht vor. In *T. brucei* scheint Lapatinib eine Reihe von Kinasen zu binden, darunter interessanterweise auch die dualspezifische Kinase TbGSK3short (Katiyar et al., 2013). Von einem Medikament, das spezifisch gegen parasitäre Strukturen gerichtet ist, wird eine geringere Nebenwirkungsrate erwartet. Millionen von Menschen mit Leishmaniose warten darauf, dass die Entwicklung eines solchen Medikaments von Erfolg gekrönt ist.

## 5. Zusammenfassung

Als potentielle Zielstruktur für die Entwicklung von Antiinfektiva gelten Proteine, deren Aktivität für den Parasiten lebensnotwendig ist. Alle Versuche, das MAPK-Homolog LmxMPK7 in *Leishmania mexicana* zu deletieren, blieben erfolglos. Dies war ein erster Hinweis, dass es sich um ein essentielles Protein handeln könnte. Als zweiter Kandidat wurde die Glykogensynthase-Kinase GSK3 auf Essentialität in Leishmanien untersucht.

Das rekombinante Protein von LmxMPK7 zeigte keine Phosphorylierungsaktivität. Weder die Entfernung der zusätzlichen Insertion in der Aktivierungsrippe noch die Inkubation der MAPK zusammen mit potentiell übergeordneten MAPKKs von *L. mexicana* konnte LmxMPK7 in den aktiven Zustand überführen. Die endogene Kinase scheint in beiden Lebensstadien in geringer Menge hergestellt zu werden. LmxMPK7 konnte in Promastigoten genomisch deletiert werden. Hierzu wurde die Kinase ersatzweise von einem Plasmid, welches das Gen ohne die stromab-Region trägt, exprimiert. Interessanterweise verloren Amastigoten der Mutante  $\Delta LmxMPK7(-/-)$  + pX6LmxMPK7TYC-ds in der Maus und Promastigoten nach Wegfall des Selektionsdruck das Plasmid und es entstand die Nullmutante  $\Delta LmxMPK7$ . Für den Parasiten scheint es wichtig zu sein, dass LmxMPK7 während des Lebenszyklus in korrekter Menge produziert wird. Episomale Überexpressoren zeigten im Kulturverlauf bei hoher Zelldichte und stationärem Wachstum eine Abnahme der Proteinmenge von LmxMPK7-TY. Liegt die Kinase nicht in physiologischer Menge vor, zeigt sich die Virulenz des Parasiten bei Infektion von BALB/c-Mäusen deutlich beeinträchtigt. Dies war sowohl für die Überexpressionsmutante als auch die Nullmutante von LmxMPK7 der Fall. Ein großer Teil der Mäuse entwickelte keine Leishmanienläsion, der andere Teil bildete verglichen zum Wildtyp heterogen mit einer Latenz von 8 - 60 Wochen eine Läsion aus. Leishmanien von  $\Delta LmxMPK7$  aus diesen verzögert entstandenen Läsionen führten bei Reinfektion von BALB/c-Mäusen ohne Verzögerung zur Ausbildung von Läsionen. Die Reinfektion macht es wahrscheinlich, dass es Zellen der Nullmutante gelungen war, die fehlende MPK7-Funktion zu kompensieren und den bestehenden Virulenzdefekt in der Maus zu überwinden. Im Gegensatz zur gestörten Virulenz *in vivo* waren Promastigoten von  $\Delta LmxMPK7$  in der Lage Peritonealmakrophagen *ex vivo* zu infizieren und sich als Amastigoten intrazellulär zu vermehren. Die Diskrepanz im Infektionsverhalten könnte ein Anhaltspunkt dafür sein, dass LmxMPK7 für Anpassungsprozesse im Säugetierwirt oder die initiale Immunevasion von Bedeutung ist.  $\Delta LmxMPK7$  Leishmanien differenzierten *in vitro* normal und waren morphologisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Interessanterweise zeigten Promastigoten als auch Amastigoten der Nullmutante eine beschleunigte Zellteilung. Gleichermäßen ging die Abnahme der Menge an episomal hergestellter LmxMPK7-TY in der Überexpressionsmutante mit einer Proliferationsbeschleunigung in beiden Lebensstadien einher. Im Lebenszyklus des Parasiten gibt es

Übergänge, an denen Umwandlungsprozesse gegenüber Wachstum Vorrang haben, auch wechseln sich proliferative und nicht-proliferative Formen ab. LmxMPK7 könnte für die negative Wachstumsregulation an einem dieser Übergänge oder in einer nicht-proliferativen Form verantwortlich sein. Allerdings blieb nach Komplementation von  $\Delta LmxMPK7$ , durch Einbringung von *LmxMPK7* auf einem Allel, die Wachstumsbeschleunigung erhalten. Womöglich bleiben Mechanismen, welche zur Kompensation der fehlenden LmxMPK7-Funktion in  $\Delta LmxMPK7$  beitragen, bestehen und machen die „add-back“-Mutante unabhängig von LmxMPK7.

Die lange LmxGSK3 $\alpha$  unterscheidet sich im Homologievergleich deutlich von der kurzen LmxGSK3 $\beta$ . Am N-Terminus von LmxGSK3 $\alpha$  wurde ein Signalpeptid des sekretorischen Weges identifiziert. Das rekombinante Protein von LmxGSK3 $\alpha$  besitzt Kinase-Aktivität und wird von LmxGSK3 $\beta$  phosphoryliert. Beide GSK3-Homologe zeigen im Kinase-Aktivitätstest Autophosphorylierungsaktivität. Durch Herstellung einer YF-Mutante konnte bewiesen werden, dass Phosphotyrosin-186 in der Aktivierungsschleife von LmxGSK3 $\beta$  für die Kinase-Aktivität notwendig ist. LmxGSK3 $\beta$  ist in beiden Lebensstadien vorhanden. Rekombinante LmxGSK3 $\beta$  phosphorylierte mehrere Proteine in Leishmanienlysaten. Dies könnte bedeuten, dass LmxGSK3 $\beta$  im Parasiten mehrere Substrate und Aufgaben besitzt. Lithiumchlorid hemmte die Kinase-Aktivität von rekombinanter LmxGSK3 $\beta$  und nach Zugabe zu einer Leishmanienkultur das Wachstum von Promastigoten und Amastigoten. Zu den Lithium-induzierten Effekten in Promastigoten gehörte eine signifikante Verlängerung des Flagellums. Außerdem wurde ein Defekt der Cytokineseinitiation festgestellt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die beobachteten Effekte von Lithium abschließend einer GSK3-Inhibition zuzuordnen. Die Testung zusammen mit anderen Kinasen von *L. mexicana*, welche an der Flagellenregulation beteiligt sind zeigte, dass LmxMKK und LmxMKK4 zwar das rekombinante Protein von LmxGSK3 $\beta$  phosphorylieren, dadurch aber nicht aktivieren. Es ist nicht möglich eine Nullmutante von LmxGSK3 $\beta$  herzustellen. Die Kinase konnte erst nach Expression vom Plasmid genomisch deletiert werden. Die Mutante  $\Delta LmxGSK3\beta(-/-)$  + pXPACLmxGSK3 $\beta$ PTPNterm Klon H4PPAC zeigte sich in der Maus infektiös. Läsions-amastigoten von H4PPAC verlieren die episomale Kopie von LmxGSK3 $\beta$  nicht (Munro, Dissertation 2013).

Fazit: Leishmanien besitzen die Möglichkeit die MPK7-Funktion zu umgehen, dies macht LmxMPK7 zu keinem idealen „Drug-Target“. LmxGSK3 $\beta$  ist für Leishmanien essentiell und eine hervorragende Zielstruktur für die Entwicklung von neuen Medikamenten zur Bekämpfung der Leishmaniose.

## 6. Summary

Proteins that are essential for the survival of a parasite could be potential targets for the development of anti-infectives. This thesis is concerned with the analysis of two glycogen synthase kinase homologues, LmxGSK3 $\alpha$  and LmxGSK3 $\beta$ , and the mitogen-activated protein kinase homologue LmxMPK7 to functionally characterise these proteins and to establish whether any of them is an essential protein for *Leishmania*.

The recombinantly expressed protein of LmxMPK7 did not exhibit kinase activity. Neither structural modification through removal of the additional insertion in the activation loop nor incubation of the MAPK together with potential MAP kinase kinases from *L. mexicana* converted LmxMPK7 into an active kinase. LmxMPK7 is present in both life stages but its expression appears to be weak. A plasmid carrying the gene of LmxMPK7 without its downstream region was introduced into the parasite. In the presence of this extra-chromosomal copy of LmxMPK7 the replacement of the genomic copies was successful. Interestingly, the resulting mutant lost the extrachromosomal copy of LmxMPK7, both in amastigotes in mice and in promastigotes cultivated without selection pressure. Hence, this led to the generation of the null mutant  $\Delta$ LmxMPK7. The protein level of LmxMPK7 appears to be important for the parasite and might be tightly regulated during its life cycle. The amount of TY-tagged LmxMPK7-TY was strongly reduced during cultivation at high cell densities and during stationary growth phase in mutants over-expressing this protein. *In vivo* investigations revealed that non-physiological amounts of LmxMPK7 entailed a significant impairment of virulence in BALB/c-mice for both the over-expressing mutant and the null mutant. Mutants caused delayed lesion development in mice 8 to 60 weeks post infection and, after more than one year, many mice did not show a *Leishmania* lesion at all. *Leishmania* of  $\Delta$ LmxMPK7 derived from delayed lesions caused normal lesion development when used for re-infection of BALB/c-mice. Thus the re-infection studies demonstrated that amastigotes of  $\Delta$ LmxMPK7 had compensated for the lack of LmxMPK7 and overcome the virulence defect in mice. Contrary to the virulence defect *in vivo*, promastigotes of  $\Delta$ LmxMPK7 infected isolated peritoneal macrophages and amastigotes proliferated successfully within the parasitophorous vacuole of the host cell. This discrepancy in infection behaviour could be a hint that LmxMPK7 might be involved in the adaptation of the parasite to the host environment in mammals or in processes of initial immune evasion.  $\Delta$ LmxMPK7 *Leishmania* differentiated normally *in vitro* and cells displayed a normal morphology. Promastigotes and amastigotes of  $\Delta$ LmxMPK7, however, presented an accelerated proliferation. Similarly the decrease in LmxMPK7-TY expressed from a plasmid was accompanied by an increased proliferation in both life stages. This indicates that the *in vivo* role of LmxMPK7 could be involved in the negative regulation of growth. In the life cycle of

the parasite dividing forms alternate with non-dividing forms and there are transitions where transformation processes precede cell growth. It is hypothesised that the potential arrest in growth caused by LmxMPK7 implicates one of those transitions or plays an important role in a non-proliferative stage of the parasite. An add-back mutant was generated by reintroducing a wild type copy of *LmxMPK7* back into one allele of the null mutant. However, the add-back mutant retained faster growth which may be because of to maintained compensation mechanisms that  $\Delta LmxMPK7$  had developed keeping the add-back mutant in a LmxMPK7-unresponsive mode.

Sequence homology analysis revealed that the long LmxGSK3 $\alpha$  is markedly different from the short LmxGSK3 $\beta$ . Interestingly, LmxGSK3 $\alpha$  presents with a N-terminal signal peptide for import into the ER. The recombinant protein of LmxGSK3 $\alpha$  showed kinase activity and was phosphorylated by LmxGSK3 $\beta$  in the *in vitro* kinase assay. Both GSK3 homologues displayed *in vitro* autophosphorylation. Furthermore, phosphorylation on tyrosine 186 in the activation loop of LmxGSK3 $\beta$  was proved to be essential for kinase activity by generation of a YF-mutant. LmxGSK3 $\beta$  is present in both life stages of the parasite. Kinase assays using recombinant LmxGSK3 $\beta$  and *L. mexicana* cell lysates implied the existence of several potential substrates in the parasite. Lithium chloride could be identified as a potential inhibitor of recombinant LmxGSK3 $\beta$  activity *in vitro*. Treatment of *Leishmania* cultures with LiCl resulted in a reduction of cell growth in promastigotes and amastigotes. In promastigotes an elongation of flagella and a defect in initiation of cytokinesis could be observed in the presence of lithium. Further investigations are required to conclusively link the effects of lithium treatment to GSK3 inhibition. The results of the lithium experiments sparked the interest in LmxGSK3 $\beta$  as a potential interaction partner of other kinases from *L. mexicana* with a proven role in flagellar length control. Using recombinant proteins it could be demonstrated that LmxMKK and LmxMKK4 are phosphorylating LmxGSK3 $\beta$  *in vitro* but do not cause a change in activity. LmxGSK3 $\beta$  could not be deleted from the *L. mexicana* genome. To overcome this problem a plasmid carrying the LmxGSK3 $\beta$  gene was introduced into the parasite. In the presence of the additional extrachromosomal copy the replacement of the genomic copies of LmxGSK3 $\beta$  was successful. The resulting mutant was named H4PPAC and was infective in mice. It was demonstrated that lesion-derived amastigotes from H4PPAC had not lost the episomal copy of LmxGSK3 $\beta$  in mice (Munro, dissertation 2013).

In conclusion, *Leishmania* can overcome a lack of LmxMPK7, which makes LmxMPK7 a flawed target for drug development. LmxGSK3 $\beta$  is essential for *Leishmania* and therefore represents a potential target for a drug which could combat *Leishmaniasis*.

## 7. Anhang

### 7.1 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

#### 7.1.1 LmxMPK7 mit flankierenden Regionen

Die Sequenz von LmxMPK7-liploop entspricht der Aminosäuresequenz von LmxMPK7 ohne den gelb unterlegten Bereich. Türkis unterlegt: Für den Phosphatgruppentransfer essentieller Lysin-Rest K151, mutiert zu Methionin in der KM-Mutante. Grün unterlegt: „gatekeeper“-Rest T210; grau unterlegt: Gen-Sonde und ds-Sonde.

```

-1586                                TTTTTTTTTCTGACGCAGAACTCAGCA -1561
-1560 GATGCGGGCACCTCTCACTGACAGTATGGAGGGAGGTGGTTCGATGGACGCCCGGCGTTTG -1501
-1500 TGGATGTATCGAGACTATCCATGTTTAGTAGTGTCTTTTTTTTCGGGGCGTGTGTGTATA -1441
-1440 TTTTCTCTCCTCCCGTACGAGTGTGCTTCTGGGTGTGTCTGCCTCTGTTCGCATTCCCCT -1381
-1380 TTTTAGTTTGTGGCCCGTGGTGAAGCTGTGCAACACTCGACACACAATCACACGCACT -1321
-1320 ACGCAGTATGCATGTCCATTCTTCTTGATCCCTGTGCATCTCGCAACACCAAAAAACACTA -1261
-1260 CCTCCACAAGAAGCACCGTGCTGATCAGCCGAAGTCCCATGAGCCCGTATCGGCTCGGTG -1201
-1200 ATTTTACGGTTGCGTTACAGGTATTGCATTCTCTCCTCTCTCCTCTTGCGCTCTCGACGT -1141
-1140 GGCGCACAGGAAGCATTTTGGGAGGGGGGCAGTTTACCTGACGACGTATAATGCGGGG -1081
-1080 AGTCGCGAAGTTGAGGGCAATGGGGGGCATTTCGAGGGTACAGCATCACATGACTCCTGTT -1021
-1020 TCTTCTGCCACTCAGTGGAAACAACAGCGTCTTTTACTCCCTTTTCTGGCACTGCCCCATC -961
-960 CATCACCGCCACCGATTCTGTCCCTCTCTTCTCCTTTCCCCACAGCGCTCAGTGAGCGTC -901
-900 GACGAGAGACAAACGAAAATAAAGGCAGACGTGAACATTTGCGTGACACATCGTCACGTTT -841
-840 GGGCATCGCAGCTGTGCTCACGAAGACCGGGTGCAGCTCAAACAGCTTCTCCCTGTCAT -781
-780 CCTCTGCGGCTGCTGCTGCGGCTGCTGACGGTCAAGTGTAGTGGTTTTGCTGGTGTGAGTG -721
-720 CATGGGAGAGAGAGGGCTAGGCCTTTGTGTGCCCTTGTAGCCTTTTCTTCAGCTTCATCGG -661
-660 CTCCGTGATGATATCGACCACCTCAGTGTGGTATCCGGGTTCGAGCAACGAACCTGGGTGG -601
-600 GGAAGTCAGAGCGGTTTGTGCGTGTGATGCCGGCGGTTTCAGGTTCTGGATGGGGTTGTG -541
-540 TCGAAACGACCTGCGACAGGGTACACGATTGTGCCATCTGTATGATGGGCCACTTGTGAG -481
-480 AGTGACTCGAACGTATCTCTACCCAGTCTTCACTACCCACATTAGTGTGGGAAACCTGA -421
-420 GTGTCACCTGTGAGGGGTGGGCCACATGGCGACCGGCGAAATGGAAGCTGCTGTATGGC -361
-360 GACCTGCTCAGCGGGCTGATGGTGGGTAGGGTTTGGAGCCAAATCCGTGCTCAGATGACT -301
-300 GAGTCGGCGCACTGCTGTACCGGCATGTCAACGACTGACTCGCGCGTTCGCGATGAGGCAT -241
-240 GTGACGGCCTGCGGGTGGGAGGCAGAGTGGCACTTGAATCATGGTTTATGGCAGAGAATG -181
-180 GACACGCCTTGCAACGGAAGAAGACATCTTATCGACTCCATTGCTCTGCGGGTGCAGCGGC -121
-120 GCCATCTCCTCTTCTCCTTTTCCCTCCTCTGTTGTTCCTTCCGCTTACGAAAAAAA -61
-60 AAGGAAAATAAACAGGCAGCACAAAGGGAGGAGAGCGCCGATCCTTCAAGCTCAAGC 0
1 ATGGCGGTCAACGAAGCAGCGGTCCCCTTTCATTTCATGCGGCGCGGACAACGGGCTGTTG 60
  M A V N E A A V P F I H A A R D N G L L
61 CTCGGTGGCAGAGAGTTGCCAGCGATGATCGATCACACCAGTGAGCACAGCAAGACTTAT 120
  L G G R E L P A M I D H T S E H S K T Y
121 CATGTGCACGGCTCCACCTTTGAGGTGGCACCTCACTTTGAGGTGCTGAACGGGATCGGA 180
  H V H G S T F E V A P H F E V L N G I G
181 TATGGCGCGTACGGCGTAGTGTGTGCTGCAGTGGACCTGCGCCTCGTCCCATCCAGTGTG 240
  Y G A Y G V V C A A V D L R L V P S S V
241 TACTACAACGAGGCGATGCGCACCATCGAGGAAGAAGGTTCGCATAGTCACGCGGCGAAGT 300
  Y Y N E A M R T I E E E G R I V T R R S
301 CGCGGCCACGACGCGCCTGTGTACTTCCGACGCGTGTGTGCTGGACGAAGCCGGGCGA 360
  R G H D A P V Y F R T R A V L D E A G R
361 GGTGGACCAGTGCAGATTCCGCACTTGTACTCGGAGCCGTTCAAGCGCGTACGCTGGCG 420
  G G P V R V P H L Y S E P F K R R T L A
421 CGTGGGGAGGTGTTCCCGTTCGTCGCAATCAAGAAGATGACGAAGGTGTTTCGATGATCTC 480
  R G E V S P F V A I K K M T K V F D D L
481 GTGGATGGGCGCCGCATCTTGAGAGAGATCAAGTTGCTGAGGTACCTGCAAGGGCATCCG 540
  V D G R R I L R E I K L L R Y L Q G H P
541 AACATTGTGCGGTTGATGGAGGTTGGACGTCCCCACGTCTCCACCGGTGCCTTGTGCTCC 600
  N I V R L M E V G R P H V S T G A L S S
601 GCCGCATTCGATGATATCTATATAGTGACCGACCTCATGGACACAGACCTAGCGGCTCTG 660
  A A F D D I Y I V D D L M D T D L A A L
661 CTGAAGTCCTCGCAGGAGATCCAGATGGACCAGTTCCGCTTTATCGCCTATCAGCTTATC 720
  L K S S Q E I Q M D Q F R F I A Y Q L I

```

721 AAGGTGCTGGTGTACCTGCACAGCAGCGGGCGTCCACCGTGACCTGAAGCCGGGTAAC 780  
K V L V Y L H S S G V V H R D L K P G N  
781 ATCCTTCTTAACGGCAACTGCGACATGAAACTCTGCGACTTTGGCCTCTCCCAGCGGGC 840  
I L L N G N C D M K L C D F G L S R G G  
841 GTTCCTGCTTGGCCGCATGAGAACTCTCACGGCAGTTCGCGACCGCAGCCAAGTCGAAC 900  
V P A W P H E N T L T A V A T A A K S N  
901 GCCAACGAACTTGAGGATTGGGGTCTATTCTGCTGGTCATCTTCCGAGTCCGTGGGGCA 960  
A N E L E D W G L F C W S S S A V R G A  
961 TCATCCTCCCCTCACGCCAGCCAACCCCGCTCTACAGCCTCACCGACTACGTTGTC 1020  
S S S P H A A S Q P P L Y S L T D Y V V  
1021 ACGCGCTACTACCGAGCACCCGAGCTGCTCATCATGGGCCGCTACAACCACGCAATCGAC 1080  
T R Y Y R A P E L L I M G R Y N H A I D  
1081 ATGTGGTCTGCCGGCTGCATCCTGGCCGAGATGGTGCTGCGCCGCCATTGTTGCCGGT 1140  
M W S A G C I L A E M V L R R P L F A G  
1141 GCCAACTACCTCTCCCAGCTGGCGTTGATTCTAGAGACGCCGGGGTTGCGTGGCGTCCC 1200  
A N Y L S Q L A L I L E T P G L R G V P  
1201 CAGACGCCGGAGCAAGTTGCCGCGCTCTTCGAGGGTGGCGAAGAAGCAAGCACTTTATC 1260  
Q T P E Q V A A L F E G G E E G K H F I  
1261 AATGACATCCTTTTTACAAAACCTGCACGAGGGCGGGAGTCGCTAATGCTGACCAACCAG 1320  
N D I L F H K T A R G R E S L M L T N Q  
1321 GTCCACTCCCAGGCCCTCTTCCACAGTACCCTCTTCGCCTTCAATGTTGACATTCTATG 1380  
V H S Q A L F H S T L F A F N V D I P M  
1381 AGTCTCGGCATATTGATTGCCAAGCTGCTCTCCTTCGATCCCCGCAAGCGACCCACCGCC 1440  
S L G I L I A K L L S F D P R K R P T A  
1441 GTGGAGGCGTGCAGGATCCGTTTTTCCGGCCGCTGTATGACAACAGAGATGAAATTTCT 1500  
V E A L R D P F F R P L Y D N R D E I L  
1501 CGTGCCCTGCATCCGACCCAAGCGTTCACGACGAGGAAATCGATGACATCGCCGCTAC 1560  
R C P A S D P S V A R E E I D D I A A Y  
1561 CAGAAGGCACACCCGTGTGTCGTGGTGGATGAGAGCCCTGTGTTACGTTGGGAGTTCGAC 1620  
Q K A H P C V V V D E S P V F T W E F D  
1621 CACCGCATCACGAGTGCAGGCGTTGCGCAGCCTCTTCGAGGAGGAGTGCCAGATCTCG 1680  
H R I T S A Q A L R S L F E E E C Q I S  
1681 CGCGATGTGCAGCAGCAGATCGAAAAACAGAAGCGTCCGCGTCTTCTACTGTAGTGTAG 1740  
R D V Q Q Q I E K Q K R P R A S T V V \*  
0 CTTTTTTCGGTGCCTCAAACGGCGGCAGGGGTGGTGATAGTGTTCATTGAATTATGGAGG +60  
+61 TGCACGCAAGCTCCCCCTCATATACCCACCTCCGCACACCTGCGCCTACCTAGCCGCTC +120  
+121 GCCACCGCTGCGGTGTGCGTGTGTAACCCGTTTCTTGCATATATTTTTGCGAGCTGAT +180  
+181 CTTGCTTGCCACTCTGCAGTACACTGGCTCCTTTACCACACACAAAACACACAGGCATCT +240  
+241 TCAAACAGACCATATGGCAGCGATAACGCGGTGCGTTCTTTTTCTCTCCCCTCGGACGAA +300  
+301 CTCGTGGTTTTAGCGTGCAGGCCGGGCTGCCGTAGACGCCCTTCCGTGTCTCCTCTTCAT +360  
+361 CGTACAGCCACCGGCTCTGAGAAGAAGATCGGGGACTATGAAGGGGGAGTTGCGAGCTTG +420  
+421 TGACAATGTGCGGTGTGCGGTAAAACCTTTGAACAGTGCATATCATAGCGCCGTACGAA +480  
+481 GCGCTGCTAATCCCCATGATATTTCGTGGCAGCGCATCTCTTAGCGCCTTCTCTCTCCGT +540  
+541 TCATGCGCCTTTTCATCGAATTTGCTCTTCGGCGTCTCATCTCTCTTTGGCACGCTCCTC +600  
+601 GCCCGCGTGCAGGACGTTCTCTCACCACCGCTTTACGCTCCCTGGCCCTTGTGCGCAGCCG +660  
+661 CACAACAGGAAAAGAAAGCACCCGAAGTTCGTGTGGGGGACGCATGTGCACACTGTGGA +720  
+721 GGCAGCGGATCGAAGTCCTTTTCCCCTTCTCACCCCTTGCTGCGCATCCCCGCGTTTGTGC +780  
+781 CAGCGGGAGTGACGCAGCCGAAACAGCCCGGTTTGAATGTGTGTGTGCTTTTCTTTTCG +840  
+841 CGTATAGGGGAAACACGGTGTGAGGCCCGGCAGCACGACCGAGGCGCCGTTTTCAGCT +900  
+901 ACATCTGCTCCCTCGCTCTTCTGTGCTTTCGTTTCTCCACACGTATTTCGCACACACTC +960  
+961 ACACACACATACGTACAGGTGCACACACATTAGAGACAGCGAGACGGAGAGACCGGTT +1020  
+1021 GTCACGGCACTTGGCGTGGTTCAGAGTCTTTCGAATTGAGGAGAAAAACACCCTCATAAAAG +1080  
+1081 GAGAACGCAAAGTGAGGGCACTCTCTCATTATCTGTGCAGTCGTCCCACCAGAAACGAGC +1140  
+1141 AGTGTAATCTTTCTTCTCTGCAATTTTCAGACACAGCGCAATGTTGCGCCGAAACGCCAG +1200  
+1201 TCTAGTTGGCAGCCGCCGAAGCTAGTCACGACGGTACTCAGCTGTGTGCGCTCGTCCGC +1260  
+1261 CTGGCGTGCTACAATGCCACCTCCTCAGTGCCTCCAAGGTACGCGACTGCTGTGCGGTGCA +1320  
+1321 GCGGTGCTGCACCCGCGCAGTCGGCGAGTGGCTCGCCTGCCGTGTGCGGCCCGCAGCCG +1380  
+1381 CTGGCGATGAGGTGCTTCCCAGCGCGCAGAACCATTTCGCGGCCACCCTGGTGGCAGAT +1440  
+1441 GACCCAAAGATGCTGCTGGCCAAGGCGCAGTACTGCATCTTACCCTCGCCTACGACCCC +1500

```

+1501 GCGCAGAAGCTTTATGCTGTGTACTCCGCCACGACGAACGAGGTGGTTCATGCAGGAG +1560
+1561 GAACTCATATGGAAGGCCCAATGTGGGTGCGACGAGCGCATTGGTGACGACTACATTGCT +1620
+1621 GGGCTCTTATTTGGCAACGACGCCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAATTGCCCTATAGT +1680
+1681 GAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTG +1740
+1741 GCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCG +1800
+1801 AAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTT +1824

