Biochemische Charakterisierung von LmxMPK1, einer essentiellen MAP Kinase aus *Leishmania mexicana*

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg

> vorgelegt von Inga Maria Melzer

Hamburg, Februar 2007

Nichts beflügelt die Wissenschaft so, wie der Schwatz mit Kollegen auf dem Flur.

Arno Penzias (*1933), amerik. Physiker, Nobelpreis 1978

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
	1.1 Leishmanien und Leishmaniosen	1
	1.1.1 Taxonomie	1
	1.1.2 Morphologie und Epidemiologie	2
	1.1.3 Krankheitsbilder der Leishmaniose	3
	1.1.4 Diagnose und Therapiemöglichkeiten	4
	1.1.5 Invasionsmechanismen und Lebenszyklus von Leishmania	7
	1.1.6 Genomorganisation und Genetik	.10
	1.2 Signaltransduktion und MAP Kinase Signalwege	14
	1.2.1 Signalwege in eukaryotischen Zellen	.14
	1.2.2 Proteinkinasen und Proteinphosphorylierung	.15
	1.2.3 MAP Kinase Signalwege	.17
	1.2.4 Signaltransduktion in Trypanosomatiden	.19
	1.2.5 LmxMPK1 - Kenntnisstand und Aufgabenstellung	.23
2	Material	26
-		20
	2.1 Chemikalien	26
	2.2 Geräte	30
	2.3 Verbrauchsmaterialien	30
	2.4 Escherichia coli Bakterienstämme	31
	2.5 Leishmanien	31
	2.6 Versuchstiere	31
	2.7 Plasmide	31
	2.8 Oligonukleotide	32
	2.9 Phagenbanken	35
	2.10 Antikörper	35
	2 11 Fnzvme	36
	2 12 Molekularhiologische Kits	36
	2 13 DNA- und Protein-Größenstandards	37
	2 14 Kulturmedien	37
	2.14 Ruiturmeulen	37
	2.14.1 Medien für Leishmanienkulturen	.37
	2 15 Duffer und weitere Lösungen	201
		50
3	Methoden	42
	3.1 Zellbiologische Methoden	42
	3.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	.42
	3.1.1.1 Kultur auf Mediumplatten	. 42
	3.1.1.2 Flüssigkultur	. 42
	3.1.1.3 Glycerinkulturen zur Langzeitlagerung	. 42
	3.1.2 Kultivierung von <i>L. mexicana</i>	.42
	3.1.2.1 Kultivierung von <i>L. mexicana</i> -Promastigoten	. 42
	3.1.2.2 Zellzahlbestimmung von Leishmanien-Kulturen	. 43
	3.1.2.3 III VIIIO-DITETETETETETETETETETETETETETETETETETETE	.43 13
	3 2 Molekularbiologische Methoden	<u></u> Δ2
	3.2.1 Herstellung kompetenter Zellen nach Hanahan (1083)	43 43
	3.2.2 Transformation von <i>F coli</i>	Δ <u>Δ</u>
	3 2 3 Transfektion von Leishmanien	<u>4</u> 4
	3 2 4 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>F coli</i>	45
	3.2.4.1 Plasmid-DNA-Minipräparation (Zhou <i>et al.</i> , 1990)	. 45
	3.2.4.2 Qiaprep [®] Spin Miniprep Kit und M&N Plasmid Isolation Kit	. 45

3.2.4.3 QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen Tip-100) und Invitrogen Plasmid Kit	45
3.2.5 Isolierung genomischer DNA aus Leishmanien	46
3.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung	46
3.2.7 Reaktionen mit DNA-modifizierenden Enzymen	46
3.2.7.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	47
3.2.7.2 Weitere Reaktionen	47
3.2.8 Phenol-Chloroform-Extraktion und DNA-Ethanolfällung	47
3.2.9 Agarosegelelektrophorese von DNA	48
3.2.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	48
3.2.11 Oligonukleotid–Mutagenese	48
3.2.12 In vitro-Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch PCR	48
3.2.13 Klonierung eines PCR-Produktes mithilfe des TOPO TA Cloning [®] Kits	49
3.2.14 DNA-Sequenzierung	49
3.2.15 DNA-Markierung mit Digoxigenin (DIG-)-dUTP	50
3.2.16 Southern Blot	50
3.2.16.1 Restriktionsspaltung genomischer DNA und Agarosegelelektrophorese	50
3.2.16.2 Southern Blot	50
3.2.16.3 Hybridisierung mit einer DIG-markierten Sonde und Stringenzwaschen	51
3.2.16.4 Nachweis der DIG-Markierung	51
3.2.16.5 Abwaschen der gebundenen Sonde ("stripping")	52
3.2.17 Durchsuchen einer λ DASH II-Phagenbank	52
3.2.17.1 Vorbereitung der Wirtsbakterien	52
3.2.17.2 Phagenplatterung	52
3.2.17.5 Obertragung von Fridgenplaques auf Nylonmernbrahen	52
3 2 17 5 Amplifikation der Phagenlösungen	53
3.2.17.6 Phagen-DNA-Isolierung mit dem Lambda Midi Kit (Qiagen, Hilden)	53
3.3 Proteinexpression und -isolierung	54
3 3 1 Expression rekombinanter Proteine in <i>F</i> coli	54
3.3.2 Herstellung von Zellivsaten	
3 3 3 Aufreingung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie	55
3.3.3.1 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen über Glutathion-Sepharose	55
3.3.3.2 Aufreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen über mit Cobalt beladene	
Chelating Sepharose	55
3.3.3.3 Aufreinigung von Strep-Tag-Fusionsproteinen über Strep-Tactin	55
3.3.3.4 Aufreinigung von Phosphoproteinen aus Leishmanien-Lysaten	56
3.4 Protein- und immunchemische Methoden	56
3.4.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	56
3.4.2 Färben von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	57
3.4.2.1 Coomassie Brilliant Blue R-250-Färbung	57
3.4.2.2 Silberfärbung	57
3.4.2.3 Trocknen der Gele	57 50
3.4.3 1 Horstollung von Leichmanian Lycaton für die SDS PACE/Immunoblat	00
3.4.3.2 Proteintransfer auf eine PVDE-Membran	00 58
3 4 3 3 Immunologische Detektion	50
3.4.3.4 Abwaschen des gebundenen Antikörpers ("stripping")	59
3.4.4 Weitere Proteinchemische Methoden.	
3.4.4.1 Bestimmung der Protein-Konzentration nach Bradford	59
3.4.4.2 Dialyse von Proteinproben	59
3.5 Aktivitätstests mit rekombinant exprimierten Proteinen	59
3.5.1 Standard Kinase-Aktivitätstest	60
3.5.2 Enzymkinetik	60
3.5.3 Screening eines Peptid-Mikrochips mit rekombinanter Kinase	61
3.5.4 Phosphorylierung von Leishmanien-Lysaten mit rekombinanter LmxMPK1	62
3.5.5 Aktivierungstest mit putativen Aktivatorkinasen	62
3.6 Infektionsexperimente	62

	3.6.2 Isolierung von Amastigoten aus Mausläsionen	63
	3.7 In silico-Substratsuche mithilfe des Programmes PREDIKIN	63
4	Ergebnisse	65
	4.1 Ausgangslage	65
	4.2 Biochemische Charakterisierung von LmxMPK1Wt, einer inaktiven	
	Mutante (K43M) sowie Mutanten im Aktivierungsmotiv	65
	4 2 1 Diverse Klonierungen mit LmxMPK1	65
	4.2.2 Rekombinante Expression von LmxMPK1 und Mutanten in <i>E. coli</i>	
	4.2.3 Kinase-Aktivitätstests mit rekombinanter LmxMPK1 und Mutanten	
	4.2.3.1 Aktivitätstest von LmxMPK1Wt und inaktiver K43M-Mutante	68
	4.2.3.2 Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen für LmxMPK1	69
	4.2.3.3 Aktivitätstests mit LmxMPK1Wt und Mutanten des Phosphorylierungsmotivs	
	in der Aktivierungsschleife (TDY)	72
	4.2.3.4 Autophosphoryllerung an Tyrosin bei LmxMPKT wit und Mutanten	70
	4 2 3 5 Die Autophosphorylierung von LmxMPK1 an Tyrosin folgt einem	12
	intramolekularen Mechanismus	
	4.2.3.6 Kinetische Parameter der Autophosphorylierung von LmxMPK1	
	4.2.4 Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von LmxMPK1 in vivo	75
	4.2.4.1 Phosphorylierungsstatus von LmxMPK1Wt in Promastigoten und	
	in vitro-differenzierten Amastigoten	
	4.2.4.2 Phosphorylierungsstatus von LmxMPK1Wt und Mutanten im	70
	Aktivierungsmotiv <i>in vivo</i>	
	4.3 Die Suche nach Aktivatoren von LmxWPK1	/9
	4.3.1 Test verschiedener bereits vorhandener potentieller Aktivatoren	
	4.3.2 Identifikation neuer putativer MAPKKs aus <i>L. mexicana</i>	83
	4.3.2.1 Homologievergieich mit Kinasen aus anderen Spezies und Figenschaften der neuen MAPKK	84
	4.3.2.2 Subklonierung in Expressionsvektoren. Expression und	
	Aufreinigung der MKK-Homologen PK5, 6 und 7	87
	4.3.2.3 Kinase-Aktivitätstests mit PK 5, 6 und 7 und Aktivatortests	
	in Kombination mit LmxMPK1	89
	4.3.2.4 Konstruktion einer konstitutiv aktivierten Mutante von LmxPK6	
	4.3.3 Aktivatortest mit zwei anderen Zellzyklus-regulierenden Kinasen	91
	4.4 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1	94
	4.4.1 In silico-Substratsuche mithilfe des PREDIKIN-Servers	
	4.4.1.1 Klonierungen sowie Expression und Aufreinigungen von LmxTFIID	
	4.4.1.2 Phosphorylierungstest mit rekombinantem GST-TFTID und LmxMPK1	
	4.4.2 Substratsuche mitnilife eines Peptid-Mikrochips	97
	4.4.2.1 Eigenschalten von EinzoF und Homologien zu anderen Froteinen	
	und weitere Klonierunasschritte	
	4.4.2.3 Expression in <i>E. coli</i> und Aufreinigung von GST-UP	
	4.4.2.4 Phosphorylierungstest von LmxMPK1 mit GST-LmxUP	100
	4.4.3 Phosphorylierung von Leishmanien-Lysaten mit rekombinanter LmxMPK1	101
	4.4.4 Analyse der Phosphoproteine aus <i>L. mexicana</i> Wt und	
	∆LmxMPK1 -/- (Pro- und Amastigote)	103
	4.5 Herstellung und Test einer inhibitorsensitiven Mutante von LmxMPH	< 1.105
	4.5.1 Klonierungen zur Herstellung einer inhibitorsensitiven Mutante	106
	4.5.2 Expression und Aufreinigung der rekombinanten Enzyme	
	und Aktivitätstests mit Inhibitoren	107
	4.5.2.1 Expression und Aufreinigung von LmxMPK1Wt und LmxMPK1F93G	40-
	als GST-Fusionsproteine	107
	4.5.2.2 AKTIVITATSTEST MIT GOT-LMXIVIPK TWT UND GOT-LMXIVIPK TP3G MIT	107
	4 5 3 Transfektion einer enisomal exprimierten inhibitorsensitiven	107
	Mutante von LmxMPK1 in den Deletionshintergrund	108

4.5.3.1 Analyse der erhaltenen Klone	108
4.5.3.2 Infektionsexperimente mit ∆LmxMPK1-/- + pX5ImpkF93G KI. 7	109
4.5.4 Inhibitortests mit Promastigoten	110
4.5.5 Inhibitortests mit axenischen Amastigoten	112
5 Diskussion	115
5.1 Biochemische Charakterisierung und Aktivierungsmechanismus	
von LmxMPK1	116
5.1.1 Aufreinigung von rekombinanter LmxMPK1 und Mutanten aus E. coli	
5.1.2 Erste Aktivitätstests	117
5.1.2.1 GST-LmxMPK1Wt, GST-LmxMPK1K43M und 6xHis-LmxMPK1Wt:	
Auto- und Substratphosphorylierung	117
5.1.2.2 Optimierung der <i>in vitro</i> -Kinase-Aktivität	118
Phosphorylierungsstelle des Aktivierungsmotivs (TDY) <i>in vitro</i>	120
5.1.4 Aktivität und Phosphorylierungsstatus von LmxMPK1Wt	
und den Mutanten im Aktivierungsmotiv (TDY) in vivo	122
5.2 Die Suche nach Aktivatoren von LmxMPK1	125
5.2.1 Test verschiedener bereits vorliegender putativer Aktivatoren	127
5.2.2 Identifikation neuer putativer MAPKKs aus <i>L. mexicana</i>	129
5.2.3 Aktivatortest mit zwei anderen, Zellzyklus-regulierenden Kinasen	132
5.2.4 Zusatzliche Faktoren und andere Moglichkeiten der Aktivierung	404
VON WAP KINDSEN	134 134
5.2.4.2 Undewöhnliche MADK ähnliche MADK Kaskaden	135
J.Z.4.2 UTUEWUTTTICTE. WAT N-attribute WAT N-Nashauett	
5.3 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1	136
5.3 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1 5.4 Eine inhibitorsensitive Mutante von LmxMPK1	136 142
5.3 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1 5.4 Eine inhibitorsensitive Mutante von LmxMPK1 6 Zusammenfassung	136 142 145
5.3 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1 5.4 Eine inhibitorsensitive Mutante von LmxMPK1 6 Zusammenfassung	136 142 145 147
 5.3 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1	136 142 145 147
 5.3 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1	136 142 145 147 149
 5.3 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1	136 142 145 147 149 163
 5.3 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1	136 142 145 147 149 163 163
 5.3 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1	136 142 145 147 149 163 163
 5.3 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1	136 142 145 145 147 149 163 163 163
 5.3 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1	136 142 145 145 147 149 163 163 163 163
 5.3 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1	136 142 145 145 147 163 163 163 163 165 166
 5.3 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1	136 142 145 145 147 149 163 163 163 163 165 166 167
 5.3 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1	136 142 145 145 147 149 163 163 163 163 165 166 169
 5.3 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1	136 142 145 145 145 149 163 163 163 165 166 167 169 173
 5.3 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1	136 142 145 145 145 163 163 163 163 165 166 167 169 173 173
 5.3 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1	136 142 145 145 147 149 163 163 163 163 165 166 166 167 169 173 173
 5.3 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1	136 142 145 145 145 163 163 163 163 163 165 166 167 173 174 174
 5.3 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1	136 142 145 145 145 147 163 163 163 163 163 163 163 165 165 166 169 173 174 175 176

Abkürzungsverzeichnis

-/-	Doppelalleldeletion
+/-	Einzelalleldeletion
С°	Grad Celsius
A	Ampère
AIDS	acquired immune deficiency syndrome
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BLE	Gen für das Phleomycin-bindende Protein
BNI	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
С	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD-Domäne	common docking-Domäne
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Ci	Curie
CL	cutane Leishmaniose
CSPD	Dinatrium-3-[4-methoxyspiro(1,2-dioxethan-3,2´-(5´- chloro)tricyclo[3.3.1.1]decan)-4-yl]-Phenylphosphat
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane
DAPI	4´,6-Diamino-2-phenylindoldilacetat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxiribinukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
Е.	Escherichia
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N´-tetraessigsäure

ERK	extrazellulär regulierte Kinase (extracellular signal-regulated kinase)
EtOH	Ethanol
F	Farad
G	Guanin
G	Glycin
g	Gramm
(x) g	(Vielfaches der) Erdbeschleunigung
gDNA	genomische DNA
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HAc	Essigsäure
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N´-[2-ethansulfonsäure]
His	Histidin
HIV	human immunodeficiency virus
HPLC	Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie
HRP	Meerettichperoxidase
Hyg	Gen für Hygromycin B-Phosphotransferase
iFCS	hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum
IFN	Interferon
IFT	intraflagellarer Transport
lgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactosid
IR	intergene Region
К	Lysin
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
kDNA	Kinetoplasten-DNA
I	Liter
L.	Leishmania
Lmx	Leishmania mexicana
LmxMPK	MAP Kinase-Homolog in <i>L. mexicana</i>
LmxMPK1(K43M)	inaktive Mutante von LmxMPK1
LmxPK	(putatives) MAPKK-Homolog aus L. mexicana
LmxTFIID	Transkriptionsinitiationsfaktor II D aus L. mexicana

LmxUP	unbekanntes Protein aus L. mexicana			
LPG	Lipophosphoglykan			
М	molar			
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight</i> Massenspektrometrie			
MAP	Mitogen-aktivierte Protein			
MAPK	MAP Kinase			
MAPKK	MAP Kinase Kinase			
MAPKKK	MAP Kinase Kinase			
MBP	Myelin basisches Protein			
MCL	mucocutane Leishmaniose			
med-RNA	miniexon-derived RNA			
MEK	ERK Kinase			
MeOH	Methanol			
MES	2-[N-Morpholino]-ethansulfonsäure			
min	Minute(n)			
МКК	MAP Kinase Kinase			
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure			
mRNA	messenger-RNA			
NaAc	Natriumacetat			
NEO	Gen für Neomycin-Phosphotransferase			
NES	Kernexportsignal			
Nt	Nukleotid(e)			
OD	Optische Dichte			
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)			
PAC	Gen für Puromycin-N-Acetyltransferase			
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese			
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung			
PCR	Polymerase-Kettenreaktion			
pfu	plaque forming units			
PKDL	Post-Kala-Azar-dermales Leishmanoid			
PMN	polymorphkernige Granulozyten			
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid			
PSG	promastigote secretory gel plug			
PVDF	Poly(vinyliden)difluorid			
R	Arginin			
RNA	Ribonukleinsäure			
RNAi	RNA-Interferenz			
rpm	Umdrehungen pro Minute			

rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S.	Saccharomyces
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SH2/SH3	Src-Homologie-Regionen 2 und 3
SL	spliced leader
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitratpuffer (standard saline citrate)
Т.	Trypanosoma
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylehtylendiamin
Th-Zellen	Helfer-T-Zellen
TLCK	N^{α} -p-Tosyl-L-Lysin-Chlormethylketon-Hydrochlorid
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VL	viszerale Leishmaniose
w/v	Gewicht pro Volumen
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid

1 Einleitung

1.1 Leishmanien und Leishmaniosen

1.1.1 Taxonomie

Parasiten der Gattung Leishmania wurden erstmals 1885 von Cunningham entdeckt und später von den britischen Tropenärzten Sir William B. Leishman (1900) und Charles Donovan (1903) beschrieben, nach ersterem wurde die Gattung benannt, letzterer gab einer Speziesgruppe, dem Leishmania donovani-Komplex seinen Namen. Es handelt sich bei diesen Parasiten um Protozoen, die der Ordnung der Kinetoplastida angehören. Die Namensgebung dieser Ordnung beruht auf einem einzigartigen Organell, dem Kinetoplasten, welcher sich an der Basis des Flagellums befindet und die dicht gepackte DNA des einzigen Mitochondriums der Zelle enthält. Anhand der Anzahl ihrer Geißeln lassen sich die Kinetoplastida in zwei Unterordnungen aufteilen, die Bodonina, die zwei Geißeln besitzen und überwiegend frei lebend sind und die einfach begeißelten, meist parasitär lebenden Trypanosomatina, zu denen die Familie der Trypanosomatidae gehört. Diese Familie umfasst neun Gattungen, unter anderem Parasiten von Invertebraten, von Pflanzen und auch die Säugerparasiten Trypanosoma und Leishmania. Neben Trypanosoma brucei (gambiense und rhodesiense), dem Erreger der Schlafkrankheit in Afrika und Trypanosoma cruzi, der die in Südamerika vorkommende Chagas-Krankheit hervorruft, gehören auch 21 der knapp 30 bekannten Leishmania-Spezies zu den humanpathogenen Erregern und können ein weites Spektrum an Krankheitsbildern hervorrufen.

1.1.2 Morphologie und Epidemiologie

Leishmanien werden durch weibliche blutsaugende Sandmücken der Gattungen *Phlebotomus* (Alte Welt) und *Lutzomyia* (Neue Welt) auf verschiedene Säugetierspezies und den Menschen übertragen. In den Insekten liegen die Parasiten extrazellulär in einer begeißelten, spindelförmigen Gestalt als sogenannter Promastigot vor, dessen Zellkörper 10 bis 20 μ M lang und 2 bis 3,5 μ M breit ist. An ihrem Vorderende besitzen sie ein bis zu 20 μ M langes Flagellum, welches sowohl der Fortbewegung als auch der Anheftung im Insektenwirt dient. Im Säugerwirt liegen Leishmanien fast ausschließlich als intrazelluläre Amastigote in den Zellen des retikulo-endothelialen Systems vor; sie sind rundlich bis oval, und weisen einen Durchmesser von ca. 2 bis 4 μ M auf. Zudem besitzen sie nur noch ein rudimentäres Flagellum, welches in der Flagellartasche, einer Einbuchtung der Leishmanien-Oberfläche, verborgen liegt.

Durch die obligate Bindung einer *Leishmania*-Spezies an ihren jeweiligen Überträger, ist das Verbreitungsgebiet der einzelnen Leishmaniosen durch den Lebensraum ihres Vektors bestimmt, der hauptsächlich in ländlichen Gebieten der Subtropen und Tropen vorkommt. Eine wichtige Rolle bei der Verbreitung der Infektion spielen die Reservoirwirte: für die cutane Leishmaniose (CL) sind dies vorwiegend Nager und andere kleine Säuger, für die durch *L. infantum* verursachte viszerale Leishmaniose (VL) hauptsächlich Hunde. Bei den meisten humanen Leishmaniosen handelt es sich um Zoonosen, bei denen der Mensch nur ein zufälliger Wirt ist. In zwei Fällen sind aber auch sogenannte Anthroponosen nachgewiesen, bei denen der infizierte Mensch das Reservoir für den Erreger darstellt: Bei der durch *L. donovani* in Indien ausgelösten viszeralen Leishmaniose und der durch *L. tropica* verursachten cutanen Leishmaniose des Mittleren Ostens.

Die verschiedenen Formen der Leishmaniose, die von der lokalisierten cutanen Leishmaniose ("Orientbeule") bis zu generalisierten, viszeralisierenden Form ("Kala-Azar") reichen. stellen mit weltweit mehr als 12 Millionen Betroffenen ein ernstes gesundheitspolitisches Problem dar. Die Zahl der geschätzten Neuerkrankungen wird mit 1,5 bis 2 Millionen pro Jahr (Handman, 2001) angegeben, die Wahrheit liegt wahrscheinlich eher an der oberen Grenze oder darüber, da eine sehr große Zahl von Neuerkrankungen aufgrund der schlechten Infrastruktur und medizinischen Versorgung in den betroffenen Ländern wahrscheinlich gar nicht erfasst wird. Weltweit sind ungefähr 350 Millionen Menschen dem Risiko einer Infektion ausgesetzt, dabei sind 88 Länder (davon 72 Entwicklungsländer) aller Kontinente mit Ausnahme von Australien betroffen (Handman, 2001). Auch in Europa, vor allem in den Mittelmeerstaaten, sind mittlerweile Infektionen mit Leishmania bekannt, hier spielt vor allem die viszerale Leishmaniose verursacht durch L. infantum eine vorherrschende Rolle (Abb. 1). Eine zunehmend wichtige Rolle spielen Leishmania/HIV-Coinfektionen, deren Zahl in den letzten 10 Jahren drastisch zugenommen hat, wobei als Ursache sowohl die Reaktivierung von zuvor immunologisch kontrollierten persistierenden Infektionen als auch Neuinfektionen diskutiert werden (Gessner et al., 1994). In Südeuropa sind bis zu 70 % aller an viszeraler Leishmaniose erkrankten Erwachsenen mit HIV coinfiziert, 2-9 % der AIDS-Patienten leiden an VL.



Abb. 1: Verbreitung der Leishmaniose (Quelle: http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm)

Einleitung 3

1.1.3 Krankheitsbilder der Leishmaniose

Hinsichtlich der Symptome und der dadurch ausgelösten klinischen Verläufe lassen sich Leishmaniosen in die im Folgenden erläuterten drei Gruppen einteilen. Die Schwere der Erkrankung hängt hierbei im Wesentlichen vom Immunstatus des Patienten sowie von der jeweiligen *Leishmania*-Spezies ab.

Cutane Leishmaniose (CL):

Die cutane Leishmaniose stellt mit ca. 75% aller Neuinfektionen die häufigste Form der Leishmaniose dar (Abb. 2). Zu den Erregern der auch als "Orient-Beule" bezeichneten Krankheit gehören in der Alten Welt (Südeuropa, Mittlerer Osten, Südwestasien und Afrika) hauptsächlich L. major, L. tropica und L. aethiopica, in der Neuen Welt (Mittel- und Südamerika) sind dies neben L. panamensis und L. guyanensis hauptsächlich Parasiten des L. mexicana-Komplexes. Bei dieser Art der Leishmaniose zeigt sich an der Stichstelle zunächst ein winziger roter Fleck mit einem begleitenden Erythem. Nach 1-2 Wochen entwickeln sich gewöhnlich entzündliche Papeln, manchmal auch vesikuläre Läsionen. Im Laufe von Monaten können sich diese vergrößern und ulzerieren, dabei hat das schmerzlose Ulkus einen erhabenen Randwall. Obwohl 90-95% dieser Läsionen spontan im Zeitraum eines Jahres abheilen, kann es zu z.T. entstellender Narbenbildung kommen, teilweise (10% der Fälle bei L. tropica) kommt es sogar auch zu einer chronischen Erkrankung. Eine einmal überwundene Infektion bewirkt normalerweise lebenslange Immunität gegenüber Reinfektion mit derselben Spezies (Hepburn, 2003). Die hauptsächlich an der Ohrmuschel und im Gesicht vorkommenden, sogenannten "Chiclero-Geschwüre", von denen vorwiegend Kautschuksammler (Chicleros) betroffen sind, werden ausschließlich von den Erregern der südund mittelamerikanischen Hautleishmaniose verursacht. Bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem können einige Vertreter des L. mexicana-Komplexes und L. aethiopica die diffuse cutante Leishmaniose (DCL) hervorrufen, bei der es zur Entwicklung multiplen, diffus über den Körper verteilten Läsionen kommen kann. von Da Spontanheilungen ausbleiben, handelt es sich hier um eine gravierende Form der Hautleishmaniose.