```

### 7.1.2 Vergleich der Aminosäuresequenz von LmxMPK7 und Homologen

CLUSTAL2.1 multiple sequence alignment (Larkin et al., 2007). Lmx: *L. mexicana*, Lmj: *L. major*, Lin: *L. infantum*, Lbr: *L. braziliensis*. Die Sequenz von *L. infantum* entspricht der von *L. donovani*. Die Zugangsnummer der jeweiligen Aminosäuresequenz findet sich unter 2.2.12.1. Der weiße Stern kennzeichnet Beginn und Ende der katalytischen Domäne. Gelb unterlegt sind die zusätzlichen Schleifen in der Kinase-Domäne; rot unterlegt das Peptid, welches dem anti-LmxMPK7-Peptid-Antikörper zugrunde liegt. Sekundärstrukturelemente von LmxMPK7 vorhergesagt mit dem PSIPRED: Rot:  $\alpha$ -Helix; blau:  $\beta$ -Faltblatt. Unterstrichen: intrinsische Proteinbereiche, welche mit DISOPRED3 als „disordered“ vorhergesagt werden.

```

LmxMPK7 -----MAVNEAAVPFIHAARDNGLLLGGRELPAMIDHTSEHSKTYHVHGSTFEVAP 51
Lmj -----MFNEAAVPFIQTARDNGLLFGGSDAPAMIDYTSEHGKSYHVRGSIFEVAP 50
Lin -----MMFNEAAVPFIQTARDNGLLFGGSNPAMIDYTSEHRKSYHVRGSVFEVAP 51
Lbr MDGILSGLNITCNEAALSLIEMARSNGLLFSSDLPATSDHTTEHSHHYHVCGSSFDVAP 60
          ****:..*: **.****:.. : ** *:*:** : ** * * :***
          ☆      I
LmxMPK7 HFEVLNGIGYGAYGVVCAAVDLRLVPSSVYNEAMRTIEEEGRIVTRRSRGHDAPVYFRT 111
Lmj HFEVLNGIGYGAYGVVCAAVDLRLVASSVYNEAMRTIEEEGRIVTRQRRGHDAPVYFRT 110
Lin HFEVLNGIGYGAYGVVCAAVDLRLVASSVYNEAMRTIEEEGRIVTRQRRGHDAPVYFRT 111
Lbr HFEVLSAIGHGTYGLVCAAVDLRLVPSSVYNEAMRTIEEEGRIVTRRRRRGHDAPIYFRT 120
          *****:..*: ** *:*:** : ** * * :***
          II III
LmxMPK7 RAVLDEAGRGGPVRVPHLYSEPFKRRTLARGEVSPFVAIKKMTKVFDDLVDGRRILREIK 171
Lmj RAVLDEAGRGGPVRVPHLYSEPFKRRTLARGEVSPFVAIKKVTKVFDDLVDGRRILREIK 170
Lin RAVLDEAGRGGPVRVPHLYSEPFKRRVLACGVSPFVAIKKVTKVFDDLVDGRRILREIK 171
Lbr RVVLGETPSGSPVRVPHLYSEPFKRRVLAHEVSPFVAIKKVAKVFDDLVDGRRILREVK 180
          *..*:*: * ..*****:..* * ..*****:..* ..*****:..*
          IV V
LmxMPK7 LLRYLQGHPNIVRLMEVGRPHVSTGALSSAFDDIYIVTDLMDTDLAALLKSSQEIQMDQ 231
Lmj LLRYLQGHPNIVRLMEVGRPAPTGASSAFDDIYLVTDLMDTDLGALLRSSQEIAMDQ 230
Lin LLRYLQGHPNIVRLMEVGRPHVPTGASSSAFDDIYLVTDLMDTDLAALLKSSQEIEMDQ 231
Lbr LLKYLQGHPNILRLMEVGRPVSTGAPSSAFDDIYIVTDLMDTDLAALLKSSQEIQMNQ 240
          ** ..*****:..* ..*****:..* ..*****:..* ..*****:..*
          VIa VIb VII
LmxMPK7 FRFIAYQLIKVLVYLHSSGVVHRDLKPGNILLNGNCDMKLCDFGLSRGGVPAWPHENTLTI 291
Lmj LRFIAYQLMKVLVYVHSSGVIHRDLKPGNILLNGNCDMKLCDFGLSRGGVPAWPHERTLTI 290
Lin FRFIAYQLMKVLVYVHSSGVIHRDLKPGNILLNGNCDMKLCDFGLSRGGVPAWPHESTLTI 291
Lbr LRFIAYQLFKALVYVHSSGVIHRDLKPCNILLNGNCDMKLCDFGLSRGGVPAWLHESTLK 300
          :*****:*.**:*:**:***** ***** *****:..*..*..*****:..*
          VIII
LmxMPK7 AVATAAKSNANELEDWGLFCWSSSAVRGASSSPHAASQPPLYSLTDYVVTRYRAPELLI 351
Lmj AVATAAESSAKELEDWGLFCWSSSAARGASSAPHAAKQPPLYSLTDYVVTRYRAPELLI 350
Lin AVATAAESSAKELEDWGLFCWSSSAVRGASSAPHAAKQPPLYSLTDYVVTRYRAPELLI 351
Lbr AVADAESSIEELEDWGRFCWSSSAARSTSCASHVAKQPPLYSLTDYVVTRYRAPELLV 360
          ***: *:*: ..***** *****:..*..*..*****:..*
          IX X
LmxMPK7 MGRYNHAIDMWSAGCILAEMVLRRPLFAGANYLSQLALILETPGLRGVPQTPEQVAALFE 411
Lmj MGRYNHAIDMWSAGCILAEMVLRRPLFTGANYLSQLALILETPGLRGVPQTPEEAAALFE 410
Lin MGRYNHAIDMWSAGCILAEMLRRPLFTGANYLSQLALILETPGLRGVPQTPEQVAALFE 411
Lbr MGRYNHAIDMWSAGCILAEMLRRPLFAGANYLSQLTLILETPGLRDVPQTPEQVATLFE 420
          *****:..* ..*****:..* ..*****:..* ..*****:..*
          GEEGKHFINDILFHKTARGRESLMLTNQVHSQALFHSTLFAFNVDIPSLGILIAKLLS 471
Lmj GEEGKHFINDILFHKTARRDPLTLSDQVHSQVLFHSTLFGFKVDVPISLGILIAKLLS 470
Lin GEEGKHFINDILFRKTARGRDSLTLSNQVHSQVLFHSTLFGFNVDIPISLGILIAKLLS 471
Lbr GEEGKHFICDILFHNTAGRWEPRTLRNQVQSQAMFHTTLFGSSADIPVSLGILIAKLLS 480
          ***** *****:..* ..* *:*:**:..* ..* ..*****:..*

```



	XI	★	
LmxMPK7	FDPRKRPTAVEALRDPFFRPLYDNRDEILRCPASDPSVAREEIDDDIAAYQKAHPCVVVDE		531
Lmj	FDPRKRPTALEALRDPFFWPLYDSRDEILRCPASDPSVAREQIDDDIAAYQKAHPCVVVDE		530
Lin	FDPRKRPTAVEALRDPFFRPLYDSRDEILRCPASDPSVEREEIDDDIAAYQKAHPCVVVDE		531
Lbr	FDPRKRPTAVEALRDPFFSPLYDARDEIVRCTASDSGFAREEIDDDIAAYKKTHTPCVVVDE		540
	*****:***** **** *:*.***... **:*****:*:*****		
LmxMPK7	SPVFTWEFDHRITSAQALRSLFEEECQISRVDVQQQIEKQKRPRASTVV-----		579
Lmj	SPVFTWEFDHRITSAQALRGLFEEECQISRVDVQQQLERQQLRSSPVVKCSEERRTLERSL		590
Lin	SPVFTWEFDHRITSAQALRSLFEEECQISRVDVQQQIERQQRPR-----		574
Lbr	NPVFPWEFDHRITNAQSLRSLFEEECQISRVDVQRQIERQQRPLSAPTACSLVP-----		593
	.***.*****.**:*.*****:***:***:*		
LmxMPK7	-----		
Lmj	FSGASDGSSGGDGAH 605		
Lin	-----		
Lbr	-----		

### 7.1.3 LmxGSK3α mit flankierenden Regionen

Gelb unterlegt: AG-Akzeptorsequenz („splice addition site“); grau unterlegt: Gen-Sonde; türkis unterlegt: potentielles Signalpeptid des sekretorischen Weges.

-313		CGTGTATCTTATC	-301
-300	CACAAAGTCGTTGGCGCCTGAAGCACCCTGCTCTGGCCGGCGTGCTGCGCGAACAGCGA		-241
-240	AGGAGCGTCGCTCTGTAAAGAAAAAAGGCGTGAGCACGGCAAAAAGAAAGCCCTGCAT		-181
-180	CTCCCTCCATCTCCCTTTTCTCGGCGCGGGCACACAACACGCTCATTATCCCGAACCTGT		-121
-120	GCATCATCACCGCTTTGACTTATTTCTGTGTGTGGTGTCTTCTCGTTTACTATTATTA		-61
-60	TCTTCTCTCTTCCCCCTCCTCCCTCCCACTCACCTCCCCACTTGCTGTGGTTCGTGC		0
1	ATGGGCGCGTGCGTGTGTGTGTGTGTCTTCCGCTTACTTCTCTGTTACAGCTTCTA		60
	M G A C V C V C V C L P L T S L F T L I		
61	TTTGCTGTCCCTCCTCCCCCGCCCGCTCTCTCCTCGCATTTGCCCTTCTCCTCCTCGT		120
	F A V P S S P A P L S P R I C P S P P R		
121	GTTTCTTGCCGTTTCATCCAGACGGCCTCCCTGCGCGTGTCGCGTGTGTGTGTGTGTGT		180
	V S C R S S Q T A S L R V C V C V C V C		
181	CTCGGCGAGCGTATCGGCGCGGAAGCGGGCCCGTGTGCTCGTATACACGCACGTGCACA		240
	L G E R I G A E A G P C S Y T R T C T		
241	CGAGTACTTACTTGCCAAAGGTGCTGTCCAAGTGTGCTCGTCCCGTCACCCCTCTCTATT		300
	R V S Y L P K V L S K C C P V T P L P I		
301	TCTCGCGTTTTGTATTCTTCCCTCCCCCTTCCCTCGCTTCAAGTGATGTCAGAGAAGTCC		360
	S R V L Y S S S P L P S L Q V M S E K S		
361	ATGCAGCCTCGACGGCCCTTGTCTCCTCTCGCGCTTCTGCGCGTGCGTCAGCCGCATCT		420
	M Q P R R P L S S S R A S A R A S A A S		
421	CGCCCGCAACCGCATAGGACCGTGAGCAGCAGCGGGCATCTCGGTGCGAGACAACGACC		480
	R P Q P H R T V S S D G A S R S Q T T T		
481	CCGATGTACAGGCCGCTGCGCTACGTGGGCCGTGGCAGCTTCGGTGTGTTCTTCTCGCC		540
	P M Y R P L R Y V G R G S F G V V L L A		
541	GAGGAGGTGCATACAGGTGACAAAGTTGCCATTAAGCGTGCCACTATGACGCCCGCCTT		600
	E E V H T G D K V A I K R V H Y D A R L		
601	CACAACCGGAGGTGGCGATCTTGAACCTCCGTTCTCGTCGACAACCCGCGGCACCAGCAG		660
	H N R E V A I L N S V L V D N P R H Q Q		
661	CCATCGAACACTGCTGTGACAGCAATGACACGTGCGGGCTCCCGATGGCGGACAAGG		720
	P S N T A V D S N D T S R L P D G G A T R		
721	ATCTCGTCTACCTCCTCTCCGTCGGCATTGCTGCTCCTCGCACACCGTGGAGACGTGCAC		780
	I S S T S S P S A L T S S S H T V E D V H		
781	CTGTGGCCTGGTACACACCATCCGAACATCGTGAACCTGCTCGACTTCTATGTGACCTAC		840
	L W P G T H H P N I V E L L D F Y V T Y		
841	GACACTGCCTCGTCAGAGCAAGTGCTGGGGCGGATATGGTGGCACCAGGGGGTGGCCGT		900
	D T A S S E Q V L G A D M V G T G G A G		
901	GCGGGTTTTGAGTTTCTGCCATCGCACACCCACAGCGCATCGGTACCCGTTGAGCGGT		960
	A G F E F L P S H H P T A H R Y P L S G		

961 GGCAGCGGTGCCGCCTCCGCGAGTGCCCCGCCCGCTTCGGCTCCCCTGGCGGCGTTTGCA 1020  
G S G A A S A S A P P A S A P L A A F A  
1021 TATCTCGAGATGGTGATGAGCTACTTACCGATGGACCTGTGCTATGTGAAGAAGTACTAT 1080  
Y L E M V M S Y L P M D L C Y V K K Y Y  
1081 TTTTGGCTTCCACGACATGCCACCATGGTGACATCCAGTTCGTTCATCTCCCCTCGCTTCG 1140  
F R F H D M P T M V T S S S S S P L A S  
1141 CCGGAGCAGGCACCGACAGATCTGTGCTCCGGCGAGCTGCCGGAAGGCACGGCAGACCCG 1200  
P E Q A P T D L S S G E L P E G T A D R  
1201 TCCCAGCGCTACCCAAGCAGCCGGGACCGGCTGCAACGGCAGCAACAGCAGCCGCCAC 1260  
S P A S P K H A G T G C N G S N S S R H  
1261 GGCAGCACCGGCAGCAGCGGTGCTGATGTTTGCAACCACCTTCCCCTGCGCTGGTGAAG 1320  
G S T G S S G A D V C N H L P L R W V K  
1321 GTGGTGCTGTTCCAGCTGGCCCCGGGCGCTGGCTTTCATGCATGTGCGTCATGTTGCCAC 1380  
V V L F Q L A R A L A F M H V R H V C H  
1381 CGTGATTTGAAGCCTGCCAACGTCCTTGTGACCCGGACACCGGCCGCGTGGCGCTCTGC 1440  
R D L K P A N V L V D P D T G R V R L C  
1441 GACTTTGGCAGCGCGAAGCTGATAGCGCGACCTGGAGAGGAGAAGAAGCTGTATATATT 1500  
D F G S A K L I A R P G E E K N V S Y I  
1501 TGCTCCCGCTACTACCGCGCCCCTGAGCTACTTTTCGGCGCACTGCACTACGGGTGCCCC 1560  
C S R Y Y R A P E L L F G A L H Y G C P  
1561 GTGGACATGTGGTTCGTTTGGCTGCATCGCCGCGGAGCTCTTTCGCGAGTTCGGGCAAGCCC 1620  
V D M W S F G C I A A E L L R E S G K P  
1621 CTCTTCCGGGGCTGCACCACGATTGATCAAATGGCGGAGCTGTTCAAGGTGCTGGGGGCG 1680  
L F R G C T T I D Q M A E L F K V L G A  
1681 CCGTCGAAACGGGAGATGTACGCCATGAACCCCAAGTGTGAGAGGCGCTGCTGCGCACC 1740  
P S K R E M Y A M N P Q C A E A L L R T  
1741 CGCGCCATGCACCGTCACCAGAGCCTGCACAAACGATCCTCATTCTGCGAGCCGCGCGGC 1800  
R A M H R H Q S L D N D P H S G S R G G  
1801 GTTCGGCAGGGCCGATCCTGCGGGCTGGAACCTCGAGGTGGACTACCAGGTGGAGGAGGAC 1860  
V R Q G R S C G L E L E V D Y Q V E E D  
1861 AACGACGTCGAGTTGCGTGGCAGCGCGCGGAGGGCGGATGACGTCGATAGTCATGGA 1920  
N D V E L R G S A R Q G G Y D V D S H G  
1921 GAATTTTTTGGCGACGCGCTAGACGATGGACTCTCGTCCCAGACTTCGGCATCGCCTGGA 1980  
E F L R D A L D D G L S S Q T S A S P G  
1981 ATGGCGACGGCATCGCCGCCCGCTCCTCCACAAAGACCCCTCGGGATTACAAGACGAGG 2040  
M A T A S P P P S S T K D P R D Y K T R  
2041 TTCTCTGCGTCACCGTCAACTGCAGCCACGGCGACGCTGGATGACGTGGCACCTACGCCG 2100  
F S A S P S T A A T A T L D D V A P T P  
2101 TTTGAGGAGTACTACGATGTGCTGAAGGTGCGCGGATACCGTGGCGAAGGCTCTTCCCC 2160  
F E E Y Y D V L K V R A I P W R R L F P  
2161 GCTGACACGCCTATGGAGGCGGTGACGCTTGTTCATCGTTGCTGTGCTACGCGCCTGAC 2220  
A D T P M E A V T L V A S L L C Y A P D  
2221 AAGCGCTCACTGCGGCGGAGCTGGTTGAACACCCCTTCTTTGACGACCTCTCAGCGCT 2280  
K R L T A A E L V E H P F F D D L F S A  
2281 GCAGATGCCCAACTGAGGACAGGAGACCTCGATCCTGCAACTGCTATGGAGAGTGGAGCG 2340  
A D A Q L R T G D L D P A T A M E S G A  
2341 ACAATGTCCCCAGCGACGATGACGGGTTGCATCTGCGGCGCTGCGGCTGCCGAACGGC 2400  
T M S P S D D D G V A S A A L R L P N G  
2401 CGCCTGATGCCATTGTCTATGTTCCAGGTACGAGGTCGAGCGAGGCTGTACACAGAC 2460  
R L M P L S M F Q V T E V E R G L Y T D  
2461 GCCTTCCCTCACGCGCATGGCGCGACAGGCGGAGCTGGTGGCAGCGGCCATGAAGCAAGAC 2520  
A F L T R M A R Q A E L V A A A M K Q D  
2521 GAATACCCATGA 2532  
E Y P \*  
0 TGCTTGTCTTACTTGTCTTTTTTTTTCTGGTTAGTGGGGGAGGGGGGGGGGAGGCATCTGCGA +60  
+61 GAGGCGGCGAAGTAATCTGCACGCATGCCCGGAAATCAACACGTCTCTTCCCTCTGTTTTT +120  
+121 TTTTTTAGGGTGTGCTCTGGTCTGTTGTTTACCTTCTCCGCATGTGCTGCTGTACAT +180  
+181 TTTATTACGCGCTGCCTCCTCCTCTAGAAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTC +240  
+241 GATATCAAGCTTATCGATAACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAATTCGCCCTA +300  
+301 TAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTC +347

7.1.4 LmxGSK3 $\beta$  mit flankierenden Regionen

Grau unterlegt: Gen-Sonde und us-Sonde; gelb unterlegt: Peptid, welches dem anti-LmxGSK3 $\beta$ -Peptid-Antikörper zugrunde liegt.

```

-665                                     TGGCGG -661
-660 CTCCCCTCGCTGGTTTCGCTCTTGAGCTGCAGCCGAGCCGCTTTTCCTCTCCGACTCGGC -601
-600 CTACGTCTGCCTGTGCGTCTGTGTAGGTGTGAGGTGGTGGCCATCTATCATCTCTCTTT -541
-540 CCTTCACGCCGCTCACCCCTTGCCCGTTAGTCGTGTGTGGGTGGTTTGTGTTCCCGCCTCT -481
-480 TCTCTGTTCCCGGATTTCTCGTGTCCGTGCTCGTGATCTGTGAGTGGCAGGCAGTTCGC -421
-420 CTCTCTCCCCTCCACCCGACATCTTCCGCTCCGTCACCTTCGCTCTTCTCGCGTGCCTG -361
-360 CGCATGTGAAGTGCCTAGTTTTCTTAGATTGTGTGTGAGTGTGTGTACGCGCGCTCTCG -301
-300 GCAGCATCTCTTCCCACCAGCCTCCCTCCGCATTGGTGTCTCTAGCAGTGGCCTGCGCT -241
-240 CCTCTCTCGCTCTTTATCGCACTGTTCCGCGTGCACGCCGTCACCGTGTCCGTCGCGC -181
-180 GCTGTGTTTTTTTTGTGTTTCAGGAGGGGTTTCTGATCTCCCCTTCCGTTTCTTCGCTTCT -121
-120 CCGCCTTACTTTTTGTGCTCCCCTACGCCGTCCTTCTTCGAGAAGCTCACCTCCAAGTTC -61
-60 AGCCCCAGTAACAGGAAAAAAGGGAACACCACCTCGTCATCCAGTCATACCCGAGACAAC 0

1 ATGTCGCTCAATGCTGCCGATGCTGCCGACGAGCGAAGTCGCAAGGAGATGGACCGGTTTC 60
  M S L N A A D A A D E R S R K E M D R F
61 CTGGTGAACGCATGGCTGGGCAGGGTACATTCGGCACTGTGCAACTGGGGAAGGAGAAG 120
  L V E R M A G Q G T F G T V Q L G K E K
121 TCCACAGGCATGAGCGTGGCGATCAAGAAGGTTATCCAAGACCCGCGCTTCCGCAACCCG 180
  S T G M S V A I K K V I Q D P R F R N R
181 GAGCTGCAGATCATGCAGGACCTTGCCGTGCTGCACCACCCCAACATCGTGCAGCTCCAG 240
  E L Q I M Q D L A V L H H P N I V Q L Q
241 AGTACTTCTACACCCTGGGTGAGCGCGACCCGCGGACATCTACCTCAATGTGCTGATG 300
  S Y F Y T L G E R D R R D I Y L N V V M
301 GAGTACGTGCCGATACGCTGCACCGCTGCTGCCGCAACTACTACCCCGTCAAGTGGCG 360
  E Y V P D T L H R C C R N Y Y R R Q V A
361 CCACCGCCGATCCTGATCAAGGTCTTTCTTTTTTTCAGCTGATCCGAAAGTATCGGGTGCTTG 420
  P P P I L I K V F L F Q L I R S I G C L
421 CACCTGCCCCTCCGTAACGTTGCCACCCGACATCAAGCCACACAACGTCGTCGTC AAC 480
  H L P S V N V C H R D I K P H N V L V N
481 GAGGCGGAAGGCACCCTGAAGCTGTGCGATTTTGGCAGTGCGAAGAACTCTCGCCGTC 540
  E A E G T L K L C D F G S A K K L S P S
541 GAGCCAAACGTGGCATAACATCTGCTCTCGTTACTACCCGCGCCCTGAGCTCATCTTTGGT 600
  E P N V A Y I C S R Y Y R A P E L I F G
601 AACCGCATTACACGACCTCGGTGACATCTGGTTCGGTGGGGTGTATCTTCGCTGAGATG 660
  N Q H Y T T S V D I W S V G C I F A E M
661 ATGCTTGGCGAGCCCATCTTCCGCGGCGATAACAGCGCCGCGCCAGCTGCACGAAATTTGT 720
  M L G E P I F R G D N S A G Q L H E I V
721 CGCGTGCTCGGCTGCCCCTCGCGCGAGGTGCTGCGTAAGCTGAATCCGTCGCACACGGAC 780
  R V L G C P S R E V L R K L N P S H T D
781 GTGATCTGTACAATAGCAAGGCATCCCGTGGAGCACCGTCTTCTGTGACCACTACTG 840
  V D L Y N S K G I P W S T V F C D H S L
841 AAGGACGCCAAGGAGGCGTACGATCTTCTTAGTGCCCTGCTGCAGTACTTGCCGGAGGAT 900
  K D A K E A Y D L L S A L L Q Y L P E D
901 CGCATGAAGCCTTACGAAGCGCTGTGCCACCCGTAAGCTTTGACGAGCTTCACGACTCCGCC 960
  R M K P Y E A L C H P Y F D E L H D S A
961 ACGAAACTGCCGAATCACAAGAATCTCCCGGAAGACCTCTTTCGCTTCTGCGGAGCGAG 1020
  T K L P N H K N L P E D L F R F L P S E
1021 ATTGAGGTGATGAGCGAAGCGCAGAAGGCCAAGCTGGTTTCGCAAGTAA 1068
  I E V M S E A Q K A K L V R K *

0 AGTGGGGGAGTGGTGAAGCGAAGTTGATGGAGGGAGCCGGTTCGCATGGCTGTGCCAAAGA +60
+61 CGCAGAAGACGCGTGTATGGCGGCAGAGAGCCCTTGCAGCAGGCCCAAAGAAACAGCGGAT +120
+121 GGCAGAGAGGAAACGTC AAGTGTGAGCGGTGCCAAGAGTGGCGCAGCGCAAACAGAGCGGG +180
+181 AGAAGCCGGTAGACAAGGAAAAAGGTTCTGGGGGAGGAGAGCAGCTGTTGCTTCTCTTC +240
+241 AGCGATTTTTTTGTTGTTGTTGTGTGGGTGCCTCTGCATCCCTCGGCGATTCTCCGTC +300
+301 TACCCTGCTTGATGACTCACAGCTGTGGCTGAGAGAGGCTCTTGCTTACGAGTGCTGATA +360

```

```

+361 TTTTAGCGATGCGACACGCCGAAAGTATCGTCTCCTCTGCTTGGTGTGTTTCGTTCAAAC +420
+421 ATGCGCACATAACCGTGCCCTCTTTTCATTTTCGTGAAGGATGAGGTCTGTGCTGTAGG +480
+481 ATCCTCGGGGCGGTTGCACGTGGCCTCTCTCCCTATATACTTTTTTCGTTTGTGCATCTC +540
+541 GATCGCGTGGCCAGTGCCTGCGTGTATGTGTGTGCACTCCCCGCTCTCCGCTCTCTCTCT +600
+601 GCCTCTTACCTCTCCCTTGCCCCATTCTAAAATGCCACAGTGCACCTGCACATGTGCGC +660
+661 GGGTGTGCACGCACACGTCTCTACATCTCCGGCCGTCTATTCGGGCGTCCCTCCG +720
+721 GTGATATGTACTGGTTGAGTCTTCAAATGGCTTCCGCTCTGCGGCTGT +768

```

### 7.1.5 LmxM.36.0430 – Hypothetisches Protein

```

ATGTATCGCCAGAGCATTGCAGGGCTGGCGCTCGCGGCTGCGCTGGCAGAGATCCAGCCTGCCCTGACACCGCGC
CAGGAAGAGGAGATATGGCGCGTTTTTCGACGCGGCAATGCAGGCCGCGGTTGCGGACGCGCCTCTAATGTGCGAC
ATCTCCGTGCAAACCCACCACCTAGCTCCGTTGGCGGAGGCGGCTACGCCGCGGTGACTTCGACCCGCTCAGAG
TTGTACGTTTCTGCCGGTGTGAAGACGGCGGCGGAATGGATGTTGAGGAGCGGGCAGTCGGAAGCCCACTGCA
GCGTCGACAGGACGGTGAGACACCGTTTTGAGGACAGCCACATCGCCTTTCTGTGTACCGCTTGATGGATGACGAG
TGGACGCTGCTGCTGAAAGACCCGACGGTAGTGGTACGGAACGAGCTTGGCGTGTCCGAGAAGATCCAACCTGGAC
TACCTTCGAGTGCGCCTCAAGGACGTTGGTGCCCAACCGGGTGCCACGCAGGCGAAGCAAGTTCATACAGTGCGG
GAGCGCCGGGTGTGA

```

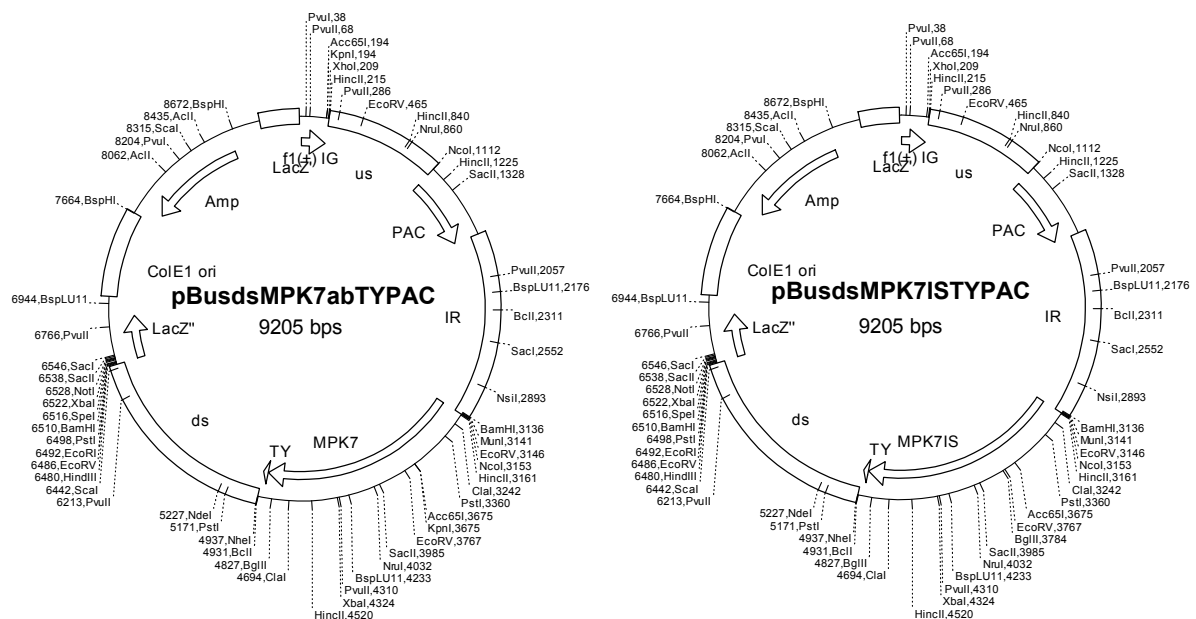
```

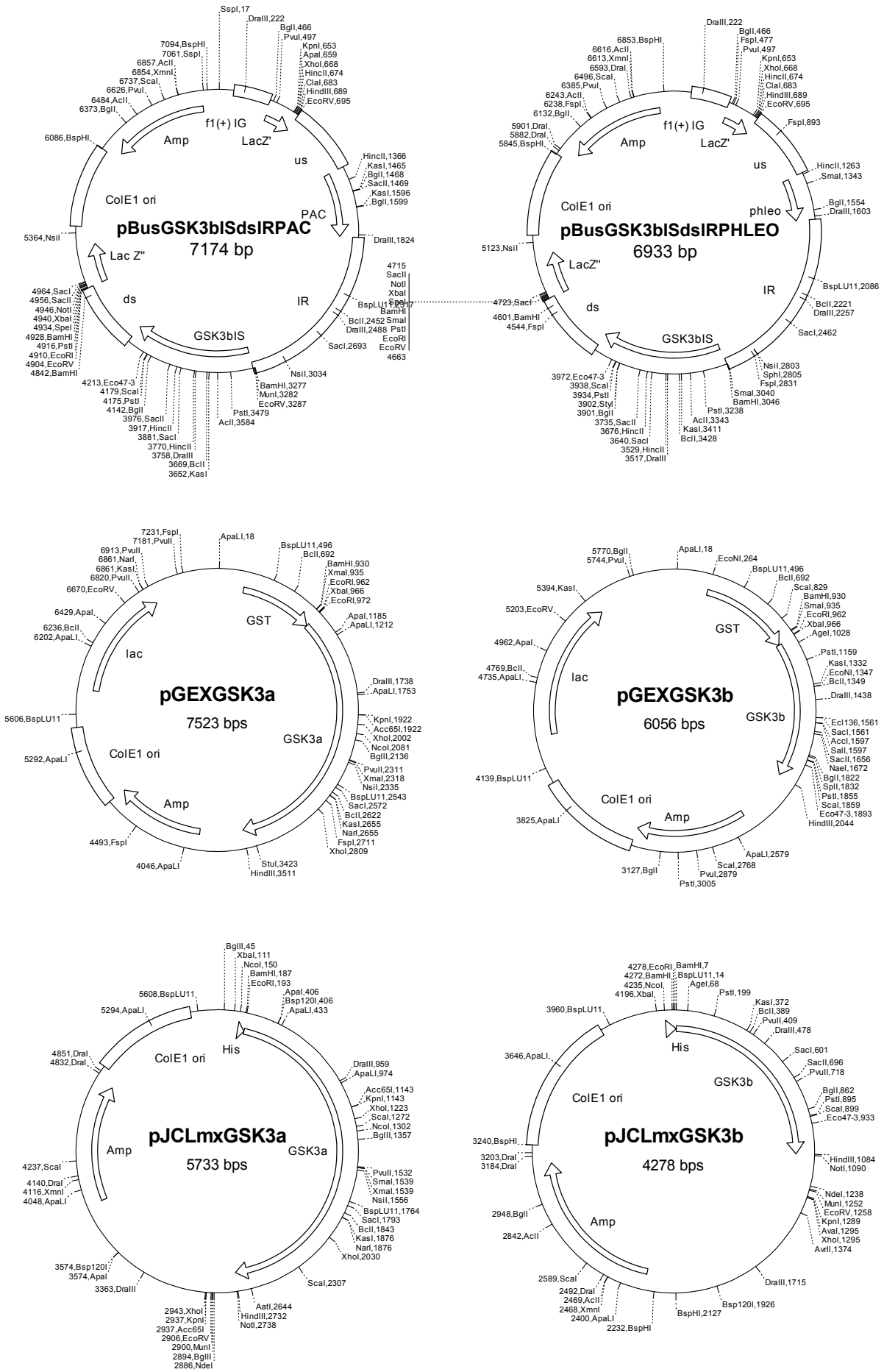
MYRQSIAGLALAAALAEIQPALTPRQEEIWRVFDAA MQAAVADAPLM SHISVQTPPPSSVGGGGYAAVTSTASE
LYVPAGAEDGGMDVEERAVGKPTAASQDGETPFEDSHIAFPVYRLMDDDEWTL LLLKDP TVVVRNELGVSEKIQLD
YLRVRLKDVGAQPGATQAKQVHTVRERRV*

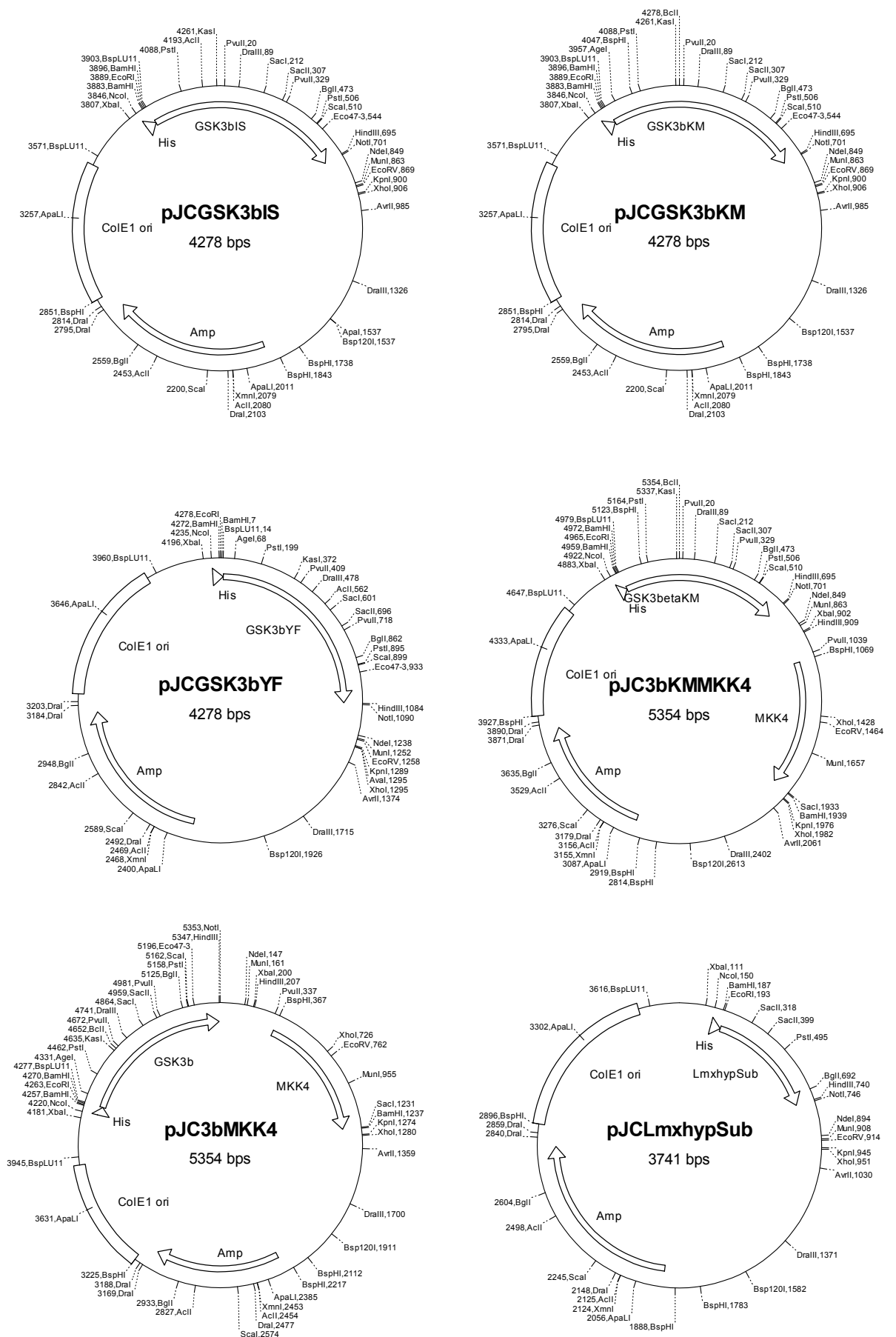
```

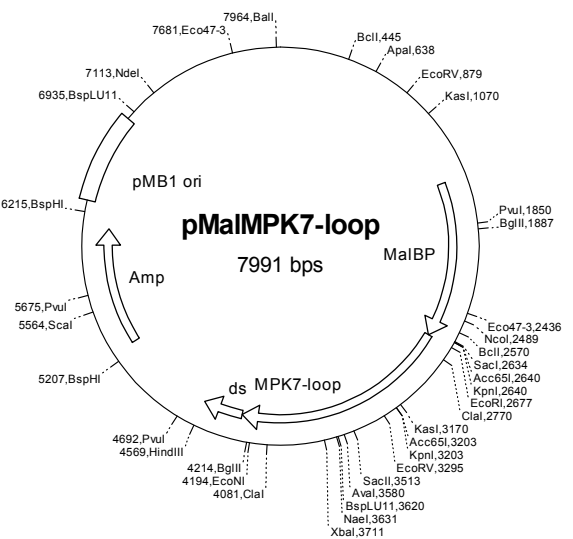
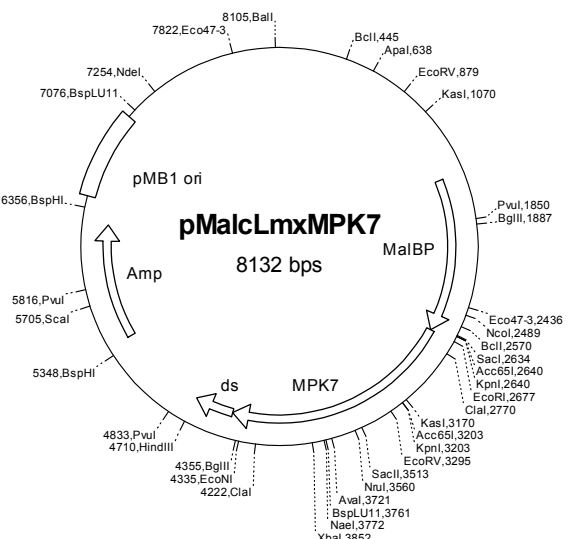
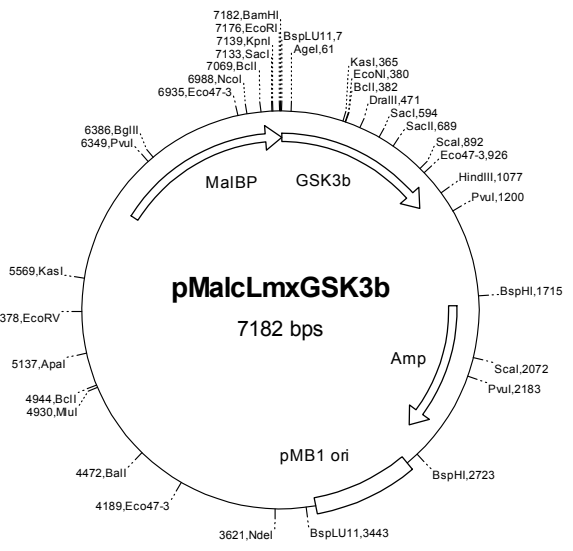
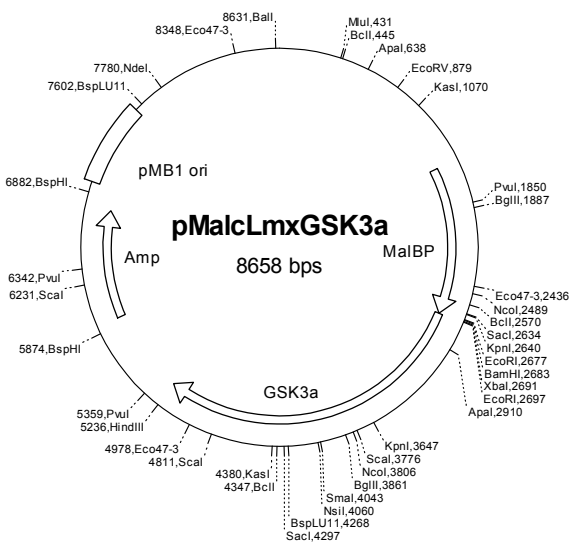
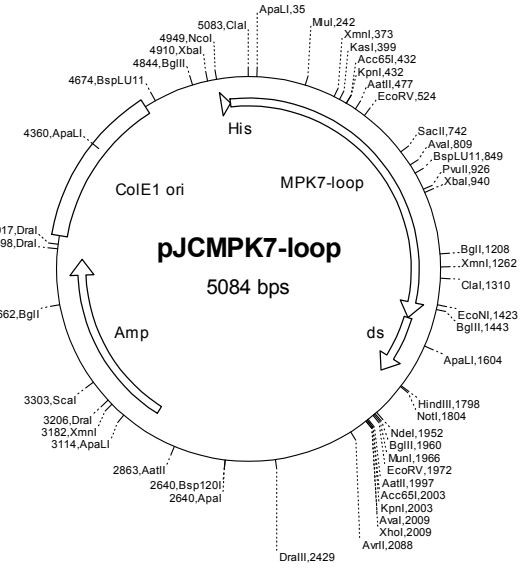
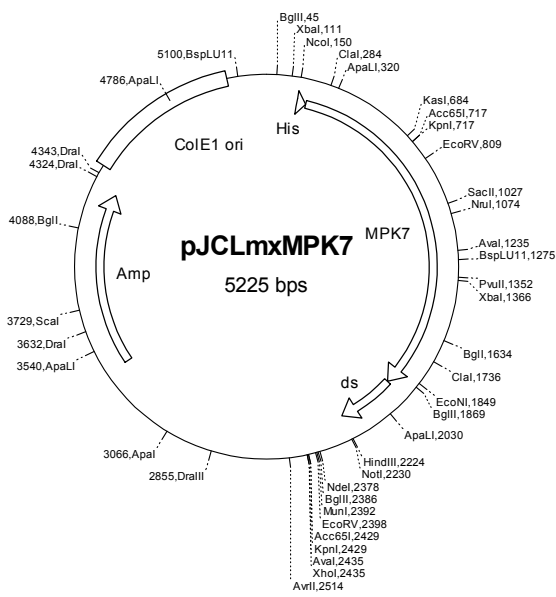
## 7.2 Plasmidkarten

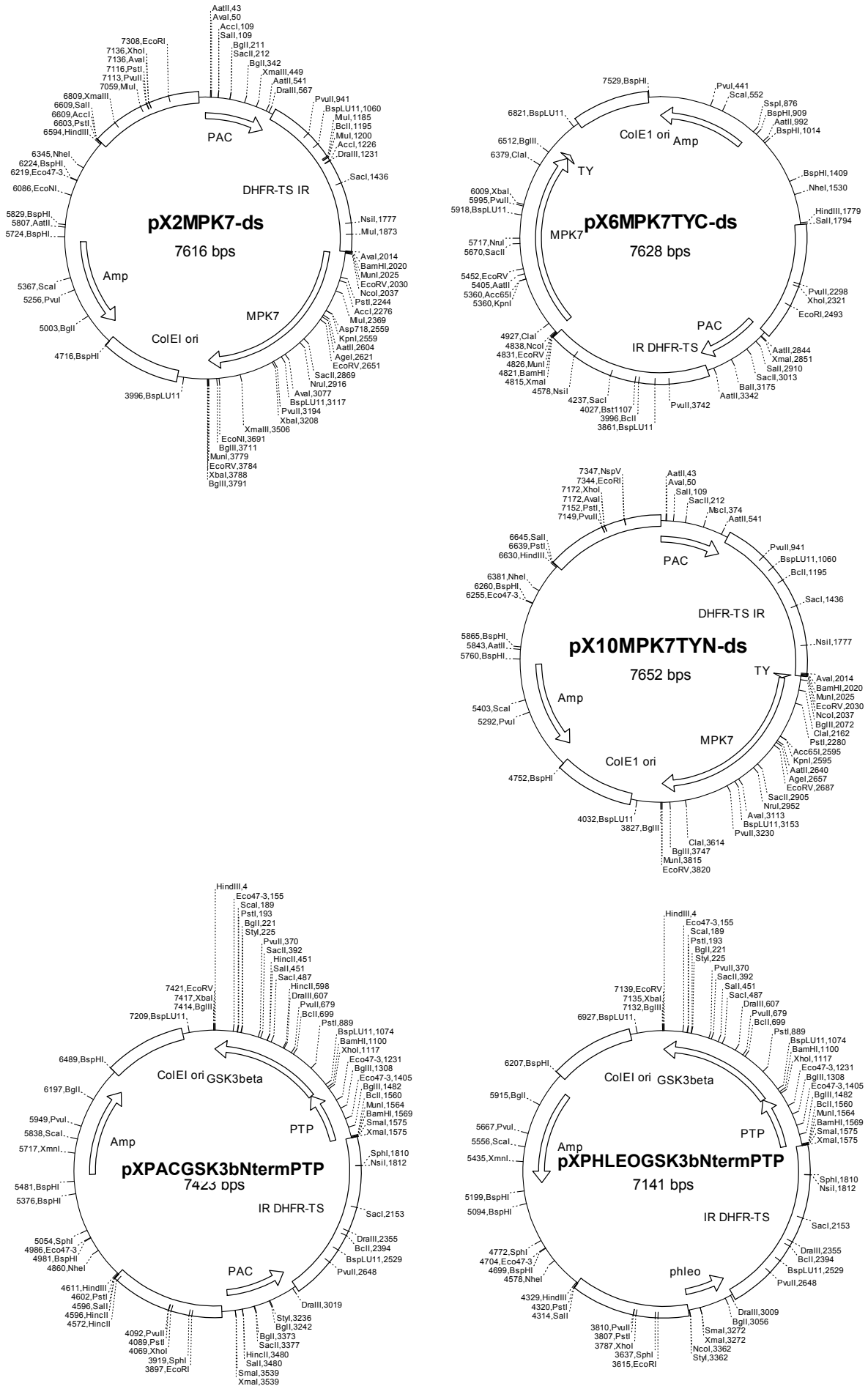
Die Plasmidkarten wurden mit dem Programm Clone Manager 4.1 erstellt.









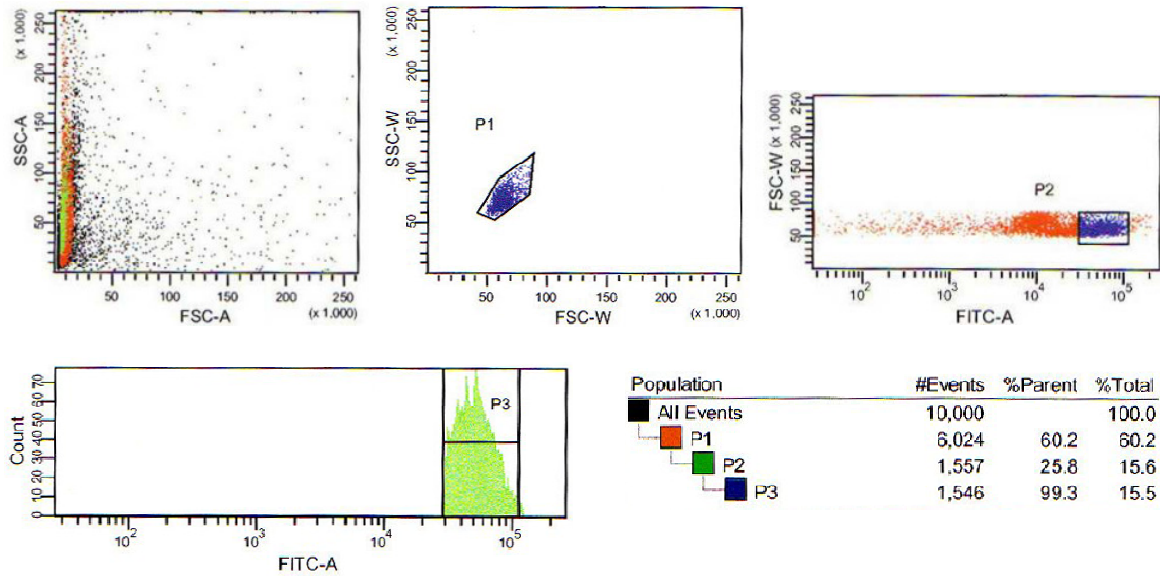




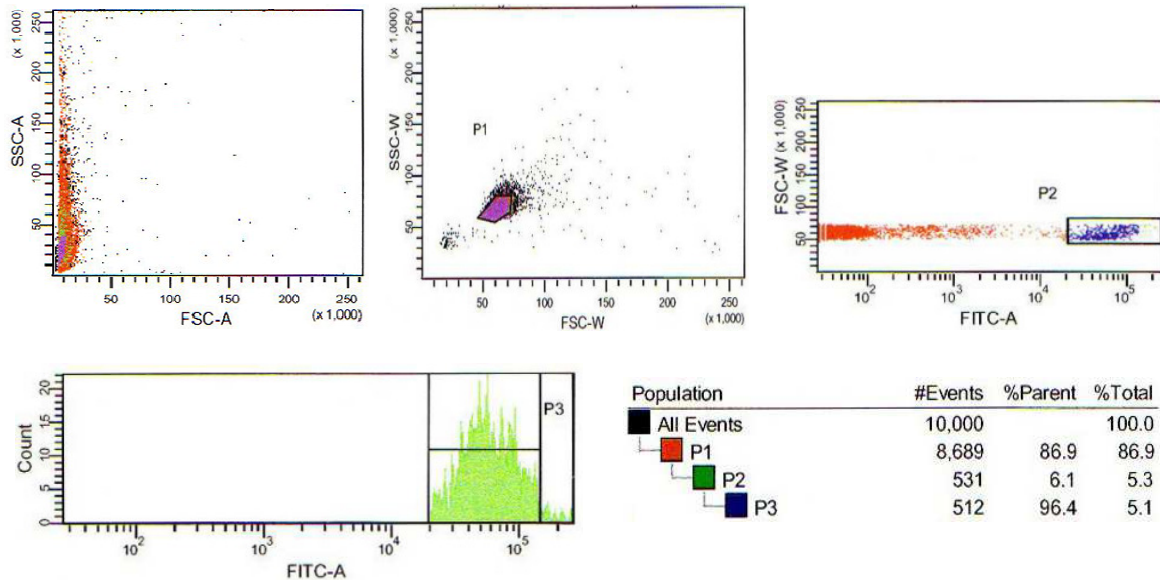
### 7.3 FACS-Analyse SYTO 16-gefärbter Amastigoten – Auswahlfenster

Gefärbte Läsionsamastigoten der Klon 4TYC2A4-1, D3-1 und H8-1 (3.1.2.4.2) wurden mit dem Durchflusszytometer FACSaria 1 analysiert und sortiert. Die hierarchischen Auswahlfenster wurden wie abgebildet festgelegt. Die Population P3 entspricht den in eine 96-well-Platte überführten Zellen. SSC-A/-W: Side Scatter-Area/-Width - Über das Seitwärtsstreulicht wird die Zellgranularität bestimmt. FSC-A/-W: Forward Scatter-Area/-Width - Über das Vorwärtsstreulicht erhält man die Zellgröße. Benutzer Kanal für Syto16-Färbung: FITC

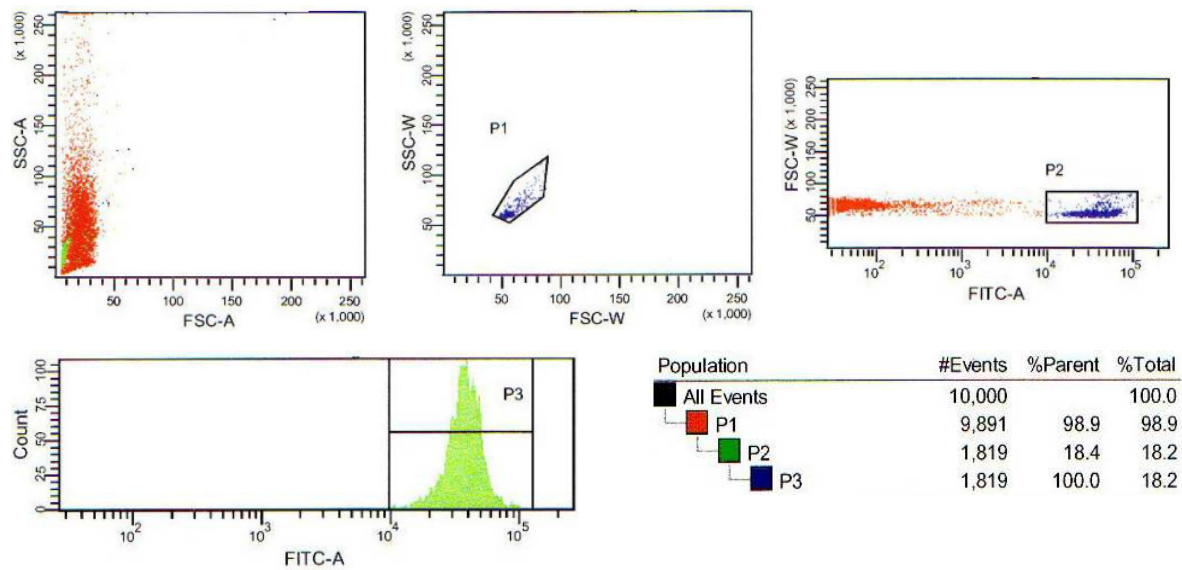
#### Klon 4TYC2A4-1



#### Klon D3-1



## Klon H8-1



## 7.4 MALDI-TOF-MS und MS/MS-Spektren

Identifizierte Peptide von rekombinatem His-LmxGSK3β-Wt

Die durch MALDI-TOF-MS ermittelten Massen wurden durch Peptidmassenfingerprint (PMF) unter Zuhilfenahme der Datenbank MASCOT Peptiden mit den in der Tabelle aufgeführten Modifikationen zugeordnet. Die gefundenen Peptide sind rot in der Proteinsequenz von LmxGSK3β dargestellt. Die Sequenzabdeckung betrug 34,6 %.