Mucocutane Leishmaniose (MCL):

Die mucocutante Leishmaniose (Abb. 2), die auch unter dem Namen "Espundia" bekannt ist, tritt hauptsächlich in Mittel- und Südamerika auf und wird hauptsächlich von Erregern des *L. braziliensis*-, aber auch des *L. mexicana*-Komplexes verursacht. Gekennzeichnet ist diese Krankheit durch Ulzerationen der oralen und nasalen Schleimhäute, die nach anfänglichen Hautläsionen im Gesicht auftreten. Unbehandelt kann es zur Zerstörung der gesamten Nasenschleimhaut, des nasalen Septums, der Lippen und des weichen Gaumens kommen.

Vor allem als Folge von Superinfektionen kann diese Art der Leishmaniose einen tödlichen Verlauf nehmen.

Viszerale Leishmaniose (VL):

Diese auch als "Kala-Azar" bezeichnete Krankheit stellt die schwerste Form der humanen Leishmaniose dar (Abb. 2). Zu den Erregern gehören hauptsächlich die Spezies des *L. donovani-* und *L. infantum*-Komplexes. Hier kommt es im Gegensatz zu den beschriebenen lokalen Formen zu einem Befall von Zellen des retikulo-endothelialen Systems im geamten Körper, insbesondere in Milz, Leber und Knochenmark sowie den Lymphknoten. Die Infektion wird von unregelmäßigen Fieberschüben, nicht schmerzhaften Milz- und Leberschwellungen, Gewichtsverlust und Anämie begleitet; in fortgeschrittenen Stadien kommt es zu einer Aszites und einer Verdunklung der Haut (Kala-Azar = schwarzes Fieber). Unbehandelt liegt die Letalität bei 75-90%, es sind jedoch auch mildere Verläufe und Spontanheilungen beschrieben worden.

Als Folgeerscheinung einer therapierten VL kann sich bei den Patienten ein Post-Kala-Azardermales Leishmanoid (PKDL) entwickeln, welches eine chronische Form der CL darstellt. Dabei treten zuerst im Gesicht Knoten auf, die sich anschließend über den ganzen Körper ausbreiten und über Jahre bestehen bleiben können. In Indien entwickelt sich diese Form der Leishmaniose 2 bis 3 Jahre nach Abheilen der VL in 10-15% der Fälle, im Sudan dagegen bereits in den ersten sechs Monaten in 50-60% der Fälle (Zijlstra *et al.*, 2003).







Abb. 2: Krankheitsbilder der Leishmaniose. Links: CL; Mitte: MCL; Rechts: VL (Quelle: WHO/TDR/Laufner/Crump)

1.1.4 Diagnose und Therapiemöglichkeiten <u>Diagnose:</u>

Alle von Kinetoplastiden verursachten Erkrankungen sind nicht einfach zu diagnostizieren. Die Suche nach den Parasiten ist zeitaufwendig und daher teuer. Methoden wie die Milzbiopsie oder die Knochenmarksaspiration sind für nicht-spezialisierte medizinische Hilfskräfte nicht leicht auszuführen, oft mangelt es auch an den notwendigen Materialien. Diese Probleme haben in den letzten Jahrzehnten zu vermehrten Forschungsanstrengungen auf dem Gebiet der parasitologischen Diagnostik geführt, z.T. auch mit Erfolg: Serologische Methoden und Techniken, die auf der Detektion von Antikörpern beruhen, wie der direkte Agglutinationstest (DAT) für viszerale Leishmaniose sind für den Gebrauch vor Ort entwickelt worden (Andrade *et al.*, 1987), auch auf PCR basierende Diagnosemethoden sind häufig im Gebrauch. So groß der Wert solcher indirekten Methoden zum Screenen von potentiellen Leishmaniose-Fällen auch ist, bleibt doch die Detektion der Parasiten stets essentiell vor Beginn einer Behandlung mit oft sehr teuren Medikamenten, die z.T. auch starke Nebenwirkungen aufweisen.

Therapie:

Die Substanz der ersten Stunde, die auch heute noch eine der wichtigsten Rollen bei der Leishmaniose-Therapie spielt, ist das Antimon. Die ersten Aufzeichnungen über eine erfolgreiche Anwendung von dreiwertigem Antimon bei CL stammen aus dem Jahre 1913 von Macado und Vianna, 1915 wurde die erfolgreiche Anwendung bei der VL in Sizilien und Indien erstmals beschrieben (Schmidt, H. und Peter, F.M., 1938). Seit über fünfzig Jahren erfolgt die Behandlung vornehmlich der VL, aber auch einiger Formen der CL mit den weniger toxischen pentavalenten Antimonverbindungen Pentostam[®] (Natriumstibogluconat, GlaxoSmithKline) und Glucantime[®] (Meglumin-Antimonat, Aventis), wobei es z.B. für Pentostam[®] auch schon effektive und günstigere Generika gibt (Veeken et al., 2000). Die Verabreichungsart der Antimonpräparate ist allerdings kompliziert und erfordert meist eine Hospitalisierung der Patienten (intravenöse oder intramuskuläre Gabe von 20 mg Antimon/kg Körpergewicht über einen Zeitraum von 21-28 Tagen; Berman, 1997). Die lange Behandlungsdauer führt oft zu schweren Nebenwirkungen wie Übelkeit, Anorexie, Myalgie, Pankreatitis und Schädigungen an Herz und Leber (Lee und Hasbun, 2003). Über den Wirkungsmechanismus dieser Präparate ist noch wenig bis fast nichts bekannt, mögliche Zielstrukturen könnten in der Glykolyse der Parasiten liegen, hier besonders bei der Inhibition der ADP-Phosphorylierung (Berman und Gallalee, 1985; Berman et al., 1987). Auch ist bekannt, dass Amastigote eine größere intrinsische Sensitivität gegenüber Antimon aufweisen als Promastigote (Sereno und Lemesre, 1997), was z.B. auf die in Amastigoten höher ausgeprägte Fähigkeit, aufgenommene Stoffe zu konzentrieren, zurückgeführt werden kann. Mittlerweile spielt auch Resistenzentwicklung eine große Rolle bei der Anwendung dieser Medikamente: In Bihar (Indien) sprechen 30-60% aller VL-Patienten nicht mehr auf die Therapie mit Antimonpräparaten an (Lira et al., 1999).

Als sogenannte "second line drug" kam es seit 1952 bei einem Fehlschlag mit Antimonpräparaten zunächst zum Einsatz von Pentamidin, welches sowohl bei CL als auch bei VL mit Erfolgen eingesetzt wurde (Thakur *et al.*, 1991). Seine hohe Toxizität war und ist jedoch immer der limitierende Faktor bei der Anwendung dieses Wirkstoffes: Er kann zu Hypoglykämie, Diabetes und Tachykardie führen und zeichnet sich außerdem durch seine hohe Nephrotoxizität aus (Soto *et al.*, 1994).

Eine Alternative, vor allem bei den antimonresistenten Fällen in Indien stellen Polyen-Antibiotika wie Amphotericin B (Bristol-Myers Squibb) dar. Dieser Wirkstoff, der seinen Ursprung in der Therapie systemischer Mykosen hat, führt seine selektive Wirkung auf Pilze und Leishmanien auf eine hohe Affinität für 24-substituierte Sterole wie Ergosterol zurück, die sich anstatt Cholesterol in der Plasmamembran dieser Organismen finden. Es bilden sich Poren, die zum Austritt von Ionen und zum daraus resultierenden Zelltod führen. Auch hier kann es aber zu starken Nebenwirkungen wie Fieber, Nephropathie und Myocarditis kommen. Mit AmBisome[®] (Gilead Sciences) und weiteren liposomalen Formulierungen von Amphotericin B konnten die Nebenwirkungen stark reduziert und die Dosis dadurch stark erhöht werden, was zu einer höheren Effektivität der Behandlung führt. Nachteil dieses Wirkstoffes sind allerdings die hohen Kosten, was den Zugang zu dieser Therapie für Patienten in den meisten endemischen Gebieten unmöglich macht (Croft und Yardley, 2002). Zudem zeigt es bei der Behandlung der CL keinen deutlichen Effekt (Berman, 1997).

Die antiprotozoische Aktivität des Aminocylitol-Aminoglycosid-Antibiotikums Paromomycin wurde 1962 erstmal im Mausmodell beschrieben (Eliseev und Kellina, 1964). Bei den Aminoglycosiden handelt es sich um eine etablierte Gruppe antibakterieller Wirkstoffe, die trotz ihrer Toxizität immer noch Anwendung finden. Eine topisch zu verabreichende Version von Paromomycin (Razak Laboratories) findet seit langer Zeit erfolgreiche Anwendung bei CL, eine parenterale Version die mittels Injektion verabreicht wird, befindet sich momentan in der Zulassungsphase, da die hohe Wirksamkeit in klinischen Studien bewiesen wurde (Jha *et al.*, 1998; http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/pr17/leishmaniasis.pdf).

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Medikamenten kann das 2002 für die Behandlung von VL bei Erwachsenen in Indien zugelassene Miltefosin oral verabreicht werden. Dieser Wirkstoff, der zur Gruppe der Lysophosphatidyl-Analoga gehört, wurde zunächst auf seine immunmodulatorische und cancerogene Wirkung überprüft, konnte aber aufgrund schwacher Wirksamkeit und schlechter Toleranz nicht zur parenteralen Krebstherapie eingesetzt werden. Die antileishmanizide Aktivität von Miltefosin wurde erstmals 1987 beschrieben (Achterberg und Gercken, 1987; Croft *et al.*, 1987). In einer klinischen Studie mit VL-Patienten in Bihar (Indien) führte eine Therapie mit 100 mg/kg Körpergewicht über 28 Tage zu einer 95%-igen Heilungsrate (Sundar *et al.*, 1999) und war auch in der Therapie der CL erfolgreich (Soto *et al.*, 2001). Zum Nachteil gereicht Miltefosin seine hohe Teratogenität sowie die hohen Kosten für die Therapie; die lange Halbwertszeit des Wirkstoffes ist ein

Faktor, der die Resistenzentwicklung begünstigt (Jha, 2006). *In vitro* sind Resistenzen schon beschrieben worden (Croft und Coombs, 2003), weswegen zu einer Kombinationstherapie mit anderen Medikamenten geraten wird.

Durch die lokale Hitzeanwendung mithilfe von Mikrowellen konnten in der Behandlung einzelner, noch nicht ulzerierter Läsionen Heilungserfolge zwischen 73 und 90% erzielt werden. Bei der bei CL ebenfalls häufig angewendeten Cryotherapie mit flüssigem Stickstoff liegt die Heilungsrate zwischen 27 und 68%, in Kombination mit lokalen Antimoninjektionen allerdings bei fast 100% (Lee und Hasbun, 2003).

Weitere Medikamente gegen die Leishmaniose befinden sich in verschiedenen Stadien der Entwicklung: Azole wie Ketoconazol und Fluconazol, die die Sterolbiosynthese der Leishmanien hemmen (die der der Pilze sehr ähnlich ist, gegen welche diese Stoffe zunächst eingesetzt wurden) besitzen aber nur bei der Therapie der durch bestimmte *Leishmania*-Spezies verursachten CL Wirksamkeit (Croft und Coombs, 2003). Weitere Ansätze für Therapiemöglichkeiten gibt es bei den Purinanaloga, da Leishmanien Purin nicht *de novo* synthetisieren können, sondern auf einen "Salvage Pathway" angewiesen sind. Ein Problem stellt dabei jedoch die schnelle Metabolisierung und Exkretion der Analoga dar. Auch mit Naturprodukten sowie Pflanzenextrakten wurden schon Therapieversuche unternommen. So zeigen verschiedene pflanzliche Substanzen wie Licochalcone A (Chen *et al.*, 1994) oder 2'-substituierte Quinolone (Fournet *et al.*, 1992) in *in vitro* und *in vivo* Versuchen mit Versuchstieren erste Erfolge, bis zu einer weitreichenden Anwendung dieser Substanzen in der Therapie ist es jedoch noch ein weiter Weg.

Anhand dieser Übersicht ist ersichtlich, dass nach wie vor ein großer Bedarf an wirksamen, einfach zu verabreichenden und vor allem kostengünstigen Medikamenten gegen die Leishmaniose besteht. Ein Hauptproblem bei der Entwicklung und Herstellung solcher Medikamente stellt zweifellos das geringe ökonomische Interesse der Pharmaindustrie an wenig gewinnbringenden Produkten dar. Auch die Erforschung solchen von Kombinationstherapien spielt aufgrund der schnellen Resistenzentwicklungen eine wichtige Rolle. Eine Möglichkeit, neue Therapeutika zu entwickeln liegt in der Erforschung und Entwicklung neuer Zielstrukturen für die medikamentöse Therapie. Die L. mexicana-MAP Kinase LmxMPK1, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, stellt eine solche Zielstruktur dar.

1.1.5 Invasionsmechanismen und Lebenszyklus von Leishmania

Leishmanien sind digenetische Parasiten, bei dem Wechsel von einem Wirt zum anderen durchlaufen sie einen Gestaltswandel: In den Vektoren, den Sandmücken der Gattungen *Phlebotomus* und *Lutzomyia*, leben die spindelförmigen Promastigoten extrazellulär im

Verdauungstrakt. Mit ihrem langen Flagellum sind sie in der Lage, sich an die Mikrovilli des Verdauungstraktes anzuheften, außerdem dient es der Fortbewegung. Im Säugerwirt sind die Parasiten obligat intrazellulär, sie liegen als ovale, unbegeißelte Amastigote hauptsächlich in Phagolysosomen mononuklearer Makrophagen vor (Abb. 3).



Abb. 3: Lebenszyklus von *Leishmania* (Quelle:<u>http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Leishmania_lifecircle_german.png#file</u>)

Bei ihrer Blutmahlzeit nehmen die weiblichen Sandmücken freie Parasiten und infizierte Makrophagen aus der Wunde auf. Diese werden von einer sackartigen peritrophen Membran umgeben, die vom Mitteldarmepithelium des Insektes sekretiert wird und hauptsächlich aus Chitin besteht, welches in eine Protein-Kohlenhydrat-Matrix eingebettet ist (Killick-Kendrick, 1990). Die Amastigoten beginnen nun, zu differenzieren; die frühen prozyklischen Promastigoten besitzen eine elliptische Form und einen relativ kurzen Zellkörper (6-8 µM) und teilen sich schnell. Nach wenigen Tagen wird die peritrophe Membran durch eine von den Parasiten sekretierte Chitinase aufgelöst (Schlein et al., 1991) und die Parasiten migrieren in den Mitteldarm. Die nun prozyklischen Promastigoten proliferieren weiter und heften sich mithilfe ihrer Flagellen an die Mikrovilli des Mitteldarms an. Die Anheftung vorzeitige Ausscheidung Parasiten verhindert eine der und wird über das Oberflächenglykolipid Lipophosphoglykan (LPG) vermittelt, welches den Hauptbestandteil der Promastigoten-Glykokalix darstellt. Nun entwickeln sich zunächst die teilungsinaktiven nectomonaden Promastigoten, die nicht mehr an das Darmepithel binden können und in die vorderen Darmabschnitte wandern. Dort angekommen findet eine Umwandlung in leptomonade Promastigote statt, was wiederum ein proliferationsfähiges Stadium der Entwicklung darstellt. Unter Verlust der Teilungsfähigkeit entwickeln sich nun die metazyklischen Promastigoten, das infektiöse Stadium des Parasiten (Gossage et al., 2003). Diese Umwandlung findet über einen Zeitraum von 5 bis 8 Tagen statt und wird von biochemischen Modifikationen, vor allem in der Zusammensetzung des LPG, begleitet, welche auch verantwortlich für die Bindung der einzelnen *Leishmania*-Spezies an ihren jeweiligen Vektor ist. Während der Metazyklogenese bilden die Parasiten einen sogenannten PSG-Stopfen ("promastigote secretory gel plug"), ein kohlenhydratreiches, gelartiges, dreidimensionales Netzwerk, welches sich hauptsächlich aus sekretiertem schleimartigem filamentösem Proteophosphoglykan (PPG) zusammensetzt und den Mitteldarm verschließt (Rogers *et al.*, 2002). Anschließend kommt es zu einer Zerstörung der Valvula cardiaca, die normalerweise den Rückfluss der Nahrung vom Darm zum Pharynx verhindert (Schlein *et al.*, 1992). Dies führt während der Nahrungsaufnahme der Sandmücke zum teilweisen Reflux der aufgenommenen Blutmahlzeit in die Bisswunde, wobei diese nun mit den infektiösen metazyklischen Promastigoten vermischt ist.

Im Säugerwirt angekommen, sind die Parasiten kurze Zeit den Bestandteilen des Komplementsystems ausgesetzt. Dabei sind die infektiösen metazyklischen Promastigoten verglichen mit den prozyklischen Promastigoten relativ resistent gegenüber der Komplementvermittelten Lyse, trotz der Tatsache, dass beide Formen signifikante Mengen des Oberfläche C3b Komplementfaktors an ihrer binden (Joiner, 1988). Die Oberflächenmetallproteinase gp63 ("Leishmanolysin") spielt dabei eine wichtige Rolle. Sie spaltet auf den metazyklischen Promastigoten C3b, SO dass dieses den Membranzerstörungskomplex nicht mehr binden kann (Brittingham und Mosser, 1996). Zusätzlich findet auch eine spontane Abstoßung des C5b-C9-Komplexes von der Oberfläche der Parasiten, sowie eine Inaktivierung von C3, C5 und C9 durch eine sekretierte Serin/Threonin-Kinase (LPK-1) statt, die so die Komplement-vermittelte Lyse verhindert (Puentes et al., 1990; Hermoso et al., 1991). Durch die oben erwähnte Spaltung von C3b kommt es außerdem zur Generierung der chemotaktischen Peptide C3a und C5a, die Monocyten zur frisch infizierten Stelle locken (Brittingham und Mosser, 1996). Monozyten sind nicht in der Lage, Antigen zu präsentieren und sind daher ideale Wirtszellen für die Parasiten in der frühen Phase der Läsionsbildung (Murray, 1994). Die Parasiten werden dann über rezeptorvermittelte Phagozytose von Makrophagen aufgenommen, dabei sind auch Oberflächenmoleküle der Promastigoten wie gp63 und die PPGs Liganden für die Makrophagenbindung (Alexander und Russell, 1992). Die aufgenommenen Leishmanien sind zunächst in membrangebundenen Phagosomen lokalisiert, diese fusionieren dann mit sekundären Lysosomen und bilden so das Phagolysosom, auch als parasitophore Vakuole (PV) bezeichnet. Die PV besitzt einen sauren pH, ist reich an mikrobiziden Peptiden und hydrolytischen Enzymen. Vor allem die pH- und die Temperaturveränderung führen zur Differenzierung zu Amastigoten: einem Einschmelzen des Flagellums, dem Verschluss der Flagellartasche sowie einer deutlichen Größenreduktion und drastischen Änderungen in der Genexpression. Je nach *Leishmania*-Spezies unterscheiden sich die PV außerdem in Form und Größe. Im Falle von *L. amazonensis* und *L. mexicana* befinden sich zahlreiche Parasiten innerhalb einer Vakuole, während *L. major*- und *L. donovani*-Amastigote einzeln in einer kleinen Vakuole vorliegen (Antoine *et al.*, 1998). Die Amastigoten vermehren sich im Folgenden in der PV, was zur Zerstörung der Wirtszelle und Infektion benachbarter Zellen mit einer konzentrischen Ausbreitung der Läsion um die Stichstelle führt.

Die Infektion mit dem Leishmania-Parasiten verändert einige Prozesse der mikrobiziden Abwehr der Makrophagen. So wird zum Beispiel die Produktion von Superoxid (O_2^{-}) und H₂O₂ inhibiert (Murray *et al.*, 1986)), die zusammen mit der Erzeugung von Stickstoffradikalen zu Beginn einer Infektion den Hauptabwehrmechanismus der Makrophagen darstellt. So ist das LPG an der Verminderung der Superoxidproduktion beteiligt, indem es die Proteinkinase C hemmt, auch gp63 spielt eine Rolle bei der Unterdrückung des sogenannten "oxidative burst" in Monozyten und Neutrophilen (Sorensen et al., 1994). Die Stickoxidsynthase NOS2 (iNOS), die für die Bildung des toxischen Stickoxides verantwortlich ist, wird hingegen sowohl durch LPG als auch durch Glykoinositolphospholipide gehemmt, die die Hauptoberflächenmoleküle der Amastigoten darstellen (Proudfoot et al., 1995). Diese Hemmung findet allerdings nur im Anfangsstadium der Infektion statt, im weiteren Verlauf kommt es dagegen zu einer erhöhten NO-Produktion (Evans et al., 1996). Nach Infektion mit L. donovani zeigen Makrophagen eine verminderte Expression von MHCI- und II-Molekülen sowie eine verminderte Produktion von IL-1 nach Stimulation mit verschiedenen Induktoren. Darüber hinaus kommt es zur Sekretion eines "Activation-supressing Factor" (ASF), welcher die Fähigkeit von Interferon-y blockiert, Makrophagen zu aktivieren (Titus et al., 1992). Eine Leishmanien-Infektion beeinflusst außerdem die Signaltransduktion in den Makrophagen und sorgt für eine veränderte Proteinexpression, unter anderem wird die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine verhindert (Nandan et al., 1999; Martiny et al., 1999; Junghae und Raynes, 2002).

Außer Makrophagen sind auch andere Zelltypen in der Lage, Leishmanien zu phagocytieren: In der Frühphase der Infektion sind dies dendritische Zellen (Caux *et al.*, 1995) und polymorphkernige neutrophile Granulozyten. Diese können vermutlich neben ihrer Abwehrauch eine Wirtsfunktion für die Parasiten übernehmen, bevor es zur Infektion der Makrophagen kommt. Retikulären Fibroblasten wird zugeschrieben, für die oft beobachtete Persistenz der Parasiten verantwortlich zu sein (Bogdan *et al.*, 2000).

1.1.6 Genomorganisation und Genetik

Das *Leishmania*-Genom unterscheidet sich in vielen Punkten von einem typischen eukaryotischen Genom. Es enthält ca. $3,2 - 5 \times 10^7$ Basenpaare (bp) und abhängig von der jeweiligen Spezies eine Anzahl von 34 (*L. mexicana*), 35 (*L. braziliensis*) oder 36 Chromosomen (*L. major*). Diese besitzen repetitive telomere Sequenzen, kondensieren aber

während des mitotischen Zyklus zu keinem Zeitpunkt, weshalb die Visualisierung einzelner Chromosomen nur unter Einsatz der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) möglich ist. Leishmanien werden als GC-reiche Organismen bezeichnet, der Anteil an GC-Paaren in ihrem Genom beträgt um die 60% im Gegensatz zu anderen Eukaryoten (Säuger 45- 50%). Die Sequenzierung des Leishmanien-Genoms wurde 2003 abgeschlossen, als Referenzstamm diente L. major MHOM/IL/81/Friedlin. Die Größe des L. major-Genoms liegt bei 3,36 x 10⁷ bp, die einzelnen Chromosomen umspannen ca. 0,3 bis 2,8 x 10⁶ bp; es konnten bisher 8300 ca. Gene identifiziert werden. die unter http://www.genedb.org/genedb/leish/index.jsp eingesehen werden können.

Leishmania ist ein diploider Organismus und soweit bekannt funktionell asexuell, anders als T. brucei, wo ein sexueller Genaustausch nachgewiesen werden konnte (Gibson und Bailey, 1994). Der Mechanismus der genetischen Rekombination konnte in Leishmania nachgewiesen werden (Taylor et al., 1994). In Verbindung mit der Tatsache, dass für die Generierung einer Deletionsmutante vieler Gene zwei Transfektionsschritte nötig sind (Cruz et al., 1991), spricht dies für das Vorhandensein eines diploiden Genoms. Die Chromosomen von Leishmania besitzen keine für Eukaryoten typischen Zentromerseguenzen und zeigen eine genomische Plastizität, die sich in einer ständig variierenden Chromosomengröße und anzahl manifestiert (Stiles et al., 1999). Dabei entstehen sogenannte "multicopy" Minichromosomen als Resultat einer Amplifikation genomischer Sequenzen. Solche extrachromosomale DNA kann spontan, unter Antibiotikaselektion oder bei nutritivem Stress entstehen (Beverley, 1991) und 5-10% des totalen zellulären DNA-Gehalts ausmachen. Die Amplifikationen können entweder stabil sein, wie z.B. bei der Glucantime-Resistenz oder unstabil, wie bei der Arsenit-Selektion in Abwesenheit des induzierenden Stimulus (Hanson et al., 1992; Wilson et al., 1992). Der Mechanismus der Entstehung der Minichromosomen ist noch nicht vollständig geklärt, es wird aber angenommen, dass die Amplifikation durch homologe intramolekulare Rekombination stattfindet, da die amplifizierten Genloci oft flankierende repetetive direkte oder invertierte Sequenzen enthalten (Olmo et al., 1995).

Neben der DNA des Zellkerns besitzen Leishmanien eine ungewöhnliche mitochondriale DNA, die Kinetoplasten-DNA (namensgebend für die Ordnung der Kinetoplastida). Sie macht ca. 10-15% der gesamten Zell-DNA aus und besteht aus zwei Typen zirkulärer DNA. Die erste, Maxicircle genannt, ist ca. 20-39 kb lang, liegt in 25-50 Kopien pro Zelle vor und repräsentiert die mitochondriale DNA des Parasiten sowie die guide-RNAs. Die DNA der Minicircles, die eine Größe von 0,5-2,8 kb aufweisen, hat keine bekannte Proteinkodierungsfunktion, die 5000-10000 Moleküle pro Zelle kodieren aber ebenfalls für die guide-RNAs. Die Minicircle-DNAs einer einzelnen Leishmanienzelle sind heterogen und

lassen sich in verschiedene Sequenzklassen einteilen; dies macht man sich bei der modernen Differenzierung von Leishmanienspezies zunutze (Gessner *et al.*, 1994).

Im Vergleich mit höheren Eukarvoten gibt es bei Trypanosomatiden bei der Genorganisation und -anordnung sowie bei der Regulierung und Art der Genexpression einige ungewöhnliche Merkmale und Mechanismen. So konnten Introns (charakteristisch für die Genomorganisation in höheren Eukaryoten) sowie die zugehörigen cis-Spleißmechanismen in fast keinem Leishmania-Gen nachgewiesen werden (Stiles et al., 1999), Ausnahme ist bei T. brucei und T. cruzi das Gen, welches für die Poly A-Polymerase codiert (Mair et al., 2000). Obwohl auch viele single-copy Gene nachgewiesen werden konnten, ist doch eine große Anzahl der Gene in *Leishmania*, vor allem stark exprimierte Gene, wie für α - und β -Tubulin, Hitzeschockproteine, Proteasen, Flagellen-Proteine und Oberflächenantigene in vielen Kopien im Genom vertreten. Solche multi-copy-Gene sind normalerweise tandemartig hintereinander angeordnet, gleichzeitig kommen auch sogenannte Gen-Cluster vor, in denen verwandte, aber auch unterschiedliche Gene zusammengefasst sind. Eine tandemartige Anordnung von sich wiederholenden Genen kann dabei ein Mittel sein, die Transkriptmenge bestimmter Gene unabhängig von der Transkriptstabilität zu erhöhen.

Die meisten proteinkodierenden Gene in Leishmania werden von einer RNA-Polymerase II cotranskribiert, Promotoren konnten dabei bisher nicht identifiziert werden. Bei diesem Prozess entsteht eine polycistronische Vorläufer-DNA, die auf zweierlei Weise prozessiert wird: Durch eine Trans-Spleiß-Reaktion wird die entstandene "Einzelgen-mRNA" am 5'-Ende mit einer ca. 40 Nukleotide langen RNA, die als Spliced Leader (SL) bezeichnet wird, versehen und so ein 7-Methylguanosin-Rest (Cap-Struktur) an dieses Ende anfügt. Gleichzeitig wird das 3'-Ende des Transkripts polyadenyliert (Ullu et al., 1993; Matthews et al., 1994)), wodurch eine stabile, translatierbare mRNA entsteht (Clayton, 2002). Trans-Spleiß-Signale sind oft U-reiche Polypyrimidin-Abschnitte, denen sogenannte AG-Akzeptor-Sequenzen nachfolgen. Für die Polyadenylierung gibt es keine eindeutigen Signale, sie erfolgt meist 100-400 Nukleotide stromaufwärts vom Spleißsignal (Clayton, 2002). Der einzige bisher in Leishmania identifizierte RNA-Polymerase II-Promoter kontrolliert die Expression der SL-Sequenzen, die individuell und nicht als Teil einer polycistronischen Einheit transkribiert werden (Saito et al., 1994). Bei diesem Prozess spielt als Proteinkomponente auch der einzige bisher in Leishmania identifizierte Transkriptionsfaktor eine Rolle, der aus drei Untereinheiten besteht, von denen eine homolog zu einer Untereinheit des humanen snRNA Transkriptionsfaktors SNAPc ("small nuclear RNAactivating protein complex") ist (Das und Bellofatto, 2003). Promotoren der Polymerasen I und III wurden ebenfalls gefunden, spielen aber bei der Transkription der meisten proteincodierenden Gene keine Rolle, da deren Transkription durch die Polymerase II erfolgt (Laufer und Günzl, 2001; Nakaar *et al.*, 1997; Gilinger und Bellofatto, 2001).

Generell kann man sagen, dass eine Regulation der Genexpression auf Transkriptionsebene bei Kinetoplastiden nur eine untergeordnete Rolle spielt. Hier findet eine Regulation hauptsächlich posttranskriptional über RNA-Prozessierung durch Trans-Spleißen und Polyadenylierung oder über Stabilität und Abbau der Vorläufer- und der vollständigen mRNA, sowie auf der Translationsebene statt. Einen großen Einfluss auf die RNA-Stabilität und die Translationseffizienz hat dabei die untranslatierte 3'-Region (UTR) des Gens (Clayton, 1999).

Mitochondriale RNA aus Leishmanien wird nach der Transkription dem sogenannten RNA-Editing unterzogen, wobei die zuvor schon erwähnte guide-RNA eine entscheidende Rolle spielt. Anhand der guide-RNA als Vorlage werden bei dem in 3'-5'-Richtung ablaufenden Editing Uridin-Basen eingefügt oder deletiert, was schließlich zu funktionellen offenen Leserahmen führt. Die guide-RNA besteht aus einer zur prä-mRNA komplementären 4-18 Nukleotide langen Ankersequenz, einem die neue Sequenzinformation enthaltenden Bereich aus mindestens 40 Nukleotiden und einer 5-24 Nukleotide langen Oligouridin-Region (Benne, 1994).

Genetische Manipulation bei Kinetoplastiden zur Untersuchung bestimmter Gene ist seit einiger Zeit unter Verwendung verschiedener Methoden möglich (Clayton, 1999). Dabei kann eine dauerhafte Transformation auf zweierlei Wegen erreicht werden: Zum einen kann das zu untersuchende Gen in zwei aufeinanderfolgenden Transfektionsschritten durch verschiedene Antibiotikaresistenzgene ersetzt werden, dabei macht man sich den Mechanismus der homologen Rekombination zunutze. Ein lineares Konstrukt, welches die stromaufwärts (5') sowie die stromabwärts (3') des Gens gelegenen UTRs sowie das gewünschte Resistenzgen zwischen diesen beiden Regionen enthält wird mittels Elektroporation in die Promastigoten eingeschleust. Anhand der UTRs kann dann die homologe Rekombination stattfinden, über die Antibiotikaresistenz erfolgt eine Selektion der transfizierten Klone. Die komplette Deletion Gens in L. eines major, der Dihydrofolatreduktase-Thymidilat-Synthase, gelang 1990 erstmals Cruz und Mitarbeitern (Cruz et al., 1991). Zum anderen kann ein Episom transfiziert werden, bei welchem das zu untersuchende Gen innerhalb einer bekannten intergenen Region vorliegt, die alle notwendigen Signalsequenzen für die RNA-Prozessierung enthält. Zusätzlich enthalten diese Vektoren einen Antibiotika-Selektionsmarker, der eine stabile Transformation unter Selektionsdruck ermöglicht (Laban et al., 1990). Der bei T. brucei standardmäßig angewandte Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) führt bei Leishmania nicht zum Erfolg, vermutlich wegen des Fehlens der dafür notwendigen Zellkomponenten (Robinson und Beverley, 2003).

1.2 Signaltransduktion und MAP Kinase Signalwege

1.2.1 Signalwege in eukaryotischen Zellen

Einzelne Zellen sowie Zellen im Zellverband müssen in der Lage sein, ihre Umgebung wahrzunehmen, um spezifisch auf Veränderungen in dieser reagieren zu können. So können z.B. Prozesse wie das Überleben oder der programmierte Zelltod (Apoptose), Differenzierung, Proliferation sowie Veränderungen der Morphologie und Motilität durch Veränderungen in der Genexpression koordiniert werden. Zusätzlich ermöglicht ein differenziertes System zur Signalwahrnehmung und -integration den Informationsaustausch zwischen einzelnen Zellen in einem vielzelligen Organismus und ermöglicht ihm so, jeder Zelle bestimmte Funktionen zuzuordnen und ihr Verhalten aufeinander abzustimmen.

Mit Hilfe von Rezeptoren in der Zellmembran und auch innerhalb der Zelle selbst können Signale aufgenommen und an eine oder mehrere Signalkaskaden weitergeleitet werden. Diese Weiterleitung wird normalerweise durch gezielte Protein-Protein-Interaktionen zwischen Signalmolekülen ausgelöst, die durch Konformationsänderung zwischen mindestens zwei verschiedenen Zuständen wechseln können und so als molekulare Schalter fungieren.

Hydrophobe Moleküle, wie die Steroidhormone, können die Zellmembran durchqueren und im Zytosol an bestimmte Rezeptoren binden, die im allgemeinen zur Gruppe der ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren gehören. Diese Komplexe wandern dann in den Zellkern, wo sie an bestimmte Nukleotid-Sequenzen, sogenannte "hormon response elements" (HRE), binden und die Transkription verschiedener Gene induzieren oder reprimieren. Auch lösliche Gase wie Kohlenmonoxid oder Stickstoffmonoxid können die Zellmembran passieren und z.B. die Guanylat-Zyklase aktivieren, die dann zyklisches GMP (cGMP) als intrazellulären Signalstoff synthetisiert. Hydrophile Hormone ("first messenger") wie das Adrenalin können die lipophile Zellmembran nicht passieren. Sie binden an in die Zellmembran integrierte Rezeptoren, wobei diese über Konformationsänderungen ihres intrazellulären Teils dann beispielsweise zur Bildung von sekundären Botenstoffen ("second messenger") führen können. Man unterscheidet drei Gruppen von Oberflächenrezeptoren:

Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren: Diese Art von Rezeptoren dient der schnellen Weiterleitung von Signalen zwischen Zellen. Es handelt sich um oligomere Membranproteine, die einen Ionenkanal bilden können. Durch die Bindung z.B. eines Neurotransmitters an den Kanal kommt es zum kurzfristigen Öffnen oder Schließen des

Kanals in der synaptischen Membran und zur Konzentrationsänderung der Ionen über der Membran, wodurch das Signal ohne Zwischenschritte weitergeleitet wird.

<u>7-Helix-Rezeptoren:</u> Bei diesen Proteinen, zu denen auch die G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören, handelt es sich um Rezeptoren, die über sieben α-Helices in der Zellmembran verankert sind. Sie leiten äußere hormonelle oder sensorische Signale in das Zellinnere weiter. Dabei wird zum Beispiel das Guanosintriphosphat (GTP)-bindende Protein (G-Protein) an der Innenseite der Zytoplasmamembran aktiviert, wodurch es zur Aktivierung der Adenylat Zyklase-Kaskade kommt. Das zyklische AMP (cAMP), welches dabei gebildet wird, dient als "second messenger", es kommt zur Ausschüttung von intrazellulärem Calcium, welches wiederum ein wichtiger Signalgeber ist.

Enzymgekoppelte Rezeptoren: Diese Rezeptoren weisen entweder selbst katalytische Aktivität auf oder sind intrazellulär mit einem Enzym gekoppelt. Ein klassisches Beispiel für diesen Rezeptortyp sind die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs). Sie besitzen einen extrazellulären Anteil, der das Signal empfängt, eine Transmembrandomäne und einen intrazellulären Anteil mit Tyrosin-Kinase-Funktion. Zu dieser Klasse von Rezeptoren gehören z.B. der EGF (Epidermal Growth Factor)-Rezeptor oder der Insulin-Rezeptor. Wird ein Signal empfangen, kommt es zur Phosphorylierung der Rezeptoren untereinander und anderer membranständiger Proteine an spezifischen Tyrosinresten, an die sich Proteine anlagern können, die spezielle Phosphotyrosin-bindende (PTB-) oder SH (SRC homologe)2-Domänen besitzen. Über solche Adapterproteine wie z.B. die Phospholipase C können nun Phosphorylierungen weitergegeben werden. Andere Adapterproteine wiederum stellen nur Vermittler dar, deren Strukturveränderungen von anderen Proteinen erkannt werden, die dann das Signal weiterleiten. Adapterproteine enthalten oftmals sogenannte SH3-Domänen, die an prolinreiche Aminosäuremotive weiterer intrazellulärer Proteine binden können.

Als Resultat solcher Mechanismen können auch die Mitogen aktivierten Protein (MAP)-Kinase Kaskaden, die Gegenstand dieser Arbeit sind, aktiviert werden, die in höheren Eukaryoten schließlich zu Änderungen in der Genexpression führen können. Neben einer Verstärkung des Signals kann es bei der Weiterleitung von Signaltransduktionskaskaden auch zu einer Quervernetzung von Signalwegen kommen, Signale verschiedener Kaskaden können konvergieren und sich dabei gegenseitig verstärken oder abschwächen.

1.2.2 Proteinkinasen und Proteinphosphorylierung

Die Proteinphosphorylierung ist eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen. Ungefähr ein Drittel aller bekannten Säugerproteine weisen gebundenes Phosphat auf. Durch reversible Phosphorylierung können die Eigenschaften von Proteinen auf vielfältige Weise verändert werden. Es kann zur Aktivierung oder Hemmung einer Enzymaktivität kommen, Bindungseigenschaften des Proteins, die Stabilität und die subzelluläre Lokalisation können beeinflusst werden. Die Proteinphosphorylierung ist außerdem verantwortlich für eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie Differenzierung, Proliferation, Zellbewegung, Apoptose, eine Vielzahl von Stoffwechselvorgängen und die Signalweiterleitung. Bei letzterer spielen vor allem Proteinkinasen und -phosphatasen eine entscheidende Rolle. Sie regulieren oftmals als antagonistische Paare die "Ein-" und "Ausschaltung" der verschiedensten Enzymaktivitäten. Dabei stellen die Proteinkinasen insgesamt 2% aller in Säugern bekannten Gene dar, womit sie eine der größten Genfamilien bilden. Mutationen in Kinasen sind häufig Auslöser für Krankheiten, wie z.B. Krebs, so dass ein besonderes Augenmerk auf der Erforschung ihrer Aufgaben und Funktionsweisen liegt. Man unterscheidet generell zwischen drei großen Klassen von Kinasen: Tyrosinkinasen übertragen den endständigen Phosphorylrest von ATP oder GTP auf eine Tyrosinseitenkette Substrats, während Serin-/Threoninkinasen entsprechend auf Serineines und Threoninseitenketten spezialisiert sind. Eine Ausnahme stellen die sogenannten dualspezifischen Kinasen wie die MAP Kinase Kinasen sowie die LAMMER-Kinasen dar, die sowohl aliphatische als auch aromatische Seitenketten phosphorylieren können (Lee et al., 1996; Hanks et al., 1988). Dabei ist Serin die am häufigsten phosphorylierte Aminosäure. Das Verhältnis der Phosphorylierung von Ser, Thr und Tyr liegt bei 1800 : 200 : 1.

Die Struktur von Proteinkinasen ist ebenso wie der Mechanismus der Phosphotransfer-Reaktion hoch konserviert. In der Regel sind sie in zwei Domänen unterteilt, die durch eine tiefe Furche, in der sich das aktive Zentrum des Enzyms befindet, getrennt sind (Abb. 4). Die N-terminale Domäne besteht aus einem 5-strängigen antiparallelen β -Faltblatt und einer α -Helix (α C-Helix), deren hauptsächliche Aufgabe die Bindung und Orientierung des Nukleotidsubstrates (ATP oder GTP) ist.



Abb.4: Struktureller Aufbau der katalytischen Einheit einer Kinase (aus Krupa et al., 2004).

Die größere C-terminale Domäne setzt sich fast ausschließlich aus α-Helices zusammen, sie ist für die Bindung des Peptidsubstrates sowie den Transfer der Phosphorylgruppe zuständig. Die katalytische Domäne von Proteinkinasen besteht aus ca. 300 Aminosäuren (AS) und umfasst 12 hochkonservierte Subdomänen, die durch Abschnitte geringerer Homologie voneinander getrennt werden.

An der Bindung und Orientierung des Nukleotidsubstrats sind Aminosäuren und konservierte Strukturen in beiden Domänen beteiligt: die glycinreiche Schleife des Phosphatankers zwischen dem β 1- und dem β 2-Strang sowie zwei Asparagin- und Aspartatreste in Subdomäne VIb und VII, die an der Bindung der zusätzlich benötigten divalenten Kationen beteiligt sind, sowie ein hochkonservierter Lysinrest, der mit einem Glutamatrest der α C-Helix eine Salzbrücke bildet und so stabilisiert und ausgerichtet wird. Dieser Lysinrest ist essentiell für die Phosphatgruppenübertragung, da er die α - und β -Phosphatgruppen des ATP (GTP) koordiniert (Matte *et al.*, 1998). Eine zentral gelegene 20-30 AS lange Aktivierungsschleife bildet eine Art Plattform für das Peptidsubstrat, diese ist allerdings nur zugänglich, wenn das TXY-Motiv in der Aktivierungsschleife sich im phosphorylierten Zustand befindet. An diesem Prozess ist ein am Rand der Aktivierungsschleife gelegenes hochkonserviertes DFG-Motiv beteiligt, welches den oben erwähnten Aspartatrest enhält. In der katalytischen Schleife liegt neben dem ebenfalls zuvor erwähnten Asparagin ein weiterer Aspartatrest vor, der mit dem Proton der zu phosphorylierenden Hydroxylgruppe des Peptidsubstrats in Wechselwirkung tritt (Huse und Kuriyan, 2002; Krupa *et al.*, 2004).

1.2.3 MAP Kinase Signalwege

Die Mitogen-aktivierten Protein (MAP) Kinase Signalwege sind zentrale Komponenten der zellulären Signaltransduktion. Sie stellen die Hauptkommunikationslinien in einem komplizierten Signalnetzwerk dar, welches für die Regulation vieler zellulärer Prozesse verantwortlich zeichnet, wie z.B. Proliferation, Differenzierung, Stressantwort oder Apoptose. Ein besonderer Fokus der aktuellen Forschung liegt auf der Erforschung der vielfältigen Funktionen der MAP Kinase Kaskaden bei der Entstehung von Krankheiten. Die ersten Mitglieder dieser Gruppe von Enzymen wurden Ende der 80er Jahre im Rahmen einer extensiven Suche nach Substraten von Tyrosinkinasen als mitogen-stimulierte Phosphotyrosinproteine entdeckt (Rossomando *et al.*, 1989), darauf beruht der Name "Mitogen-aktivierte Protein Kinase".

Den Kern der MAP Kinase Kaskade bildet ein Modul aus drei Elementen: Die MAP Kinase Kinase Kinasen (MAPKKK) aktivieren die dual-spezifischen MAP Kinase Kinasen (MAPKK), die wiederum über Phosphorylierung eines hochkonservierten TXY-Motivs in der Aktivierungsschleife die zentralen Komponenten der Kaskade, die MAP Kinasen, aktivieren. Die MAPKK sind dabei in der Regel hochspezifisch für die von ihnen aktivierte MAP Kinase. Im Anschluss an ihre Aktivierung sind die MAP Kinasen in der Lage z.B. in den Zellkern zu

translozieren und verschiedene Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren, womit sie einen direkten Einfluss auf die Regulation der Genexpression in höheren Eukaryoten haben. Aber auch verschiedene andere intrazelluläre Proteine wie z.B. die RNA Polymerase II, Proteine des Zytoskeletts oder weitere Proteinkinasen, wie die MAPK-aktivierten Proteinkinasen (MAPKAPs), werden von MAP Kinasen reguliert.

In der Gruppe der MAP Kinasen der höheren Eukaryoten unterscheidet man zwischen vier Untergruppen (Tanoue und Nishida, 2002). Die Aktivität von Kinasen der "extracellular signal regulated kinase" (ERK)-1/2-Gruppe wird hauptsächlich durch Mitogene stimuliert, während Kinasen der p38 ($\alpha/\beta/\gamma/\delta$)- und der JNK/SAPK ("c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases")-Gruppe überwiegend über Stressreize oder inflammatorische Zytokine aktiviert werden. Die Aktivierung von MAP Kinasen der ERK5-Gruppe wird vor allem durch den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), den neuronalen Wachstumsfaktor (NGF) sowie durch osmotischen und oxidativen Stress ausgelöst. Zusätzlich gibt es zu jeder MAP Kinase auch spezifische Phosphatasen, welche die Aktivierung wieder rückgängig machen können.

Trotz der großen Unterschiede zwischen den einzelnen MAP Kinasen gibt es auch einige Gemeinsamkeiten: Um volle Aktivität zu erreichen, müssen sowohl der Threonin- als auch der Tyrosinrest in dem bereits erwähnten Aktivierungsmotiv (TXY) phosphoryliert sein (Payne et al., 1991; L'Allemain et al., 1992; Wu et al., 1992). In Substraten wird meist ein Threonin- oder Serinrest phosphoryliert, dem ein Prolinrest folgt (Pearson et al., 2001), was vor allem sterische Gründe hat. MAP Kinasen besitzen im Gegensatz zu anderen Proteinkinasen nur eine kleine Einbuchtung im aktiven Zentrum, da die normalerweise in Kinasen vorhandene, tiefere Tasche schon durch das phosphorylierte Tyrosin ausgefüllt ist. Prolin, dessen Seitenkette so plaziert wird, dass sie von der Kinaseoberfläche fort weist, ist daher neben Glycin (keine Seitenkette) die präferierte Aminosäure an dieser Position, und ein relativ verlässliches Sequenzmerkmal eukaryotischer MAP Kinase Substrate, während Substrate anderer Kinasen an der P+1-Stelle (P: phosphorylierte Aminosäure) auch eine Aminosäure mit einer großen Seitenkette besitzen können (Pearson et al., 2001). Oftmals besitzen Substrate auch konservierte Domänen (Docking sites) mithilfe derer sie mit der aktivierenden MAP Kinase interagieren können. Die erste Docking Domäne, die identifiziert wurde war ein Motiv des Transkriptionsfaktors c-Jun (Kallunki et al., 1994; Kallunki et al., 1996), welches als δ -Domäne bezeichnet wird und für die Interaktion von c-Jun mit JNK/SAPKs verantwortlich ist. Ähnlich hierzu ist die in vielen MAP Kinase Substraten vorkommende sogenannte D-Domäne. Sie setzt sich aus einem Cluster aus basischen Resten zusammen, dem in einigem Abstand eine (L/I)X(L/I)-Sequenz folgt und ist in vielen Interaktionspartnern von MAP Kinasen aller Untergruppen, z.B. auch in Aktivatoren wie z.B. MEK1/2, vorhanden. Ein anderes distinktes Motiv, welches hauptsächlich bei der Interaktion von ERK1/2 MAP Kinasen mit ihren Substraten eine Rolle spielt, ist das FXFP-Motiv (Yang *et al.*, 1998). Genauso können auch die MAP Kinasen eine sogenannte "Common Docking Domain" (CD-Domäne) besitzen, welche die Sequenz DXXD/E beinhaltet. Sie liegt normalerweise C-terminal zu der katalytischen Domäne und ist neben einer in der Nähe gelegenen ED-Stelle verantwortlich für die Aktivierung und Bindung von ERK an MEK (Tanoue *et al.*, 2000; Tanoue and Nishida, 2003). Darüber hinaus sind MAP Kinasen und ihre Aktivatoren oft an Gerüstproteine gekoppelt, die ebenfalls die Spezifität der Kaskade garantieren (Marcus *et al.*, 1994).

1.2.4 Signaltransduktion in Trypanosomatiden

Wie auch höhere Organismen, müssen Leishmanien in der Lage sein, Änderungen in ihrer Umgebung wahrzunehmen, Signale weiterzuleiten und mittels Regulation der Genexpression auf diese Änderungen zu reagieren. Als digenetische Parasiten sind sie während ihres Lebenszyklus starken Schwankungen der äußeren Bedingungen ausgesetzt, was besonders klar die Notwendigkeit eines differenzierten Signaltransduktionssystems demonstriert. Während über die vielfältigen Prozesse der Signaltransduktion in höheren Eukaryoten und Modellorganismen wie Saccharomyces cerevisiae schon viel bekannt ist, gibt es über die Organismen, die sich entwicklungsgeschichtlich früh von der Eukaryotenlinie abzweigten, nur eingeschränkte Informationen. Viele typische Komponenten der eukaryoten Signaltransduktion konnten über Homologien auch in Leishmania identifiziert werden, wobei aber andererseits Homologe für Schlüsselkomponenten der Signalerkennung, -weiterleitung und der Genexpression bisher nicht nachgewiesen werden konnten (Parsons und Ruben, 2000; Abb. 5).



Abb. 5: Signaltransduktionswege in Trypanosomatiden und höheren Eukaryoten (modifiziert aus Parsons und Ruben, 2000)

Auf der Ebene der Rezeptoren sind die einzigen bisher in Trypanosomatiden nachgewiesenen Moleküle Adenylatzyklase-Rezeptoren (Ross et al., 1991; Sanchez et al., 1995). Die entsprechenden Gene gehören einer in den Trypanosomatiden konservierten Multigenfamilie an. Diese Rezeptoren besitzen eine extrazelluläre Domäne mit Rezeptorfunktion, die in ihrer Zusammensetzung am stärksten variiert, so wie eine intrazelluläre Adenylatzyklase-Domäne (Naula und Seebeck, 2000). Diese Rezeptoren können vermutlich viele verschiedene extrazelluläre Signale erkennen und so die Bildung von cAMP regulieren. Bei cAMP handelt es sich um einen Effektor der Proteinkinase A. Es wurde bereits nachgewiesen, dass er bei der Differenzierung von Trypanosomen eine Rolle spielt (De Castro und Luz, 1993; Rolin et al., 1993). Als weitere Komponenten der Adenylatzyklase-Kaskade konnten ebenfalls Homologe der Proteinkinase A (Boshart und Mottram, 1997; Huang et al., 2002), sowie Phosphodiesterasen identifiziert werden, die den Abbau von cAMP katalysieren (al Chalabi et al., 1989). Substrate der PKA-Homologen wurden bisher jedoch nicht nachgewiesen. Eine weitere wichtige Komponente der Signaltransduktion, die Signalweiterleitung über Calcium als "second messenger", ist ebenfalls in Trypanosomatiden vorhanden. Der entscheidende intrazelluläre Calciumspeicher ist dabei das Acidocalcisom (Parsons und Ruben, 2000). Weitere in höheren Eukaryoten wichtige "second messenger" wie Inositolphosphate scheinen ebenfalls in Trypanosomatiden vorzuliegen. Die an diesem Signalweg beteiligte Phospholipase C (PIPLC) konnten in T.cruzi bereits identifiziert werden (Nozaki et al., 1999), zusätzlich wurden weitere Komponenten dieser Kaskade in T. brucei kloniert (Bringaud et al., 1998)).

Wie in Abb. 5 gezeigt, konnten neben den Adenylatzyklase-Rezeptoren keine anderen Rezeptoren in Trypanosomatiden identifiziert werden. In höheren Eukaryoten gehören dazu normalerweise Rezeptor-Proteinkinasen und -Phosphatasen, 7-Helix-Rezeptoren und heterotrimere G-Proteine. Darüber hinaus sind in Trypanosomatiden bisher keine Tyrosin-Kinasen oder -Phosphatasen bekannt, obwohl Nachweise ihrer Aktivitäten bereits vorliegen (Parsons et al., 1994; Zhong et al., 1998). Signalwege in vielen Organismen münden oft in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche die Genexpression auf Transkriptionsebene beeinflussen. Da diese Moleküle in Trypanosomatiden bisher nicht identifiziert werden konnten und die Regulation der Genexpression vorwiegend posttranskriptional erfolgt, kann man annehmen, dass hier eine Steuerung von Proteinen erfolgt, die z.B. an der RNA-Prozessierung sowie der RNA-Stabilität beteiligt sind. Dass die reversible Phosphorylierung von Proteinen als Signalantwort bei Trypanosomatiden aber eine große Rolle spielen muss, zeigen Untersuchungen, die eine stadienspezifische Proteinphosphorylierung in diesen Organismen nachwiesen (Parsons, 1990; Parsons et al.,1993; Parsons et al., 1995; Aboagye-Kwarteng et al., 1991; Dell und Engel, 1994). Eine

dementsprechend große Anzahl an Proteinkinasen und -Phosphatasen konnte bisher in Trypanosomatiden entdeckt werden. Nach einer Analyse der Kinome der drei Trypanosomatidenarten *L. major*, *T. brucei* und *T. cruzi* beträgt die Gesamtzahl der Kinasen in den jeweiligen Organismen 179 in *L. major*, 156 in *T. brucei* und 171 in *T. cruzi* (Parsons *et al.*, 2005).