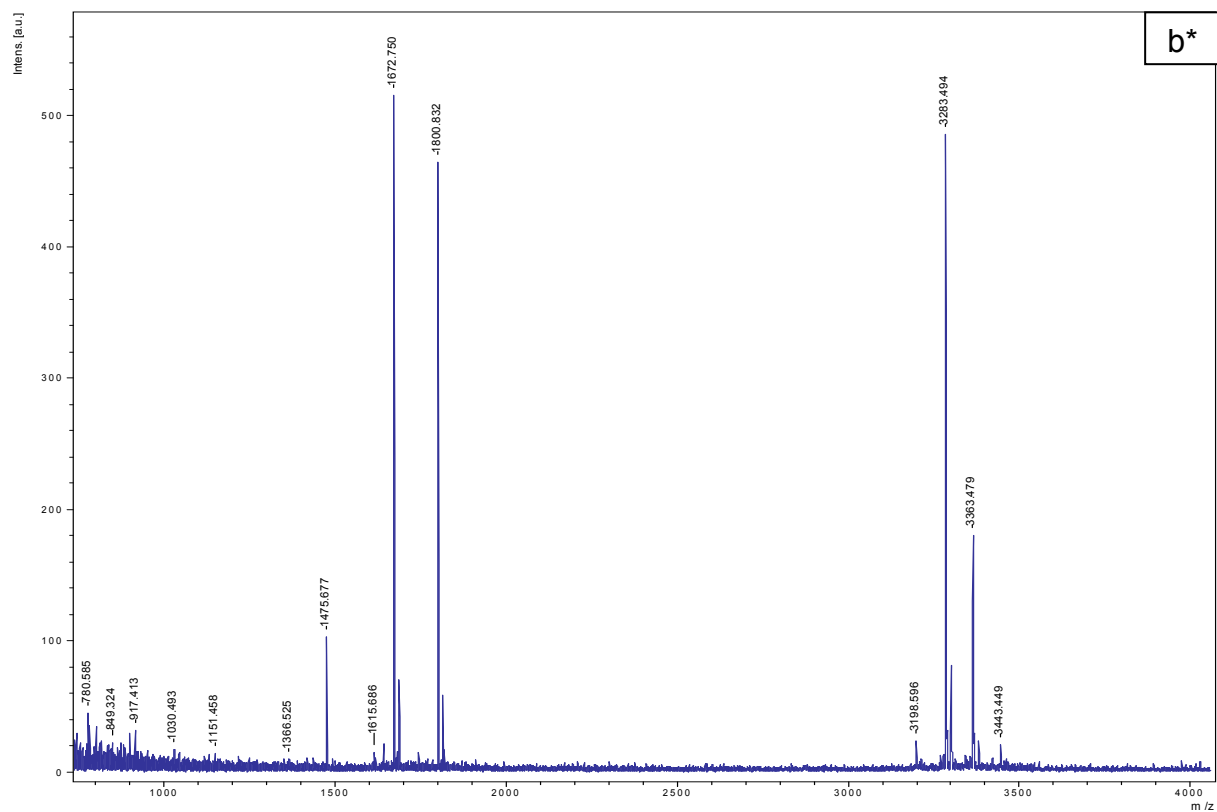
```

1  MSLNAADAAD ERSRKEMDRF LVERMAGQGT FGTVQLGKEK STGMSVAIKK
51  VIQDPRFRNR ELQIMQDLAV LHPNIVQLQ SYFYTLGERD RRDIYLNVMV
101 EYVPTLHRC CRNYRQVA PPIILIKVFL FQLIRSIGCL HLPVNVCHR
151 DIKPHNVLVN EAEGTLKLCD FGSAKKLSPS EPNVAYICSR YYRAPELIFG
201 NQHYTTSVDI WSVGCIFAEM MLGEPFRGD NSAGQLHEIV RVLGCPREV
251 LRKLNPSHTD VDLNYSK GIP WSTVFCDHSL KDAKEAYDLL SALLQYLPED
301 RMKPYEALCH PYFDELHDSA TKLPNHKNLP EDLFRFLPSE IEVMSEAQKA
351 KLVRK

```

Position	Sequenz	Modifikation
1-14	<u>MS</u> LNAADAAD <u>ERS</u> R	Oxidation (M); 2x Phosphorylierung (ST)
2-12	SLNAADAADER	-
25-38	<u>M</u> AGQGT <u>FTV</u> QLGK	Oxidation (M); Phosphorylierung (ST)
25-40	MAGQGT <u>FTV</u> QLGKEK	2x Phosphorylierung (ST)
39-49	EK <u>STGMS</u> VAIK	Oxidation (M); Phosphorylierung (ST)
136-150	<u>SIGCL</u> HLPVNVCHR	Phosphorylierung (ST)
176-190	KLSPSEPNVA <u>Y</u> ICSR	Phosphorylierung (Y)
177-190	LSPSEPNVA <u>Y</u> ICSR	Phosphorylierung (Y)
229-241	GDNSAGQLHEIVR	-
229-241	GDNS <u>S</u> AGQLHEIVR	Phosphorylierung (ST)
253-267	KLNPSTHTD <u>VDL</u> YNSK	Phosphorylierung (Y)
254-267	LNPSHTD <u>VDL</u> YNSK	Phosphorylierung (Y)
302-327	MKP <u>Y</u> EALCH <u>PY</u> FDELHDSATKLPNHK	Phosphorylierung (ST); 2x Phosphorylierung (Y)

### MALDI-TOF-MS Spektrum der Phosphopeptide von His-LmxGSK3 $\beta$ -Wt



### MS/MS-Analyse von rekombinantem His-LmxGSK3 $\beta$

Die gefundenen Peptide sind gelb unterlegt und die phosphorylierten Reste rot gedruckt.

```

MGSSHHHHHSQDPNSGSN M S L N A A D A A D E R S R K E M D R F L
V E R M A G Q G T F G T V Q L G K E K S T G M S V A I K K V I
Q D P R F R N R E L Q I M Q D L A V L H H P N I V Q L Q S Y F
Y T L G E R D R R D I Y L N V V M E Y V P D T L H R C C R N Y
Y R R Q V A P P P I L I K V F L F Q L I R S I G C L H L P S V
N V C H R D I K P H N V L V N E A E G T L K L C D F G S A K K
L S P S E P N V A Y I C S R Y Y R A P E L I F G N Q H Y T T S
V D I W S V G C I F A E M M L G E P I F R G D N S A G Q L H E
I V R V L G C P S R E V L R K L N P S H T D V D L Y N S K G I
P W S T V F C D H S L K D A K E A Y D L L S A L L Q Y L P E D
R M K P Y E A L C H P Y F D E L H D S A T K L P N H K N L P E
D L F R F L P S E I E V M S E A Q K A K L V R K Stop
  
```

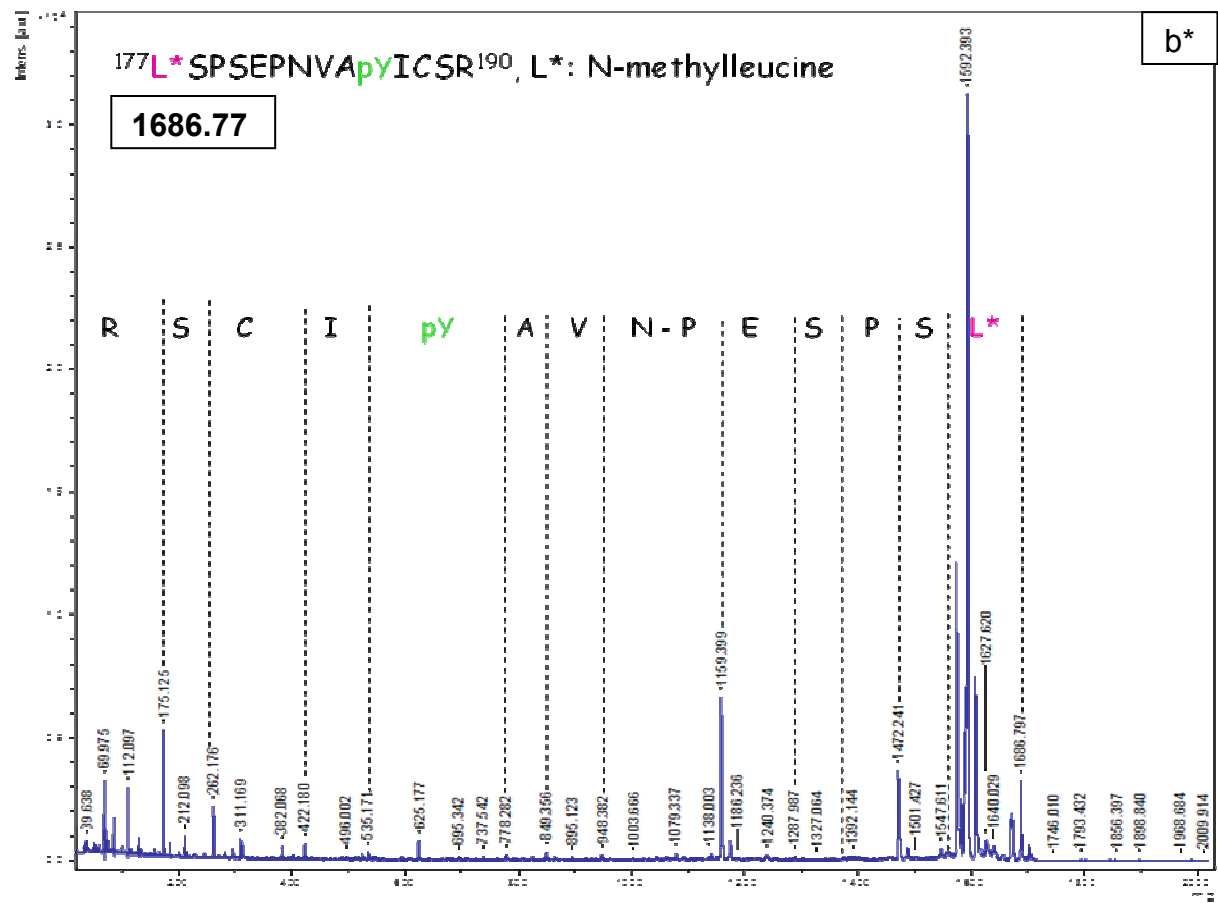
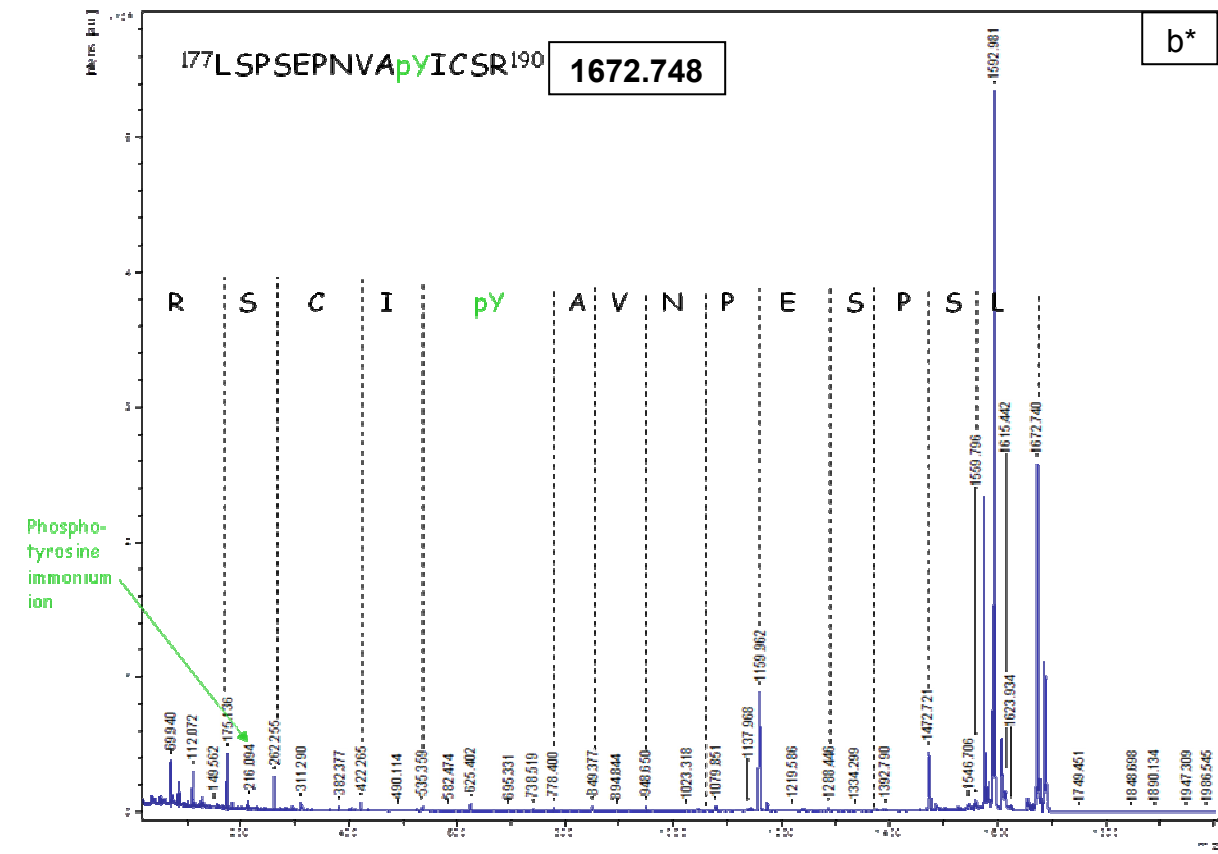
T30: His-LmxGSK3 $\beta$ -KM + PK4

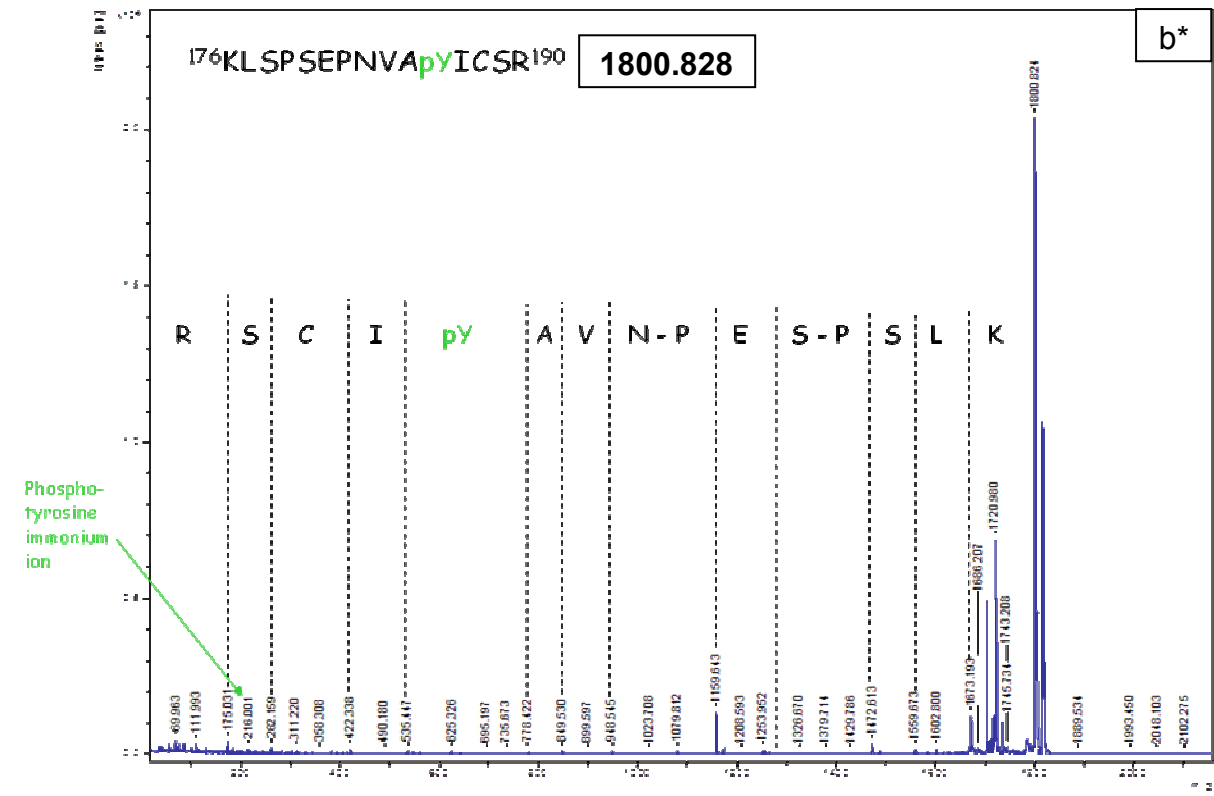
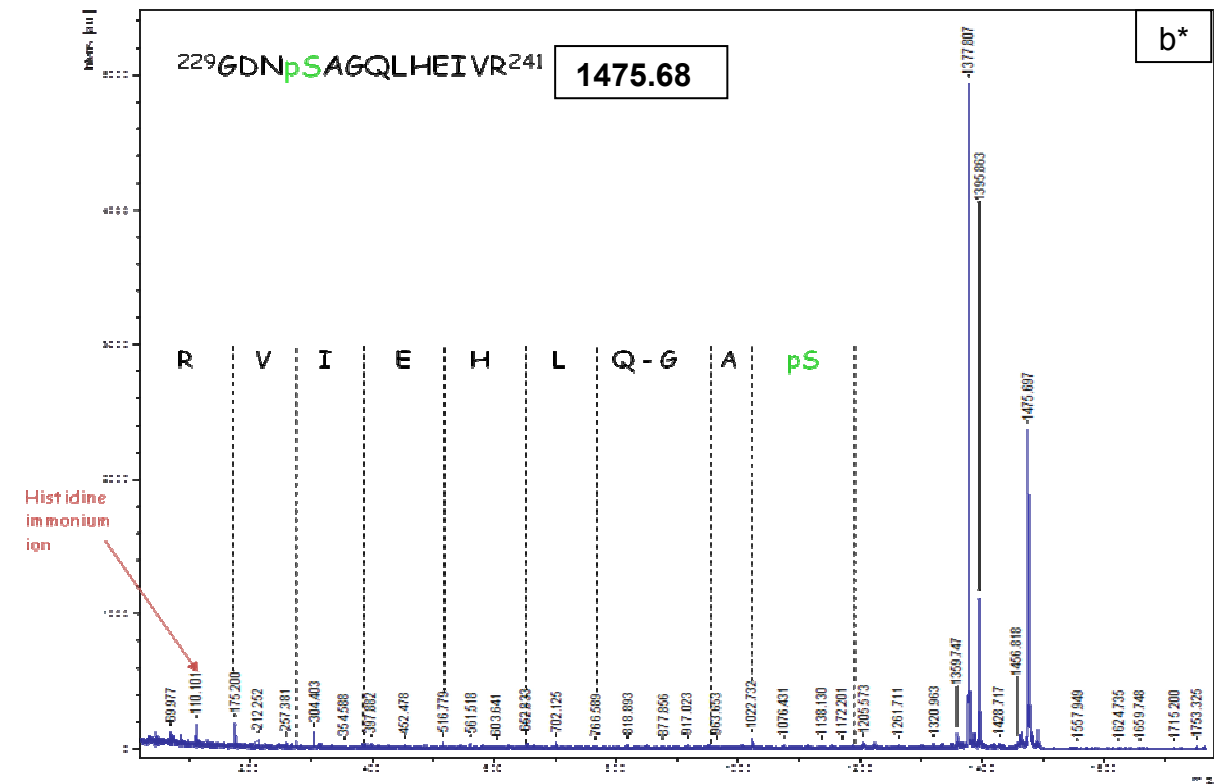
T33: His-LmxGSK3 $\beta$ -KM + PK4

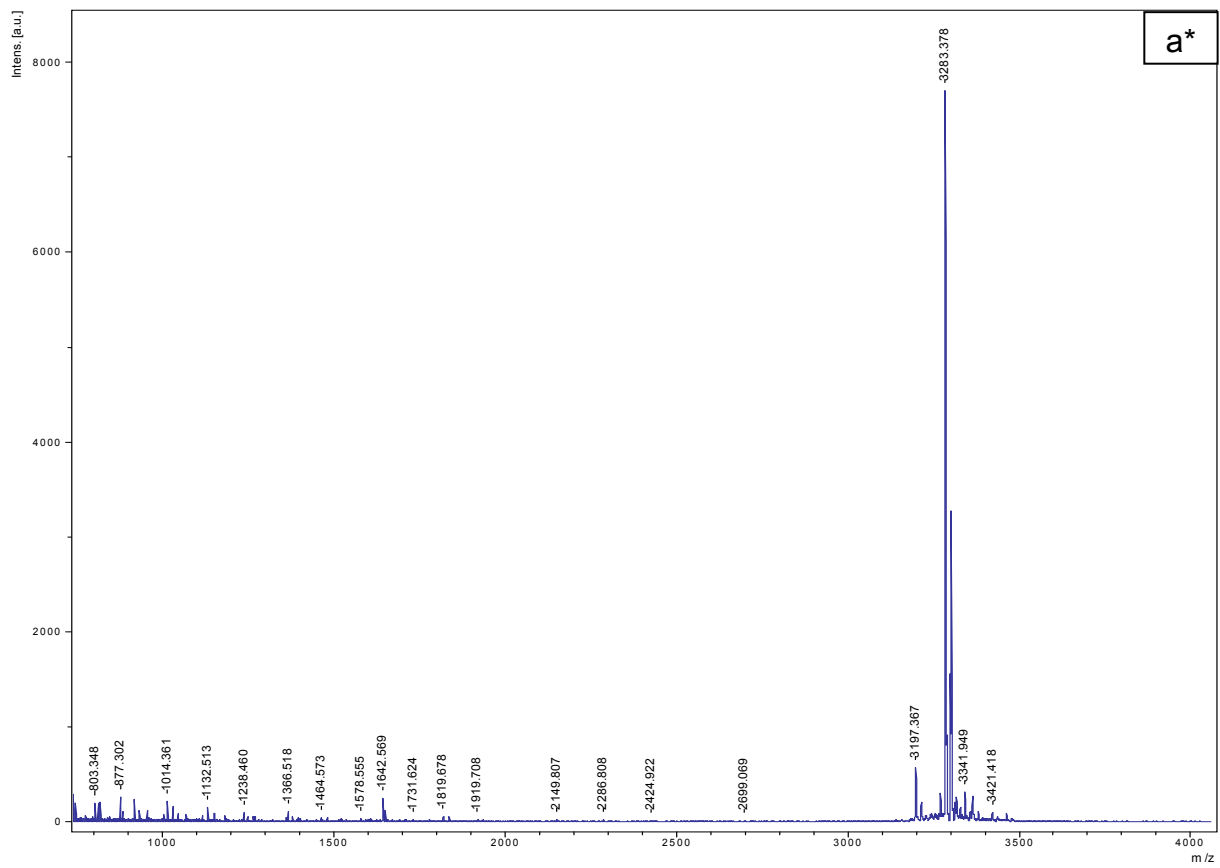
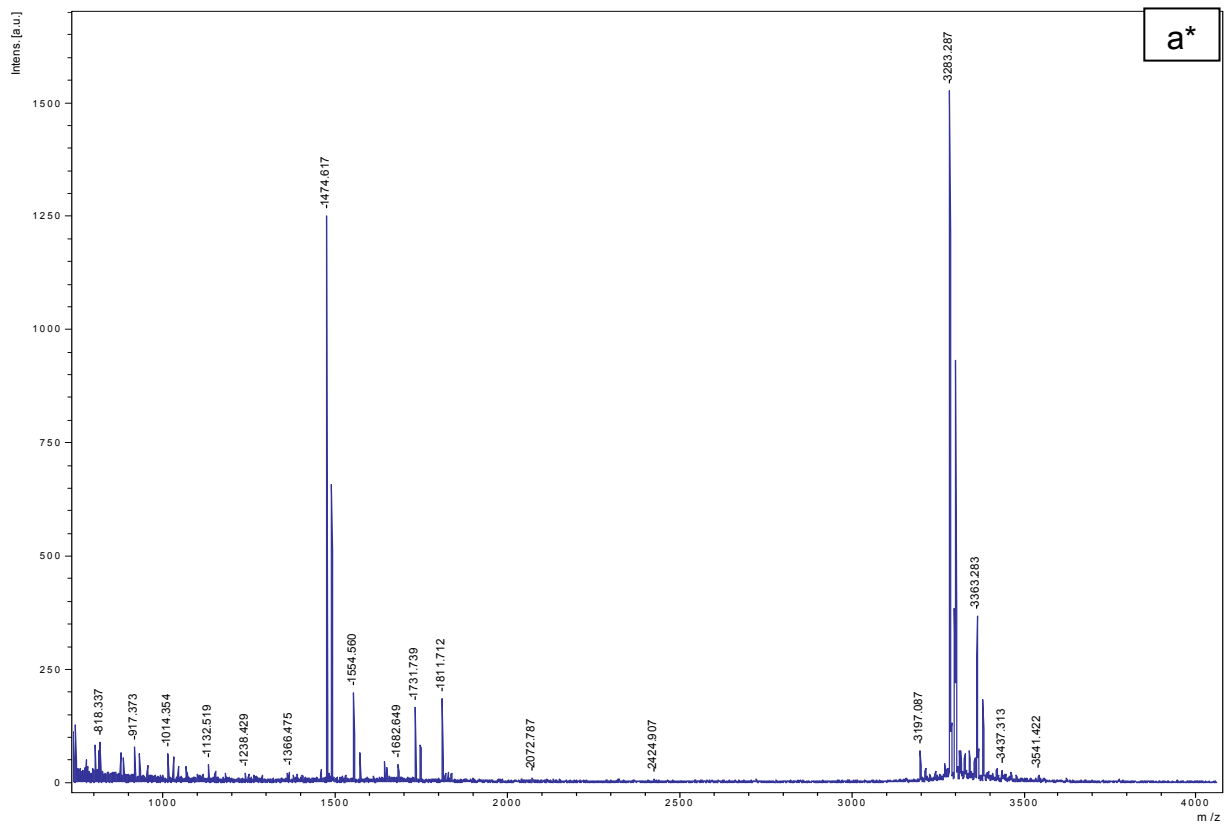
Y186: His-LmxGSK3 $\beta$ -Wt (direkt aus *E. coli* und nach Inkubation mit ATP)