Eine besondere Rolle bei der Regulierung des Zellzyklus spielen Zykline und Zyklinabhängige Kinasen (Cyclin dependent kinases; CDKs). Die am besten charakterisierte CDK ist dabei cdc2, die ein Schlüsselelement bei der Kontrolle der Mitose darstellt. In Trypanosomatiden liegt eine Familie von mit cdc2 verwandten Kinasen (CDC2-related kinases, CRKs) vor, die teilweise schon sehr gut beschrieben ist. So konnten in Trypanosomatiden sechs verschiedene CRK-Klassen identifiziert werden (CRK1-6, (Mottram, 1994). CRK3 aus L. mexicana erwies sich als essentiell für den Fortlauf des Zellzyklus in diesem Parasit (Hassan et al., 2001). Eine Ausschaltung dieser Kinase mittels der klassischen Strategie der homologen Rekombination schlug fehl. Unter Zuhilfenahme des Inhibitors Flavopiridol, der scheinbar spezifisch für diese Kinase ist, konnte gezeigt werden, dass Promastigoten in der G2/M-Phase des Zellzyklus arretiert wurden, weshalb eine Rolle dieser CRK beim Übergang von der G2- in die M-Phase vermutet wird. Eine andere CRK aus L. mexicana, CRK1, ist ebenfalls essentiell für den Parasiten und wird derart posttranslational reguliert, dass sie nur in den Promastigoten, nicht aber in Amastigoten aktiv ist (Mottram et al., 1993; Mottram et al., 1996). Zu diesen beiden Kinasen gibt es auch in den anderen Trypanosomatiden gut charakterisierte Homologe, so zeigen RNAi-vermittelte "knockdowns" der beiden Gene in T. brucei ähnliche Phänotypen (Tu und Wang, 2004; Tu und Wang, 2005).

Darüber hinaus wurden in *T. brucei* 1993 von Gale und Parsons zwei Gene von NIMAähnlichen Proteinkinasen kloniert, nrkA und B (Gale und Parsons, 1993). Die NIMA-Kinase ("never in mitosis/Aspergillus") wurde erstmals in *Aspergillus* identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass es sich hier um eine G2-spezifische, zyklin-unabhängige Serin/Threoninkinase handelt, die der Pilz für den Eintritt in die Mitose benötigt (Osmani *et al.*, 1988)). Andere wichtige Kinasen, die den Übergang von der Mitose zur G1-Phase regulieren, sind die Poloähnlichen Kinasen (PLK). Homologe konnten bereits in *T. brucei* und *Leishmania* identifiziert werden (Graham *et al.*, 1998; Wiese und Mitarbeiter, unveröffentlicht).

Auch Homologe zu Komponenten der MAP Kinase Kaskaden konnten bereits in Trypanosomatiden identifiziert werden. Das erste Homolog einer MAP Kinase, Kfr 1, wurde 1994 von Hua und Wang in *T. brucei* gefunden (Hua und Wang, 1994); später konnten auch in *L. mexicana* 9 MAPK Homologe identifiziert und kloniert werden (LmxMPK1-9: (Wiese *et*

al., 2003b). Letztendlich wurden im *L. major* Friedlin Genomprojekt eine Zahl von 15 MAP Kinase Homologen ausgemacht (Parsons *et al.*, 2005), die zugehörigen Gene wurden inzwischen ebenfalls in *L. mexicana* identifiziert und kloniert (LmxMPK10-15: Wiese und Mitarbeiter, unveröffentlicht). Dabei enthalten alle Proteine die für Proteinkinasen typischen Subdomänen, sowie das typische Aktivierungsmotiv TXY in der Phosphorylierungslippe. Für LmxMPK8 und vor allem LmxMPK6 konnte eine besonders große zusätzliche C-terminale Domäne nachgewiesen werden, die mehrere SH3-Bindungsmotive enthält und möglicherweise regulatorische Funktion hat, wie bereits für eine weitere Kinase aus *T. brucei*, TbECK1, beschrieben (Ellis *et al.*, 2004). Diese Kinase besitzt sowohl Eigenschaften von MAP Kinasen wie als auch von CDKs und spielt eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus.

Die MAP Kinasen aus L. mexicana weisen Größen zwischen 41 und 166 kD auf und werden soweit bekannt durch "single-copy"-Gene, kodiert (Wiese et al., 2003b). Einigen Homologen konnten experimentell bereits verschiedene Funktionen zugeordnet werden. So ist LmxMPK1, die Kinase die Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, bereits 1998 als essentiell für das amastigote Stadium des Parasiten beschrieben worden (Wiese, 1998). Diese Kinase ist in beiden Lebensstadien vorhanden, ein Verlust des Gens zeigt allerdings keinen sichtbaren Effekt auf das promastigote Lebensstadium. Das Homolog zu dieser Kinase in T. brucei ist die bereits oben erwähnte Kfr 1, die ebenfalls eine Rolle bei der Proliferation des Säugerstadiums des Parasiten spielt (Hua und Wang, 1997). Auch in weiteren Leishmania Spezies konnten Homologe dieser Kinase nachgewiesen werden (Wiese und Goercke, 2001). LmxMPK4 wurde kürzlich als essentiell für beide Lebensstadien von L. mexicana beschrieben, da eine Deletion des zugehörigen Gens nicht möglich war und eine episomale Kopie des Gens im Deletionshintergrund auch nach langfristigem Überdauern der Parasiten in der Maus ohne Selektionsdruck bestehen blieb (Wang et al., 2005). TbMAPK2, das zugehörige Homolog aus T. brucei steuert die Differenzierung des Parasiten von der Blutstrom- zur prozyklischen Form (Müller et al., 2002). LmxMPK9, die spezifisch für das promastigote Lebensstadium von L. mexicana ist, scheint, wie auch LmxMPK3, eine Rolle bei der Regulation der Flagellenlänge zu spielen, dabei unterstützt LmxMPK9 wahrscheinlich den retrograden intraflagellaren Transport (IFT), während LmxMPK3 für den anterograden Transport zuständig ist (Bengs et al., 2005; Erdmann, 2004; Erdmann et al., 2006). Weiterhin ist LmxMPK5 ebenfalls essentiell für das amastigote Lebensstadium von L. mexicana, über die Funktion dieser MAP Kinase ist aber noch nichts bekannt (Wanders, 2004). Ein besonderes Augenmerk liegt in der Arbeitsgruppe von Dr. Wiese zurzeit auf der Identifizierung von MAPK/MAPKK-Paaren. In L. mexicana konnten bis zum Beginn dieser Arbeit vier potentielle MAPKK Homologe identifiziert werden. Dabei handelt es sich um LmxMKK (Wiese et al., 2003a; Scholz, 2003), LmxPK2 und 3 (Wiese und Mitarbeiter, unveröffentlicht) und LmxPK4 (Kuhn, 2004; Kuhn und Wiese, 2005). Gut erforscht sind hier schon LmxMKK so wie LmxPK4, die zusammen mit den schon erwähnten LmxMPK3 und 9 wahrscheinlich die Flagellenlänge in Promastigoten regulieren. Dabei konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass es sich bei LmxMPK3 um ein Substrat von LmxMKK handelt (Erdmann et al., 2006). Ein ähnlicher Zusammenhang wird zwischen LmxPK4 und LmxMPK9 vermutet, konnte aber bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen werden (Kuhn, 2004). LmxPK4 wird außerdem eine Rolle bei der Differenzierung vom pro- zum amastigoten zugesprochen, Deletionsmutante Lebensstadium da eine dieser MAPKK im Infektionsexperiment nur kleine bis gar keine Läsionen erzeugen konnte. Im L. major-Genom wurden drei weitere putative MAPKK Homologe identifiziert (Parsons et al., 2005), die Klonierung und Charakterisierung der zugehörigen L. mexicana Homologen war unter anderem Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Kürzlich konnte darüber hinaus in *L. major* ein putativer MAPKK-Aktivator, eine MAPKKK, identifiziert und kloniert werden (Agron *et al.*, 2005). Das Gen der Kinase MRK1 ließ sich bisher nicht deletieren, so dass es sich auch hier vermutlich um ein essentielles Gen handelt. Mithilfe des *L. major* Genomprojektes wurden bisher noch 23 weitere putative MAPKKK Homologe identifiziert (Parsons *et al.*, 2005)). Diese große Zahl weist darauf hin, dass MAP Kinase Signalwege in Trypanosomatiden noch wesentlich komplexer als bisher angenommen sein könnten.

1.2.5 LmxMPK1 - Kenntnisstand und Aufgabenstellung

Das MAP Kinase Homolog LmxMPK1 aus *L. mexicana* wurde 1995 von Wiese entdeckt. Eine Deletionsmutante erwies sich im Maus- sowie im Makrophagen-Infektionsexperiment als nicht-proliferativ, es konnte keine Infektion etabliert werden (Wiese, 1998). Auf das promastigote Lebensstadium der Parasiten hingegen hat der Verlust des Gens keine messbaren Auswirkungen, obwohl sowohl *LmxMPK1*-mRNA als auch LmxMPK1-Protein in beiden Lebensstadien nachgewiesen wurde. Im folgenden wurde mehrfach versucht, das rekombinante Protein in *E. coli* zu exprimieren und aufzureinigen, um Aktivitätstests durchführen und nach möglichen Inhibitoren suchen zu können, da das Protein aufgrund seiner Wichtigkeit für das Säugerstadium des Parasiten scheinbar eine gute Zielstruktur für die medikamentöse Therapie darstellt. Leider gelang eine rekombinante Expression in *E. coli* zunächst nicht, so dass versucht wurde, das rekombinante Enzym mit einem 6xHis-Tag versehen im Baculovirus-System in *Sf* (*Spodoptera frugiperda*) 9-Zellen herzustellen. 2003 konnte erstmals Aktivität von rekombinanter LmxMPK1 nachgewiesen werden (Schuldt, 2003). Aufgrund der umständlichen Handhabung des Systems sowie der geringen Ausbeute an Protein sollte aber im Rahmen dieser Arbeit erneut versucht werden, eine rekombinante

Expression von LmxMPK1 in E. coli zu etablieren. Das rekombinante Enzym sollte dann biochemisch charakterisiert und die optimalen Reaktionsbedingungen sowie kinetische Parameter bestimmt werden. Darüber hinaus waren zu Beginn der Arbeit bereits verschiedene Mutanten von LmxMPK1 vorhanden. Eine Mutante, bei der ein hochkonservierter katalytischer Lysinrest in Position 43 gegen Methionin ausgetauscht wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls rekombinant exprimiert und im Aktivitätstest eingesetzt werden, um zu zeigen, dass die resultierende K43M-Mutante keine Aktivität mehr aufweist. Zusätzlich lagen bereits verschiedene Mutanten im Aktivierungsmotiv der Phosphorylierungslippe (TDY) in Leishmanien-Expressionsvektoren vor. Drei Mutanten waren erstellt worden, bei denen ein Verlust der Kinase-Aktivität erwartet wurde. Hier wurden die beiden zu phosphorylierenden Aminosäuren Threonin und Tyrosin einzeln oder gemeinsam gegen unpolare Reste ausgetauscht (ADY-, TDF- und ADF-Mutante). Eine weitere Mutante, deren Phosphorylierungsmotiv dem der humanen ERK2 gleicht (TEY), wie auch drei Mutanten, bei denen der Threonin- und der Tyrosinrest wiederum einzeln oder gemeinsam durch Glutamat ersetzt worden waren (EDY-, TDE- und EDE-Mutante), lagen außerdem vor. Mit diesen Mutanten sollte gezeigt werden, ob eine konstitutive Aktivierung der Kinase durch den Einbau der negativ geladenen Aminosäure Glutamat möglich ist. Diese Methode war zuvor bei der murinen MAPKK MKK1, wie als auch bei der L. mexicana-MAPKK LmxMKK erfolgreich eingesetzt worden (Mansour et al., 1996; Scholz, 2003). Zu Beginn dieser Arbeit lagen bereits rekombinante Leishmania-Promastigoten vor, die je eine der genannten Mutanten auf einem episomalen Konstrukt im Deletionshintergrund enthielten. Dabei konnte mithilfe eines Immunoblots gezeigt werden, dass alle Mutanten mit Ausnahme der EDE-Mutante in Leishmania-Promastigoten exprimiert wurden, wenn auch im Falle der K43M-Mutante nur in geringerer Menge (Melzer und Wiese, 2007). Alle Mutanten, mit Ausnahme der EDE-Mutante, wurden daher für Mausinfektionen verwendet, um den Einfluss Mutationen in vivo zu bestimmen. Abb. 6 zeigt die Ergebnisse dieses der Infektionsexperimentes. Dargestellt ist die Fußdickenzunahme in Abhängigkeit von der Zeit nach der Injektion der Parasiten. Diese stellt ein Maß für die Infektiosität dar.

Wie man sehen kann, sind nur die TDF- und die EDY- sowie die TEY-Mutante in der Lage die Deletionsmutante von LmxMPK1 zu komplementieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun die verschiedenen Mutanten rekombinant in *E. coli* exprimiert und auf ihre Aktivität überprüft werden. Die oben dargestellten Ergebnisse werden daher im Diskussionsteil dieser Arbeit gemeinsam mit den neu gewonnenen Erkenntnissen aus der rekombinanten Expression der Enzyme und den Kinase-Tests diskutiert



Abb. 6: Infektionsexperimente mit verschiedenen Mutanten von LmxMPK1 in Balb/c-Mäusen: Legende: (Δ) *L. mexicana* Wildtyp, (\diamond) Δ LmxMPK1, (\times) Δ LmxMPK1+LmxMPK1(K43M), (|) Δ LmxMPK1+LmxMPK1(ADF), (\Box) Δ LmxMPK1+LmxMPK1(ADY), (\triangleright) Δ LmxMPK1+LmxMPK1(EDY), (\heartsuit) Δ LmxMPK1+LmxMPK1(TEY), (\triangleleft) Δ LmxMPK1+LmxMPK1(TDE), (\bigcirc) Δ LmxMPK1+LmxMPK1(TDF) (aus: Melzer und Wiese, 2007).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von Substraten und Aktivatoren von LmxMPK1. Durch die Aufklärung der Kaskade, deren Teil LmxMPK1 ist, wäre es möglich, neben der MAP Kinase selbst noch andere potentielle Zielstrukturen für die medikamentöse Therapie der Leishmaniose zu finden. Könnte man zwei oder mehrere Komponenten in einem Signalweg inhibieren, würde das die Möglichkeit von Kompensationsmechanismen und Resistenzentwicklung stark verringern. Darüber hinaus wäre es interessant ein Substrat einer Leishmania MAP Kinase zu identifizieren, da es sich aufgrund des Fehlens von "klassischen" Substraten (z.B. Transkriptionsfaktoren) um ein bisher unbekanntes genregulatorisches Molekül handeln könnte. Zuletzt sollte in dieser Arbeit der Wert von LmxMPK1 als Zielstruktur für eine gezielte Inhibition bzw. für eine medikamentöse Therapie evaluiert werden. Zu diesem Zweck wurde eine inhibitorsensitive Mutante sowohl als rekombinantes Enzym als auch auf einem episomalen Expressionskonstrukt in Leishmania im LmxMPK1-Deletionshintergrund hergestellt. In dieser Mutante ist der Phenylalaninrest an Position 93 gegen Glycin ausgetauscht, was darin resultiert, dass im aktiven Zentrum der Kinase eine Tasche generiert wird. In diese Tasche können dann spezifische Inhibitoren binden, die somit nur die mutierten und nicht die Wildtyp-Kinasen ausschalten (Bishop et al., 2000; Bishop et al., 2001). Diese Strategie hilft zum einen, ein System für den Inhibitortest zu etablieren und liefert zum anderen zusätzlich zur Deletion des Enzyms eine weitere Möglichkeit, die Funktion der Kinase in vivo zu erschließen und nach Substraten zu suchen.

2 Material

2.1 Chemikalien

Aufgeführt werden neben den verwendeten Chemikalien die zugehörigen Gefahrensymbole, die Risiko- und Sicherheitssätze (R- und S-Sätze) sowie die Herstellerangaben.

Acrylamid 30% (w/v)/ 0,8% (w/v) Bisacrylamid Stammlösung	Т	R:45-46-20/21-25-36/38- 43-48/23/24/25-62 S: 53-36/37-45	Carl Roth, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)			Roche Diagnostics, Mannheim
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	O;Xn	R:8-22-36/37-38-42/43 S: 22-26-36/37	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Ampicillin	Xn	R: 36/37/38-42/43 S: 22-26-36/37	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Bacto-Agar			Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Bacto-Trypton			Becton Dickinson, Heidelberg
Bleocin (Phleomycin)	Xn	R: 20/21/22-36/37/38-40- 42/43-68 S: 22-26-36/37/39-45	Merck Biosciences, Schwalbach
Blockierungsreagenz	Xn	R: 22-36/37/38 S: 26-28-37	Roche Diagnostics, Mannheim
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D- galactosid (X-Gal)			Roche Diagnostics, Mannheim
Borsäure			Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA)			Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Bromphenolblau		S: 22-24/25	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Calciumchlorid	Xi	R: 36 S: 22-24	Merck, Darmstadt
Chloroform	Xn	R: 22-38-40-48/20/22 S: 36/37	Carl Roth, Karlsruhe
Cobaltchlorid	T; Xn	R: 49-22-42/43-50/53 S: 53-22-45-60-61	Carl Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R-250			Serva, Heidelberg
CSPD®	Xn	R: 22-38-41-48/22 S: 26-36/37/39-46	Roche Diagnostics, Mannheim
4´, 6-Diamino-2-phenylindol- dilactat (DAPI)		S: 22.24/25	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Т	R: 61-20/21-36	Merck, Darmstadt
--	------	--	---
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Xi	R: 36/38 S: 26	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat			Merck, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Xn	R: 22-36/37/38 S: 26-36	Biomol, Hamburg
dNTP-Mix			Roche Diagnostics, Mannheim
Electrophoresis Grade Agarose			Amersham Biosciences, Freiburg
Essigsäure	С	R: 10-35 S: 23-26-45	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	F	R: 11 S: 2-7-16	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	T+	R: 22-26-36/37/38-68 S: 26-28-36/37-45	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Xn	R:22	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylenglykol-bis(2-aminoethyl- ether)-N,N´-tetraessigsäure			Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Fischsperm-DNA			Roche Diagnostics, Mannheim
Formaldehyd 37% (Formalin)	Т	R: 23/24/25-34-40-43 S: 26-36/37/39-45-51	Carl Roth, Karlsruhe
Formamid	Т	R: 61 S: 53-45	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)			Gibco BRL, Eggenstein/ PAN Biotech, Aidenbach
Gelatine			Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Geneticin (G418)	Xn	R: 20/22-36/37/38 S: 26-28-36	Roche Diagnostics, Mannheim
Glukose			Merck Darmstadt
L-Glutamin (0,2 M für Zellkultur)			PAN Biotech, Aidenbach
Glutardialdehyd	T; N	R: 22-23-34-42/43-50 S: 26-36/37/39-45-61	Merck, Darmstadt
Glutathion, reduziert			Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Glycerin			Carl Roth, Karlsruhe
Glycin			Carl Roth, Karlsruhe
Hämin (bovines Häminchlorid)		S: 22-24/25	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Hefe-Extrakt			Carl Roth, Karlsruhe

N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N´-[2- ethansulfonsäure] (HEPES)			Merck, Darmstadt
Hygromycin B	T+	R: 26/27/28-41-42/43 S: 22-26-28-36/37/39-45	Merck Biosciences, Schwalbach
Igepal CA-630 (Nonidet P-40)	Xn	R: 22-41 S: 26-36/39	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Imidazol	С	R: 22-34 S: 22-26-36/37/39-45	Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol	Xn	R: 10-20 S: 24/25	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	F; Xi	R: 11-36-67 S: 7-16-24/25-26	Carl Roth, Karlsruhe
IsopropyI-β-D-thiogalactosid (IPTG)		S: 22-24/25	Gerbu Biochemicals, Gailberg
Kaliumacetat			Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid			Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat			Merck, Darmstadt
Kanamycinsulfat	Т	R: 61 S: 26-36/37/39-45	Gerbu Biochemicals, Gailberg
N-Lauroylsarcosin	Xi	R: 36/37/38 S: 26-36	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Leupeptin			Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Lithiumchlorid	Xn	R: 22-36/37/38 S: 26-36/37/39	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Magermilchpulver			Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid			Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat			Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Xn	R: 22-36-37/38 S: 26-28-37	Serva, Heidelberg
Maltose			Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Xn	R: 22	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	T; N	R: 22-24-34-51/53 S: 26-36/37/39-45-60	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Methanol	F; T	R: 11-23/24/25-39/23/24- 25 S: 7-16-36/37-45	Carl Roth, Karlsruhe
2-[N-Morpholino]-ethansulfon- säure (MES)	Xi	R: 36/37/38 S: 36/37/39	Serva, Heidelberg
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)			Gerbu Biochemicals, Gailberg
Mowiol 4-88			Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Xi	R: 36 S: 22-26	Merck, Darmstadt

Natriumchlorid			Merck, Darmstadt
Natriumcitrat			Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat			Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Xi	R: 22-36/38 S: 22-24/25	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Т	R: 25-32-36/38 S: 22-24/25	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	С	R: 35 S: 2-26-37/39-45	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Т	R: 25-36/37/38 S: 37-45	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumthiosulfat			Merck, Darmstadt
ortho-Phenanthrolin	T; N	R: 25-50/53	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Paraformaldehyd	С	R: 20/22-34-40-43 S: 26-36/37/39	Sigma Aldrich Chemie, Steinheik
Penstrep (1000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)			PAN Biotech, Aidenbach
Phenol, TE-äquilibiriert pH 7,5-8,0	Т	R: 24/25-34 S: 2-28-45	Carl Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Т	R: 25-34 S: 26-36/37/39	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Poly-L-Lysin Hydrobromid			Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Puromycin	Xn	R: 22 S: 22-24/25	Carl Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid			Merck, Darmstadt
Salzsäure	С	R. 34-37 S: 26-45	Carl Roth, Karlsruhe
Schneiders Drosophila Medium			PAN Biotech, Aidenbach
SDM-Medium			PAN Biotech, Aidenbach
Silbernitrat	C; N	R: 34-50/53 S: 26-45-60-61	Merck, Darmstadt
Staurosporin	Xn	R: 40 S: 36/37	Serva, Heidelberg
Tetracyclin	Xi	R: 36/37/38	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
N,N,N´,N´-Tetramethylethylen- diamin (TEMED)	F; C	R: 11-20/22-34 S: 16-26-36/37/39-45	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
N ^a -p-Tosyl-L-Lysin- Chloromethylketon-Hydrochlorid	Xi	R: 36/37/38 S: 26-36	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Tris Base	Xi	R: 36/38	Carl Roth, Karlsruhe

Triton X-100	Xn	R: 22-41 S: 26-36/39	Sigma Aldrich, Steinheim
Tween 20			Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Xi	R: 36/37/38 S: 26-36	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim

2.2 Geräte

Centrifuge 5415C, 5415R und 5415D	Eppendorf, Hamburg
GS-6KR Centrifuge; GH3.8 Rotor	Beckman Coulter, Krefeld
Hermle Z 400K	Hermle Labortechnik, Wehningen
Optima [™] TL Ultracentrifuge; TLA 55-Rotor	Beckman Coulter, Krefeld
Sigma 1-15	Sigma Laborzentrifugen, Osterode
Sorvall [®] RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge; SS-34 Rotor, GSA-Rotor	Kendro Laboratory Products, Hanau
ProFuge [®] 10 K	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Begasungsbrutschrank mit Kühlung BBK 6220 (Heraeus)	Kendro Laboratory Products, Hanau
Schüttelinkubator Innova 4230	New Brunswick Scientific, USA
Sicherheitswerkbank HERAsafe HS15 (Heraeus)	Kendro Laboratory Products, Hanau
Schüttelwasserbad 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Agarosegel-Elektrophoresekammer	Labtech International, Burkhardtsdorf
Consort E734	Consort nv, Turnhout, Belgien
Gene Power Supply GPS 200/400	Amersham Biosciences, Freiburg
Spektralphotometer Ultrospec III	Amersham Biosciences, Freiburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Digital-pH-Meter CG 820	Schott, Hofheim am Taunus
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen
Vortex VF 2	Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen

Darüber hinaus verwendete Geräte werden an den entsprechenden Stellen im Methodenteil angegeben.

2.3 Verbrauchsmaterialien

Sterile Plastikwaren für die Zellkultur wurden von den Firmen Sarstedt (Nürnbrecht), Nunc (Wiesbaden), Greiner Bio-One (Frickenhausen), VWR International (Darmstadt) und Eppendorf (Hamburg) bezogen. Röntgen-Bender (Baden Baden) lieferte die Retina XBA Röntgenfilme. Zusätzlich verwendete Verbrauchsmaterialien sind an den betreffenden Stellen im Methodenteil angegeben.

2.4 Escherichia coli Bakterienstämme

BL21 und BL21DE3	<i>hsdS gal</i> (λcl <i>ts</i> 857 <i>ind</i> 1 Sam7 <i>nin</i> 5 <i>lac</i> UV5- T7 gene 1)
M15[pREP4]	<i>lac ara gal mtl rec</i> A ⁺ <i>uvr</i> ⁺ [pREP4, lacl, kana ^r] (Qiagen, Hilden)
P2392	LE392 (P2 lysogen) (Stratagene, La Jolla, USA)
ΤΟΡ10 Γ΄	F´ [<i>lacl^q</i> Tn <i>10</i> (Tet ^R)] <i>mcrA</i> ∆(<i>mrr-hsd</i> RMS- <i>mcr</i> BC) \u00f880 <i>lacZ</i> ∆M15∆ <i>lacX</i> 74 <i>rec</i> A1 <i>ara</i> D139 ∆ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>gal</i> U <i>gal</i> K rpsL (Str ^R) <i>end</i> A1 <i>nup</i> G (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)
XL1 Blue	recA endA gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F´ proAB lac ^q Z∆M15 Tn <i>10</i> (Tet ^r)] (Stratagene, La Jolla, USA)

2.5 Leishmanien

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

2.6 Versuchstiere

Für die Infektionsversuche wurden zwischen 6 und 10 Wochen alte, weibliche Balb/c-Mäuse verwendet. Die Tiere wurden am Bernhard-Nocht-Institut gezüchtet oder von Charles River (Sulzfeld) erworben.

2.7 Plasmide

Allgemeine und bereits vorliegenden Plasmide:

pASKIBA7	IBA TAGnologies, Göttingen
pBluescript II SK(+)	Stratagene, La Jolla, CA, USA
pCR [®] 2.1TOPO	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
pGEX-KG	(Guan und Dixon, 1991)
pQE8	Qiagen, Hilden
pX63polPAC	Bengs <i>et al.</i> , 2005
pQE8lmpk	Melzer und Wiese, 2007
pGEX-KGImpk	Melzer und Wiese, 2007
pX63polPACGSTImpk	
pX5ImpkWt	Wiese, 1998
pX19ImpkADF	Melzer und Wiese, 2007
pX13ImpkADY	Melzer und Wiese, 2007
pX8lmpkEDE	Melzer und Wiese, 2007
pX5ImpkEDY	Melzer und Wiese, 2007

pX1ImpkTDE	Melzer und Wiese, 2007
pX5ImpkTDF	Melzer und Wiese, 2007
pX6ImpkK43M	Melzer und Wiese, 2007
pFastBacImpk	Schuldt, 2003
pFastBacImpkK43M	Schuldt, 2003

Eine detaillierte Übersicht aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide befindet sich im Anhang.

2.8 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden bei Invitrogen (Karlsruhe), Amersham Biosciences (Freiburg) und Interactiva (UIm) synthetisiert. Unterstrichene Bereiche markieren Erkennungsstellen für die angegebenen Restriktionsendonukleasen, die für Klonierungszwecke eingeführt wurden.

F93G.for	5´ACAC <u>AGATCT</u> GTACCTCGTCGGGGAGTTGATAGAGACCGAT 3´
	(<i>BgI</i> II)
F93G.rev (<i>BgI</i> II)	5´ACAC <u>AGATCT</u> ATGTCGTTGGCCGCACGAAT 3´ (<i>Bgl</i> II)
F144L.for	5'GCCGGCCAACGTATTAGTGAGCAGCGACTGCTCC 3'
lmmkkMut2.sense	5'AGCTTATTGACGACGACGCTGACGACTTCGTTG 3'
lmmkkMut2.anti	5'GTACCAACGAAGTCGTCAGCGTCGTCGTCAATA 3'
Impk C-term anti	5´CACATGTCCATCGCTGTGGA 3´
LmxMPK1IBA.for	5´ <u>GGCGCC</u> GGACCTCATACGGCATCGAC 3´(Sfol)
LmxMPK1IBA.rev	5´ <u>CCATGG</u> ATAATACACGTCTGTTATG 3´ (<i>Nco</i> l)
LmxPK5exp.for	5´ <u>GAATTC</u> G <u>AGATCT</u> C <u>ACATGT</u> CTCGACTGAAAATAAACCTTGAC
	G 3´ (<i>Eco</i> RI, <i>BgI</i> II, <i>Bsp</i> LU11I)
LmxPK5exp.rev	5´ <u>AAGCTTACGTA</u> TCAGAAGAGAGAGCCTGTTTAGTTCATCATCG 3´
	(<i>Hin</i> dIII, <i>Sna</i> BI)
LmxPK6akt.for	5'GGCTGCGGC <u>AAGCTT</u> GAAC <u>GGTACC</u> ATACTGTACAAAGCA 3'
	(<i>Hin</i> dIII, <i>Acc</i> 65I)
LmxPK6akt.rev	5´GTACAGTAT <u>GGTACC</u> GTTC <u>AAGCTT</u> GCCGCAGCCGAAGTCGG
	C 3´ (<i>Acc</i> 65I, <i>Hin</i> dIII)
LmxPK6exp.for	5´C <u>GATATCGGATCC</u> GG <u>TCATGA</u> GGGCGAAGCGCCCGCTCCGTA
	CGTC 3´ (<i>Eco</i> RV, <i>Bam</i> HI, <i>Bsp</i> HI)
LmxPK6exp.rev	5´GTA <u>TACGTA</u> CTACGTGTGACGCAGCTCCGGAAACATGG 3´
	(<i>Sna</i> BI)
LmxPK6Nhe.for	5´ AGCAGAAGTTCAA <u>GCTAGC</u> CGACTTCGGCTGCGGC 3´ (<i>Nhe</i> l)
LmxPK6Nhe.rev	5´ GCAGCCGAAGTCG <u>GCTAGC</u> TTGAACTTCTGCTGAT 3´ (<i>Nhe</i> l)
LmxPK7_2.for	5'GTCGTCATCAACCGCGATAAT 3'

LmxPK7_2.rev.	5´GTTGCGGTGCTCGAAGAGGA 3´
LmxPK7n.for	5 <u>CATATGGGATCC</u> GGTGGCTCAGGGACGACTCA 3′
	(<i>Nd</i> el, <i>Bam</i> HI)
LmxPK7c.rev	5´ <u>GATATCAAGCTT</u> AGCCCAGCGGGCCGG 3´ (<i>Eco</i> RV, <i>Hin</i> dIII)
LmxZF1.for	5´ CGCTCCAGGACGCCTACAAT 3´
LmxZF1.rev	5´ CTGCCCGCGGCAGCAGGTAC 3´
M13pUC-F	5'CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG 3'
M13pUC-R	5´AGCGGATAACAATTTCACACAGG 3´
PK5.for	5'ACTTTGCAACGCCGTACCTCG3'
PK5.rev	5´TACGAGTAGTGCTCGCCTCGC3´
PK5.1for	5´ CGCACAGCTACCACATAGTT 3´
PK5.1rev	5' GCGCTCGATGGCGTCAAGGT 3'
PK5.2for	5' AGGCTACTTCGCCATCTCCT 3'
PK5.2rev	5´ CGCCAGCTCTGCGACAACGA 3´
PK5.3rev	5' CTCTGTCGCGCTAGCACCAT 3'
PK5.4rev	5' TGGTGCTCTCTCAACGTCAAGCTAC 3'
PK6.for	5´ TAAAGCCGGCCAACGTGATGC3´
PK6.rev	5´ ACGACTCTGACCAGTTGAGCG3´
PK6.1for	5´ TCAAATGTCGGCTGACCACT 3´
PK6.1rev	5' TCTGGTGCTTTGTACAGTAT 3'
PK6.2for	5´ CAGATTTCGGTGGAGGAGAT 3´
PK6.2rev	5' GCTTCTTCTCCGCGTCCAGT 3'
PK6.3for	5´ CCGGAGCTGCGTCACACGTA 3´
PK6.3rev	5' GCCCTAGCGATGCCTTTGCT 3'
PK6.4for	5'CGCAGCAGAACTGCTGAACT 3'
PK6.4rev	5´TGCGCAAACAGCGTCTCACA 3´
PK6.5for	5'GAAGTGGAACGCGTCGTCGA 3'
PK6.5rev	5'CGACGCCCACGGATTCGCGAT 3'
PK6.6for	5'CATCGCACGGCGTGTGCTCA 3'
PK6.6rev	5'GAAGACGCGCATCCACGCAA 3'
PK6.7for	5'AGTCTGCCACTGAGCTCATT 3'
PK6.7rev	5'CTGTCGTGATCATCGGTGAA 3'
PK6ds.rev	5'ATATCAGGGTGATAGGTACAC 3'
PK6 <i>Mfe</i> I.rev	5´ ACCATCGCAAGGAGACATCGACACAAACGCTC 3´
PK6 <i>Pci</i> l.for	5'AAGCAGCTGAGCATCCTGATCGAGCTGATGTCC 3'
PK7.for	5'AGCTGCTGCGCGGTGTCCGCG3'
PK7.rev	5'AGCACATCCATGCCGTC3'

PK7.3for	5 TCCGACTCCGAGTCGTCTGT 3
PK7.3rev	5'TCATCTGGCACGCTCAACGT 3'
PK7.4for	5'GCGCTGGACATTGTGATGGA 3'
PK7.4rev	5'GAGCCTCCTCACACGCACAT 3'
PK7.5for	5'GTGGCTCAGGGACGACTCAT 3'
PK7.5rev	5 TAGGCAGTTGGCGAGGTGAT 3
PK7.6for	5′CTTACGTATCTGGCCATGAT 3′
PK7.6rev	5´CACCATCCGCGCATGCTGTT 3´
PK7.7for	5'ACCTCGCCAACTGCCTACAA 3'
PK7.7rev	5'GGGCAGCAGCAGACTGTTCA 3'
PK7.8for	5´GTCAGAGCCTGAGCACCTTT 3´
PK7.8rev	5'ACCTCCGCGTCTGCACGCAA 3'
PK7.9for	5´GTCCCATGACACCGAACACA 3´
PK7.9rev	5'AGCTCTCTGACAGGTCGCAA 3'
PK7.10for	5'GACACGGTGAACAGTCTGCT 3'
PK7.10rev	5'ACGCGGTCAAACTCGTCGAT 3'
PK7.11for	5´CTGTGACACCGAACGCGACA 3´
PK7.11rev	5´CCGCCGCTGTTGTGCATGTT 3´
PK7.12for	5´GACGCCCGCCATCACTCTTT 3´
PK7.12rev	5 TACGCACCGTGAGACAACCT 3
PK7.13for	5 TCGTACTCCTCGACAGCATT 3
PK7.13rev	5´CTGCGGAAGGCGGCTGAAGT 3´
PK7.14for	5 TACATCCATCAAGTCATCAA 3'
PK7.14rev	5´CTGGCGGCGACGGTCAGAAA 3´
PK7.15for	5´GTGTATGTGCGTAGTAGACA 3´
PK7.15rev	5'CCAGCGGCAGCATCAACGAC 3'
PK7.16for	5´CTGCGGAGGCAGCGGTTGGA 3´
PK7.16rev	5´ACACAAGGAGTAGCGTACTA 3´
PK7.17rev	5'TGTGTTCCTCATCGCATGAT 3'
Scal-Primer.for	5´CTGTGACTGGTG <u>AGTACT</u> CAACCAAG 3´ (<i>Sca</i> l)
Scal-Primer.rev	5´ATGACTTGGTTG <u>AGTACT</u> CACCAGTC 3´(Scal)
SeqB1.2	5´CAACGGGGTCGGAAGGGAGTT 3´
SeqB1.7	5'ACCGCATTCTCCGCCACATC 3'
SeqB1.4	5'GCGATGTAGTCGGTCAGGT 3'
SeqB2.7	5'CGACGTGATTCGTGCGGCCAA 3'
SeqB1.6	5'CCGCAGTCGCTGCAAAAGCAT 3'
SLMPK	5´CGCGGATCCACCTCATACGGCATCGACGGT 3´

T7	5´GTAATACGACTCACTATAGGG 3´
TA-F	5'ACCGAGCTCGGATCCACTAGT 3'
TA-R	5'ATTGGGCCCTCTAGATGCATG 3'
TFII_1.for	5′ <u>GGATCC</u> ATGGACGATGACTATGCTTTC 3′ (<i>Bam</i> HI)
TFII_1.rev	5´CTCGAG <u>AAGCTT</u> CTAGGCAGTCTTCCGCTCG 3´ (<i>Hin</i> dIII)
UP1.for	5' GTTCGTGCTGCTTCGGCACC 3'
UP1.rev	5´ AGCGTCGGACCAGCGATGCC 3´
UP2.for	5´ ACGTGGCGTTGCGTCGTTA 3´
UP2.rev	5´ AGTCCGTCACCGCCGTGATA 3´
UP3.for	5´ AGGCCACCGCCCTCTTTAT 3´
UP3.rev	5´ CGTAGTCGCGTGGTGGCTT 3´
UP4.for	5´-ACCGTCTGCGCGTAGACTT-3´
UP4.rev	5´ CCGTCTCCGTGGCCTCATT 3´
UP5.for	5´-GACATCACTGCACGACCTT-3´
UP5.rev	5'-CATCCCTTCCCGGCAAATT-3'
UP6.for	5´-TGGACGCCAACCATTCAAA-3´
UP6.rev	5´-TCCAACAGCCGTTGCGATA-3´
UP7.for	5´-TGAAGCCACCACGCGACTA-3´
UP7.rev	5´-TGCTGAAGCGCCTGATTGA-3´
UP8.for	5´ TTCCGCGTTATCGCCTTCT 3´
UP8.rev	5´-CAGTCGCCCACGCCGAATT-3´
UP9.for	5´ CCGCTGTGAGTCTTCCAAA 3´
UP10.for	5´ CACTGGCAGCTGTCCATTA 3´
UP10.rev	5´ AGGAGGGACAGAGAGAGAGAT 3´
UP1 BamHI/Ncol.for	5' <u>GGATCCATGG</u> CGACGACCTCGCCCACATCG 3' (BamHI, Ncol)
UP1 <i>Hin</i> dIII.rev	5´ <u>AAGCTT</u> CTAATACAGGTCGCTAATGG 3´ (<i>Hin</i> dIII)

2.9 Phagenbanken

λ DASH II-gDNA-Phagenbank L. mexicana (2. Amplifikat) Wie

Wiese, 1991

2.10 Antikörper

Zusätzlich zu den Antikörpern werden die im Immunoblot eingesetzten spezifischen Verdünnungen angegeben.

Primärantikörper:

anti-C-term Impk	1:500	Wiese, 1998
anti-myo-Inositol-1-Phosphat-Synthase, polyklonales Kaninchenserum gegen rekombinantes Protein	1:200	(llg, 2002)
anti-Digoxigenin Fab-Fragment aus Schaf, AP- gekoppelt	1:10000	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-Glutathion-S-Transferase, Hybridomzell- Kulturüberstand (Maus)	1:50	Fleischer, BNI, Hamburg
anti-Phospho-Tyrosin	1:2000	CST, Danvers, USA
Sekundärantikörper:		
anti-Kaninchen IgG (H+L) aus Ziege, Meerrettichperoxidase (HRP-)- gekoppelt	1:5000	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG (H+L) aus Ziege, HRP- gekoppelt	1:5000	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG aus Kaninchen, HRP-gekoppelt	1:2000	DAKO, Hamburg

2.11 Enzyme

Alkalische Phosphatase, Shrimp	Roche Diagnostics, Mannheim
Expand High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
Klenow Enzym	Roche Diagnostics, Mannheim
Lysozym	Serva, Heidelberg
Quick Ligation Kit	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt a.M. Fermentas, StLeon-Rot
RNase A (bovine pancreas)	Roche Diagnostics, Mannheim
S1-Nuklease	Amersham Biosciences, Freiburg
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
Thrombin	Amersham Biosciences, Freiburg

2.12 Molekularbiologische Kits

Big Dye [™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden

QIAGEN[®] Plasmid Midi Kit QIAquick[®] Gel Extraction Kit TOPO TA Cloning[®] Kit ECL Western Blotting Detection Reagent M&N Nucleospin Plasmid Kit Invitrogen Plasmid Purification Kit Qiagen, Hilden Qiagen, Hilden Invitrogen, Karlsruhe Amersham Biosciences, Freiburg Macherey & Nagel, Düren Invitrogen, Karlsruhe

2.13 DNA- und Protein-Größenstandards

peqGOLD DNA-Sizer II 1kb-DNA-Ladder Prestained Protein Marker, Broad Range PEQLAB, Erlangen Carl Roth, Karlsruhe New England Biolabs, Frankfurt a.M.

2.14 Kulturmedien

2.14.1 Medien für Bakterienkulturen

Alle Medien wurden mit ddH₂O angesetzt und 25 min bei 120°C und 1 bar autoklaviert; falls erforderlich wurden Antibiotika nach Abkühlung auf ca. 50°C zugegeben. Für die Herstellung von Festmedien wurden vor dem Autoklavieren 15 g Bacto-Agar pro Liter Medium zugegeben.

LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl
NZY-Medium	5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Casein-Hydrolysat (NZ-Amin) 5 g/l NaCl 2 g/l MgSO₄x 7 H₂O; pH 7,5
NZY-Top-Agarose	0,7 % (w/v) Agarose in NZY-Medium
SOB-Medium	20 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 0,5 g/l NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ ; pH 7,0
SOC-Medium	SOB-Medium mit 20 mM Glucose

2.14.2 Medien für Leishmanienkulturen

Fötales Kälberserum wurde vor Gebrauch 45 min bei 56°C hitzeinaktiviert und in Aliquots von jeweils 50 ml bei -20°C gelagert. Das inaktivierte Serum wird im folgenden als iFCS bezeichnet.

SDM-Medium komplett (Brun und Schönenberger, 1979) 7,5 µg/ml Hämin 5% (v/v) iFCS 1% (v/v) Penstrep in SDM-Medium

Differenzierungsmedium	20% (v/v) iFCS 1% (v/v) Penstrep 1% (v/v) L-Glutamin 1,95 g MES/ 500 ml in Schneiders Drosophila Medium; pH 5,5
Einfriermedium für Leishmanien	10% (v/v) DMSO in iFCS

2.15 Puffer und weitere Lösungen

Blockierungslösung 1 (Immunoblot)	5% (w/v) BSA in TBST
Blockierungslösung 2 (Immunoblot)	5% (w/v) Magermilchpulver In PBST
Bradford-Lösung	5% (v/v) Ethanol 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 10% (v/v) Phosphosäure filtriert und bei 4°C gelagert
Cobalt-Bindepuffer/Waschpuffer 2	50 mM Tris HCl pH 8 1 M NaCl 10 % Glycerol 20 mM Imidazol
Cobalt-Waschpuffer 1	50 mM Tris HCl pH 8 1 M NaCl 10 % Glycerol 10 mM Imidazol
Cobalt-Elutionspuffer	50 mM Tris HCl pH 8 300 mM NaCl 10 % Glycerol 500 mM Imidazol 1 mM PMSF
Coomassie-Entfärber	30% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
DAPI-Stammlösung	160 μg DAPI/mI in Methanol
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5M NaOH
DIG-Puffer 1	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl; pH 7,5
DIG-Puffer 2	1% (w/ v) Blockierungsreagenz in DIG-Puffer I
DIG-Puffer 3	50 mM MgCl₂ 0,1 M NaCl 0,1 M Tris-HCl pH 9,5
DIG-Waschpuffer	0,3% (v/v) Tween 20 in DIG-Puffer I

DNA-Auftragspuffer (10x)	0,5x TBE 0,1M EDTA pH 8,0 0,1% Bromphenolblau 0,1% Xylenblau 50% (v/v) Glycerin
Elektroporationspuffer	21 mM HEPES pH 7,5 137 mM NaCl 5 mM KCl 0,7 mM Na ₂ HPO ₄ 6 mM Glucose; pH 7,5
Fastblot-Transferpuffer	25 mM Tris-Base 150 mM Glycin 10% (v/v) Methanol
Fixierlösung für Leishmanien	3,7 % Formaldehyd in 1x PBS
Geltrocknungslösung	20% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Glycerin
GSH-Elutionspuffer	10 mM GSH (reduziert) 50 mM Tris-HCl pH 8,0
Hämin-Stammlösung	2,5 mg Hämin/ml in 50 mM NaOH
Hybridisierungslösung (Southern-Blot)	50% (v/v) Formamid 5x SSC 0,1% (w/v) N-Lauroylsarcosin 0,02% SDS 2% (w/v) Blockierungsreagenz
Standard-Kinase-Puffer (10x)	0,5 M MOPS pH 7,2 100 mM MgCl ₂ 20 mM MnCl ₂ 1 M NaCl
Leishmanien-Lysepuffer (für Immunoblotting)	50 µM Leupeptin 25 µM TLCK 1 mM PMSF 10 mM ortho-Phenanthrolin 1x PBS 0,1% SDS 50 mM DTT 1x SDS-PAGE Auftragspuffer
Mowiol/DABCO	2,4 g Mowiol 6 g Glycerin 12 ml 0,2 M Tris-HCl pH 8,5 6 ml ddH ₂ O 2,5% (w/v) DABCO
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M Tris HCl pH 7,1 1 mM EDTA pH 8,0
PBS (10x)	1,37 M NaCl 27 mM KCl 101 mM Na ₂ HPO ₄ 18 mM KH ₂ PO ₄
PBST	0,2% (v/v) Tween 20 in 1xPBS

Prähybridisierungslösung (Southern Blot)	100 μg/ml Fischsperm-DNA in Hybrdisierungslösung
Proteaseinhibitorenlösung	50 μM Leupeptin 25 μM TLCK 1 mM PMSF 10 mM ortho-Phenanthrolin in 1 x PBS
Puffer W (Strep-Aufreinigung)	100 mM Tris-HCl pH 8,5 150 mM NaCl 1 mM EDTA
Puffer E (Strep-Aufreinigung)	10 x Puffer (IBA TAGnologies, Göttingen)
Puffer R (Strep-Aufreinigung)	10 x Puffer (IBA TAGnologies, Göttingen)
RF1 (kompetente Zellen)	0,1 M RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ 15% (v/v) Glycerin; pH 5,8
RF2 (kompetente Zellen)	10 mM RbCl 10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 15% (v/v) Glycerin; pH 6,8
SDS-PAGE Elektrophoresepuffer (10x)	0,25 M Tris-HCl 1,92 M Glycin 1% (w/v) SDS; pH 8,3
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 50 mM DTT
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris-HCl 0,4% (w/v) SDS; pH 6,8
SDS-PAGE-Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris-HCl 0,4% (w/v) SDS; pH 8,8
Silberfärbungs-Entwicklerlösung (Lsg. 5)	2,5% (w/v) Na₂CO₃ 0,01% (v/v) Formaldehyd
Silberfärbungs-Färbelösung (Lsg. 4)	0,1% (w/v) AgNO₃ 0,02% (v/v) Formaldehyd
Silberfärbungs-Fixierlösung (Lsg.1)	30%(v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure
Silberfärbungslösung 2	30% (v/v) Ethanol 0,5 M NaAc x 3 H ₂ O 0,5% (v/v) Glutardialdehyd 0,2% (w/v) Natriumthiosulfat
SM-Puffer	100 mM NaCl 8 mM MgSO₄ 50 mM Tris-HCl pH 7,5 0,01% (w/v) Gelatine

SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0
T ₁₀ E _{0,1}	10 mM Tris-HCl pH 8,0 0,1 mM EDTA pH 8,0
TBE (5x)	0,45 M Tris-Base 0,45 M Borsäure 10 mM EDTA pH 8,0
TBS (10x)	200 mM Tris-HCl pH 7,5 137 mM NaCl
TBST	0,2% Tween 20 in 1xTBS
TENS	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0 10 mM NaOH 0,5% (w/v) SDS

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von E. coli

3.1.1.1 Kultur auf Mediumplatten

Für die Kultivierung von *E. coli* auf Mediumplatten wurden bis zu 300 μ l einer Bakteriensuspension auf den entsprechenden Mediumplatten ausgebracht und in inverser Orientierung bei 37°C inkubiert, bis Einzelkolonien sichtbar waren. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und konnten so mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden. Es handelte sich meist um LB-Platten, die mit einem Antibiotikum versetzt worden waren (überwiegend 100 μ g/ml Ampicillin und/oder 50 μ g/ml Kanamycin), so dass auf resistente Bakterienkolonien selektioniert werden konnte.

3.1.1.2 Flüssigkultur

Zum Anziehen einer Flüssigkultur wurde eine Einzelkolonie von einer Mediumplatte mit Hilfe einer Impföse in die jeweilige Menge geeigneten Mediums überführt und üN unter Schütteln je nach Kulturvolumen und Kolbengröße mit 120-190 rpm bei 37°C inkubiert. In der Regel wurde LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin verwendet.

3.1.1.3 Glycerinkulturen zur Langzeitlagerung

In einem sterilen Kryoröhrchen wurden 500 µl einer dicht gewachsenen üN-Kultur mit 500 µl Glycerin (steril) versetzt, gut gemischt und nach 10 min Inkubation auf Eis bei -70°C eingefroren. Diese Dauerkulturen können ohne Verlust ihrer Lebensfähigkeit über lange Zeit gelagert werden; bei Bedarf wird ein geringer Teil auf einer entsprechenden Mediumplatte erneut ausgestrichen.

3.1.2 Kultivierung von L. mexicana

3.1.2.1 Kultivierung von L. mexicana-Promastigoten

Promastigote Leishmanien wurden bei 27°C in SDM-Medium (komplett) kultiviert. Bei Vorhandensein eines Resistenzgens wurde das entsprechende Antibiotikum in den folgenden Konzentrationen zugesetzt: G418 (Geneticin): 10 µg/ml; Hygromycin B: 20 µg/ml; Bleocin (Phleomycin): 5 µg/ml; Puromycin: 40 µM. Das in der Standardkultur verwendete Kulturvolumen betrug 10 ml in 50 ml-Gewebekulturflaschen; die Kulturen wurden jeweils nach Erreichen einer Dichte von 5-7 x 10^7 Zellen/ml in einem Verhältnis von 1:500 bis 1:1000 unter Verwendung steriler Einwegpipetten passagiert.

3.1.2.2 Zellzahlbestimmung von Leishmanien-Kulturen

10 µl der zu zählenden Kultur wurden mit Fixierlösung (3,7 % Formaldehyd in 1 x PBS) nach Bedarf verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Es wurde jeweils der Mittelwert aus zwei Großquadraten gebildet. Die Zellzahl wurde wie folgt ermittelt: Zellzahl/ml = gezählte Zellen x Verdünnungsfaktor x 10^4 .

3.1.2.3 In vitro-Differenzierung zu axenischen Amastigoten und deren Kultivierung

Um Kulturpromastigote *in vitro* zu Amastigoten zu differenzieren, wurden aus einer sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden Kultur Leishmanien entnommen und je nach Größe des entnommenen Volumens für 20 sec bei 5600 x g und RT oder für 5 min bei 2050 x g zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden mit Differenzierungsmedium gewaschen und anschließend mit einer Zelldichte von ca. 2-4 x 10^6 Zellen/ml in eine Kultur desselben Mediums überführt und bei 34°C und 5% CO₂ inkubiert (Bates *et al.*, 1992).