S232: His-LmxGSK3 $\beta$ -Wt (direkt aus *E. coli*)

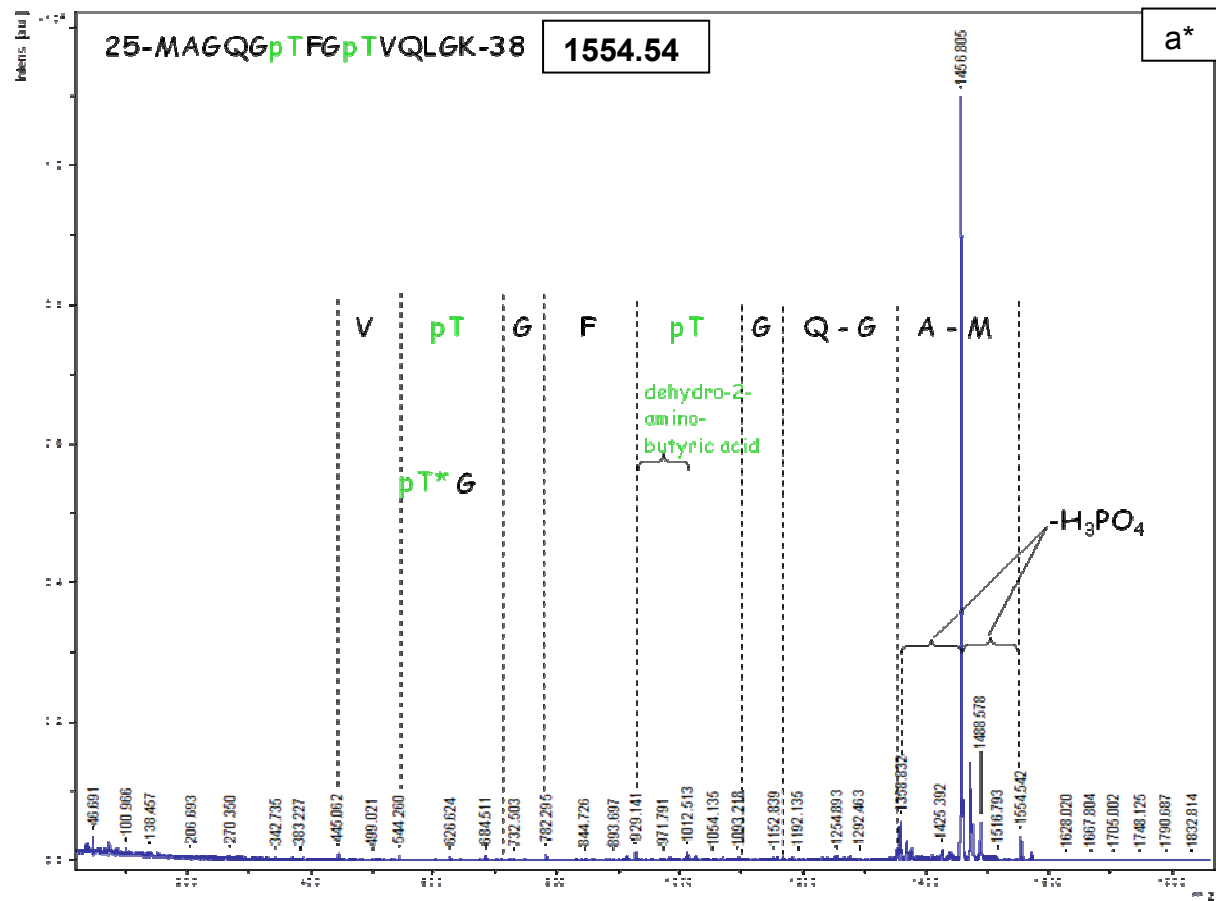
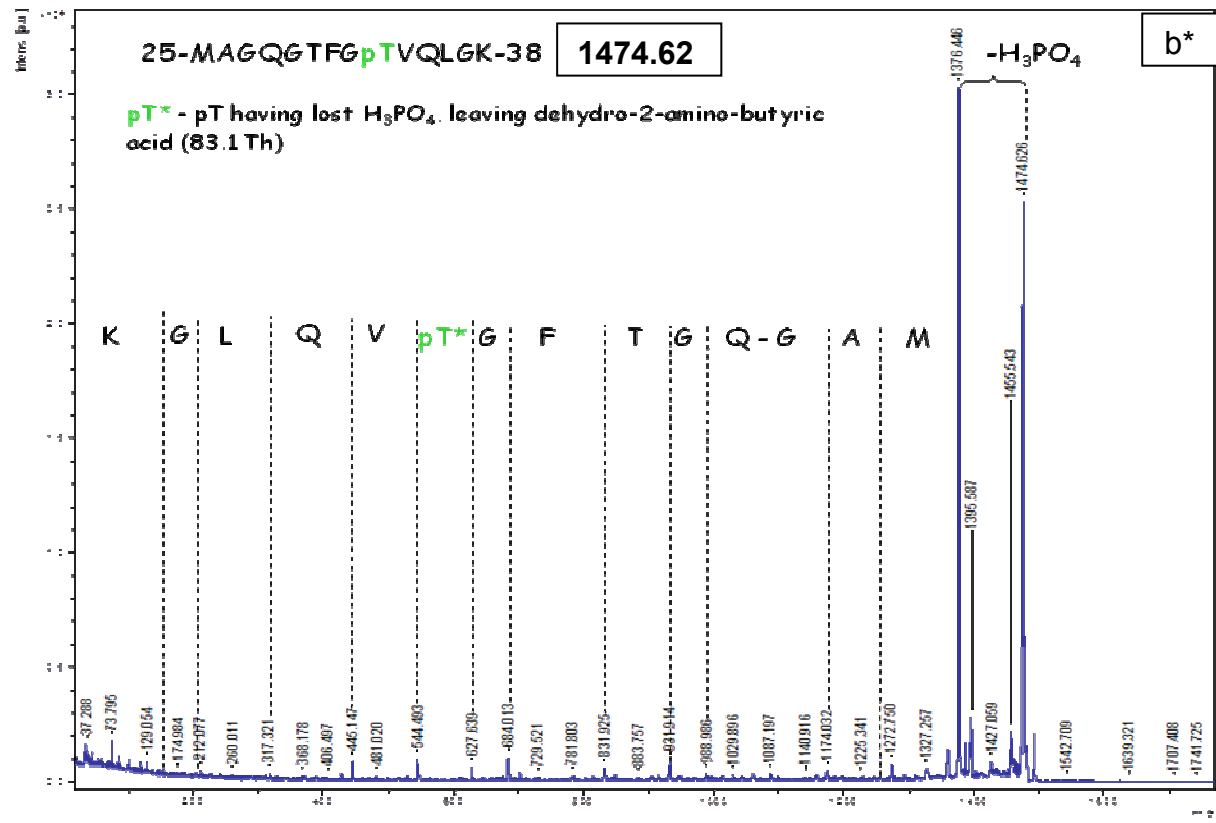
MS/MS-Spektren der Y186-Phosphorylierung von His-LmxGSK3β-Wt

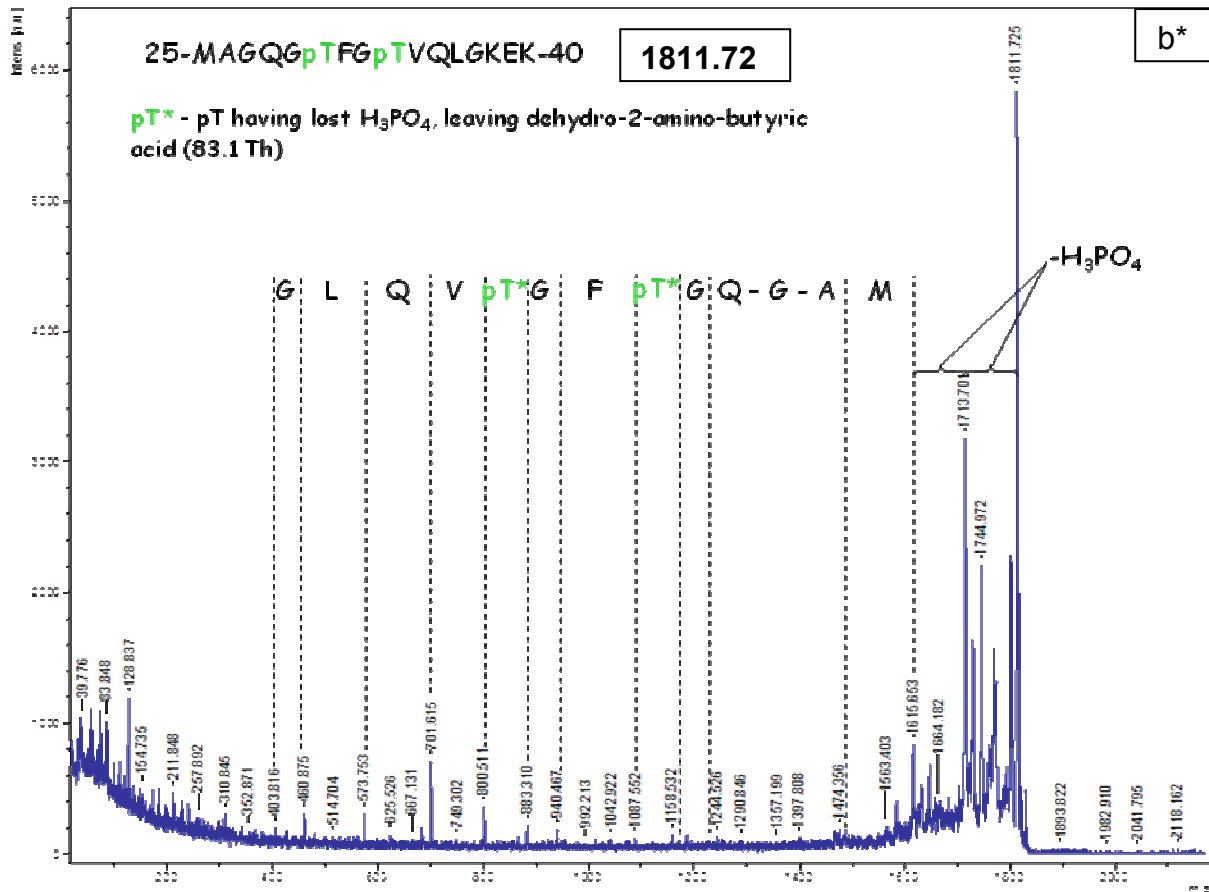


MS/MS-Spektrum der S232-Phosphorylierung von His-LmxGSK3 $\beta$ -Wt

MALDI-TOF-MS-Spektrum der Phosphopeptide von His-LmxGSK3 $\beta$ -KMMALDI-TOF-MS-Spektrum der Phosphopeptide von His-LmxGSK3 $\beta$ -KM nach Co-Expression mit LmxPK4

MS/MS-Spektren der T30- und T33-Phosphorylierung von His-LmxGSK3 $\beta$ -KM nach Co-Expression mit LmxPK4





a\*: Analyse des Überstands des in-Gel-Verdaus mit Trypsin.

b\*: Analyse eines Gemisches aus Überstand und Peptidextrakt der Gelproben.

Abszisse:  $m/z$  = Masse des Ions / Ladungszahl

Ordinate: Intensity [a.u.] = relative Intensität



### III Literaturverzeichnis

**Abe MK, Kuo WL, Hershenson MB, Rosner MR (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(2)**, 1301-12

**Absalon S, Blisnick T, Kohl L, Toutirais G, Doré G, Julkowska D, Tavenet A, Bastin P (2008).** Intraflagellar transport and functional analysis of genes required for flagellum formation in trypanosomes. *Mol Biol Cell* **19(3)**, 929-44

**Absalon S, Kohl L, Branche C, Blisnick T, Toutirais G, Rusconi F, Cosson J, Bonhivers M, Robinson D, Bastin P (2007).** Basal body positioning is controlled by flagellum formation in *Trypanosoma brucei*. *PLoS One* **2(5)**, e437

**Adams JA, Taylor SS (1993).** Divalent metal ions influence catalysis and active-site accessibility in the CAMP-dependent protein kinase. *Protein Sci* **2**, 2177-2186

**Adhiambo C, Forney JD, Asai DJ, LeBowitz JH (2005).** The two cytoplasmic dynein-2 isoforms in *Leishmania mexicana* perform separate functions. *Mol Biochem Parasitol* **143(2)**, 216-25

**Adung'a VO, Field MC (2013).** TbFRP, a novel FYVE-domain containing phosphoinositide-binding Ras-like GTPase from trypanosomes. *Exp Parasitol* **133(3)**, 255-64

**Afzal AJ, Wood AJ, Lightfoot DA (2008).** Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *Mol Plant Microbe Interact* **21(5)**, 507-17

**Agron PG, Reed SL, Engel JN (2005).** An essential, putative MEK kinase of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* **142(1)**, 121-5

**Ajdary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K, Kharazmi A (2000).** Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infect Immun* **68(4)**, 1760-4

**Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P, Dobson DE, Beverley SM, Sacks DL (2009).** Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science* **324(5924)**, 265-8

**Ali A, Hoeflich KP, Woodgett JR (2001).** Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. *Chem Rev* **101(8)**, 2527-40

**Ali KS, Rees RC, Terrell-Nield C, Ali SA (2013).** Virulence loss and amastigote transformation failure determine host cell responses to *Leishmania mexicana*. *Parasite Immunol* **35(12)**, 441-56

**Alonso G, Guevara P, Ramirez JL (1992).** Trypanosomatidae codon usage and GC distribution. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **87(4)**, 517-23

**Alsford S, Turner DJ, Obado SO, Sanchez-Flores A, Glover L, Berriman M, Hertz-Fowler C, Horn D (2011).** High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. *Genome Res* **21(6)**, 915-24

**Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25(17)**, 3389-402

**Ambit A, Woods KL, Cull B, Coombs GH, Mottram JC (2011).** Morphological events during the cell cycle of *Leishmania major*. *Eukaryot Cell* **10(11)**, 1429-38

- Aslett M, Aurrecochea C, Berriman M, Brestelli J, Brunk BP, Carrington M, Depledge DP, Fischer S, Gajria B, Gao X, Gardner MJ, Gingle A, Grant G, Harb OS, Heiges M, Hertz-Fowler C, Houston R, Innamorato F, Iodice J, Kissinger JC, Kraemer E, Li W, Logan FJ, Miller JA, Mitra S, Myler PJ, Nayak V, Pennington C, Phan I, Pinney DF, Ramasamy G, Rogers MB, Roos DS, Ross C, Sivam D, Smith DF, Srinivasamoorthy G, Stoeckert CJ Jr, Subramanian S, Thibodeau R, Tivey A, Treatman C, Velarde G, Wang H (2010).** TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res* **38** (Database issue):D457-62
- Bahia D, Oliveira LM, Lima FM, Oliveira P, Silveira JF, Mortara RA, Ruiz JC (2009).** The TryPIKinome of five human pathogenic trypanosomatids: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum*--new tools for designing specific inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* **390(3)**, 963-70
- Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P (2007).** The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* **408(3)**, 297-315
- Bansal V, Ochoa JB (2003).** Arginine availability, arginase, and the immune response. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **6(2)**, 223-8
- Bao Y, Weiss LM, Braunstein VL, Huang H (2008).** Role of protein kinase A in *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* **76(10)**, 4757-63
- Bao Y, Weiss LM, Ma YF, Lisanti MP, Tanowitz HB, Das BC, Zheng R, Huang H (2010).** Molecular cloning and characterization of mitogen-activated protein kinase 2 in *Trypanosoma cruzi*. *Cell Cycle* **9(14)**, 2888-96
- Barak E, Amin-Spector S, Gerliak E, Goyard S, Holland N, Zilberstein D (2005).** Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system, analysis of signal perception and response. *Mol Biochem Parasitol* **141(1)**, 99-108
- Bastin P, Bagherzadeh A, Matthews KR, Gull K (1996).** A novel epitope tag system to study protein targeting and organelle biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **77(2)**, 235-239
- Bates PA (2007).** Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* **37(10)**, 1097-106
- Bates PA, Robertson CD, Tetley L, Coombs GH (1992).** Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology* **105(Pt2)**, 193-202
- Bax B, Carter PS, Lewis C, Guy AR, Bridges A, Tanner R, Pettman G, Mannix C, Culbert AA, Brown MJ, Smith DG, Reith AD (2001).** The structure of phosphorylated GSK-3 $\beta$  complexed with a peptide, FRATtide, that inhibits beta-catenin phosphorylation. *Structure* **9(12)**, 1143-52
- Baulieu JM, Marion S, Rodriguiz RM, Medvedev IO, Sotnikova TD, Ghisi V, Wetsel WC, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG (2008).** A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior. *Cell* **132(1)**, 125-36
- Bee A, Culley FJ, Alkhalife IS, Bodman-Smith KB, Raynes JG, Bates PA (2001).** Transformation of *Leishmania mexicana* metacyclic promastigotes to amastigote-like forms mediated by binding of human C-reactive protein. *Parasitology* **122(Pt 5)**, 521-9
- Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D (2000).** A natural model of *Leishmania* major infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol* **165(2)**, 969-77
- Beneke T, Madden R, Makin L, Valli J, Sunter J, Gluenz E (2017).** A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. *R Soc Open Sci* **4(5)**, 170095
- Bengs F, Scholz A, Kuhn D, Wiese M (2005).** LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol* **55**, 1606-15

- Benz C, Clucas C, Mottram JC, Hammarton TC (2012).** Cytokinesis in bloodstream stage *Trypanosoma brucei* requires a family of katanins and spastin. *PLoS One* **7(1)**, e30367
- Benzel I, Weise F, Wiese M (2000).** Deletion of the gene for the membrane-bound acid phosphatase of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* **111**, 77-86
- Berman SA, Wilson NF, Haas NA, Lefebvre PA (2003).** A novel MAP kinase regulates flagellar length in *Chlamydomonas*. *Curr Biol* **13(13)**, 1145-9
- Beverley SM (1991).** Gene amplification in *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* **45**, 417-44
- Beverley SM, Clayton CE (1993).** Transfection of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* by electroporation. *Methods Mol Biol* **21**, 333-48
- Bhatia A, Sanyal R, Paramchuk W, Gedamu L (1998).** Isolation, characterization and disruption of the casein kinase II alpha subunit gene of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* **92(2)**, 195-206
- Bhattacharya A, Biswas A, Das PK (2009).** Role of a differentially expressed cAMP phosphodiesterase in regulating the induction of resistance against oxidative damage in *Leishmania donovani*. *Free Radic Biol Med* **47(10)**, 1494-506
- Bijur GN, Jope RS (2001).** Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem* **276(40)**, 37436-42
- Bijur GN, Jope RS (2003).** Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport* **14(18)**, 2415-9
- Bishop AC, Buzko O, Shokat KM (2001).** Magic bullets for protein kinases. *Trends Cell Biol* **11(4)**, 167-72
- Blaineau C, Tessier M, Dubessay P, Tasse L, Crobu L, Pagès M, Bastien P (2007).** A novel microtubule-depolymerizing kinesin involved in length control of a eukaryotic flagellum. *Curr Biol* **17(9)**, 778-82
- Blisnick T, Buisson J, Absalon S, Marie A, Cayet N, Bastin P (2014).** The intraflagellar transport dynein complex of trypanosomes is made of a heterodimer of dynein heavy chains and of light and intermediate chains of distinct functions. *Mol Biol Cell* **25(17)**, 2620-33
- Boecken G, Sunderkötter C, Bogdan C, Weitzel T, Fischer M, Müller A, Löbermann M, Anders G, von Stebut E, Schunk M, Burchard G, Grobusch M, Bialek R, Harms-Zwingerberger G, Fleischer B, Pietras M, Faulde M, Erkens K; Germany Society of Dermatology; German Society of Tropical Medicine; German Society of Chemotherapy (2011).** Diagnosis and therapy of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis in Germany. *J Dtsch Dermatol Ges* **9 S8**, 1-51
- Bogdan C (2008).** Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens, leishmaniasis as an example. *Cell Microbiol.* **10(6)**, 1221-34
- Bogdan C, Donhauser N, Döring R, Röllinghoff M, Diefenbach A, Rittig MG (2000).** Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med* **191(12)**, 2121-30
- Boucher N, McNicoll F, Laverdière M, Rochette A, Chou MN, Papadopoulou B (2004).** The ribosomal RNA gene promoter and adjacent cis-acting DNA sequences govern plasmid DNA partitioning and stable inheritance in the parasitic protozoan *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* **32(9)**, 2925-36
- Bousslimi N, Ben-Ayed S, Ben-Abda I, Aoun K, Bouratbine A (2012).** Natural infection of North African gundi (*Ctenodactylus gundi*) by *Leishmania tropica* in the focus of cutaneous leishmaniasis, Southeast Tunisia. *Am J Trop Med Hyg* **86(6)**, 962-5
- Boynak NY, Rojas F, D'Alessio C, Vilchez Larrea SC, Rodriguez V, Ghiringhelli PD, Téllez-Iñón MT (2013).** Identification of a Wee1-like kinase gene essential for procyclic *Trypanosoma brucei* survival. *PLoS One* **8(11)**, e79364

- Bradford MM (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54
- Bradley BA, Quarmby LM (2005).** A NIMA-related kinase, Cnk2p, regulates both flagellar length and cell size in *Chlamydomonas*. *J Cell Sci* **118(Pt15)**, 3317-26
- Braga MV, de Souza W (2006).** Effects of protein kinase and phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors on growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett* **256(2)**, 209-16
- Brenchley R, Tariq H, McElhinney H, Szöör B, Huxley-Jones J, Stevens R, Matthews K, Taberero L (2007).** The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. *BMC Genomics* **8**, 434
- Brinkworth RI, Breinl RA, Kobe B (2003).** Structural basis and prediction of substrate specificity in protein serine/threonine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* **100(1)**, 74-9
- Britto C, Ravel C, Bastien P, Blaineau C, Pagès M, Dedet JP, Wincker P (1998).** Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene* **222(1)**, 107-17
- Broadhead R, Dawe HR, Farr H, Griffiths S, Hart SR, Portman N, Shaw MK, Ginger ML, Gaskell SJ, McKean PG, Gull K (2006).** Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature* **440(7081)**, 224-7
- Brookman JL, Stott AJ, Cheeseman PJ, Burns NR, Adams SE, Kingsman AJ, and Gull K (1995).** An immunological analysis of Ty1 virus-like particle structure. *Virology* **207**, 59-67
- Brown NR, Noble ME, Lawrie AM, Morris MC, Tunnah P, Divita G, Johnson LN, Endicott JA (1999).** Effects of phosphorylation of threonine 160 on cyclin-dependent kinase 2 structure and activity. *J Biol Chem* **274(13)**, 8746-56
- Brumlik MJ, Pandeswara S, Ludwig SM, Murthy K, Curiel TJ (2011).** Parasite mitogen-activated protein kinases as drug discovery targets to treat human protozoan pathogens. *J Signal Transduct* **2011**, 971968
- Brun R, Schönenberger M (1979).** Cultivation and in vitro cloning of procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in semi-defined medium. *Acta Trop* **36**, 289-292
- Buch I, Fishelovitch D, London N, Raveh B, Wolfson HJ, Nussinov R (2010).** Allosteric regulation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$ : a theoretical study. *Biochemistry* **49(51)**, 10890-901
- Buchan DWA, Minneci F, Nugent TCO, Bryson K, Jones DT (2013).** Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Research* **41(W1)**, W340-W348
- Burchmore RJ, Rodriguez-Contreras D, McBride K, Merkel P, Barrett MP, Modi G, Sacks D, Landfear SM (2003).** Genetic characterization of glucose transporter function in *Leishmania mexicana*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100(7)**, 3901-6
- Cadigan KM, Nusse R (1997).** Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* **11(24)**, 3286-305
- Campbell DA, Thomas S, Sturm NR (2003).** Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect* **5(13)**, 1231-40
- Canagarajah BJ, Khokhlatchev A, Cobb MH, Goldsmith EJ (1997).** Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90(5)**, 859-69
- Cass CE (1972).** Density-dependent resistance to puromycin in cell cultures. *J Cell Physiol* **79(1)**, 139-46
- Castanys-Muñoz E, Brown E, Coombs GH, Mottram JC (2012).** *Leishmania mexicana* metacaspase is a negative regulator of amastigote proliferation in mammalian cells. *Cell Death Dis* **3**, e385

- Cayla M, Rachidi N, Leclercq O, Schmidt-Arras D, Rosenqvist H, Wiese M, Späth GF (2014).** Transgenic analysis of the Leishmania MAP kinase MPK10 reveals an auto-inhibitory mechanism crucial for stage-regulated activity and parasite viability. *PLoS Pathog* **10(9)**, e1004347
- CDC (2013):** <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>
- CDC (2017):** <https://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/index.html>
- Chalecka-Franaszek E, Chuang DM (1999).** Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **96(15)**, 8745-50
- Chen G, Huang LD, Jiang YM, Manji HK (1999).** The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3. *J Neurochem* **72(3)**, 1327-30
- Chenik M, Lakhal S, Ben Khalef N, Zribi L, Louzir H, Dellagi K (2006).** Approaches for the identification of potential excreted/secreted proteins of Leishmania major parasites. *Parasitology* **132(Pt 4)**, 493-509
- Chhajer R, Bhattacharyya A, Didwania N, Shadab M, Das N, Palit P, Vaidya T, Ali N (2016).** Leishmania donovani Aurora kinase: A promising therapeutic target against visceral leishmaniasis. *Biochim Biophys Acta* **1860(9)**, 1973-88
- Chojnacki S, Cowley A, Lee J, Foix A, Lopez R (2017).** Programmatic access to bioinformatics tools from EMBL-EBI update: 2017. *Nucleic Acids Res* **45(W1)**, W550-W553
- Clayton CE (2002).** Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* **21(8)**, 1881-1888
- Clayton C, Shapira M (2007).** Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol* **156(2)**, 93-101
- Cohen P (2009).** Targeting protein kinases for the development of anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Cell Biol* **21(2)**, 317-24
- Cohen-Freue G, Holzer TR, Forney JD, McMaster WR (2007).** Global gene expression in Leishmania. *Int J Parasitol* **37(10)**, 1077-86
- Cole AR (2012).** GSK3 as a Sensor Determining Cell Fate in the Brain. *Front Mol Neurosci* **5**, 4
- Cole AR, Causeret F, Yadirgi G, Hastie CJ, McLauchlan H, McManus EJ, Hernández F, Eickholt BJ, Nikolic M, Sutherland C (2006).** Distinct priming kinases contribute to differential regulation of collapsin response mediator proteins by glycogen synthase kinase-3 in vivo. *J Biol Chem* **281(24)**, 16591-8
- Cole A, Frame S, Cohen P (2004).** Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *Biochem J* **377(Pt1)**, 249-55
- Cooper R, de Jesus AR, Cross GA (1993).** Deletion of an immunodominant Trypanosoma cruzi surface glycoprotein disrupts flagellum-cell adhesion. *J Cell Biol* **122**, 149-156
- Corrales RM, Mathieu-Daudé F, Garcia D, Brenière SF, Sereno D (2010).** An experimental approach for the identification of conserved secreted proteins in trypanosomatids. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 752698
- Cribb P, Serra E (2009).** One- and two-hybrid analysis of the interactions between components of the Trypanosoma cruzi spliced leader RNA gene promoter binding complex. *Int J Parasitol* **39(5)**, 525-32
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995).** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378(6559)**, 785-9