3.1.2.4 Leishmanien-Stabilate zur Langzeitlagerung

Um Leishmanien-Klone über einen langen Zeitraum zu lagern, wurden Stabilate angefertigt. Zu diesem Zweck wurden 10 ml einer sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden Promastigoten-Kultur 10 min bei 2050 x g und 4°C zentrifugiert. Der Zellniederschlag wurde in 1,5 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert, in Aliquots zu 500 µl auf drei vorgekühlte Kryoröhrchen verteilt und für 24 h in der Gasphase des Stickstofftanks eingefroren. Anschließend konnten die Röhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Um die eingefrorenen Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie im 37°C-Wasserbad aufgetaut, die gesamte Probe sofort in 10 ml SDM-Medium (komplett, mit 10% iFCS) überführt und bei 27°C inkubiert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Herstellung kompetenter Zellen nach Hanahan (1983)

Aus einer bei -70°C gelagerten Glycerinkultur wurden Bakterien des gewünschten *E. coli* Stammes (XL1 blue, BL21 oder BL21DE3) auf einer LB-Agarplatte mit 20 µg/ml Tetracyclin (XL1) oder einer NZY-Agarplatte (BL21 und BL21DE3) ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert. Mit je einer Einzelkolonie wurden 3 ml SOB-Medium (40 µg/ml Tetracyclin für XL1) angeimpft und üN bei 37°C unter Schütteln mit 225 rpm inkubiert. Mit 100-500 µl dieser Vorkultur wurden 100 ml SOB-Medium beimpft und bis zu einer OD₅₅₀ \approx 0,2 (4-7x10⁷ Zellen/ml) bei 225 rpm und 37°C geschüttelt. Die Kulturen wurden 15 min auf Eis gekühlt und anschließend in je zwei 50 ml-Röhrchen für 15 min bei 4000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Zellniederschläge wurden in je 16 ml RF1 durch Schütteln resuspendiert, vereinigt und 90 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Zellniederschlag in 8 ml RF2 resuspendiert, weitere 15 min auf Eis inkubiert und Aliquots von 200 µl auf gekühlte 1,5 ml

Safe-Lock-Reaktionsgefäße verteilt. Die kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

3.2.2 Transformation von E.coli

Die gefrorenen kompetenten Zellen (200 μ l Aliquots) wurden auf Eis aufgetaut und Plasmid-DNA in einem Volumen von 1-10 μ l (normalerweise 5 μ l eines Ligationsansatzes) zugegeben. Nach kurzem Vortexen wurden die Zellen für 15-30 min auf Eis inkubiert, einem Hitzeschock von 42°C im Wasserbad ausgesetzt (XL1 blue 90 sec, BL21 und BL21DE3 60 sec) und anschließend 5 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 800 μ l SOC-Medium wurde die Zellsuspension 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Von diesem Transformationsansatz wurden je 100 bis 300 μ l auf antibiotikahaltigem Medium ausplattiert und die Platten bei 37°C üN inkubiert.

War eine "Blau-Weiß"-Selektion der Bakterien nach der Transformation möglich, so wurden auf den antibiotikahaltigen Agarplatten 30 min vor Ausbringen des Transformationsansatzes 40 µl einer X-Gal-Lösung (40 mg/ml in DMF) sowie 40 µl einer 100 mM IPTG-Lösung ausplattiert und die Platten bis zur Verwendung bei 37°C verwahrt.

3.2.3 Transfektion von Leishmanien

Durch Elektroporation kann Fremd-DNA in Leishmanien eingeschleust werden. Dabei werden promastigote Zellen der spätlogarithmischen Wachstumsphase (4-6x 10⁷ Zellen/ml) einem kurzen elektrischen Impuls ausgesetzt, der zur vorübergehenden Entstehung von Löchern in der Zellmembran führt. Über diese Öffnungen kann Fremd-DNA in die Zellen gelangen.

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden 4 x 10^7 Zellen der *L. mexicana*-Kultur 20 sec bei 5600 x g und RT zentrifugiert und mit 500 µl eiskaltem Elektroporationspuffer gewaschen. Der Zellniederschlag wurde in 400 µl dieses Puffers zu einer Zelldichte von 1 x 10^8 Zellen/ml resuspendiert und in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (4 mm; BIO-RAD Laboratories, München) überführt. Zu der Zellsuspension wurden 5 bis 15 µg der gewünschten linearen DNA oder bis zu 20 µg Plasmid-DNA gegeben, vorsichtig gemischt und die Zellen bei 1,5 kV, 200 Ω und 25 µF dreimal durch einen Strompuls von 0,9 bis 1,1 msec elektroporiert (BIO-RAD Gene Pulser 1652077 mit BIO-RAD Pulse Controller, BIO-RAD Laboratories). Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen vollständig in 10 ml SDM-Medium mit 10% iFCS und dem entsprechenden Antibiotikum der Ausgangskultur überführt und üN bei 27°C inkubiert. Am Folgetag wurde die Kultur auf 40 ml mit SDM-Medium (10% iFCS) aufgefüllt und zur Selektion mit dem Antibiotikum versetzt, dessen Resistenzgen sich auf dem verwendeten DNA-Fragment bzw. Plasmid befand. Die so verdünnte Kultur wurde auf zwei 96-Well Mikrotiterplatten verteilt, diese wurden mit Parafilm verschlossen und 14 Tage bei 27°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden überlebende – sprich

resistente - Zellen vollständig in 2 ml-Kulturen überführt und später in 10 ml-Kulturen unter Selektionsdruck herangezogen.

3.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden unterschiedliche Protokolle verwendet. Das in 3.2.4.1 beschriebene Verfahren nach Zhou ist kostengünstig, während die Plasmid-DNA-Präparation mittels QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (3.2.4.2), M&N Plasmid Purification Kit (3.2.4.2), QIAGEN[®] Plasmid Midi Kit (3.2.4.3) oder Invitrogen Plasmid Purification Kits (3.2.4.3) dagegen besonders reine DNA liefert, die für nachfolgende Sequenzierungen des Plasmids, weitere enzymatische Reaktionen oder zur Elektroporation verwendet werden kann. Die ersten drei Methoden (3.2.4.1 und 3.2.4.2) dienen der Untersuchung vieler verschiedener Klone nach einer Transformation; wurde ein positiver Klon identifiziert, so wurde mit der vierten oder der fünften Methode (3.2.4.3) eine größere Menge (bis zu 100 µg) hochreiner Plasmid-DNA isoliert.

3.2.4.1 Plasmid-DNA-Minipräparation (Zhou et al., 1990)

Von einer 3 ml üN-Kultur wurden 1,5 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und anschließend 30 sec bei 15800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 50-100 µl dekantiert und der Zellniederschlag durch Vortexen in dem verbliebenen Volumen resuspendiert. Es wurden 300 µl TENS zugegeben, dann wurde 4 sec durch Vortexen auf mittlerer Stufe gemischt und das Lysat bei Verarbeitung mehrerer Ansätze bis zum nächsten Schritt auf Eis gehalten. Nach Zugabe von 150 µl 3 M NaAc pH 5,2 und erneutem Vortexen (s.o.) wurden die Ansätze auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 15800 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 900 µl eiskaltem EtOH (100%) gefällt. Nach 15 min Zentrifugation bei 15800 x g und 4°C wurde der Überstand abgenommen und der Niederschlag mit 1 ml eiskaltem 70% EtOH gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde 10 min bei 37°C getrocknet und in 50 µl ddH₂O aufgenommen.

3.2.4.2 Qiaprep[®] Spin Miniprep Kit und M&N Plasmid Isolation Kit

Zunächst wurden von einer 3 ml üN-Kultur 1,5 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 30 sec bei 15800 x g zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde dekantiert. Das weitere Vorgehen erfolgte wie in den Abschnitten "using a microcentrifuge" der jeweiligen Handbücher beschrieben.

3.2.4.3 QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen Tip-100) und Invitrogen Plasmid Kit

Eine 100 ml üN-Kultur wurde in 50 ml-Röhrchen überführt und 15 min bei 4000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Resuspension des Zellniederschlags sowie die weiteren Schritte bis zur DNA-Präzipitation entsprachen dem im Handbuch aufgeführten Vorgehen. Die eluierte Plasmid-DNA wurde in Aliquots zu je 833 µl auf sechs Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, in

die zuvor je 583 μ l Isopropanol (0,7 Volumenanteile) gegeben worden waren. Nach sorgfältigem Durchmischen wurde 30 min bei 15800 x g und 4°C zentrifugiert und mit 70% EtOH (eiskalt) gewaschen. Der DNA-Niederschlag wurde 10 min bei RT getrocknet und in insgesamt 180 μ l ddH₂O aufgenommen.

3.2.5 Isolierung genomischer DNA aus Leishmanien

Diese Methode nach Medina-Acosta und Cross (Medina-Acosta und Cross, 1993) dient der schnellen Isolierung kleiner Mengen genomischer DNA aus Leishmanien, da diese im Gegensatz zur bakteriellen genomischen DNA unter den angewandten Lysebedingungen löslich ist und so aus der wässrigen Phase präzipitiert werden kann.

Aus einer 10 ml-Kultur von *L. mexicana*-Promastigoten (Zelldichte 1-6 x 10^7 Zellen/ml) wurden 2-3 ml entnommen und 30 sec bei 5600 x g und RT zentrifugiert. Der Zellniederschlag wurde in 400 µl frischem TELT-Puffer resuspendiert, 5 min bei RT inkubiert und mit 400 µl kaltem TE-äquilibriertem Phenol versetzt. Der Ansatz wurde 5 min bei 4°C durch End-über End-Rotation vermischt und die Phasen anschließend durch Zentrifugation für 10 min bei 15800 x g und 4°C getrennt. Nach Überführen der oberen, wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wurden je 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben. Der Ansatz wurde wie zuvor gemischt, zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Durch Zugabe von 1 ml eiskaltem 100% EtOH (2,5 Volumenanteile) wurde die DNA gefällt; nach 5 min Inkubation auf Eis wurde die Lösung 10 min bei 15800 x g und 4°C zentrifugiert, der DNA-Niederschlag mit 70% EtOH (eiskalt) gewaschen und nach Trocknen bei RT in 200 µl T₁₀E_{0,1} aufgenommen.

3.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Probe wurde 1:100 in ddH_2O verdünnt und die Konzentration in einer UV-ette (Eppendorf) mit dem Biophotometer 6131 (Eppendorf) bestimmt. Lag nur eine geringe DNA-Menge vor, so konnten deren Konzentration durch Vergleich der Bandenintensitäten in einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel abgeschätzt werden, indem bei dem Gellauf eine mit *Hind*III gespaltene λ -DNA bekannter Konzentration als Standard neben den DNA-Proben aufgetragen wurde.

3.2.7 Reaktionen mit DNA-modifizierenden Enzymen

3.2.7.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Verwendet wurden ausschließlich Restriktionsendonukleasen vom Typ II, welche die doppelsträngige DNA spezifisch innerhalb der jeweils charakteristischen palindromischen Sequenz schneiden.

Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA:

In analytischen Standardansätzen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 μ l 0,2 – 1,0 μ g Plasmid-DNA in dem für die jeweilige Restriktionsendonuklease geeigneten Puffersystem mit 5-10 U des Enzyms gespalten. Je nach Bedarf wurden dem Ansatz 2 μ g BSA und /oder 4 μ g RNase A zugegeben, letztere nur bei Restriktionsspaltungen von Plasmid-Präparationen nach Zhou (3.2.4.1). Der Ansatz wurde 2-3 h bei dem Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms, in der Regel 37°C, inkubiert. In präparativen Restriktionsspaltungen wurden 10-20 μ g Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 100 μ l geschnitten. Die Menge an eingesetzter Endonuklease und die Volumina der übrigen Komponenten wurden entsprechend angepasst.

Restriktionsspaltung genomischer DNA:

Es wurden 3-5 µg genomische DNA mit 50 U Restriktionsendonuklease, 40 µg RNase A und 40 µg BSA in einem Gesamtvolumen von 400 µl unter ständigem Invertieren bei dem jeweiligen Temperaturoptimum üN inkubiert. Anschließend wurde eine EtOH-Fällung durchgeführt: dazu wurden 44,4 µl 3 M NaAc pH 5,2 (1/9 Volumenanteil) und 1100 µl 100% EtOH (eiskalt; 2,5 Volumenanteile) zugesetzt und nach Durchmischung 30 min auf Trockeneis inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch 20 min Zentrifugation bei 4°C und 15800 x g präzipitiert, mit eiskaltem 70% EtOH gewaschen, 10 min bei RT getrocknet und in 15 µl T₁₀E_{0,1} aufgenommen.

3.2.7.2 Weitere Reaktionen

Die Dephosphorylierung von DNA-Enden nach Restriktionsspaltung mithilfe der Shrimp Alkalischen Phosphatase (SAP), die Entfernung von 5'-Überhängen zur Erzeugung glatter DNA-Enden durch die S1-Nuklease, das Auffüllen von 5'-Überhängen mit dem Klenow-Enzym sowie die Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4 DNA-Ligase erfolgten nach Herstellerangaben.

3.2.8 Phenol-Chloroform-Extraktion und DNA-Ethanolfällung

Die DNA-Lösung wurde mit einem Volumenanteil TE-äquilibriertem Phenol versetzt, 30 sec durch Vortexen gemischt und anschließend 5 min bei 15800 x g und RT zentrifugiert. Nach Überführung in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde der oberen, wässrigen Phase der gleiche Volumenanteil Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zur Entfernung von Phenolresten zugegeben, wie oben beschrieben gemischt und zentrifugiert. Es wurde erneut die obere, wässrige Phase abgenommen und dieser 1/9 Volumenanteile 3 M NaAc pH 5,2 und 2,5 Volumenanteile eiskalten 100% EtOH zugegeben und der Ansatz 30 min bei -70°C oder auf Trockeneis inkubiert. Durch eine 20minütige Zentrifugation bei 15800 x g und 4°C wurde die ausgefallene DNA sedimentiert und einmal mit 70% EtOH (eiskalt) gewaschen. Anschließend wurde der DNA-Niederschlag 10 min bei RT getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH₂O aufgenommen.

3.2.9 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,7-0,9%-igen Agarosegelen, die Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,1 µg/ml enthielten. Zu der DNA-haltigen Probe wurden 1/10 Volumenanteile 10 x DNA-Auftragspuffer gegeben, der gesamte Ansatz wurde dann nach Überführung in die Geltaschen bei einer Feldstärke von 1,4- 10 V/cm aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer diente 0,5 x TBE, in diesem Puffer wurde auch die Agarose gelöst. Nach der Trennung wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht und unter Verwendung eines Dokumentationssystems fotografiert. Anhand eines mitgelaufenen DNA-Längenstandards konnten die Größen und Mengen der DNA-Fragmente abgeschätzt werden.

3.2.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA, welche das zu isolierende Fragment enthielt, wurde in einem präparativen Ansatz mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Unter schwachem UV-Licht (λ = 365 nm) wurde das Gelstück mit dem gewünschten DNA-Fragment ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus der Agarose wurde in allen Fällen mit dem *QIAquick[®] Gel Extraction Kit* nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach 1-minütiger Inkubation wurde die DNA mit 30 µl ddH₂O eluiert.

3.2.11 Oligonukleotid–Mutagenese

Es wurden je 0,5 μ l der Oligonukleotide ImmkkMut2.sense und ImmkkMut2.anti (beide 100 pmol/ μ l) in insgesamt 50 μ l ddH₂O aufgenommen und für 10 min auf 95°C erhitzt. Der Ansatz wurde anschließend für 10 min bei 65°C und je 30 min bei 37°C und bei RT inkubiert, so dass die beiden Oligonukleotide sich aneinander anlagern konnten. Mit 1 μ l linearisiertem pGEX-KGPK6-Vektor sowie 5 μ l dieses Ansatzes wurde dann eine Ligation durchgeführt. Das entstandene Produkt wurde sequenziert.

3.2.12 In vitro-Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde mit dem *Expand High Fidelity PCR System* durchgeführt, welches ein DNA-Polymerase-Gemisch aus einer NH₂-terminalen Deletionsmutante der thermostabilen *Taq*-DNA und der *Tgo*-DNA-Polymerase enthält. Letztere senkt durch ihre 3'-5'-Exonuklease-Proofreading-Aktivität die Fehlerquote der *Taq*-DNA-Polymerase beim Einbau der Nukleotide auf ¹/₃. Als DNA-Template wurden sowohl Qiagen-gereinigte Plasmid-DNA als auch genomische DNA von *L. mexicana* und *L. major*

verwendet. Die Reaktionen wurden in 200 µI-PCR-Reaktionsgefäßen in einem GeneAmp[®] PCR System 9700 von PE Applied Biosystems (Weiterstadt) wie folgt durchgeführt:

Reaktionsansatz:	
Template:	10-200 ng
Primer (10µM):	je 1 µl
10 x PCR-Puffer mit 15 mM MgCl ₂ :	2,5 µl
dNTP-Mix (20 mM):	0,3 µl
Polymerase:	0,5 µl
mit ddH ₂ O	ad 25 µl

Reaktionsbedingungen:			
Start/Denaturierung:	94°C	5 min	
Denaturierung:	94°C	30 sec	٦
Annealing:	45- 65°C	30 sec	≥ 25-30 x
Elongation:	72°C	30 sec – 5 min	
Elongation:	72°C	7 min	-

Die Höhe der Annealingtemperatur richtete sich nach der Länge und Beschaffenheit der Primer. Die Elongationszeit war abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes. Hierbei wurde die Elongationszeit pro zu amplifizierenden 1000 bp um je 1 min verlängert.

3.2.13 Klonierung eines PCR-Produktes mithilfe des TOPO TA Cloning[®] Kits

Mittels Verwendung des *TOPO TA Cloning[®] Kits* können PCR-Produkte, welche von der *Taq*-DNA-Polymerase synthetisiert worden sind, direkt ligiert und in *E. coli* transformiert werden. Die Ligation in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor sowie die anschließende Transformation in kompetente *E. coli* One Shot[®] TOP10F' erfolgte laut Herstellerangaben.

3.2.14 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) erfolgte zu Beginn der Arbeit mit dem *BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit.* Die Gelelektrophorese inklusive Detektion der DNA-Fragmente wurde zentral im Institut durchgeführt, so dass hier nur die Sequenzierungsreaktion sowie die anschließende DNA-Präzipitation beschrieben werden.

Ein Reaktionsansatz für die Sequenzierung enthielt 1 bis 2 μ g Template-DNA, 10 pmol Primer und 4 μ l *BigDyeTM Ready Reaction*-Mix; das Reaktionsvolumen wurde mit HPLC-H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde in einem GeneAmp[®] PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) in einem 200 µl-PCR-Reaktionsgefäß wie folgt durchgeführt:

Denaturierung:	96°C	10 sec	٦
Annealing:	50°C	5 sec	25 x
Elongation:	60°C	4 min	J

Anschließend wurde der Ansatz in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zur DNA-Fällung 80 μ l HPLC-H₂O, 10 μ l 3 M NaAc (pH 4,6) und 250 μ l 100% EtOH (RT) hinzugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und 15 min bei 15800 x g und RT zentrifugiert. Die sedimentierte DNA wurde einmal mit 70% EtOH (RT) gewaschen, 10 min im Heizblock bei 37°C getrocknet und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde Plasmid-DNA nicht mehr selbst sequenziert, sondern zur Sequenzierung an die Firma AGOWA (Berlin) geschickt.

3.2.15 DNA-Markierung mit Digoxigenin (DIG-)-dUTP

Die Verwendung des *PCR DIG Probe Synthesis Kit* ermöglicht die Markierung eines DNA-Fragmentes durch den Einbau von DIG-markiertem dUTP für den Einsatz als Sonde in Southern Blot-Hybridisierungen und gDNA-Bank-Screenings. Die Durchführung der PCR erfolgte laut Herstellerangaben. Die DIG-markierte DNA konnte nach 10 min Denaturierung bei 95°C und Inkubation auf Eis (5 min) in der Hybridisierung eingesetzt werden.

3.2.16 Southern Blot

3.2.16.1 Restriktionsspaltung genomischer DNA und Agarosegelelektrophorese

Genomische DNA von *L. mexicana* wurde wie unter 3.2.7.1 beschrieben gespalten, gefällt und in 15 μ I T₁₀E_{0,1} aufgenommen. Nach Zugabe von 1,5 μ I 10 x DNA-Auftragspuffer erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente in einem 0,7%-igen Agarosegel mit 4,5 V/cm bei RT. Das Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese mit einem seitlich angelegten Lineal zur Kontrolle der Laufstrecke unter UV-Licht fotografiert.

3.2.16.2 Southern Blot

Das Gel wurde bei RT zunächst 20 min in 0,25 N HCI (Denaturierung), dann 30 min in 0,5 M NaOH/ 1,5 M NaCI (Neutralisierung) leicht geschwenkt. Durch Kapillartransfer üN bei 4°C mit 20 x SSC als Transferpuffer wurde die DNA auf eine *Biodyne A Transfer Membrane* (PAA Laboratories, Cölbe) übertragen. Den Aufbau des Southern Blots verdeutlicht Abb. 7.

Nach mindestens 12 h wurde der Blot abgebaut, die Position der Geltaschen auf der Membran markiert und die DNA durch UV-Quervernetzung (Autocrosslinking-Funktion, UV Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, CA, USA) an dieser fixiert.



Abb. 7: Aufbau eines Southern Blots

3.2.16.3 Hybridisierung mit einer DIG-markierten Sonde und Stringenzwaschen

Die Membran wurde mit 50 ml Prähybridisierungslösung in Plastikfolie eingeschweißt und mindestens 3 h bei 42°C im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Die in der Prähybridisierungslösung enthaltene Fischsperm-DNA dient der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Die DIG-markierte DNA (siehe 3.2.14) wurde nach Hitzedenaturierung (10 min 95°C) 5 min auf Eis abgekühlt und zu 30 ml auf 42°C vorgewärmter Hybridisierungslösung gegeben. Die Prähybridisierungslösung wurde durch diese ersetzt und die Membran darin üN bei 42°C im Wasserbad geschwenkt. Die Hybridisierungslösung wurde nach Gebrauch bei -20°C gelagert und konnte nach erneuter Hitzedenaturierung mehrmals wiederverwendet werden.

Die Membran wurde 2 x 5 min bei RT in je 250 ml 2 x SSC/ 0,1% SDS und 2 x 10 min bei 68°C in 0,1 x SSC/ 0,1% SDS unter leichtem Schwenken gewaschen. Hierdurch werden unspezifische Wechselwirkungen zwischen der Sonde und der membrangebundenen DNA gelöst.

3.2.16.4 Nachweis der DIG-Markierung

Die Detektion der DIG-markierten Sonde erfolgte über einen Alkalische Phosphatase (AP)gekoppelten DIG-Antikörper mit anschließender Chemolumineszenzdetektion. Die von der AP katalysierte Dephosphorylierung von CSPD führt zur Bildung eines metastabilen Intermediates, welches unter Lichtemission (477 nm) zerfällt und zur Schwärzung eines Röntgenfilms führt.

Die Membran wurde bei RT 5 min in DIG-Waschpuffer geschwenkt, dann mit 50 ml DIG-Puffer 2 in Plastikfolie eingeschweißt und 2 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für mindestens 45 min bei 37°C in 30 ml DIG-Puffer 2 mit anti-DIG-AP (Fab-Fragmente, 1:10000). Danach wurde die Membran bei RT 2 x 15 min in je 250 ml DIG-Waschpuffer gewaschen und 5 min in DIG-Puffer 3 äquilibriert. Nun wurde jede Seite der Membran 2,5 min in die Substratlösung (CSPD 1:100 in DIG-Puffer 3) gelegt, kurz auf Whatman-Papier abgetropft und luftblasenfrei zwischen zwei Folien eingepackt. Nach 10 min Vorinkubation in einer Röntgenfilmkassette bei 37°C wurden für 15 -60 min Röntgenfilme bei 37°C exponiert.

3.2.16.5 Abwaschen der gebundenen Sonde ("stripping")

Die Membran wurde unter ständigem Schwenken zunächst 10 min bei RT in ddH_2O , anschließend 2 x 15 min in 0,2 M NaOH/ 0,1% SDS bei 37°C inkubiert und 5 min in 2 x SSC bei 37°C gewaschen. Danach konnte sie bei 4°C in DIG-Puffer 1 gelagert oder einer erneuten Hybridisierung mit einer weiteren Sonde unterzogen werden.

3.2.17 Durchsuchen einer λ **DASH II-Phagenbank**

3.2.17.1 Vorbereitung der Wirtsbakterien

Als Wirt diente der Bakterienstamm *E. coli* P2392, welcher nur das Wachstum von rekombinanten Phagen zulässt. Die Bakterien wurden auf NZY-Agarplatten angezogen. Eine Einzelkolonie diente zum Beimpfen einer 3 ml üN-Kultur in NZY-Medium. Mit 1 ml dieser Kultur wurden 50 ml TB-Medium mit 0,2% Maltose und 10 mM MgSO₄ angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1 bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Zellen wurden dann durch 15-minütige Zentrifugation bei 1050 x g und 4°C sedimentiert, in 20 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert und mit 10 mM MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,5 verdünnt. Aliquots von je 200 µl wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.2.17.2 Phagenplattierung

Die benötigte Anzahl NZY-Agarplatten wurde zunächst bei 37°C getrocknet und 10 min vor Gebrauch auf 68°C vorgewärmt. Für jede Platte wurden weiterhin je 3 ml NZY-Top-Agarose in sterile Reaganzgläser vorgelegt und bei 52°C inkubiert. Die jeweilige Phagenlösung wurde so in SM-Puffer verdünnt, dass eine je nach Bedarf geeignete Phagenmenge in einem Volumen von 5 µl pro Ansatz eingesetzt werden konnte. Diese wurde dann mit je einem Aliquot Bakteriensuspension vermischt, 30 min bei 37°C inkubiert, in die flüssige Top-Agarose gegeben und nach gründlicher Durchmischung gleichmäßig auf die vorgewärmten NZY-Agarplatten verteilt. Nach Erstarren der Top-Agarose wurden die Platten in inverser Orientierung üN bei 37°C bis zum Auftreten von Phagenplaques inkubiert.

3.2.17.3 Übertragung von Phagenplaques auf Nylonmembranen

Platten mit deutlich sichtbaren Phagenplaques wurden für 30 min bei 4°C gekühlt um ein Ablösen der Top-Agar-Schicht zu verhindern. Anschließend wurde ein Nylon-Rundfilter (Nytran[®] SuPerCharge, Schleicher & Schuell, Dassel) für 5 min auf die Platte gelegt, dieser numeriert und die exakte Lage durch 4 mit einer Kanüle gestochene Löcher markiert, damit die genaue Zuordnung der später erhaltenen Signale auf dem Röntgenfilm zu einzelnen Plaques möglich war. Die Nylonmembran wurde schnell abgezogen, 5 min mit der Plaqueseite nach oben auf ein mit Denaturierungslösung und im Anschluss 2 x 5 min auf ein

mit Neutralisierungslösung getränktes Whatman-Papier gelegt. Abschließend wurde die Membran in ein Tauchbad mit 2 x SSC überführt. Nach einem kurzen Abtrocknen der Membranen auf Whatman-Papier wurde die DNA durch UV-Quervernetzung (Autocrosslinking-Funktion, UV Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, CA, USA)) fixiert und die Nylonfilter dann bis zur weiteren Verwendung in einem 2 x SSC-Bad aufbewahrt.

Prähybridisierung und Hybridisierung mit einer DIG-markierten Sonde sowie der DIG-Nachweis erfolgten wie unter 3.2.15.3 und 3.2.15.4 angegeben.

3.2.17.4 Untersuchung der gentragenden Phagenklone

Ausgehend von den Signalen auf dem Film wurden mithilfe der Lochmarkierung auf den Nylonmembranen die positiven Plaques bestimmt und der Agar an dieser Stelle großzügig (Durchmesser ca. 3-5 mm) mithilfe einer Pasteurpipette ausgestochen und in je 80 µl SM-Puffer zur Elution der Phagen aus dem Agar überführt. Nach Inkubation üN bei 4°C wurden die Phagen in verschiedenen Verdünnungen zur weiteren Untersuchung und Vereinzelung erneut wie unter 3.2.16.2 beschrieben ausplattiert.

3.2.17.5 Amplifikation der Phagenlösungen

Die eluierten positiven Phagen wurden erneut ausplattiert, jedoch in einer Konzentration, die zur kompletten Lyse der Bakterien auf der Platte führte. Es wurden je 3 Platten pro Klon verwendet. Die lysierten Platten wurden mit je 3 ml SM-Puffer überschichtet und üN bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Der Überstand wurde in 15 ml-Reaktionsgefäße überführt, die Platten jeweils noch einmal mit 1 ml SM-Puffer nachgespült und diese Lösung mit der jeweiligen Phagenlösung vereinigt. Nach Volumenbestimmung wurde zu der Phagenlösung Chloroform in einer Endkonzentration von 5 % zugesetzt. Nach einer Inkubation von 15 min unter Rollern bei RT wurde für 10 min bei 2060 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand in neue Röhrchen überführt und mit Chloroform in einer Endkonzentration von 0,3 % versetzt. Die Phagenlösungen wurden bei 4°C gelagert.

3.2.17.6 Phagen-DNA-Isolierung mit dem Lambda Midi Kit (Qiagen, Hilden)

Mit 4 ml einer üN-Kultur *E. coli* P2392 wurden 200 ml TB-Medium mit 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO₄ beimpft und bis zum Erreichen einer OD₅₅₀ von ca. 0,6 (entspricht 9 x 10^7 Zellen) unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Pro Phagenklon, dessen DNA isoliert werden sollte wurden je 1 x 10^9 Zellen 15 min bei 1050 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Zellniederschlag wurde in je 200 µl 10 mM MgSO₄/ 10^9 Zellen resuspendiert und pro Ansatz 5 x 10^6 Phagen in einem Volumen SM-Puffer bis 10 µl zugegeben und gemischt. Zur Phagen-Präadsorption wurde dann 25 min bei 37° C inkubiert. Währenddessen wurden pro Ansatz je 50 ml NZY-Medium auf 37° C vorgewärmt, dann die Bakterien-Phagen-Suspension zugegeben und bei 37° C unter Schütteln inkubiert. Die OD₆₀₀ wurde regelmäßig überprüft. Wurde nach ca. 3-4 h

ein Abfall der OD₆₀₀ beobachtet, so waren die Bakterien lysiert; die Kultur wurde nun in ein 50 ml-Röhrchen überführt und je 1,5 ml Chloroform zum Erreichen einer Endkonzentration von 3 % zugesetzt. Es wurde für 15 min bei RT unter Invertieren inkubiert, dann 15 min bei 4200 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in neue Röhrchen überführt. Nun wurde bis zur Präzipitation der DNA nach Herstellerangaben verfahren. Die semdimentierte Phagen-DNA wurde nach dem letzten Waschschritt nur sehr kurz bei RT trocknen gelassen und anschließend je Klon in insgesamt 120 μ I T₁₀E_{0,1} aufgenommen. Die Phagen-DNA wurde im Anschluss jeweils mit den Restriktionsendonukleasen *Not*I, *Eco*RI und *Xba*I gespalten, die unter anderem jeweils stromauf- und abwärts des *L. mexicana*-DNA-Inserts schneiden. Die so freigesetzten Fragmente wurden anschließend in den Vektor pBluescript II SK (+), der mit den selben Restriktionsenzymen linearisiert worden war, ligiert und sequenziert.

3.3 Proteinexpression und -isolierung

3.3.1 Expression rekombinanter Proteine in E. coli

Wurde ein Protein erstmalig exprimiert, so wurden zunächst mittels einer Testexpression die optimalen Expressionsbedingungen ermittelt. Zu diesem Zweck wurden 5-10 Röhrchen mit je 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikumszusatz mit je 100 μ l einer entsprechenden üN-Kultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde z.B. mit verschiedenen Mengen IPTG induziert oder bei verschiedenen Temperaturen exprimiert. Nach einer Inkubation üN wurden je Probe 1,5 ml Kultur bei 15800 x g und RT für 1 min abzentrifugiert, das Pellet in 1 x SDS-PAGE-Auftragspuffer gelöst und für 10 min auf 95°C erhitzt. Mittels SDS-PAGE dieser Gesamtzelllysate konnten so die optimalen Expressionsbedingungen abgeschätzt werden.

Bei der Expression zur Proteinaufreinigung wurden 100 ml bis 1 I LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikumszusatz mit 3 bis 20 ml einer entsprechenden üN-Vorkultur inokuliert und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD_{600} von 0,9 inkubiert (Strep-Tag-System: bis zu einer OD_{550} von 0,5-0,6). Anschließend wurde je nach zu exprimierendem Protein IPTG in Endkonzentrationen von 50 bis 200 µM (His- und GST-Tag-Systeme) bzw. Anhydrotetracyclin (AHT) in einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml zu der auf 18°C abgekühlten Kultur zugegeben und diese unter Schütteln üN bei 18°C weiter inkubiert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation bei 4500 x g und 4°C geerntet, die Zellniederschläge jeweils einmal mit einer entsprechenden Menge kaltem 1 x PBS gewaschen und erneut sedimentiert. Bis zu einer weiteren Verarbeitung konnten die Zellniederschläge bei -20°C gelagert werden.

3.3.2 Herstellung von Zelllysaten

Die Zellniederschläge wurden in je 5 ml 1 x PBS pro 100 ml verwendeter Zellkultur (GSTund His-Fusionsproteine) bzw. 5 ml Puffer W pro 100 ml verwendeter Zellkultur (Strep-TagFusionsproteine) resuspendiert und durch 4-10 Ultraschallimpulse auf Eis aufgebrochen (Branson Sonifier 250; Geräteeinstellungen: konstanter Impuls, Impulsdauer 20 s, Stufe 2-4; Spitzendurchmesser 6 bis 10 mm). Anschließend wurde Triton X-100 in einer Endkonzentration von 1 % zum Lysat hinzugegeben und der Ansatz für 30 bis 60 min bei 4°C invertiert, um an das Zytoskelett gebundenes Protein zu lösen. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 15800 x g und 4°C abgetrennt, so dass ein klares Lysat erhalten wurde.

3.3.3 Aufreingung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie

3.3.3.1 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen über Glutathion-Sepharose

Das als 50%-ige Lösung erhältliche Glutathion Uniflow Resin (BD Biosciences, Heidelberg) wurde zunächst laut Herstellerangaben dreimal mit 1 x PBS gewaschen (Zentrifugation bei 500 x g). Pro ml eingesetztem Lysat wurden 50 µl Bettvolumen Sepharose verwendet. Die Mischung aus Lysat und Sepharose wurde 1 h unter ständigem Invertieren bei 4°C inkubiert, im Anschluss dreimal je 5 min mit 1 x PBS gewaschen und abschließend im einfachen Bettvolumen GSH-Elutionspuffer resuspendiert. Die Elution erfolgte 2 x für jeweils 10 min unter Invertieren bei 4°C, die Überstände wurden jeweils abgenommen und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

War eine Spaltung des Fusionsproteins in beide Einzelkomponenten erforderlich, so wurde die gewünschte Menge Protein in Elutionspuffer mit 2 U Thrombin/ mg Fusionsprotein versetzt und üN bei 20°C inkubiert.

3.3.3.2 Aufreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen über mit Cobalt beladene Chelating Sepharose

Die als 50%-ige Lösung erhältliche Chelating Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde zunächst zweimal mit ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde für 5 min unter Invertieren bei RT mit einem Bettvolumen 100 mM Cobaltchloridlösung inkubiert. Um freies Cobalt zu entfernen wurde anschließend noch dreimal mit ddH₂O gewaschen und abschließend noch einmal mit einem Bettvolumen Bindepuffer äquilibriert. Wie oben wurden (wenn nicht anders angegeben) pro eingesetztem ml Lysat je 50 µl vorbereitete Sepharose eingesetzt, allerdings wurde das Lysat zuvor 1:1 mit Bindepuffer verdünnt. Das Gemisch wurde 1 h bei 4°C invertiert und anschließend je 1 x 5 min bei 4°C unter Invertieren mit Waschpuffer 1, Waschpuffer 2 (= Bindepuffer) und Waschpuffer 1 gewaschen. Eluiert wurde wie oben beschrieben 2 x 10 min bei 4°C mit je einem Bettvolumen Elutionspuffer. Die Eluate wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.3.3.3 Aufreinigung von Strep-Tag-Fusionsproteinen über Strep-Tactin

Das als 50%-ige Lösung erhältliche Strep-Tactin (IBA TAGnologies, Göttingen) wurde 2 x mit Puffer W gewaschen. Pro ml Lysat wurden 40 µl Bettvolumen Strep-Tactin eingesetzt.

Die Mischung aus Lysat und Strep-Tactin wurde wie oben beschrieben bei 4°C für 1 h invertiert und anschließend 5 x je 5 min wie oben mit je einem Bettvolumen Puffer W gewaschen. Es wurde abschließend 3-6 mal mit je 0,5 Bettvolumen Puffer E eluiert und die erhaltenen Eluate bis zu weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Zur Regeneration des Strep-Tactins, welches mehrfach verwendet werden konnte, wurde dieses nach der Elution 3-5 x mit je 5 Bettvolumen Puffer R gewaschen, bis eine deutliche Rotfärbung zu erkennen war. Anschließend wurde mit 2 ml Puffer W überschichtet und das Strep-Tactin bei 4°C aufbewahrt.

3.3.3.4 Aufreinigung von Phosphoproteinen aus Leishmanien-Lysaten

Die Aufreinigung von Phosphoproteinen aus *Leishmania* wurde aus jeweils 2 x 10^9 spätlogarithmischen Promastigoten oder aus 5 x 10^9 *in vitro*-differenzierten Amastigoten (3Tage) nach Herstellerangaben mithilfe des Phosphoprotein Purification Kits (Qiagen, Hilden) vorgenommen. Die erhaltenen Eluate wurden komplett in 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 10 min bei 95°C gekocht. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, silbergefärbt und Unterschiede im Phosphorylierungsmuster zwischen Wildtyp und Deletionsmutante massenspektrometrisch untersucht.

3.4 Protein- und immunchemische Methoden

3.4.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung denaturierter Proteine gemäß ihrer molekularen Masse erfolgte unter Verwendung des *Minigel*-Systems von Biometra (Göttingen) durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Gearbeitet wurde mit 8-15%-igen Trenngelen sowie 4%-igen Sammelgelen. Proteinproben wurden in 1 x SDS-Auftragspuffer 10 min bei 95°C erhitzt, kurz auf Eis abgekühlt und in einem Gesamtvolumen von 15-30 μ l in die Geltaschen geladen (bei Leishmanien-Lysaten 20 μ l, siehe 3.3.4). Die Auftrennung erfolgte bei RT pro Gel mit einer Stromstärke von 20 mA im Sammelgel und 30 mA im Trenngel. Als Laufpuffer diente ein 0,1%-iger SDS-Elektrophoresepuffer.

Als Größenstandard wurde der Prestained Protein Marker, Broad Range von New England Biolabs (Frankfurt) verwendet. Die darin enthaltenen Proteine und ihre zugehörigen Molekülmassen in kDa sind in Tabelle 1 dargestellt.

Protein	Molekülmasse [kDa]
MBP-β-Galactosidase	175,0
MBP-Paramyosin	83,0
Glutamin-Dehydrogenase	62,0
Aldolase	47,5
Triosephosphat-Isomerase	32,5
β-Lactoglobulin A	25,0
Lysozym	16,5
Aprotinin	6,5

Tabelle 1: Prestained Protein Marker, Broad range (New England Biolabs, Frankfurt)

3.4.2 Färben von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

3.4.2.1 Coomassie Brilliant Blue R-250-Färbung

Um Proteine mit Coomassie Brilliant Blue R-250 anzufärben wurden die Trenngele 30 bis 60 min bei RT in einer Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend unter leichtem Schütteln in Entfärberlösung inkubiert, bis die Proteinbanden deutlich zu sehen waren und die Färbung des Hintergrunds ein Minimum erreicht hatte. Bei dieser Methode liegt die untere Nachweisgrenze bei 100 ng pro Bande.

3.4.2.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung stellt eine sensitivere Färbemethode für Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen dar als die Coomassie-Färbung (Nachweisgrenze: 5 ng pro Bande). Alle Schritte wurden bei RT in einem Volumen von 50 -100 ml pro Gel durchgeführt. Zunächst wurde das Trenngel 10 min in Fixierlösung (Lsg.1) inkubiert und anschließend ebenfalls 10 min in Silberfärbungslösung 2 geschwenkt. Es wurde dann dreimal je 10 min mit ddH₂O gewaschen und im Anschluss 10-30 min in Silberfärbelösung (Lsg.4) inkubiert. Um die gefärbten Banden sichtbar zu machen wurde dann bis zum Erreichen der gewünschten Bandenintensität in Entwicklerlösung (Lsg.5) geschwenkt. Um die Reaktion zu stoppen wurde dann kurz (1-2 min) in 0,05 M EDTA geschüttelt und das Gel anschließend in ddH₂O aufbewahrt.

3.4.2.3 Trocknen der Gele

Gefärbte Polyacrylamidgele wurden zur langfristigen Aufbewahrung getrocknet. Dazu wurden die Gele zunächst für 30 min unter leichtem Schwenken in Geltrocknungslösung inkubiert, bevor sie mittels eines Geltrocknungsrahmens (Roth, Karlsruhe) luftblasenfrei zwischen zwei in ddH₂O eingeweichte Blatt Cellophan eingespannt wurden. Nach 24 h wurden die Gele entnommen und zur Dokumentation eingescannt.

3.4.3 Immunoblot

3.4.3.1 Herstellung von Leishmanien-Lysaten für die SDS-PAGE/Immunoblot

Die gewünschte Anzahl Zellen wurden aus einer entsprechenden Amastigoten- oder Promastigoten-Kultur entnommen und für 30 s bei 5600 x g und RT oder für 10 min bei 2050 x g und 4°C sedimentiert. Der Zellniederschlag wurde mit 1 ml kaltem 1 x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 100 μ l SDS-Lysepuffer pro 10⁸ Zellen resuspendiert, für 10 min auf 95°C erhitzt und anschließend kurz auf Eis gekühlt. Sofern nicht anders angegeben wurden dann je 2 x 10⁷ Zellen auf einem entsprechenden SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die fertigen Lysate konnten über längere Zeiträume bei -20°C gelagert werden.

3.4.3.2 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

Im Anschluss an die Auftrennung mittels SDS-Gelelektrophorese konnten die Proteine mittels des "Semi-Dry-Verfahrens" auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Immobilon[™]-P-Transfer Membran; Millipore, Schwalbach) übertragen werden. Vor dem Transfer wurde die PVDF-Membran zur besseren Benetzung zunächst 1 min in Methanol geschwenkt und anschließend mindestens 10 min in Fastblot Transferpuffer äquilibriert. Der Proteintransfer erfolgte dann in einer Fastblot-Kammer (B44, Biometra, Göttingen) für 30 min bei RT und 2,6 mA/cm² Membranfläche (Aufbau siehe Abb. 8).



Abb. 8: Aufbau eines Western blots

3.4.3.3 Immunologische Detektion

Wenn der Transfer vollständig erfolgt war, wurden zunächst die Banden des Größenstandards auf der Membran markiert. Anschließend wurden freie Bindungsstellen auf der Membran zur Vermeidung unspezifischer Bindung von Antikörpern durch Inkubation der Membran für 1 h bei 37°C unter Schwenken in Blockierlösung abgesättigt. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit einer antikörperspezifischen Verdünnung des jeweiligen Primärantikörpers in Blockierlösung für 1 h bei 37°C oder üN bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen in 1 x PBST oder 1 x TBST für jeweils 5 min bei RT wurde die Membran dann mit einem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (entsprechend der Herstellerangaben in Blockierlösung verdünnt) 1 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert und im Anschluss daran wieder 3 x je 5 min in 1 x PBST oder 1 x TBST gewaschen. Zur Entwicklung wurde die Membran von beiden Seiten mit ECL (enhanced chemoluminescence) Western Blotting

Detection Reagent benetzt und zwischen zwei durchsichtigen Folien in eine Filmkassette gelegt. Ein Röntgenfilm wurde dann für 1 sec bis 30 min bis zum Erreichen der gewünschten Signalstärke exponiert.

3.4.3.4 Abwaschen des gebundenen Antikörpers ("stripping")

War eine Detektion mit einem weiteren Antikörper erwünscht, so wurde die Membran im Anschluss an die Entwicklung des Blots zunächst für 30 min bei 68°C unter Schütteln in 100 mM β -Mercaptoethanol/2% SDS/62,5 mM Tris-HCl pH 6,7 inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2 x je 10 min in 1 x PBST oder 1 x TBST bei RT gewaschen, danach konnte erneut blockiert werden.

3.4.4 Weitere Proteinchemische Methoden

3.4.4.1 Bestimmung der Protein-Konzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Protein-Konzentration einer Lösung erfolgte mit der Methode nach Bradford. Mit dieser Methode konnten Konzentrationen zwischen 50 und 2000 µg Protein/ml bestimmt werden. Dazu wurden 10 µl der zu bestimmenden Probe mit 500 µl Bradford-Lösung versetzt und 2-3 Minuten gewartet. Zur Messung der Extinktion wurde das Biophotometer 6131 von Eppendorf verwendet.

3.4.4.2 Dialyse von Proteinproben

Die Dialyse von Proteinlösungen diente einerseits dem Pufferwechsel andererseits dem Entfernen störender Moleküle wie Glutathion nach der Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen. Es wurden entweder *Slide-A-Lyzer®*-Dialysekassetten von Perbio Science mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa oder *Spectra/Por®*- Dialyseschäuche von Roth mit einem Ausschlussvolumen von 25 kDa verwendet. Dialysiert wurde zunächst üN bei 4°C unter Rühren gegen das 500- bis 1000-fache Probenvolumen, anschließend erfolgte ein Pufferwechsel und die Dialyse wurde für mehrere Stunden fortgesetzt. Als Dialysepuffer diente sofern nicht anders angegeben 1 x PBS oder 1 x Kinase-Puffer.

3.5 Aktivitätstests mit rekombinant exprimierten Proteinen

Mithilfe eines sogenannten Kinase-Aktivitätstests kann festgestellt werden, ob rekombinante Proteine zur Autophosphorylierung oder zur Übertragung einer Phosphatgruppe auf ein anderes Protein in der Lage sind. Im Reaktionsansatz liegt neben unmarkiertem ATP auch radioaktiv markiertes [γ -³²P]-ATP als Phosphatgruppendonor vor, so dass der Grad der Phosphorylierung des zu untersuchenden Proteins sowohl qualitativ als auch quantitativ ausgewertet werden kann. Zusätzlich werden divalente Kationen wie Mn²⁺ oder Mg²⁺ als Co-Faktoren benötigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle in *E. coli* rekombinant exprimierten Kinasen auf Aktivität untersucht, unterschiedliche Reaktionsbedingungen getestet und die Phosphorylierung potentieller Substrate *in vitro* getestet.

3.5.1 Standard Kinase-Aktivitätstest

Ein 50 µl-Standardansatz enthielt 1x Kinase-Puffer (100 mM NaCl, 50 mM MOPS, 2 mM MnCl₂, 10 mM MgCl₂), 1 mM ATP und 5 μ Ci [γ -³²P]-ATP (5000 Ci/mmol; Hartmann Analytic, Braunschweig) sowie 0,5 - 2 µg der zu untersuchenden Kinase (sofern nicht anders angegeben) und ggf. eine bestimmte Menge an zu untersuchendem Substrat (Myelin basisches Protein= 5 µg). Es wurde 1 h bei 34°C inkubiert, die Proben anschließend in 1 x SDS-Probenpuffer mit 50 mM DTT für 10 min auf 95°C erhitzt, kurz auf Eis gelagert und dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Abschließend wurden die Proteine üblicherweise mit Coomassie Brilliant Blue R-250 angefärbt, die Gele getrocknet und in eine Filmkassette überführt. Bei -70°C erfolgte dann die Exposition eines Röntgenfilms für mehrere Stunden bis Tage.

3.5.2 Enzymkinetik

Um die Reaktionsordnung der Autophosphorylierungsreaktion von LmxMPK1 zu ermitteln, wurden Kinase-Aktivitätstest (s.o.) mit steigenden Konzentrationen von LmxMPK1 (0,24-25 µM) durchgeführt. Die Reaktionen wurden nach 15 Minuten durch Zugabe von EDTA in einer Endkonzentration von 10 mM gestoppt, die Proben auf beschriftetes Phosphocellulose p81-Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel) aufgebracht und viermal für je fünf Minuten in 75 mM ortho-Phosphorsäure sowie einmal in Aceton gewaschen, um nicht inkorporiertes ATP zu entfernen und die Papiere anschließend leichter trocknen zu können. Die Menge an inkorporiertem radioaktivem Phosphat wurde mittels Cerenkov-Zählung in einem Beckman LS5000CE Flüssigszintillationszähler ermittelt. Die Messwerte ließen sich im Anschluss in von der jeweiligen Enzymkonzentration Abhängigkeit darstellen und so die Reaktionsordnung ermitteln. die Um Parameter der Abhängigkeit der Autophosphorylierungsreaktion von der ATP-Konzentration zu bestimmen, wurde ein ähnlicher Test durchgeführt, hier wurde allerdings mit einer konstanten Menge an LmxMPK1 von 2 µg und an radioaktiv markiertem ATP von 5 µCi gearbeitet während die Konzentration an unmarkiertem ATP von 2 bis 100 µM variiert wurde. Die Messung des inkorporierten radioaktiv markierten Phosphats erfolgte wie oben beschrieben über Cerenkov-Zählung. Die Auswertung der Messdaten wurde unter Zuhilfenahme der folgenden Gleichungen durchgeführt:

n ATP_(umges.)[pmol] t_{Reakt.}[min] X m_{Enz.}[mg] V_{Reakt.} = -

Dabei ist V_{Reakt.} die Reaktionsgeschwindigkeit, t_{Reakt.} die Reaktionsdauer (in diesem Fall 60 min), m_{Enz.} die Menge an eingesetztem Enzym (in diesem Fall 2 µg) und nATP_(umges.) die Menge an umgesetztem ATP in pmol. Dieser Wert wird aus den gemessenen "counts per minute (cpm)" wie folgt errechnet:

n ATP_(umges.)[pmol] = _____

Spez. Rad.[cpm/pmol] x n ATP(rad.)[pmol]

nATP_(Ges.) ist dabei die Stoffmenge an gesamt eingesetztem ATP in pmol, Spez. Rad. steht für die spezifische Radioaktivität des [y-³²P]-ATP, die vor jedem Versuch bestimmt wurde (in der Regel ca. 3 x 10⁶ cpm/pmol) und n ATP_(rad.) ist die Stoffmenge an eingesetztem radioaktivem ATP (konstant = 1 pmol).

Mit den so bestimmten Reaktionsgeschwindigkeiten sowie den zugehörigen Substratkonzentrationen konnten die kinetischen Parameter der Reaktion bestimmt werden.

3.5.3 Screening eines Peptid-Mikrochips mit rekombinanter Kinase

Zur Substratsuche für LmxMPK1 wurde ein Peptid-Mikrochip durchsucht, der Peptide enthält, die Phosphorylierungsstellen bekannter Kinase-Substrate darstellen. Zu diesem Zweck wurden zwei Trial/Evaluation Chips und ein "Full Slide" der Firma Pepscan (Lelystad, Niederlande) verwendet. Die Trial/Evaluation Chips enthalten jeweils zwei identische Sets Peptide. Dabei enthält jedes Set 2 x 4 Subarrays mit je 6 x 4 Peptiden, also insgesamt 192 verschiedene Peptide im Duplikat. Der "Full Slide" enthält ebenfalls zwei identische Sets an Peptiden, jedoch enthält jedes Set hier 4 x 6 Subarrays mit je 7 x 7 Spots, also insgesamt je 1176 Spots pro Set. Zum Ermitteln der präferentiell phosphorylierten Peptide für eine Kinase wurde ein typischer Phosphorylierungs-Ansatz zusammengegeben. Dieser enthält: 1 x Kinase-Mastermix (1x optimaler Kinase-Puffer s.unter 4.2.5.2, 10% Glycerin, 0,01 mg/ml BSA, 0,01% (v/v) Brij-35), 10 µM ATP, 300 µCi/ml [y-³³P] ATP und 4 µg 6xHis-LmxMPK1Wt in insgesamt 60 µl. Der Ansatz wird gut gemischt und 50 µl werden in die Mitte eines bereitliegenden 25 x 60 mm Deckglases pipettiert. Der jeweilige Pepchip wird nun auf das Deckglas herabgesenkt bis sich das Deckglas mit der Flüssigkeit durch die Kapillarkräfte am Chip festsaugt. Nun wird der Chip mit einer schnellen Bewegung umgedreht und in eine Box, die mit feuchten Papiertüchern ausgelegt ist, auf einen etwas erhöhten, trockenen Gegenstand plaziert. Der Deckel der Box wird geschlossen, um die Feuchtigkeit zu halten und den Chip vor Austrocknen zu schützen, anschließend wird bei 34°C für ca. 3 h inkubiert. Nach Ende der Inkubation wird der Chip in einem 50 ml Tube, das mit 40 ml PBST (1% Triton x-100) gefüllt ist von dem Deckglas befreit. Anschließend wird er in das beiliegende Waschgefäß überführt und 2 x je 5 min unter Schütteln bei RT mit NaCl-T (1% Triton X-100) gewaschen. Abschließend wird noch einmal 5 min bei RT mit ddH₂O gewaschen, 2 x mit frischem ddH₂O gespült und der Chip kurz trocknen lassen. Es wird in einer Filmkassette ein Röntgenfilm exponiert. Das Autoradiogramm wurde eingescannt und von Jos Joore (Pepscan, Lelystad, Niederlande) ausgewertet. Mithilfe der so erhaltenen Konsensussequenz konnten eine L. major- Datenbank durchsucht und einige putative Substratproteine erhalten werden.