- Cruz A, Beverley SM (1990).** Gene replacement in parasitic protozoa. *Nature* **348(6297)**, 171-3
- Cruz AK, Titus R, Beverley SM (1993).** Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* **90(4)**, 1599-603
- Cuervo P, De Jesus JB, Saboia-Vahia L, Mendonça-Lima L, Domont GB, Cupolillo E (2009).** Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* promastigotes. *J Proteomics* **73(1)**, 79-92
- Culley FJ, Harris RA, Kaye PM, McAdam KP, Raynes JG (1996).** C-reactive protein binds to a novel ligand on *Leishmania donovani* and increases uptake into human macrophages. *J Immunol* **156(12)**, 4691-6
- Cysne-Finkelstein L, Temporal RM, Alves FA, Leon LL (1998).** *Leishmania amazonensis*, long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Exp Parasitol* **89(1)**, 58-62
- Da Silva R, Sacks DL (1987).** Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect Immun* **55(11)**, 2802-6
- Dagger F, Valdivieso E, Marcano AK, Ayesta C (2013).** Regulatory volume decrease in *Leishmania mexicana*: effect of anti-microtubule drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **108(1)**, 84-90
- Dajani R, Fraser E, Roe SM, Young N, Good V, Dale TC, Pearl LH (2001).** Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* **105(6)**, 721-32
- Dan-Goor M, Nasereddin A, Jaber H, Jaffe CL (2013).** Identification of a secreted casein kinase 1 in *Leishmania donovani*: effect of protein over expression on parasite growth and virulence. *PLoS One* **8(11)**, e79287
- David M, Gabdank I, Ben-David M, Zilka A, Orr I, Barash D, Shapira M (2010).** Preferential translation of Hsp83 in *Leishmania* requires a thermosensitive polypyrimidine-rich element in the 3' UTR and involves scanning of the 5' UTR. *RNA* **16(2)**, 364-74
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000).** Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* **351(Pt1)**, 95-105
- Dawson SC, Sagolla MS, Mancuso JJ, Woessner DJ, House SA, Fritz-Laylin L, Cande WZ (2007).** Kinesin-13 regulates flagellar, interphase, and mitotic microtubule dynamics in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot Cell* **6(12)**, 2354-64
- DeRoy S, Keenan AB, Ueno N, Jeronimo SMB, Donelson JE, and Wilson ME (2010).** *Leishmania infantum chagasi*, A genome-based approach to identification of excreted/secreted proteins. *Exp Parasitol* **126(4)**, 582-591
- De Ferrari GV, Inestrosa NC (2000).** Wnt signaling function in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* **33(1)**, 1-12
- Denise H, McNeil K, Brooks DR, Alexander J, Coombs GH, Mottram JC (2003).** Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. *Infect Immun* **71(6)**, 3190-5
- Desjardins M, Descoteaux A (1997).** Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med* **185(12)**, 2061-8
- Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ (1998).** Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* **12 (22)**, 3499-511
- Ding Q, Xia W, Liu JC, Yang JY, Lee DF, Xia J, Bartholomeusz G, Li Y, Pan Y, Li Z, Bargou RC, Qin J, Lai CC, Tsai FJ, Tsai CH, Hung MC (2005).** Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin. *Mol Cell* **19(2)**, 159-70

- Doble BW, Patel S, Wood GA, Kockeritz LK, Woodgett JR (2007).** Functional redundancy of GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines. *Dev Cell* **12(6)**, 957-71
- Doble BW, Woodgett JR (2003).** GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* **116(Pt7)**, 1175-86
- Docampo R, Moreno SN (2011).** Acidocalcisomes. *Cell Calcium* **50(2)**, 113-9
- Docampo R, Pignataro OP (1991).** The inositol phosphate/diacylglycerol signalling pathway in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* **275(Pt2)**, 407-11
- Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W (2005).** Karlsons Biochemie und Pathobiochemie. 15. Auflage, Georg Thieme Verlag KG
- Domenicali Pfister D, Burkard G, Morand S, Renggli CK, Roditi I, Vassella E (2006).** A Mitogen-activated protein kinase controls differentiation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell* **5(7)**, 1126-35
- Dorin D, Le Roch K, Sallicandro P, Alano P, Parzy D, Poulet P, Meijer L, 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(9)**, 2600-8
- Dostálová A, Volf P (2012).** Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors* **5**, 276
- Doudna JA, Charpentier E (2014).** Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346(6213)**, 1258096
- Downing T, Imamura H, Decuypere S, Clark TG, Coombs GH, Cotton JA, Hilley JD, de Doncker S, Maes I, Mottram JC, Quail MA, Rijal S, Sanders M, Schönian G, Stark O, Sundar S, Vanaerschot M, Hertz-Fowler C, Dujardin JC, Berriman M (2011).** Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome Res* **21(12)**, 2143-56
- Droucheau E, Primot A, Thomas V, Mattei D, Knockaert M, Richardson C, Sallicandro P, Alano P, Jafarshad A, Baratte B, Kunick C, Parzy D, Pearl L, Doerig C, Meijer L (2004).** *Plasmodium falciparum* glycogen synthase kinase-3: molecular model, expression, intracellular localisation and selective inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **1697(1-2)**, 181-96
- Duncan SM, Jones NG, Mottram JC (2017).** Recent advances in *Leishmania* reverse genetics: Manipulating a manipulative parasite. *Mol Biochem Parasitol* **216**, 30-38
- Duncan SM, Myburgh E, Philipon C, Brown E, Meissner M, Brewer J, Mottram JC (2016).** Conditional gene deletion with DiCre demonstrates an essential role for CRK3 in *Leishmania mexicana* cell cycle regulation. *Mol Microbiol* **100(6)**, 931-44
- Dunker AK, Lawson JD, Brown CJ, Williams RM, Romero P, Oh JS, Oldfield CJ, Campen AM, Ratliff CM, Hipps KW, Ausio J, Nissen MS, Reeves R, Kang C, Kissinger CR, Bailey RW, Griswold MD, Chiu W, Garner EC, Obradovic Z (2001).** Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model* **19(1)**, 26-59
- Efstathiou A, Gaboriaud-Kolar N, Smirlis D, Myriantopoulos V, Vougianniopoulou K, Alexandratos A, Kritsanida M, Mikros E, Soteriadou K, Skaltsounis AL (2014).** An inhibitor-driven study for enhancing the selectivity of indirubin derivatives towards leishmanial Glycogen Synthase Kinase-3 over leishmanial cdc2-related protein kinase 3. *Parasit Vectors* **7**, 234
- Eintracht J, Maathai R, Mellors A, Ruben L (1998).** Calcium entry in *Trypanosoma brucei* is regulated by phospholipase A2 and arachidonic acid. *Biochem J* **336(Pt3)**, 659-66
- Eira J, Silva CS, Sousa MM, Liz MA (2016).** The cytoskeleton as a novel therapeutic target for old neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol* **141**, 61-82

- Eisenhaber B, Bork P, Eisenhaber F (1999).** Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences. *J Mol Biol* **292(3)**, 741-58
- Eldar-Finkelman H, Schreyer SA, Shinohara MM, LeBoeuf RC, Krebs EG (1999).** Increased glycogen synthase kinase-3 activity in diabetes- and obesity-prone C57BL/6J mice. *Diabetes* **48(8)**, 1662-6
- Ellis J, Sarkar M, Hendriks E, 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(5)**, 1487-99
- Embi N, Rylatt DB, Cohen P (1980).** Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* **107(2)**, 519-27
- Engel BD, Ludington WB, Marshall WF (2009).** Intraflagellar transport particle size scales inversely with flagellar length: revisiting the balance-point length control model. *J Cell Biol* **187(1)**, 81-9
- Erdmann M (2004).** Diplomarbeit, Molekulare Analyse von LmxMPK3, einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase aus *Leishmania mexicana*. Studiengang Biochemie/Molekularbiologie, Universität Hamburg.
- Erdmann M (2009).** Dissertation: LmxMPK3, a mitogen-activated protein kinase involved in length control of a eukaryotic flagellum. Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin. Fachbereich Biologie, Universität Hamburg
- Erdmann M, Scholz A, Melzer IM, Schmetz C, Wiese M (2006).** Interacting protein kinases involved in the regulation of flagellar length. *Mol Biol Cell* **17**, 2035-45.
- Fankhauser N, Mäser P (2005).** Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. *Bioinformatics* **21(9)**, 1846-52
- Feng X, Rodriguez-Contreras D, Buffalo C, Bouwer HG, Kruvad E, Beverley SM, Landfear SM (2009).** Amplification of an alternate transporter gene suppresses the avirulent phenotype of glucose transporter null mutants in *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol* **71(2)**, 369-81
- Feng X, Rodriguez-Contreras D, Polley T, Lye LF, Scott D, Burchmore RJ, Beverley SM, Landfear SM (2013).** 'Transient' genetic suppression facilitates generation of hexose transporter null mutants in *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol* **87(2)**, 412-29
- Field MC, O'Reilly AJ (2008).** How complex is GTPase signaling in trypanosomes? *Trends Parasitol* **24(6)**, 253-7
- Figarella K, Uzcategui NL, Zhou Y, LeFurgey A, Ouellette M, Bhattacharjee H, Mukhopadhyay R (2007).** Biochemical characterization of *Leishmania major* aquaglyceroporin LmAQP1: possible role in volume regulation and osmotaxis. *Mol Microbiol* **65(4)**, 1006-17
- Fiol CJ, Mahrenholz AM, Wang Y, Roeske RW, Roach PJ (1987).** Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. *J Biol Chem* **262(29)**, 14042-8
- Fiol CJ, Wang A, Roeske RW, Roach PJ (1990).** Ordered multisite protein phosphorylation. Analysis of glycogen synthase kinase 3 action using model peptide substrates. *J Biol Chem* **265(11)**, 6061-5
- Flaherty DB, Soria JP, Tomasiewicz HG, Wood JG (2000).** Phosphorylation of human tau protein by microtubule-associated kinases: GSK3beta and cdk5 are key participants. *J Neurosci Res* **62(3)**, 463-72
- Forsberg PO, Martin SC, Nilsson B, Ekman P, Nilsson UR, Engström L (1990).** In vitro phosphorylation of human complement factor C3 by protein kinase A and protein kinase C. Effects on the classical and alternative pathways. *J Biol Chem* **265(5)**, 2941-6



- Frame S and Cohen P (2001).** GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* **359**(Pt 1), 1–16
- Freedman DJ, Beverley SM (1993).** Two more independent selectable markers for stable transfection of Leishmania. *Mol Biochem Parasitol* **62**(1), 37-44
- Gadelha C, Wickstead B, de Souza W, Gull K, Cunha-e-Silva N (2005).** Cryptic paraflagellar rod in endosymbiont-containing kinetoplastid protozoa. *Eukaryot Cell* **4**(3), 516-25
- Gannavaram S, Connelly PS, Daniels MP, Duncan R, Salotra P, Nakhasi HL (2012).** Deletion of mitochondrial associated ubiquitin fold modifier protein Ufm1 in Leishmania donovani results in loss of  $\beta$ -oxidation of fatty acids and blocks cell division in the amastigote stage. *Mol Microbiol* **86**(1), 187-98
- Garg M, Goyal N (2015).** MAPK1 of Leishmania donovani modulates antimony susceptibility by downregulating P-glycoprotein efflux pumps. *Antimicrob Agents Chemother* **59**(7), 3853-63
- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2012).** Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**(39), E2579-86
- Ghalib HW, Piuvezam MR, Skeiky YA, Siddig M, Hashim FA, el-Hassan AM, Russo DM, Reed SG (1993).** Interleukin 10 production correlates with pathology in human Leishmania donovani infections. *J Clin Invest* **92**, 324–9
- Gilinger G, Bellofatto V (2001).** Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res* **29**(7), 1556-64
- Ginger ML, Portman N, McKean PG (2008).** Swimming with protists: perception, motility and flagellum assembly. *Nat Rev Microbiol* **6**(11), 838-50
- Gomez C, Esther Ramirez M, Calixto-Galvez M, Medel O, Rodríguez MA (2010).** Regulation of gene expression in protozoa parasites. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 726045
- Gossage SM, Rogers ME, Bates PA (2003).** Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies, implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol* **33**(10), 1027-1034
- Gosset WS Pseudonym: Student (1908).** The Probable Error of a Mean. *Biometrika* **6** (1), 1–25
- Gould MK, de Koning HP (2011).** Cyclic-nucleotide signalling in protozoa. *FEMS Microbiol Rev* **35**(3), 515-41
- Gould TD, Chen G, Manji HK (2004).** In vivo evidence in the brain for lithium inhibition of glycogen synthase kinase-3. *Neuropsychopharmacology* **29**(1), 32-8
- Grams J, Morris JC, Drew ME, Wang Z, Englund PT, Hajduk SL (2002).** A trypanosome mitochondrial RNA polymerase is required for transcription and replication. *J Biol Chem* **277**(19), 16952-9
- Grimm F, Brun R, Jenni L (1990).** Promastigote infectivity in *Leishmania infantum*. *Parasitol Res* **77**, 185-191
- Grondin K, Papadopoulou B, Ouellette M (1993).** Homologous recombination between direct repeat sequences yields P-glycoprotein containing amplicons in arsenite resistant Leishmania. *Nucleic Acids Res* **21**(8), 1895-901
- Guan KL, Dixon JE (1991).** Eukaryotic proteins expressed in Escherichia coli: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal. Biochem* **192** (2), 262
- Guégan JP, Ezan F, Théret N, Langouët S, Baffet G (2013).** MAPK signaling in cisplatin-induced death: predominant role of ERK1 over ERK2 in human hepatocellular carcinoma cells. *Carcinogenesis* **34**(1), 38-47

- Günzl A, Bruderer T, Laufer G, Schimanski B, Tu LC, Chung HM, Lee PT, Lee MG (2003).** RNA polymerase I transcribes procyclin genes and variant surface glycoprotein gene expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell* **2(3)**, 542-51
- Güttinger A, Schwab C, Morand S, Roditi I, Vassella E (2007).** A mitogen-activated protein kinase of *Trypanosoma brucei* confers resistance to temperature stress. *Mol Biochem Parasitol* **153(2)**, 203-6
- Ha DS, Schwarz JK, Turco SJ, Beverley SM (1996).** Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **77**, 57–64
- Hagen T, Di Daniel E, Culbert AA, Reith AD (2002).** Expression and characterization of GSK-3 mutants and their effect on beta-catenin phosphorylation in intact cells. *J Biol Chem* **277(26)**, 23330-5
- Hammarton TC, Kramer S, Tetley L, Boshart M, Mottram JC (2007a).** *Trypanosoma brucei* Polo-like kinase is essential for basal body duplication, kDNA segregation and cytokinesis. *Mol Microbiol* **65(5)**, 1229-48
- Hammarton TC, Lillico SG, Welburn SC, Mottram JC (2005).** *Trypanosoma brucei* MOB1 is required for accurate and efficient cytokinesis but not for exit from mitosis. *Mol Microbiol* **56(1)**, 104-16
- Hammarton TC, Monnerat S, Mottram JC (2007b).** Cytokinesis in trypanosomatids. *Curr Opin Microbiol* **10(6)**, 520-7
- Hammarton TC, Mottram JC, Doerig C (2003).** The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation. *Prog Cell Cycle Res* **5**, 91-101
- Hanahan D (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166(4)**, 557-80
- Hanks SK (2003).** Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol* **4(5)**, 111
- Hanks SK, Hunter T (1995).** Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* **9(8)**, 576-96
- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988).** The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241(4861)**, 42-52
- Happel N, Stoldt S, Schmidt B, Doenecke D (2009).** M phase-specific phosphorylation of histone H1.5 at threonine 10 by GSK-3. *J Mol Biol* **386(2)**, 339-50
- Harms-Zwingenberger G, Bienzle U (2007).** Nach Deutschland importierte Leishmaniosen. *Dtsch Arztebl* **104(45)**, A-3108/B-2732/C-2639
- Harper JD, Sanders MA, Salisbury JL (1993).** Phosphorylation of nuclear and flagellar basal apparatus proteins during flagellar regeneration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* **122(4)**, 877-86
- Hassani K, Antoniak E, Jardim A, Olivier M (2011).** Temperature-induced protein secretion by *Leishmania mexicana* modulates macrophage signalling and function. *PLoS One* **6(5)**, e18724
- Hawkins T, Mirigian M, Selcuk Yasar M, Ross JL (2010).** Mechanics of microtubules. *J Biomech* **43(1)**, 23-30
- Heinzel FP, Sadick MD, Mutha SS, Locksley RM (1991).** Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci USA* **88(16)**, 7011-5
- Helms MJ, Ambit A, Appleton P, Tetley L, Coombs GH, Mottram JC (2006).** Bloodstream form *Trypanosoma brucei* depend upon multiple metacaspases associated with RAB11-positive endosomes. *J Cell Sci* **119**, 1105-1117

- Hem S, Gherardini PF, Osorio y Fortéa J, Hourdel V, Morales MA, Watanabe R, Pescher P, Kuzyk MA, Smith D, Borchers CH, Zilberstein D, Helmer-Citterich M, Namane A, Späth GF (2010).** Identification of Leishmania-specific protein phosphorylation sites by LC-ESI-MS/MS and comparative genomics analyses. *Proteomics* **10(21)**, 3868-83
- Hergovich A, Lisztwan J, Thoma CR, Wirbelauer C, Barry RE, Krek W (2006).** Priming-dependent phosphorylation and regulation of the tumor suppressor pVHL by glycogen synthase kinase 3. *Mol Cell Biol* **26(15)**, 5784–5796
- Hermoso T, Fishelson Z, Becker SI, Hirschberg K, Jaffe CL (1991).** Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. *EMBO J* **10(13)**, 4061-7
- Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR (2000).** Requirement for glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* **406(6791)**, 86-90
- Horjales S, Schmidt-Arras D, Limardo RR, Leclercq O, Obal G, Prina E, Turjanski AG, Späth GF, Buschiazio A (2012).** The crystal structure of the MAP kinase LmaMPK10 from *Leishmania major* reveals parasite-specific features and regulatory mechanisms. *Structure* **20(10)**, 1649-60
- Hu H, Yu Z, Liu Y, Wang T, Wei Y, Li Z (2014).** The Aurora B kinase in *Trypanosoma brucei* undergoes post-translational modifications and is targeted to various subcellular locations through binding to TbCPC1. *Mol Microbiol* **91(2)**, 256-74
- Hua SB, Wang CC (1997).** Interferon-gamma activation of a mitogen-activated protein kinase, KFR1, in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* **272(16)**, 10797-803
- Huang G, Bartlett PJ, Thomas AP, Moreno SN, Docampo R (2013).** Acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei* have an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor that is required for growth and infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* **110(5)**, 1887-92
- Huang H, Weiss LM, Nagajyothi F, Tanowitz HB, Wittner M, Orr GA, Bao Y (2006).** Molecular cloning and characterization of the protein kinase A regulatory subunit of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **149(2)**, 242-5
- Hughes K, Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF, Woodgett JR (1993).** Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J* **12(2)**, 803-8
- Hughes LC, Ralston KS, Hill KL, Zhou ZH (2012).** Three-dimensional structure of the Trypanosome flagellum suggests that the paraflagellar rod functions as a biomechanical spring. *PLoS One* **7(1)**, e25700
- Hummel HS, Gillespie RD, Swindle J (2000).** Mutational analysis of 3' splice site selection during trans-splicing. *J Biol Chem* **275(45)**, 35522-31
- Huse M, Kuriyan J (2002).** The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109(3)**, 275-82
- Ikeda KN, de Graffenried CL (2012).** Polo-like kinase is necessary for flagellum inheritance in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* **125(Pt13)**, 3173-84
- Ilg T, Demar M, Harbecke D (2001).** Phosphoglycan repeat-deficient *Leishmania mexicana* parasites remain infectious to macrophages and mice. *J Biol Chem* **276(7)**, 4988-97
- Ilg T, Stierhof YD, Craik D, Simpson R, Handman E, Bacic A (1996).** Purification and structural characterization of a filamentous, mucin-like proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* parasites. *J Biol Chem* **271(35)**, 21583-96

Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De Gaudenzi J, Dobson DE, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram JC, Müller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schäfer M, Schein J, Schwartz DC, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmermann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**, 436-42

John von Freyend S (2010). Dissertation: Analysis of LmxMPK4 and LmxMPK6, two mitogen-activated protein kinases of *Leishmania mexicana*. Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin. Fachbereich Biologie, Universität Hamburg

John von Freyend S, Rosenqvist H, Fink A, Melzer IM, Clos J, Jensen ON, Wiese M (2010). LmxMPK4, an essential mitogen-activated protein kinase of *Leishmania mexicana* is phosphorylated and activated by the STE7-like protein kinase LmxMCK5. *Int J Parasitol* **40(8)**, 969-78

Johnson GL, Lapadat R (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298(5600)**, 1911-2

Johnson GL, Nakamura K (2007). The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim Biophys Acta* **1773(8)**, 1341-8

Johnson KA, Rosenbaum JL (1992). Polarity of flagellar assembly in *Chlamydomonas*. *J Cell Biol* **119(6)**, 1605-11

Johnson LN, Noble ME, Owen DJ (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85(2)**, 149-58

Jones DT (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* **292(2)**, 195-202

Jones NG, Thomas EB, Brown E, Dickens NJ, Hammarton TC, Mottram JC (2014). Regulators of *Trypanosoma brucei* cell cycle progression and differentiation identified using a kinome-wide RNAi screen. *PLoS Pathog* **10(1)**, e1003886

Joep RS (1999). Anti-bipolar therapy: mechanism of action of lithium. *Mol Psychiatry* **4(2)**, 117-28

Joep RS, Johnson GV (2004). The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* **29(2)**, 95-102

Julia V, Glaichenhaus N (1999). CD4(+) T cells which react to the *Leishmania major* LACK antigen rapidly secrete interleukin-4 and are detrimental to the host in resistant B10.D2 mice. *Infect Immun* **67(7)**, 3641-4

Kaidanovich-Beilin O, Woodgett JR (2011). GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models. *Front Mol Neurosci* **4**, 40

Käll L, Krogh A, Sonnhammer EL (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol* **338(5)**, 1027-36

Kamhawi S, Ramalho-Ortigao M, Pham VM, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, Barillas-Mury C, Sacks DL, Valenzuela JG (2004). A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* **119(3)**, 329-41

Kane MM, Mosser DM (2000). *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin Hematol* **7(1)**, 26-31

- Kannan N, Neuwald AF (2004).** Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2alpha. *Protein Sci* **13(8)**, 2059-77
- Karow T, Lang-Roth R (2010).** Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *Karow* **18. Auflage**, 1047-48
- Katiyar S, Kufareva I, Behera R, Thomas SM, Ogata Y, Pollastri M, Abagyan R, Mensa-Wilmot K (2013).** Lapatinib-binding protein kinases in the African trypanosome: identification of cellular targets for kinase-directed chemical scaffolds. *PLoS One* **8(2)**, e56150
- Kawakami F, Yamaguchi A, Suzuki K, Yamamoto T, Ohtsuki K (2008).** Biochemical characterization of phospholipids, sulfatide and heparin as potent stimulators for autophosphorylation of GSK-3beta and the GSK-3beta-mediated phosphorylation of myelin basic protein in vitro. *J Biochem* **143(3)**, 359-67
- Kerkela R, Kockeritz L, Macaulay K, Zhou J, Doble BW, Beahm C, Greytak S, Woulfe K, Trivedi CM, Woodgett JR, Epstein JA, Force T, Huggins GS (2008).** Deletion of GSK-3beta in mice leads to hypertrophic cardiomyopathy secondary to cardiomyoblast hyperproliferation. *J Clin Invest* **118(11)**, 3609-18
- Keyse SM (2000).** Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 186-192.
- Killick-Kendrick R, Molyneux DH, Ashford RW (1974).** Leishmania in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **187(1089)**, 409-19
- Kim L, Brzostowski J, Majithia A, Lee NS, McMains V, Kimmel AR (2011).** Combinatorial cell-specific regulation of GSK3 directs cell differentiation and polarity in Dictyostelium. *Development* **138(3)**, 421-30
- Kima PE (2007).** The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int J Parasitol* **37(10)**, 1087-96
- Kima PE, Bonilla JA, Cho E, Ndjamen B, Canton J, Leal N, Handfield M (2010).** Identification of Leishmania Proteins Preferentially Released in Infected Cells Using Change Mediated Antigen Technology (CMAT). *PLoS Negl Trop Dis* **4(10)**, e842
- King TD, Gandy JC, Bijur GN (2006).** The protein phosphatase-1/inhibitor-2 complex differentially regulates GSK3 dephosphorylation and increases sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 levels. *Exp Cell Res* **12(18)**, 3693-700
- Klein PS, Melton DA (1996).** A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA* **93(16)**, 8455-9
- Kohl L, Bastin P (2005).** The flagellum of trypanosomes. *Int Rev Cytol* **244**, 227-85
- Kohl L, Robinson D, Bastin P (2003).** Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *EMBO J* **22(20)**, 5336-46
- Kohl L, Sherwin T, Gull K (1999).** Assembly of the paraflagellar rod and the flagellum attachment zone complex during the Trypanosoma brucei cell cycle. *J Eukaryot Microbiol* **46(2)**, 105-9
- Kong JN, Hardin K, Dinkins M, Wang G, He Q, Mujadzic T, Zhu G, Bielawski J, Spassieva S, Bieberich E (2015).** Regulation of Chlamydomonas flagella and ependymal cell motile cilia by ceramide-mediated translocation of GSK3. *Mol Biol Cell* **26(24)**, 4451-65
- Krupa A, Preethi G, Srinivasan N (2004).** Structural modes of stabilization of permissive phosphorylation sites in protein kinases: distinct strategies in Ser/Thr and Tyr kinases. *J Mol Biol* **339(5)**, 1025-39

- Kuhn D (2005).** Dissertation: *In vitro* und *in vivo* Analyse von LmxPK4, einer MAP Kinase Kinase aus *Leishmania mexicana*. Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin. Fachbereich Chemie, Universität Hamburg
- Kuhn D, Wiese M (2005).** LmxPK4, a mitogen-activated protein kinase kinase homologue of *Leishmania mexicana* with a potential role in parasite differentiation. *Mol Microbiol* **56**, 1169-82
- Kumar P, Wang CC (2006).** Dissociation of cytokinesis initiation from mitotic control in a eukaryote. *Eukaryot Cell* **5(1)**, 92-102
- Kuo WL, Duke CJ, Abe MK, Kaplan EL, Gomes S, Rosner MR (2004).** ERK7 expression and kinase activity is regulated by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **279(22)**, 23073-81
- Kushnir S, Cirstea IC, Basiliya L, Lupilova N, Breitling R, Alexandrov K (2011).** Artificial linear episome-based protein expression system for protozoan *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol* **176(2)**, 69-79
- Laemmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227(5259)**, 680-5
- Lainson R, Ward RD, Shaw JJ (1977).** *Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **199(1135)**, 309-20
- Lambertz U, Silverman JM, Nandan D, McMaster WR, Clos J, Foster LJ, Reiner NE (2012).** Secreted virulence factors and immune evasion in visceral leishmaniasis. *J Leukoc Biol* **91(6)**, 887-99
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007).** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23(21)**, 2947-8
- Laxman S, Beavo JA (2007).** Cyclic nucleotide signaling mechanisms in trypanosomes: possible targets for therapeutic agents. *Mol Interv* **7(4)**, 203-15
- LeBowitz JH, Coburn CM, McMahon-Pratt D, Beverley SM (1990).** Development of a stable *Leishmania* expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **87(24)**, 9736-40
- Lee JH, Nguyen TN, Schimanski B, Günzl A (2007).** Spliced leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei* requires transcription factor TFIIH. *Eukaryot Cell* **6(4)**, 641-9
- Lee K, Du C, Horn M, Rabinow L (1996).** Activity and autophosphorylation of LAMMER protein kinases. *J Biol Chem* **271(44)**, 27299-303
- Li Z, Lee JH, Chu F, Burlingame AL, Günzl A, Wang CC (2008).** Identification of a novel chromosomal passenger complex and its unique localization during cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *PLoS One* **3(6)**, e2354
- Li Z, Umeyama T, Wang CC (2009).** The Aurora Kinase in *Trypanosoma brucei* plays distinctive roles in metaphase-anaphase transition and cytokinetic initiation. *PLoS Pathog* **5(9)**, e1000575
- Li Z, Wang CC (2006).** Changing roles of aurora-B kinase in two life cycle stages of *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell* **5(7)**, 1026-35
- Lim MY, Dailey D, Martin GS, Thorner J (1993).** Yeast MCK1 protein kinase autophosphorylates at tyrosine and serine but phosphorylates exogenous substrates at serine and threonine. *J Biol Chem* **268(28)**, 21155-64
- Liu J, Carvalho LP, Bhattacharya S, Carbone CJ, Kumar KG, Leu NA, Yau PM, Donald RG, Weiss MJ, Baker DP, McLaughlin KJ, Scott P, Fuchs SY (2009).** Mammalian casein kinase 1alpha and its leishmanial ortholog regulate stability of IFNAR1 and type I interferon signaling. *Mol Cell Biol* **29(24)**, 6401-12

- Lochhead PA, Kinstrie R, Sibbet G, Rawjee T, Morrice N, Cleghon V (2006).** A chaperone-dependent GSK3beta transitional intermediate mediates activation-loop autophosphorylation. *Mol Cell* **24(4)**, 627-33
- Logan-Klumpler FJ, De Silva N, Boehme U, Rogers MB, Velarde G, McQuillan JA, Carver T, Aslett M, Olsen C, Subramanian S, Phan I, Farris C, Mitra S, Ramasamy G, Wang H, Tivey A, Jackson A, Houston R, Parkhill J, Holden M, Harb OS, Brunk BP, Myler PJ, Roos D, Carrington M, Smith DF, Hertz-Fowler C, Berriman M (2012).** GeneDB—an annotation database for pathogens. *Nucleic Acids Res* **40** (Database issue):D98-108
- Löscher T, Burchard G-D (2010).** Tropenmedizin in Klinik und Praxis. 4. Auflage, Georg Thieme Verlag KG. Kapitel 51, Leishmaniosen von Harms-Zwingenberger G, 600-616
- Louzir H, Melby PC, Ben Salah A, Marrakchi H, Aoun K, Ben Ismail R, Dellagi K (1998).** Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *J Infect Dis* **177**, 1687–95
- Low SH, Roche PA, Anderson HA, van Ijzendoorn SC, Zhang M, Mostov KE, Weimbs T (1998).** Targeting of SNAP-23 and SNAP-25 in polarized epithelial cells. *J Biol Chem* **273(6)**, 3422-30
- Lu HG, Zhong L, de Souza W, Benchimol M, Moreno S, Docampo R (1998).** Ca<sup>2+</sup> content and expression of an acidocalcisomal calcium pump are elevated in intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Cell Biol* **18(4)**, 2309-23
- Lucas FR, Goold RG, Gordon-Weeks PR, Salinas PC (1998).** Inhibition of GSK-3beta leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by WNT-7a or lithium. *J Cell Sci* **111(Pt10)**, 1351-61
- Lukes J, Hashimi H, Ziková A (2005).** Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr Genet* **48(5)**, 277-99
- Lukes J, Mauricio IL, Schönián G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls K, Tintaya KW, Jirků M, Chocholová E, Haralambous C, Pratloug F, Oborník M, Horák A, Ayala FJ, Miles MA (2007).** Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci USA* **104(22)**, 9375-80
- Luo M, Cao M, Kan Y, Li G, Snell W, Pan J (2011).** The phosphorylation state of an aurora-like kinase marks the length of growing flagella in *Chlamydomonas*. *Curr Biol* **21(7)**, 586-91
- Lye LF, Owens K, Shi H, Murta SM, Vieira AC, Turco SJ, Tschudi C, Ullu E, Beverley SM (2010).** Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. *PLoS Pathog* **6(10)**, e1001161
- Ma J, Benz C, Grimaldi R, Stockdale C, Wyatt P, Frearson J, Hammarton TC (2010).** Nuclear DBF-2-related kinases are essential regulators of cytokinesis in bloodstream stage *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* **285(20)**, 15356-68
- MacAulay K, Doble BW, Patel S, Hansotia T, Sinclair EM, Drucker DJ, Nagy A, Woodgett JR (2007).** Glycogen synthase kinase 3alpha-specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. *Cell Metab* **6(4)**, 329-37
- Maccioni RB, Muñoz JP, Barbeito L (2001).** The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res* **32(5)**, 367-81
- Macek B, Gnad F, Soufi B, Kumar C, Olsen JV, Mijakovic I, Mann M (2008).** Phosphoproteome analysis of *E. coli* reveals evolutionary conservation of bacterial Ser/Thr/Tyr phosphorylation. *Mol Cell Proteomics* **7(2)**, 299-307
- Madeira da Silva L, Owens KL, Murta SM, Beverley SM (2009).** Regulated expression of the *Leishmania major* surface virulence factor lipophosphoglycan using conditionally destabilized fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. **106(18)**, 7583-8

- Magalhães RD, Duarte MC, Mattos EC, Martins VT, Lage PS, Chávez-Fumagalli MA, Lage DP, Menezes-Souza D, Régis WC, Manso Alves MJ, Soto M, Tavares CA, Nagen RA, Coelho EA (2014).** Identification of differentially expressed proteins from *Leishmania amazonensis* associated with the loss of virulence of the parasites. *PLoS Negl Trop Dis* **8(4)**, e2764
- Mahjoub MR, Montpetit B, Zhao L, Finst RJ, Goh B, Kim AC, Quarmby LM (2002).** The FA2 gene of *Chlamydomonas* encodes a NIMA family kinase with roles in cell cycle progression and microtubule severing during deflagellation. *J Cell Sci* **115(Pt8)**, 1759-68
- Mair G, Shi H, Li H, Djikeng A, Aviles HO, Bishop JR, Falcone FH, Gavrilescu C, Montgomery JL, Santori MI, Stern LS, Wang Z, Ullu E, Tschudi C (2000).** A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA* **6(2)**, 163-9
- Mallinson DJ, Coombs GH (1989).** Biochemical characteristics of the metacyclic forms of *Leishmania major* and *L. mexicana mexicana*. *Parasitology* **98(Pt1)**, 7-15
- Mandal G, Sharma M, Kruse M, Sander-Juelch C, Munro LA, Wang Y, Vilg JV, Tamás MJ, Bhattacharjee H, Wiese M, Mukhopadhyay R (2012).** Modulation of *Leishmania major* aquaglyceroporin activity by a mitogen-activated protein kinase. *Mol Microbiol* **85(6)**, 1204-18
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor, New York*
- Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S (2002).** Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci* **27(10)**, 514-20
- Manoukian AS, Woodgett JR (2002).** Role of glycogen synthase kinase-3 in cancer: regulation by Wnts and other signaling pathways. *Adv Cancer Res* **84**, 203-29
- Marshall WF, Rosenbaum JL (2001).** Intraflagellar transport balances continuous turnover of outer doublet microtubules: implications for flagellar length control. *J Cell Biol* **155(3)**, 405-14
- Martenson RE, Law MJ, Deibler GE (1983).** Identification of multiple in vivo phosphorylation sites in rabbit myelin basic protein. *J Biol Chem* **258(2)**, 930-7
- Martínez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda JC, Florencio-Martínez LE, Manning-Cela RG, Figueroa-Angulo EE (2010).** Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 525241
- Martínez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K, Myler PJ (2003).** Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell* **11(5)**, 1291-9
- Matthews KR, Tschudi C, Ullu E (1994).** A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev* **8(4)**, 491-501
- May SF, Peacock L, Almeida Costa CI, Gibson WC, Tetley L, Robinson DR, Hammarton TC (2012).** The *Trypanosoma brucei* AIR9-like protein is cytoskeleton-associated and is required for nucleus positioning and accurate cleavage furrow placement. *Mol Microbiol* **84(1)**, 77-92
- McConville MJ, Mullin KA, Ilgoutz SC, Teasdale RD (2002).** Secretory pathway of trypanosomatid parasites. *Microbiol Mol Biol Rev* **66(1)**, 122-54
- McConville MJ, Naderer T (2011).** Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* **65**, 543-61
- McMahon-Pratt D, Alexander J (2004).** Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunol Rev* **201**, 206-24
- McNicoll F, Müller M, Cloutier S, Boilard N, Rochette A, Dubé M, Papadopoulou B (2005).** Distinct 3'-untranslated region elements regulate stagespecific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*. *J Biol Chem* **280(42)**, 35238-46



- Meijer L, Skaltsounis AL, Magiatis P, Polychronopoulos P, Knockaert M, Leost M, Ryan XP, Vonica CA, Brivanlou A, Dajani R, Crovace C, Tarricone C, Musacchio A, Roe SM, Pearl L, Greengard P (2003).** GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem Biol* **10(12)**, 1255-66
- Mennella V, Tan DY, Buster DW, Asenjo AB, Rath U, Ma A, Sosa HJ, Sharp DJ (2009).** Motor domain phosphorylation and regulation of the Drosophila kinesin 13, KLP10A. *J Cell Biol* **186(4)**, 481-90
- Mittra B, Laranjeira-Silva MF, Perrone Bezerra de Menezes J, Jensen J, Michailowsky V, Andrews NW (2016).** A Trypanosomatid Iron Transporter that Regulates Mitochondrial Function Is Required for Leishmania amazonensis Virulence. *PLoS Pathog* **12(1)**, e1005340
- Miyoshi K, Kasahara K, Miyazaki I, Asanuma M (2011).** Factors that influence primary cilium length. *Acta Med Okayama* **65(5)**, 279-85
- Morales MA, Renaud O, Faigle W, Shorte SL, Späth GF (2007).** Over-expression of *Leishmania major* MAP kinases reveals stage-specific induction of phosphotransferase activity. *Int J Parasitol* **37(11)**, 1187-99
- Morales MA, Pescher P, Späth GF (2010a).** *Leishmania major* MPK7 protein kinase activity inhibits intracellular growth of the pathogenic amastigote stage. *Eukaryot Cell* **9(1)**, 22-30
- Morales MA, Watanabe R, Dacher M, Chafey P, Osorio y Fortéa J, Scott DA, Beverley SM, Ommen G, Clos J, Hem S, Lenormand P, Rousselle JC, Namane A, Späth GF (2010b).** Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the *Leishmania donovani* infectious stage. *Proc Natl Acad Sci USA* **107(18)**, 8381-6
- Moreira BP, Fonseca CK, Hammarton TC, Baqui MM (2017).** Giant FAZ10 is required for flagellum attachment zone stabilization and furrow positioning in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* **130(6)**, 1179-1193
- Moreira D, Santarém N, Loureiro I, Tavares J, Silva AM, Amorim AM, Ouaiissi A, Cordeiro-da-Silva A, Silvestre R (2012).** Impact of continuous axenic cultivation in *Leishmania infantum* virulence. *PLoS Negl Trop Dis* **6(1)**, e1469
- Moreno SN, Silva J, Vercesi AE, Docampo R (1994).** Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *J Exp Med* **180(4)**, 1535-40
- Morfini G, Szebenyi G, Brown H, Pant HC, Pigino G, DeBoer S, Beffert U, Brady ST (2004).** A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *EMBO J* **23(11)**, 2235-45
- Morga B, Bastin P (2013).** Getting to the heart of intraflagellar transport using *Trypanosoma* and *Chlamydomonas* models: the strength is in their differences. *Cilia* **2(1)**, 16
- Morgan DO (1997).** Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 261-91
- Morrison DK (2012).** MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4(11)**, a011254
- Mosser DM, Brittingham A (1997).** *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology* **115**, S9-23
- Mosser DM, Miles SA (2007).** Avoidance of innate immune mechanisms by the protozoan parasite *Leishmania* spp. *Landes Bioscience* **9**, 118-129
- Mougueau E, Bihl F, Glaichenhaus N (2011).** Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol Rev* **240(1)**, 286-96
- Mukhopadhyay AG, Dey CS (2016).** Reactivation of flagellar motility in demembrated *Leishmania* reveals role of cAMP in flagellar wave reversal to ciliary waveform. *Sci Rep* **6**, 37308

- Müller IB, Domenicali-Pfister D, Roditi I, Vassella E (2002).** Stage-specific requirement of a mitogen-activated protein kinase by *Trypanosoma brucei*. *Mol Biol Cell* **13**(11), 3787-99
- Muñoz-Montaño JR, Moreno FJ, Avila J, Diaz-Nido J (1997).** Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett* **411**(2-3), 183-8
- Munro LA (2013).** PhD thesis, Analysis of LmxMPK2 and LmxGSK3- $\beta$ , two protein kinases important for the survival of *Leishmania mexicana*. Strathclyde Institute of Pharmacy & Biomedical Sciences, University of Strathclyde, Glasgow, Scotland
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005).** Advances in leishmaniasis. *Lancet* **366**(9496), 1561-77
- Myškova J, Svobodova M, Beverley SM, Volf P (2007).** A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes Infect* **9**(3), 317-24
- Naderer T, Heng J, McConville MJ (2010).** Evidence that intracellular stages of *Leishmania major* utilize amino sugars as a major carbon source. *PLoS Pathog* **6**(12), e1001245
- Naderer T, Vince JE, McConville MJ (2004).** Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Curr Mol Med* **4**(6), 649-65
- Nakayasu ES, Gaynor MR, Sobreira TJ, Ross JA, Almeida IC (2009).** Phosphoproteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at the epimastigote stage. *Proteomics* **9**(13), 3489-506
- Naula C, Parsons M, Mottram JC (2005).** Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochim Biophys Acta* **1754**(1-2), 151-9
- Needleman SB, Wunsch CD (1970).** A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol* **48**(3), 443-53
- Nett IR, Davidson L, Lamont D, Ferguson MA (2009a).** Identification and specific localization of tyrosine-phosphorylated proteins in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell* **8**(4), 617-26
- Nett IR, Martin DM, Miranda-Saavedra D, Lamont D, Barber JD, Mehlert A, Ferguson MA (2009b).** The phosphoproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*, causative agent of African sleeping sickness. *Mol Cell Proteomics* **8**(7), 1527-38
- Noble W, Olm V, Takata K, Casey E, Mary O, Meyerson J, Gaynor K, LaFrancois J, Wang L, Kondo T, Davies P, Burns M, Veeranna, Nixon R, Dickson D, Matsuoka Y, Ahljianian M, Lau LF, Duff K (2003).** Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron* **38**(4), 555-65
- Nozaki T, Toh-e A, Fujii M, Yagisawa H, Nakazawa M, Takeuchi T (1999).** Cloning and characterization of a gene encoding phosphatidyl inositol-specific phospholipase C from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **102**(2), 283-95
- Nurul Aiezzah Z, Noor E, Hasidah MS (2010).** Suppression of *Plasmodium berghei* parasitemia by LiCl in an animal infection model. *Trop Biomed* **27**(3), 624-31
- Oberholzer M, Marti G, Baresic M, Kunz S, Hemphill A, Seebeck T (2007).** The *Trypanosoma brucei* cAMP phosphodiesterases TbrPDEB1 and TbrPDEB2: flagellar enzymes that are essential for parasite virulence. *FASEB J* **21**(3), 720-31
- Odiwuor S, De Doncker S, Maes I, Dujardin JC, Van der Auwera G (2011).** Natural *Leishmania donovani/Leishmania aethiopia* hybrids identified from Ethiopia. *Infect Genet Evol* **11**(8), 2113-8
- Oduor RO, Ojo KK, Williams GP, Bertelli F, Mills J, Maes L, Pryde DC, Parkinson T, Van Voorhis WC, Holler TP (2011).** *Trypanosoma brucei* glycogen synthase kinase-3, a target for anti-trypanosomal drug development: a public-private partnership to identify novel leads. *PLoS Negl Trop Dis* **5**(4), e1017

- Ogbadoyi EO, Robinson DR, Gull K (2003).** A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes. *Mol Biol Cell* **14(5)**, 1769-79
- Oh MH, Wang X, Clouse SD, Huber SC (2012).** Deactivation of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1) receptor kinase by autophosphorylation within the glycine-rich loop. *Proc Natl Acad Sci USA* **109(1)**, 327-32
- Ohtani M, Nagai S, Kondo S, Mizuno S, Nakamura K, Tanabe M, Takeuchi T, Matsuda S, Koyasu S (2008).** Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. *Blood* **112(3)**, 635-43
- Ojo KK, Arakaki TL, Napuli AJ, Inampudi KK, Keyloun KR, Zhang L, Hol WG, Verlinde CL, Merritt EA, Van Voorhis WC (2011).** Structure determination of glycogen synthase kinase-3 from *Leishmania major* and comparative inhibitor structure-activity relationships with *Trypanosoma brucei* GSK-3. *Mol Biochem Parasitol* **176(2)**, 98-108
- Ojo KK, Gillespie JR, Riechers AJ, Napuli AJ, Verlinde CL, Buckner FS, Gelb MH, Domostoj MM, Wells SJ, Scheer A, Wells TN, Van Voorhis WC (2008).** Glycogen synthase kinase 3 is a potential drug target for African trypanosomiasis therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **52(10)**, 3710-7
- Okamura H, Garcia-Rodriguez C, Martinson H, Qin J, Virshup DM, Rao A (2004).** A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. *Mol Cell Biol* **24(10)**, 4184-95
- Olivier M, Gregory DJ, Forget G (2005).** Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response, a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* **18(2)**, 293-305
- Ou Y, Ruan Y, Cheng M, Moser JJ, Rattner JB, van der Hoorn FA (2009).** Adenylate cyclase regulates elongation of mammalian primary cilia. *Exp Cell Res* **15(16)**, 2802-17
- Ouellette M, Hetteima E, Wüst D, Fase-Fowler F, Borst P (1991).** Direct and inverted DNA repeats associated with P-glycoprotein gene amplification in drug resistant *Leishmania*. *EMBO J* **10(4)**, 1009-16
- Overath P, Stierhof YD, Wiese M (1997).** Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites - Tumultuous traffic in a pocket. *Trends Cell Biol* **7(1)**, 27-33
- Oyola SO, Evans KJ, Smith TK, Smith BA, Hilley JD, Mottram JC, Kaye PM, Smith DF (2012).** Functional analysis of *Leishmania* cyclopropane fatty acid synthetase. *PLoS* **7(12)**, e51300
- Palenchar JB, Liu W, Palenchar PM, Bellofatto V (2006).** A divergent transcription factor TFIIB in trypanosomes is required for RNA polymerase II-dependent spliced leader RNA transcription and cell viability. *Eukaryot Cell* **5(2)**, 293-300
- Palumbo E (2010).** Treatment strategies for mucocutaneous leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* **2(2)**, 147-50
- Papadopoulou B, Roy G, Ouellette M (1994).** Autonomous replication of bacterial DNA plasmid oligomers in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **65(1)**, 39-49
- Papadopoulou D, Bianchi MW, Bourouis M (2004).** Functional studies of shaggy/glycogen synthase kinase 3 phosphorylation sites in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **24(11)**, 4909-19
- Parsons M, Nelson RG, Watkins KP, Agabian N (1984).** Trypanosome mRNAs share a common 5' spliced leader sequence. *Cell* **38(1)**, 309-16
- Parsons M, Ruben L (2000).** Pathways involved in environmental sensing in trypanosomatids. *Parasitol Today* **16(2)**, 56-62

- Parsons M, Worthey EA, Ward PN, Mottram JC (2005).** Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* **6**, 127
- Passos-Silva DG, Rajão MA, Nascimento de Aguiar PH, Vieira-da-Rocha JP, Machado CR, Furtado C (2010).** Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. *J Nucleic Acids* **2010**, 840768
- Pavli A, Maltezos HC (2010).** Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *Int J Infect Dis* **14(12)**, e1032-9
- Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream MA, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead S, Rabinowitsch E, Arrowsmith C, White B, Thurston S, Bringaud F, Baldauf SL, Faulconbridge A, Jeffares D, Depledge DP, Oyola SO, Hilley JD, Brito LO, Tosi LR, Barrell B, Cruz AK, Mottram JC, Smith DF, Berriman M (2007).** Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* **39**, 839-47
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001).** Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22(2)**, 153-83
- Peters DJ, Snaar-Jagalska BE, Van Haastert PJ, Schaap P (1992).** Lithium, an inhibitor of cAMP-induced inositol 1,4,5-trisphosphate accumulation in *Dictyostelium discoideum*, inhibits activation of guanine-nucleotide-binding regulatory proteins, reduces activation of adenylcyclase, but potentiates activation of guanylyl cyclase by cAMP. *Eur J Biochem* **209(1)**, 299-304
- Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D (2008).** In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* **321(5891)**, 970-4
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011).** SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* **8(10)**, 785-6
- Petritis PM, Manzoni-de-Almeida D, Gimblet C, Gonzalez Lombana C, Scott P (2012).** *Leishmania mexicana* induces limited recruitment and activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells early during infection. *PLoS Negl Trop Dis* **6(10)**, e1858
- Piani A, Ilg T, Elefanty AG, Curtis J, Handman E (1999).** *Leishmania major* proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function. *Microbes Infect* **1(8)**, 589-99
- Piao T, Luo M, Wang L, Guo Y, Li D, Li P, Snell WJ, Pan J (2009).** A microtubule depolymerizing kinesin functions during both flagellar disassembly and flagellar assembly in *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci USA* **106(12)**, 4713-8
- Piperno G, Huang B, Ramanis Z, Luck DJ (1981).** Radial spokes of *Chlamydomonas* flagella: polypeptide composition and phosphorylation of stalk components. *J Cell Biol* **88(1)**, 73-9
- Piperno G, Luck DJ (1976).** Phosphorylation of axonemal proteins in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **251(7)**, 2161-7
- Ploubidou A, Robinson DR, Docherty RC, Ogbadoyi EO, Gull K (1999).** Evidence for novel cell cycle checkpoints in trypanosomes: kinetoplast segregation and cytokinesis in the absence of mitosis. *J Cell Sci* **112(Pt24)**, 4641-50
- Polakis P (2000).** Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* **14(15)**, 1837-51
- Portman N, Gull K (2014).** Identification of paralogous life-cycle stage specific cytoskeletal proteins in the parasite *Trypanosoma brucei*. *PLoS One* **9(9)**, e106777

- Portman N, Lacomble S, Thomas B, McKean PG, Gull K (2009).** Combining RNA interference mutants and comparative proteomics to identify protein components and dependences in a eukaryotic flagellum. *J Biol Chem* **284(9)**, 5610-9
- Pradel LC, Bonhivers M, Landrein N, Robinson DR (2006).** NIMA-related kinase TbNRKC is involved in basal body separation in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* **119(Pt9)**, 1852-63
- Prasad A, Kaur S, Malla N, Ganguly NK, Mahajan RC (2001).** Ca<sup>2+</sup> signaling in the transformation of promastigotes to axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. *Mol Cell Biochem* **224(1-2)**, 39-44
- Pratt WB, Morishima Y, Osawa Y (2008).** The Hsp90 chaperone machinery regulates signaling by modulating ligand binding clefts. *J Biol Chem* **283(34)**, 22885-9
- Prinz B, Harvey KL, Wilcke L, Ruch U, Engelberg K, Biller L, Lucet I, Erkelenz S, Heincke D, Spielmann T, Doerig C, Kunick C, Crabb BS, Gilson PR, Gilberger TW (2016).** Hierarchical phosphorylation of apical membrane antigen 1 is required for efficient red blood cell invasion by malaria parasites. *Sci Rep* **6**, 34479
- Puentes SM, Da Silva RP, Sacks DL, Hammer CH, Joiner KA (1990).** Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J Immunol* **145(12)**, 4311-6
- Qi H, Ji J, Wanasen N, Soong L (2004).** Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* **72(2)**, 988-95
- Qi M, Elion EA (2005).** MAP kinase pathways. *J Cell Sci* **118(Pt 16)**, 3569-72
- Qian W, Shi J, Yin X, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX, Liu F (2010).** PP2A regulates tau phosphorylation directly and also indirectly via activating GSK-3beta. *J Alzheimers Dis* **19(4)**, 1221-9
- Qin H, Diener DR, Geimer S, Cole DG, Rosenbaum JL (2004).** Intraflagellar transport (IFT) cargo: IFT transports flagellar precursors to the tip and turnover products to the cell body. *J Cell Biol* **164(2)**, 255-66
- Quijada L, Soto M, Alonso C, Requena JM (2000).** Identification of a putative regulatory element in the 3'-untranslated region that controls expression of HSP70 in *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol* **110(1)**, 79-91
- Rachidi N, Taly JF, Durieu E, Leclercq O, Aulner N, Prina E, Pescher P, Notredame C, Meijer L, Späth GF (2014).** Pharmacological assessment defines *Leishmania donovani* casein kinase 1 as a drug target and reveals important functions in parasite viability and intracellular infection. *Antimicrob Agents Chemother* **58(3)**, 1501-15
- Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995).** Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* **270(13)**, 7420-6
- Ramalho-Ortigao M, Saraiva EM, Traub-Csekö YM (2010).** Sand fly-*Leishmania* interactions: long relationships are not necessarily easy. *Open Parasitol J* **4**, 195-204
- Ravel C, Cortes S, Pratlong F, Morio F, Dedet JP, Campino L (2006).** First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *Int J Parasitol* **36(13)**, 1383-8
- Real F, Vidal RO, Carazzolle MF, Mondego JM, Costa GG, Herai RH, Würtele M, de Carvalho LM, Carmona e Ferreira R, Mortara RA, Barbiéri CL, Mieczkowski P, da Silveira JF, Briones MR, Pereira GA, Bahia D (2013).** The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. *DNA Res* **20(6)**, 567-81
- Ridgley E, Webster P, Patton C, Ruben L (2000).** Calmodulin-binding properties of the paraflagellar rod complex from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **109(2)**, 195-201

- Robbins DJ, Zhen E, Owaki H, Vanderbilt CA, Ebert D, Geppert TD, Cobb MH (1993).** Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *J Biol Chem* **268**(7), 5097-106
- Roberts MT (2006).** Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br Med Bull* **75-76**, 115-30
- Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates PA, Depledge DP, Harris D, Her Y, Herzyk P, Imamura H, Otto TD, Sanders M, Seeger K, Dujardin JC, Berriman M, Smith DF, Hertz-Fowler C, Mottram JC (2011).** Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Res* **21**(12), 2129-42
- Rogers ME (2012).** The role of leishmania proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the Mammalian host. *Front Microbiol* **3**, 223
- Rogers ME, Chance ML, Bates PA (2002).** The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* **124**(Pt 5), 495-507
- Rogers ME, Hajmová M, Joshi MB, Sadlova J, Dwyer DM, Volf P, Bates PA (2008).** *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cell Microbiol* **10**(6), 1363-72
- Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA (2004).** Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* **430**(6998), 463-7
- Rolin S, Paindavoine P, Hanocq-Quertier J, Hanocq F, Claes Y, Le Ray D, Overath P, Pays E (1993).** Transient adenylate cyclase activation accompanies differentiation of *Trypanosoma brucei* from bloodstream to procyclic forms. *Mol Biochem Parasitol* **61**(1), 115-25
- Romani AMP (2007).** Magnesium homeostasis in mammalian cells. *Front Biosci* **12**, 308-31
- Romero P, Obradovic Z, Li X, Garner EC, Brown CJ, Dunker AK (2001).** Sequence complexity of disordered protein. *Proteins* **42**(1), 38-48
- Rosenbaum JL, Witman GB (2002).** Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(11), 813-25
- Rosenqvist H (2011).** PhD thesis, *Leishmania mexicana* phosphoproteomics. Strathclyde Institute of Pharmacy & Biomedical Sciences, University of Strathclyde, Glasgow, Scotland
- Rosenzweig D, Smith D, Myler PJ, Olafson RW, Zilberstein D (2008a).** Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. *Proteomics* **8**(9), 1843-50
- Rosenzweig D, Smith D, Oppendoes F, Stern S, Olafson RW, Zilberstein D (2008b).** Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB J* **22**(2), 590-602
- Rothberg KG, Burdette DL, Pfannstiel J, Jetton N, Singh R, Ruben L (2006).** The RACK1 homologue from *Trypanosoma brucei* is required for the onset and progression of cytokinesis. *J Biol Chem* **281**, 9781-9790
- Rovai L, Tripp C, Stuart K, Simpson L (1992).** Recurrent polymorphisms in small chromosomes of *Leishmania tarentolae* after nutrient stress or subcloning. *Mol Biochem Parasitol* **50**(1), 115-25
- Ruan JP, Arhin GK, Ullu E, Tschudi C (2004).** Functional characterization of a *Trypanosoma brucei* TATA-binding protein-related factor points to a universal regulator of transcription in trypanosomes. *Mol Cell Biol* **24**(21), 9610-8

**Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, Gabor Miklos GL, Nelson CR, Hariharan IK, Fortini ME, Li PW, Apweiler R, Fleischmann W, Cherry JM, Henikoff S, Skupski MP, Misra S, Ashburner M, Birney E, Boguski MS, Brody T, Brokstein P, Celniker SE, Chervitz SA, Coates D, Cravchik A, Gabrielian A, Galle RF, Gelbart WM, George RA, Goldstein LS, Gong F, Guan P, Harris NL, Hay BA, Hoskins RA, Li J, Li Z, Hynes RO, Jones SJ, Kuehl PM, Lemaitre B, Littleton JT, Morrison DK, Mungall C, O'Farrell PH, Pickeral OK, Shue C, Vossball LB, Zhang J, Zhao Q, Zheng XH, Lewis S (2000).** Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **287(5461)**, 2204-15

**Rylatt DB, Aitken A, Bilham T, Condon GD, Embi N, Cohen P (1980).** Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Amino acid sequence at the sites phosphorylated by glycogen synthase kinase-3, and extension of the N-terminal sequence containing the site phosphorylated by phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* **107(2)**, 529-37

**Ryves WJ, Harwood AJ (2001).** Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem Biophys Res Commun* **280(3)**, 720-5

**Sacerdoti-Sierra N, Jaffe CL (1997).** Release of Ecto-protein Kinases by the Protozoan Parasite *Leishmania major*. *J Biol Chem* **272(49)**, 30760-5

**Sachdev D, Chirgwin JM (1998).** Solubility of proteins isolated from inclusion bodies is enhanced by fusion to maltose-binding protein or thioredoxin. *Protein Expr Purif* **12(1)**, 122-132

**Sacks DL, Perkins PV (1984).** Identification of an infective stage of *Leishmania promastigotes*. *Science* **223(4643)**, 1417-9

**Sádlová J, Svobodová M, Volf P (1999).** *Leishmania major*, effect of repeated passages through sandfly vectors or murine hosts. *Ann Trop Med Parasitol* **93(6)**, 599-611

**Sahasrabudde AA, Nayak RC, Gupta CM (2009).** Ancient *Leishmania coronin* (CRN12) is involved in microtubule remodeling during cytokinesis. *J Cell Sci* **122(Pt10)**, 1691-9

**Saksela K, Mäkelä TP, Hughes K, Woodgett JR, Alitalo K (1992).** Activation of protein kinase C increases phosphorylation of the L-myc trans-activator domain at a GSK-3 target site. *Oncogene* **7(2)**, 347-53

**Salmon D, Bachmaier S, Krumbholz C, Kador M, Gossmann JA, Uzureau P, Pays E, Boshart M (2012).** Cytokinesis of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms depends on expression of adenylyl cyclases of the ESAG4 or ESAG4-like subfamily. *Mol Microbiol* **84(2)**, 225-42

**Saravanan P, Venkatesan SK, Mohan CG, Patra S, Dubey VK (2010).** Mitogen-activated protein kinase 4 of *Leishmania* parasite as a therapeutic target. *Eur J Med Chem* **45(12)**, 5662-70

**Saunders EC, Ng WW, Kloehn J, Chambers JM, Ng M, McConville MJ (2014).** Induction of a stringent metabolic response in intracellular stages of *Leishmania mexicana* leads to increased dependence on mitochondrial metabolism. *PLoS Pathog* **10(1)**, e1003888

**Scales TM, Lin S, Kraus M, Goold RG, Gordon-Weeks PR (2009).** Nonprimed and DYRK1A-primed GSK3 beta-phosphorylation sites on MAP1B regulate microtubule dynamics in growing axons. *J Cell Sci* **122(Pt14)**, 2424-35

**Schimanski B, Nguyen TN, Günzl A (2005a).** Characterization of a multisubunit transcription factor complex essential for spliced-leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* **25(16)**, 7303-13

**Schimanski B, Nguyen TN, Günzl A (2005b).** Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. *Eukaryot Cell* **4(11)**, 1942-50

**Schlein Y, Jacobson RL, Messer G (1992).** *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and impede parasite transmission by bite. *Proc Natl Acad Sci USA* **89(20)**, 9944-8

- Schoijet AC, Miranda K, Medeiros LC, de Souza W, Flawiá MM, Torres HN, Pignataro OP, Docampo R, Alonso GD (2011).** Defining the role of a FYVE domain in the localization and activity of a cAMP phosphodiesterase implicated in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol* **79(1)**, 50-62
- Scholz A (2008).** Dissertation: Interagierende Proteinkinasen in *Leishmania mexicana*, die an der Regulation der Flagellenlänge beteiligt sind. Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin. Fachbereich Chemie, Universität Hamburg
- Scott DA, Hickerson SM, Vickers TJ, Beverley SM (2008).** The role of the mitochondrial glycine cleavage complex in the metabolism and virulence of the protozoan parasite *Leishmania major*. *J Biol Chem* **283(1)**, 155-65
- Scott JD, Pawson T (2009).** Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. *Science* **326(5957)**, 1220-4
- Segovia M, Artero JM, Mellado E, Chance ML (1992).** Effects of long-term in vitro cultivation on the virulence of cloned lines of *Leishmania major* promastigotes. *Ann Trop Med Parasitol* **86(4)**, 347-54
- Sen Santara S, Roy J, Mukherjee S, Bose M, Saha R, Adak S (2013).** Globin-coupled heme containing oxygen sensor soluble adenylate cyclase in *Leishmania* prevents cell death during hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* **110(42)**, 16790-5
- Sengupta A, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Singh TJ (1997).** Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5. *Mol Cell Biochem* **167(1-2)**, 99-105
- Serafim TD, Figueiredo AB, Costa PA, Marques-da-Silva EA, Gonçalves R, de Moura SA, Gontijo NF, da Silva SM, Michalick MS, Meyer-Fernandes JR, de Carvalho RP, Uliana SR, Fietto JL, Afonso LC (2012).** *Leishmania* metacyclogenesis is promoted in absence of purines. *PLoS Negl Trop Dis* **6(9)**, e1833
- Sewing A, Wiseman B, Lloyd AC, Land H (1997).** High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol* **17(9)**, 5588-97
- Shankar A, Mitchen TK, Hall LR, Turco SJ, Titus RG (1993).** Reversion to virulence in *Leishmania major* correlates with expression of surface lipophosphoglycan. *Mol Biochem Parasitol* **61(2)**, 207-16
- Sherwin T, Gull K (1989).** Visualization of detyrosination along single microtubules reveals novel mechanisms of assembly during cytoskeletal duplication in trypanosomes. *Cell* **57(2)**, 211-21
- Silverman JM, Chan SK, Robinson DP, Dwyer DM, Nandan D, Foster LJ, Reiner NE (2008).** Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol* **9(2)**, R35
- Silverman JM, Clos J, de'Oliveira CC, Shirvani O, Fang Y, Wang C, Foster LJ, Reiner NE (2010).** An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci* **123(Pt 6)**, 842-52
- Siman-Tov MM, Ivens AC, Jaffe CL (2001).** Identification and cloning of Lmairk, a member of the Aurora/Ipl1p protein kinase family, from the human protozoan parasite *Leishmania*. *Biochim Biophys Acta* **1519(3)**, 241-5
- Sinclair-Davis AN, McAllaster MR, de Graffenried CL (2017).** A functional analysis of TOEFAZ1 uncovers protein domains essential for cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* **130(22)**, 3918-3932
- Sinha PK, Pandey K, Bhattacharya SK (2005).** Diagnosis & management of leishmania/HIV co-infection. *Indian J Med Res* **121(4)**, 407-14
- Sollelis L, Ghorbal M, MacPherson CR, Martins RM, Kuk N, Crobu L, Bastien P, Scherf A, Lopez-Rubio JJ, Sterkers Y (2015).** First efficient CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania* parasites. *Cell Microbiol* **17(10)**, 1405-12



- Solomon MJ, Kaldis P (1998).** Regulation of CDKs by phosphorylation. *Results Probl Cell Differ* **22**, 79-109
- Song L, Dentler WL (2001).** Flagellar protein dynamics in Chlamydomonas. *J Biol Chem* **276(32)**, 29754-63
- Sousa LM, Carneiro MB, Resende ME, Martins LS, Dos Santos LM, Vaz LG, Mello PS, Mosser DM, Oliveira MA, Vieira LQ (2014).** Neutrophils have a protective role during early stages of Leishmania amazonensis infection in BALB/c mice. *Parasite Immunol* **36(1)**, 13-31
- Späth GF, Epstein L, Leader B, Singer SM, Avila HA, Turco SJ, Beverley SM (2000).** Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite Leishmania major. *Proc Natl Acad Sci USA* **97(16)**, 9258-63
- Späth GF, Lye LF, Segawa H, Turco SJ, Beverley SM (2004).** Identification of a compensatory mutant (lpg2-REV) of Leishmania major able to survive as amastigotes within macrophages without LPG2-dependent glycoconjugates and its significance to virulence and immunization strategies. *Infect Immun* **72(6)**, 3622-7
- Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR (1996).** Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol* **6(12)**, 1664-8
- Stanford University (2007), ParaSite-website:**  
<http://web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2007/ImmuneEvasion/>
- Sterkers Y, Lachaud L, Bourgeois N, Crobu L, Bastien P, Pagès M (2012).** Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in Leishmania. *Mol Microbiol* **86(1)**, 15-23
- Stojdl DF, Clarke MW (1996).** Trypanosoma brucei: analysis of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> during differentiation of bloodstream stages in vitro. *Exp Parasitol* **83(1)**, 134-46
- Subramanya S, Hardin CF, Steverding D, Mensa-Wilmot K (2009).** Glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase C regulates transferrin endocytosis in the African trypanosome. *Biochem J* **417(3)**, 685-94
- Sudduth TL, Wilson JG, Everhart A, Colton CA, Wilcock DM (2012).** Lithium treatment of APPSwDI/NOS2<sup>-/-</sup> mice leads to reduced hyperphosphorylated tau, increased amyloid deposition and altered inflammatory phenotype. *PLoS One* **7(2)**, e31993
- Sudeck H (2006).** Kala Azar, seltener Import und wichtige Differenzialdiagnose. *Internist* **47(8)**, 825-8
- Suganuma T, Workman JL (2012).** MAP kinases and histone modification. *J Mol Cell Biol* **4(5)**, 348-50
- Sun SY, Wang C, Yuan YA, He CY (2013).** An intracellular membrane junction consisting of flagellum adhesion glycoproteins links flagellum biogenesis to cell morphogenesis in Trypanosoma brucei. *J Cell Sci* **126(Pt2)**, 520-31
- Sundar S, Chakravarty J (2010).** Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: dose and response. *J Glob Infect Dis* **2(2)**, 159-66
- Sundar S, Chakravarty J (2013).** Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother* **14(1)**, 53-63
- Sunter JD, Gull K (2016).** The Flagellum Attachment Zone: 'The Cellular Ruler' of Trypanosome Morphology. *Trends Parasitol* **32(4)**, 309-324
- Sutherland C, Cohen P (1994).** The alpha-isoform of glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle is inactivated by p70 S6 kinase or MAP kinase-activated protein kinase-1 in vitro. *FEBS Lett* **338(1)**, 37-42

- Sutherland C, Leighton IA, Cohen P (1993).** Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J* **296(Pt1)**, 15-9
- Tam LW, Ranum PT, Lefebvre PA (2013).** CDKL5 regulates flagellar length and localizes to the base of the flagella in *Chlamydomonas*. *Mol Biol Cell* **24(5)**, 588-600
- Tam LW, Wilson NF, Lefebvre PA (2007).** A CDK-related kinase regulates the length and assembly of flagella in *Chlamydomonas*. *J Cell Biol* **176(6)**, 819-29
- Tamma TV, Sahasrabudde AA, Bajpai VK, Gupta CM (2010).** ADF/cofilin-driven actin dynamics in early events of *Leishmania* cell division. *J Cell Sci* **123(Pt 11)**, 1894-901
- Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E (2000).** A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol* **2(2)**, 110-6
- Taylor MC, Kelly JM (2006).** pTcINDEX, a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Biotechnol* **6**, 32
- ter Haar E, Coll JT, Austen DA, Hsiao HM, Swenson L, Jain J (2001).** Structure of GSK3beta reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nat Struct Biol* **8(7)**, 593-6
- Thiel M, Harder S, Wiese M, Kroemer M, Bruchhaus I (2008).** Involvement of a *Leishmania* thymidine kinase in flagellum formation, promastigote shape and growth as well as virulence. *Mol Biochem Parasitol* **158(2)**, 152-62
- Thoma CR, Frew IJ, Hoerner CR, Montani M, Moch H, Krek W (2007).** pVHL and GSK3beta are components of a primary cilium-maintenance signalling network. *Nat Cell Biol* **9(5)**, 588-95
- Thomas GM, Frame S, Goedert M, Nathke I, Polakis P, Cohen P (1999).** A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of axin and beta-catenin. *FEBS Lett* **458(2)**, 245-51
- Thomas SR, Keller CA, Szyk A, Cannon JR, LaRonde-LeBlanc NA (2011).** Structural insight into the functional mechanism of Nep1/Emg1 N1-specific pseudouridine methyltransferase in ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res* **39(6)**, 2445-2457
- Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood CD, Aronshtam A, Clements JL, Sabio G, Davis RJ, Matthews DE, Doble B, Rincon M (2008).** Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science* **320(5876)**, 667-70
- Titus RG, Ribeiro JM (1988).** Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* **239(4845)**, 1306-8
- Tran KD, Vieira DP, Sanchez MA, Valli J, Gluenz E, Landfear SM (2015).** Kharon1 null mutants of *Leishmania mexicana* are avirulent in mice and exhibit a cytokinesis defect within macrophages. *PLoS One* **10(8)**, e0134432
- Tsigankov P, Gherardini PF, Helmer-Citterich M, Späth GF, Zilberstein D (2013).** Phosphoproteomic analysis of differentiating *Leishmania* parasites reveals a unique stage-specific phosphorylation motif. *J Proteome Res* **12(7)**, 3405-12
- Tu X, Kumar P, Li Z, Wang CC (2006).** An aurora kinase homologue is involved in regulating both mitosis and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* **281(14)**, 9677-87
- Turco SJ, Späth GF, Beverley SM (2001).** Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends Parasitol* **17(5)**, 223-6
- Ubeda JM, Légaré D, Raymond F, Ouameur AA, Boisvert S, Rigault P, Corbeil J, Tremblay MJ, Olivier M, Papadopoulou B, Ouellette M (2008).** Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. *Genome Biol* **9(7)**, R115

- Ubeda JM, Raymond F, Mukherjee A, Plourde M, Gingras H, Roy G, Lapointe A, Leprohon P, Papadopoulou B, Corbeil J, Ouellette M (2014).** Genome-wide stochastic adaptive DNA amplification at direct and inverted DNA repeats in the parasite *Leishmania*. *PLoS Biol* **12(5)**, e1001868
- Urich R, Grimaldi R, Luksch T, Frearson JA, Brenk R, Wyatt PG (2014).** The design and synthesis of potent and selective inhibitors of *Trypanosoma brucei* glycogen synthase kinase 3 for the treatment of human african trypanosomiasis. *J Med Chem* **57(18)**, 7536-49
- Vassella E, Krämer R, Turner CM, Wankell M, Modes C, van den Bogaard M, Boshart M (2001).** Deletion of a novel protein kinase with PX and FYVE-related domains increases the rate of differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol* **41(1)**, 33-46
- Vaughan S, Gull K (2016).** Basal body structure and cell cycle-dependent biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Cilia* **5**, 5
- Vaughan S, Kohl L, Ngai I, Wheeler RJ, Gull K (2008).** A repetitive protein essential for the flagellum attachment zone filament structure and function in *Trypanosoma brucei*. *Protist* **159(1)**, 127-36
- Volf P, Hajmova M, Sadlova J, Votypka J (2004).** Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *Int J Parasitol* **34(11)**, 1221-7
- Voorheis HP, Martin BR (1981).** Characteristics of the calcium-mediated mechanism activating adenylate cyclase in *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem* **116(3)**, 471-7
- Waas WF, Rainey MA, Szafranska AE, Cox K, Dalby KN (2004).** A kinetic approach towards understanding substrate interactions and the catalytic mechanism of the serine/threonine protein kinase ERK2: identifying a potential regulatory role for divalent magnesium. *Biochim Biophys Acta* **1697(1-2)**, 81-7
- Wakid MH, Bates PA (2004).** Flagellar attachment of *Leishmania* promastigotes to plastic film in vitro. *Exp Parasitol* **106(3-4)**, 173-8
- Wanderley JL, Moreira ME, Benjamin A, Bonomo AC, Barcinski MA (2006).** Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis* in mammalian hosts. *J Immunol* **176(3)**, 1834-9
- Wanders P (2004).** Dissertation: In-vitro- und In-vivo-Charakterisierung einer LmxMPK5-Deletionsmutante von *Leishmania mexicana*. Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin. Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Wang QM, Fiol CJ, DePaoli-Roach AA, Roach P (1994).** Glycogen synthase kinase-3 beta is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* **269(20)**, 14566-74
- Wang Q, Melzer IM, Kruse M, Sander-Juelch C, Wiese M (2005).** LmxMPK4, a mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue essential for promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. *Kinetoplastid Biol Dis* **4**, 6
- Ward JJ, Sodhi JS, McGuffin LJ, Buxton BF, Jones DT (2004).** Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J Mol Biol* **337(3)**, 635-45
- Wei Y, Li Z (2014).** Distinct roles of a mitogen-activated protein kinase in cytokinesis between different life cycle forms of *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell* **13(1)**, 110-8
- Weise F, Stierhof YD, Kühn C, Wiese M, Overath P (2000).** Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells. *J Cell Sci* **113 Pt24**, 4587-603
- Welburn JP, Tucker JA, Johnson T, Lindert L, Morgan M, Willis A, Noble ME, Endicott JA (2007).** How tyrosine 15 phosphorylation inhibits the activity of cyclin-dependent kinase 2-cyclin A. *J Biol Chem* **282(5)**, 3173-81

- Welsh GI, Proud CG (1993).** Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem J* **294**(Pt3), 625-9
- Wheeler RJ, Gluenz E, Gull K (2011).** The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Mol Microbiol* **79**(3), 647-62
- Wheeler RJ, Scheumann N, Wickstead B, Gull K, Vaughan S (2013).** Cytokinesis in *Trypanosoma brucei* differs between bloodstream and tsetse trypomastigote forms: implications for microtubule-based morphogenesis and mutant analysis. *Mol Microbiol* **90**(6), 1339-55
- Wheeler RJ, Sunter JD, Gull K (2016).** Flagellar pocket restructuring through the *Leishmania* life cycle involves a discrete flagellum attachment zone. *J Cell Sci* **129**(4), 854-67
- WHO (2018a):** <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>
- WHO (2018b):** [http://www.who.int/neglected\\_diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/en/)
- Wiese M (1991).** Diplomarbeit. Klonierung des Gens einer membrangebundenen, sauren Phosphatase von *Leishmania mexicana*. Biologische Fakultät, Universität Tübingen
- Wiese M (1998).** A mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue of *Leishmania mexicana* is essential for parasite survival in the infected host. *EMBO J* **17**, 2619-28
- Wiese M (2007).** *Leishmania* MAP kinases--familial proteins in an unusual context. *Int J Parasitol* **37**, 1053-62
- Wiese M, Berger O, Stierhof YD, Wolfram M, Fuchs M, Overath P (1996).** Gene cloning and cellular localization of a membrane-bound acid phosphatase of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* **82**, 153-65
- Wiese M, Ilg T, Lottspeich F, Overath P (1995).** Ser/Thr-rich repetitive motifs as targets for phosphoglycan modifications in *Leishmania mexicana* secreted acid phosphatase. *EMBO J*, **6**, 1067-1074
- Wiese M, Kuhn D, Grünfelder CG (2003a).** Protein kinase involved in flagellar-length control. *Eukaryot Cell* **2**, 769-77
- Wiese M, Wang Q, Görcke I (2003b).** Identification of mitogen-activated protein kinase homologues from *Leishmania mexicana*. *Int J Parasitol* **33**, 1577-87
- Wiesgigl M und Clos J (2001).** Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol Biol Cell* **12**(11), 3307-16
- Wilson NF, Iyer JK, Buchheim JA, Meek W (2008).** Regulation of flagellar length in *Chlamydomonas*. *Semin Cell Dev Biol* **19**(6), 494-501
- Wilson NF, Lefebvre PA (2004).** Regulation of flagellar assembly by glycogen synthase kinase 3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* **3**(5), 1307-19
- Windelberg M (2007).** Dissertation: Molekulare Charakterisierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen LmxMPK11 und LmxMPK12 aus *Leishmania mexicana*. Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin. Fachbereich Humanmedizin, Universität Hamburg.
- Wolfram M, Fuchs M, Wiese M, Stierhof YD, Overath P (1996).** Antigen presentation by *Leishmania mexicana*-infected macrophages, activation of helper T cells by a model parasite antigen secreted into the parasitophorous vacuole or expressed on the amastigote surface. *Eur J Immunol* **26**(12), 3153-62
- Woodgett JR, Cohen P (1984).** Multisite phosphorylation of glycogen synthase. Molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-II (glycogen synthase kinase-5). *Biochim Biophys Acta* **788**(3), 339-47

- Woods D, Parry D, Cherwinski H, Bosch E, Lees E, McMahon M (1997).** Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol* **17(9)**, 5598-611
- Woods YL, Cohen P, Becker W, Jakes R, Goedert M, Wang X, Proud CG (2001).** The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem J* **355(Pt3)**, 609-15
- Woodward R, Gull K (1990).** Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* **95(Pt1)**, 49-57
- Xingi E, Smirlis D, Myrianthopoulos V, Magiatis P, Grant KM, Meijer L, Mikros E, Skaltsounis AL, Soteriadou K (2009).** 6-Br-5methylindirubin-3'oxime (5-Me-6-BIO) targeting the leishmanial glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) short form affects cell-cycle progression and induces apoptosis-like death: exploitation of GSK-3 for treating leishmaniasis. *Int J Parasitol* **39(12)**, 1289-303
- Yeh YY, Shah KH, Chou CC, Hsiao HH, Wrasman KM, Stephan JS, Stamatakos D, Khoo KH, Herman PK (2011).** The identification and analysis of phosphorylation sites on the Atg1 protein kinase. *Autophagy* **7(7)**, 716-26
- Yu JS, Yang SD (1994).** Protein kinase FA/glycogen synthase kinase-3 predominantly phosphorylates the in vivo site Thr97-Pro in brain myelin basic protein: evidence for Thr-Pro and Ser-Arg-X-X-Ser as consensus sequence motifs. *J Neurochem* **62(4)**, 1596-603
- Zhang F, Phiel CJ, Spece L, Gurvich N, Klein PS (2003).** Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. *J Biol Chem* **278(35)**, 33067-77
- Zhang F, Wen Y, Guo X (2014).** CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet* **23(R1)**, R40-6
- Zhang J, Yang PL, Gray NS (2009).** Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* **9(1)**, 28-39
- Zhang O, Hsu FF, Xu W, Pawlowic M, Zhang K (2013).** Sphingosine kinase A is a pleiotropic and essential enzyme for *Leishmania* survival and virulence. *Mol Microbiol* **90(3)**, 489-501
- Zhang WW, Lypaczewski P, Matlashewski G (2017).** Optimized CRISPR-Cas9 Genome Editing for *Leishmania* and Its Use To Target a Multigene Family, Induce Chromosomal Translocation, and Study DNA Break Repair Mechanisms. *mSphere* **2(1)**, e00340-16
- Zhang WW, Matlashewski G (2015).** CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in *Leishmania donovani*. *MBio* **6(4)**, e00861
- Zhou C, Yang Y, Jong AY (1990).** Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* **8(2)**, 172
- Zhou Q, Gu J, Lun ZR, Ayala F, Li Z (2016a).** Two distinct cytokinesis pathways drive trypanosome cell division initiation from opposite cell ends. *Proc Natl Acad Sci USA* **113(12)**, 3287-92
- Zhou Q, Hu H, Li Z (2016b).** An EF-hand-containing Protein in *Trypanosoma brucei* Regulates Cytokinesis Initiation by Maintaining the Stability of the Cytokinesis Initiation Factor CIF1. *J Biol Chem* **291(28)**, 14395-409
- Zilberstein D, Shapira M (1994).** The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* **48**, 449-70
- Zilka A, Garlapati S, Dahan E, Yaolsky V, Shapira M (2001).** Developmental regulation of heat shock protein 83 in *Leishmania*. 3' processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation is directed by a determinant in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* **276(51)**, 47922-9



### **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegeben Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.