3.5.4 Phosphorylierung von Leishmanien-Lysaten mit rekombinanter LmxMPK1

Eine weitere Methode, die zur Substratsuche von LmxMPK1 angewendet wurde, war die direkte Phosphorylierung von Leishmanien-Lysaten mit rekombinantem Enzym. Zur Herstellung der Lysate wurden je 2 x 10⁹ L. mexicana Wt Pro- bzw. 4 x 10⁹ Amastigote in je 2 ml Lysepuffer (40 mM Tris-HCl pH 7,0, 2,5 mM EDTA, 15 mM DTT, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin, 1 mM ortho-Phenanthrolin) resuspendiert und durch zwei Frier-Tau-Zyklen (2 min in flüssigem Stickstoff, 45 min auf Eis) aufgebrochen. Zelltrümmer wurden anschließend für 15 min bei 4°C und 15800 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zwecks Entfernung von ATP, ADP und anderen kleinen Molekülen durch eine Sephadex G-25-Säule gegeben, die zuvor mit Äquilibrierungspuffer (40 mM Tri-HCI pH7,0, 0,1% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,1 mM EGTA, 0,1% Triton X-100) gespült worden war. Die so entsalzten Extrakte wurden anschließend zur Dephosphorylierung vor der Weiterverwendung für 20 min bei 30°C inkubiert. 50 µl dieser Lysate wurde dann in einem Kinase-Aktivitätstest mit 2 µg rekombinanter LmxMPK1 in dem hierfür optimalen Puffer (siehe 4.2.5.2) mit 10 mM NaF sowie 10 mM Na-Orthovanadat und unter Verwendung von 20 nM [y-³²P] ATP (3 x 10⁶ cpm) bzw. 100 µM [y-³²P] ATP (10⁶ cpm/nmol) für 1 h bei 34°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 x SDS-PAGE-Probenpuffer und 10minütiges Erhitzen auf 95°C beendet und die Lysate mittels SDS-PAGE auf 8-12%-igen Gelen aufgetrennt. Die Gele wurden Coomassie-gefärbt, getrocknet und ein Röntgenfilm exponiert.

3.5.5 Aktivierungstest mit putativen Aktivatorkinasen

Eine Möglichkeit, Kinasen auf ihre Fähigkeit, LmxMPK1 zu aktivieren zu überprüfen, ist der sogenannte Aktivierungstest. Es wurde zunächst eine Aktivierungsreaktion mit LmxMPK1, der putativen Aktivatorkinase und nicht-radioaktivem ATP (100 μM) unter Standardbedingungen (s.o., plus 1 mM EGTA, 1 mM Na-Orthovanadat) in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt, bei der LmxMPK1 in starkem Überschuss vorlag (LmxMPK1: 5-10 µg; Aktivatorkinase: 350 ng). Nach 1 h Reaktionsdauer wurden 5 µl der Reaktion in einen weiteren Reaktionsansatz überführt, in dem nun unter für LmxMPK1 optimalen Bedingungen mit radioaktiv markiertem ATP die und Substratphosphorylierungsaktivität von LmxMPK1 gegenüber MBP getestet wurde. Als Kontrollen dienten jeweils "Aktivierungsreaktionen" bei denen entweder die Aktivatorkinase oder LmxMPK1 alleine inkubiert wurden. Nach Ablauf der zweiten Reaktion, wurde der komplette Ansatz wie unter 3.5.2 beschrieben weiterbehandelt und die Menge des in das MBP inkorporierten ATPs mittels Cerenkov-Zählung bestimmt.

3.6 Infektionsexperimente

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Infektionsexperimente mit Balb/c Mäusen durchgeführt.
3.6.1 Fußsohleninfektion von Balb/c Mäusen

Jeweils fünf weibliche Mäuse im Alter zwischen sechs und zehn Wochen wurden mit Wt oder den zu untersuchenden Mutanten infiziert. Dazu wurde zunächst die Zellzahl der betreffenden Leishmanien-Kultur bestimmt. Jeweils 1,4 x 10⁸ Promastigote, die sich in der spätlogarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden entnommen und 10 min bei 4°C und 2050 x g zentrifugiert, einmal mit 1 x PBS gewaschen und zu einer Dichte von 3,33 x 10⁸ Zellen/ml in 1 x PBS aufgenommen. Jeder Maus wurden in die Fußßsohle des linken Hinterlaufs 1 x 10⁷ Promastigoten (in 30 µl Suspension) injiziert (Kanüle 0,3 mm x 13 mm). Die Mäuse wurden zur Unterscheidung am rechten Ohr markiert und die Dicke des infizierten sowie des nichtinfizierten Fußes über mehrere Monate hinweg mittels einer Schieblehre (Oditest, Kroeplin, Schluechtern) gemessen.

3.6.2 Isolierung von Amastigoten aus Mausläsionen

Mithilfe dieser Methode können amastigote Leishmanien aus Fußläsionen von infizierten Mäusen isoliert und anschließend für weitere Untersuchungen eingesetzt werden. Die Isolierung sollte zügig durchgeführt und die Amastigotensuspension aufgrund hoher Proteaseaktivität stets auf Eis oder bei 4°C gehalten werden.

Der infizierte linke Hinterfuß der durch Genickbruch getöteten Maus wurde zunächst sorgfältig mit 70%-igem Ethanol desinfiziert, dann steril abgetrennt und in kleinere Stücke geschnitten. Das Läsionsgewebe wurde dann unter Spülen mit insgesamt 10 ml eiskalter Proteaseinhibitorenlösung mit dem Stempel einer Spritze durch ein Metallsieb gerieben und der Durchfluss in einer Petrischale aufgefangen. Die so entstandene Zellsuspension wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 150 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und anschließend 10 min bei 1500 x g und 4°C zentrifugiert. Die so sedimentierten Amastigoten wurden in 10 ml Proteaseinhibitorenlösung resuspendiert und die Zellzahl wurde bestimmt. Im Schnitt konnten aus einer Läsion von 0,6 bis 1 cm Dicke zwischen 1 x 10⁸ und 1 x 10⁹ Amastigote isoliert werden. Die Zellen wurden anschließend direkt zur Herstellung von Lysaten eingesetzt oder in Aliquots von 1 oder 2 x 10⁸ Zellen nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -70°C gelagert. Zur *in vitro* Rückdifferenzierung zu Promastigoten wurden Amastigote in SDM-Medium gegeben und bei 27°C inkubiert.

3.7 In silico-Substratsuche mithilfe des Programmes PREDIKIN

Eine weitere Methode zur Suche nach potentiellen Substraten von LmxMPK1 stellt das Computerprogramm PREDIKIN dar. Dieses Programm kann unter <u>http://florey.biosci.uq.edu.au/kinsub/home.htm</u> eingesehen und benutzt werden und sagt die Zusammensetzung von Phosphorylierungsstellen von potentiellen Substraten einer Kinase basierend auf der Aminosäuresequenz der katalytischen Domäne der Kinase voraus. Dabei sind die Vorhersagen basierend auf Sequenzen, die in einem Experiment mit einer orientierten Peptidbibliothek in bekannten natürlichen Substraten und durch Modelling unter Verwendung des Insight II Software Packages (Accelrys) ermittelt wurden. Mithilfe der so erhaltenen Konsensussequenz wurde die *Leishmania major*-Datenbank auf mögliche Substrate durchsucht.

4 Ergebnisse

4.1 Ausgangslage

Vor Beginn dieser Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe bereits neun Gene von MAP Kinase homologen Proteinen in *Leishmania mexicana* identifiziert und teilweise charakterisiert. LmxMPK1, das MAP Kinase Homolog, welches Gegenstand dieser Arbeit ist, wurde bereits 1995 identifiziert und als essentiell für die Proliferation des amastigoten Lebensstadiums von *L. mexicana* beschrieben (Wiese, 1998). Dabei konnte außerdem nachgewiesen werden, dass eine Expression von LmxMPK1 sowohl in den Amastigoten als auch im Insektenstadium des Parasits, den Promastigoten, vorliegt, in denen eine Deletion des *LmxMPK1*-Gens jedoch scheinbar keinen distinkten Phänotyp hervorruft. Bis zum Beginn dieser Arbeit war es nicht möglich, LmxMPK1 rekombinant in *E. coli* zu exprimieren und aufzureinigen, eine rekombinante Expression war nur im Baculovirus-System möglich (Schuldt, 2003). Aufgrund der besseren Handhabbarkeit sowie der schnelleren, effektiveren und einfacheren Expression wurde zunächst versucht, eine Expression in *E. coli* zu etablieren, um anschließend verschiedene Mutanten - z.B. im Aktivierungsmotiv - biochemisch zu charakterisieren.

4.2 Biochemische Charakterisierung von LmxMPK1Wt, einer inaktiven Mutante (K43M) sowie Mutanten im Aktivierungsmotiv

Zu Beginn der Arbeit lagen folgende Konstrukte bereits vor: Expressionsplasmide zur rekombinanten Expression in *E. coli*: pQE8lmpk, pGEX-KGImpk KI.6. Expressionsplasmide zur rekombinanten Expression im Baculovirus-System: pFa20mpk1 und pFaNEMPK1KM. Expressionsplasmide zur episomalen Expression von LmxMPK1 in Leishmanien: pX5lmpk, pX19lmpkADF, pX13lmpkADY, pX6lmpkEDE, pX4lmpkTtoE(EDY), pX1lmpkTDE, pX5lmpkTDF, pX6lmpkK43M. Eine detaillierte Übersicht aller verwendeten und während dieser Arbeit hergestellten Plasmide findet sich im Anhang.

4.2.1 Diverse Klonierungen mit LmxMPK1

Da zunächst die Proteinexpression in *E. coli* etabliert werden sollte, und dafür bisher nur Wt-(Wildtyp-) Konstrukte vorhanden waren, mussten für alle zu testenden Mutanten ebenfalls *E. coli*-Expressionskonstrukte in den entsprechenden Vektoren hergestellt werden. Zuerst wurde aus den pX5-Plasmiden der Mutanten im Aktivierungsmotiv (TDY) mithilfe der Restriktionsendonukleasen *Sac*II und *Eco*47III jeweils ein 544 bp großes, die Mutation enthaltendes Fragment ausgeschnitten, welches anschließend in pQE8ImpkWt, der ebenso vorbehandelt worden war, ligiert wurde. Dies ergab die Expressionsplasmide pQE8ImpkADF, pQE8ImpkADY, pQE8ImpkEDE, pQE8ImpkEDY, pQE8ImpkTDE und pQE8ImpkTDF. Die K43M-Mutation ließ sich mittels dieser Strategie nicht in den pQE8-Vektor einbringen, hier wurde stattdessen ein 843 bp großes *Bsml/Sac*II-Fragment aus pFastBacImpkK43M ausgeschnitten und in pGEX-KGImpk ligiert, der zuvor ebenfalls mit *Bsm*I und *Sac*II vorbehandelt worden war. Dies ergab das Konstrukt pGEX-KGImpkK43M. Alle Produkte wurden zur Überprüfung sequenziert.

4.2.2 Rekombinante Expression von LmxMPK1 und Mutanten in E. coli

LmxMPK1 sollte sowohl als 6xHis-Protein als auch als Fusionsprotein mit einem Nterminalen Glutathion S-Transferase-Anteil (GST) in E. coli exprimiert und mittels Affinitätschromatographie über mit Cobalt beladene "Chelating Sepharose" (Amersham Biosciences, Freiburg) bzw. über "Glutathion Uniflow Resin" (BD Biosciences, Heidelberg) aufgereinigt werden, um einen anschließenden Einsatz in Aktivitätstest zu ermöglichen. Neben LmxMPK1Wt wurde eine Kinase-inaktive Mutante, LmxMPK1(K43M), die einen Lys-Met-Austausch an Position 43 aufweist, als GST-Fusionsprotein exprimiert. Außerdem wurden die bereits in der Einleitung beschriebenen verschiedenen Mutanten im Aktivierungsmotiv der Phosphorylierungslippe (TDY) exprimiert, die dazu dienen sollten, zusätzlich zu den in vivo-Daten (siehe 1.2.5) den Einfluss des Threonins und des Tyrosins bei der Autophosphorylierung und -aktivierung in vitro zu bestimmen. Für MAP-Kinasen höherer Eukaryoten ist bekannt, dass beide Reste phosphoryliert sein müssen, um höchste Aktivität zu erreichen (Payne et al., 1991; L'Allemain et al., 1992; Wu et al., 1992). Es wurden je drei Mutanten getestet, bei denen ein Verlust der Kinase-Aktivität zu erwarten war (ADF, ADY und TDF), sowie drei Mutanten, bei denen durch Ersatz des Threonins und/oder Tyrosins durch ein geladenes Glutamat eine Phosphorylierung vorgetäuscht werden sollte (EDY, EDE, TDE). Diese Strategie zur konstitutiven Aktivierung von Kinasen wurde zuvor bereits bei humanen MAPKKs wie MKK3 und 6 mit Glutamat (MKK3 und 6: Fujishiro et al., 2001; MKK6: Zhang et al., 2006) oder der murinen MKK1 mit Aspartat angewendet (Mansour et al., 1996), auch bei zwei Leishmania-MKKs (MKK und PK2) konnte mit dieser Strategie eine dauerhafte Aktivierung erreicht werden (Wiese et al., 2003); Wiese und Mitarbeiter, unveröffentlicht).

Bis zum Beginn dieser Arbeit war es nicht gelungen, LmxMPK1 rekombinant in *E. coli* zu exprimieren. Ein Problem bei der Proteinexpression in Bakterien liegt in der Bildung unlöslicher Einschlusskörper, was eine nachfolgende Aufreinigung des aktiven Proteins erschweren oder gar unmöglich machen kann. Daher wurden zunächst in Vorversuchen die Wachstums- und Expressionsbedingungen optimiert. Es stellte sich heraus, dass sowohl für 6xHis- und GST-LmxMPK1Wt als auch für alle Mutanten eine Induktion mit 50 µM IPTG und eine anschließende Kultivierung der Zellen üN bei 18°C die beste Ausbeute an Protein lieferte. Es wurden außerdem verschiedene *E. coli*-Stämme getestet, wobei sich zeigte, dass eine optimale Ausbeute an Protein in den Stämmen XL1 blue und vor allem BL21 erhalten

werden konnte. Wichtig war hierbei vor allem, dass frisch mit Expressionsplasmid transformierte Zellen zur Expression verwendet wurden, je älter die Zellen waren, desto geringer war die Ausbeute an rekombinantem, löslichem Protein. Abb. 9 zeigt, dass eine Isolierung von LmxMPK1Wt als 6xHis- und als GST-Fusionsprotein sowie der oben beschriebenen Mutanten in allen Fällen möglich war, wenn auch mit unterschiedlicher Ausbeute (Tab. 2) und Reinheit der Eluate.



Abb. 9: Aufreinigung von 6xHis-LmxMPK1, GST-LmxMPK1 und Mutanten aus je 100 ml *E. coli*-Kultur.
A) 1-7: komplette Aufreinigung von 6xHis-LmxMPK1Wt: 1:Zelllysat-Niederschlag; 2: Zelllysat-Überstand; 3: Überstand nach Bindung an Sepharose; 4: Waschlösung 1; 5: Waschlösung 2; 6: Waschlösung 3; 7: Eluat 1; 8: GST-LmxMPK1Wt, Eluat 1; 9: GST-LmxMPK1K43M, Eluat 1. B) Aufreinigung von 6xHis-LmxMPK1Wt und Mutanten im Aktivierungsmotiv aus je 100 ml *E. coli*-Kultur. Es sind jeweils die ersten Eluate dargestellt. 1: 6xHis-LmxMPK1Wt; 2: ADF-Mutante; 3: ADY-Mutante;
4: EDE-Mutante; 5: EDY-Mutante; 6: TDE-Mutante; 7: TDF-Mutante.

Die Proben wurden auf 12%-igen SDS-Polyacrylamid (PA-)-Gelen aufgetrennt und diese mit Coomassie gefärbt.

Protein	Ausbeute [mg Protein/I <i>E. coli</i> -Kultur]
6xHis-LmxMPK1	5,8
6xHis-LmxMPK1(ADF, ADY, EDE, EDY,	0,7
TDE, TDF)	
GST-LmxMPK1	3,5
GST-LmxMPK1K43M	1,2

Tab. 2: Ausbeute der Aufreinigungen

Dabei sind alle Proteine in den zu erwartenden Größen (6xHis-LmxMPK1 Wt , ADF, ADY, EDE, EDY, TDE und TDF= 41,2 kDa; GST-LmxMPK1Wt und K43M = 67,2 kDa) zu erkennen. Die größte Ausbeute wurde bei der Aufreinigung von 6xHis-LmxMPK1Wt erzielt, die ebenfalls mit dem 6x His-Tag versehenen Mutanten konnten aber nur in sehr geringer Ausbeute und Reinheit erhalten werden. Ähnliches konnte bei den GST-Fusionsproteinen festgestellt werden: auch die K43M-Mutante war nur in geringerer Ausbeute als der Wt aufzureinigen. Ferner war bei ausreichender Verdünnung der Eluate zu erkennen, dass es sich bei der aufgereinigten Kinase jeweils um eine Doppelbande handelte, außerdem lag die Bande von GST-LmxMPK1K43M unterhalb der des Wt-Fusionsproteins obwohl diese Proteine nominell die gleiche Größe haben sollten.

4.2.3 Kinase-Aktivitätstests mit rekombinanter LmxMPK1 und Mutanten

Kinase-Aktivität von 6xHis-LmxMPK1Wt konnte bereits unter Verwendung einer aus *Sf9*-Zellen aufgereinigten Version nachgewiesen werden (Schuldt, 2003). Leider erwies sich die Aufreinigung der Kinase-inaktiven K43M-Mutante sowie der Mutanten im Aktivierungsmotiv aus *Sf9*-Zellen als schwierig, zudem wurden nur geringe Ausbeuten erzielt. Mithilfe des aus *E. coli* aufgereinigten Wt-Enzyms sowie der K43M-Mutante sollte nun eindeutig eine Phosphorylierungsaktivität von LmxMPK1Wt sowie die fehlende Aktivität von LmxMPK1K43M nachgewiesen werden.

4.2.3.1 Aktivitätstest von LmxMPK1Wt und inaktiver K43M-Mutante

Zu diesem Zweck wurden das gereinigte 6xHis-Wt-Protein sowie das GST-Wt-Protein und die GST-K43M-Mutante zunächst in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ATP ([γ^{32} -P]ATP) und den zweiwertigen Kationen Mg²⁺ und Mn²⁺ in Standardkonzentrationen (10 und 2 mM) mit dem klassischen *in vitro*-Kinase-Substrat Myelin basisches Protein (MBP) inkubiert, 6xHis-LmxMPK1Wt wurde zusätzlich auch mit den Substraten Casein sowie Histon H1 inkubiert. Die Ansätze wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und eingebautes radioaktives Phosphat durch Exposition eines Röntgenfilmes nachgewiesen. Alle Versuche, die im folgenden erläutert werden, wurden mehrmals wiederholt und Filme verschieden lang exponiert.

In Abb. 10 ist deutlich sowohl eine Auto- als auch eine Substratphosphorylierungsaktivität in Bezug auf MBP von 6xHis- und GST-LmxMPK1Wt zu erkennen, während die Kinaseinaktive K43M-Mutante keinerlei Aktivität aufweist, was sich auch nach längeren Expositionszeiten bestätigte. MBP scheint dabei das effektivste Substrat zu sein. Casein und Histon H1 zeigen zwar eine ebenso starke Bande im Autoradiogramm, sind aber in deutlich größerer Menge vorhanden. In den Bahnen 1 und 2 erkennt man zusätzlich zu der Kinase und dem MBP noch eine schwache Bande, bei der es sich vermutlich um GST handelt. In den Bahnen 3-5 des gefärbten Gels sind einige zusätzliche Banden zu erkennen, die Abbauprodukte von LmxMPK1 oder der Substrate sowie Verunreinigungen der LmxMPK1-Aufreinigung darstellen können. Eine potentielle Verunreinigung der Aufreinigung, die ein Molekulargewicht von ca. 62 kD besitzt, wird darüber hinaus außerdem leicht phosphoryliert oder phosphoryliert sich selbst.



Abb. 10: Kinase-Aktivitätstest mit 6xHis-LmxMPK1Wt, GST-LmxMPK1Wt und GST-LmxMPK1K43M; jeweils links: Coomassie-gefärbtes SDS-PA-Gel (12%); rechts: Autoradiogramm nach 24 h (Spuren 3-5) bzw. 48 h Exposition (Spuren 1 und 2).1: GST-LmxMPK1Wt+MBP; 2: GST-LmxMPK1K43M+MBP;
3: 6xHis-LmxMPK1Wt+MBP; 4: 6xHis-LmxMPK1Wt+Casein; 5: 6xHis-LmxMPK1Wt+Histon H1.

4.2.3.2 Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen für LmxMPK1

Die im folgenden erläuterten Tests wurden ausschließlich mit 6xHisLmxMPK1Wt durchgeführt, da diese eine höhere Aktivität aufwies, als das GST-Fusionsprotein. In einem ersten Test wurden die Abhängigkeit der Auto- und MBP-Phosphorylierungsaktivität von LmxMPK1Wt von der Temperatur untersucht. Um die optimale Reaktionstemperatur zu ermitteln, wurde der Kinasetest unter Standardbedingungen (pH 7,2; 10 mM Mg²⁺; 2 mM Mn²⁺) bei verschiedenen Temperaturen von 4 - 40°C durchgeführt.

Das Autoradiogramm (Abb.11A) zeigt, dass sowohl die Auto- als auch die Substratphosphorylierungsaktivität von LmxMPK1 mit zunehmender Temperatur steigt und bei ca. 37-40°C ein Maximum erreicht. Auch bei 4°C ist schon eine deutliche Autophosphorylierung zu erkennen, eine MBP-Phosphorylierung findet bei diesen Temperaturen hingegen noch nicht statt. Als zweiter Punkt wurde die Abhängigkeit der Aktivität von LmxMPK1 von Magnesium und Magan in verschiedenen Konzentrationen (Mg²⁺: 0 bis 20 mM; Mn²⁺: 0 bis 10 mM) getestet. Kinasen benötigen neben einem Substrat wie z.B. MBP und dem "zweiten" Substrat ATP zweiwertige Ionen als Cofaktoren. Diese

bilden einen Komplex mit dem freien ATP, der dann das "wahre" Substrat darstellt. Manche Kinasen besitzen darüber hinaus eine zweite Bindungsstelle für zweiwertige Ionen, die so zusätzlich die Aktivität steigern können (Sun und Budde, 1997; Waas und Dalby, 2003). Anhand des gezeigten Autoradiogramms (Abb. 11B) wird deutlich, dass LmxMPK1 *in vitro* eine deutliche Präferenz für Mn²⁺ als Cofaktor zeigt.



Abb. 11: Enzymatische Charakterisierung der Auto- und Substratphosphorylierung von 6xHis-LmxMPK1. **A**) Abhängigkeit der Aktivität von LmxMPK1 von der Temperatur. Die Tests wurden bei Standard-pH (7,2) sowie Standard-Ionenkonzentrationen (2 mM Mn²⁺ und 10 mM Mg²⁺) durchgeführt, dabei wurden verschiedene Temperaturen von 4-40°C getestet. **B**) Abhängigkeit der Aktivität von LmxMPK1 von divalenten Kationen. Die Tests wurden bei Standard-pH (7,2) und 34°C mit steigenden Konzentrationen von Mn²⁺ und Mg²⁺ durchgeführt. **C**) Abhängigkeit der Aktivität von LmxMPK1 von verschiedenen pH-Werten. Die Tests wurden bei Standard-Ionenkonzentrationen und 34°C mit steigenden pH-Werten von 5,0 bis 6,0 (MES), 6,5 bis 7,5 (MOPS) und 8,0 bis 8,5 (Tris/HCI) durchgeführt. **D**) Zeitverlaufsexperiment mit LmxMPK1. Der Test wurde unter den ermittelten optimalen Bedingungen durchgeführt und nach verschiedenen Zeiträumen Proben entnommen. Alle Proteine wurden auf 12%-igen SDS-PA-Gelen aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt (links) und Röntgenfilme 24 h exponiert (rechts).

steigenden Mn²⁺-Konzentrationen steigt sowohl die Auto- als auch Mit die Substratphosphorylierungsaktivität, wobei letztere in ihrer Stärke immer hinter ersterer zurückbleibt. Eine Sättigung ist bei 5 mM Mn²⁺ zu erkennen, eine Steigerung der Ionenkonzentration auf 10 mM resultierte nicht in einer weiteren Steigerung der Aktivität. Ohne zweiwertige Kationen ist, wie erwartet, keine Aktivität sichtbar. Mg²⁺ ist als Cofaktor von ATP ebenfalls wirksam, auch hier ist eine Steigerung der Autophosphorylierungsaktivität Mg²⁺-Konzentration mit steigender zu beobachten. Allerdings erreicht die Substratphosphorylierungsaktivität von LmxMPK1 mit Mg²⁺ zu keinem Zeitpunkt dasselbe Ausmaß wie mit Mn²⁺ allein und ist erst nach 48 h Exposition schwach zu erkennen (nicht gezeigt).

Als dritter Punkt wurde der Einfluss des pH-Wertes des Reaktionspuffers auf die Kinase-Aktivität untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Puffersubstanzen MES (pH 5,5-6,0), MOPS (pH 6,5-7,5) und Tris (8,0-8,5) verwendet und mit Standardkonzentrationen an Mn²⁺ (2 mM) und Mg²⁺ (10 mM) gearbeitet. Abb. 11C lässt eine deutlich erhöhte Substratphosphorylierungsaktivtät von LmxMPK1 bei pH 7,5 erkennen, bei allen anderen getesteten Werten ist das Enzym zwar auch aktiv, zeigt aber stark verringerte Aktivität. Die Autophosphorylierung scheint bei pH-Werten um 5,5 am stärksten, nimmt aber mit steigendem pH nur wenig ab.

Die optimale Dauer eines Aktivitätstests mit LmxMPK1 wurde ebenfalls unter Standardbedingungen ermittelt; hier wurde der Test jeweils nach 5, 10, 15, 40, 50, 60 und 75 min abgestoppt und erneut der Grad der Phosphorylierung mittels Autoradiographie ermittelt. Eine optimale Reaktionsdauer wurde bei ca. 45-60 min erreicht, da hier eine sichtbare Sättigung der Phosphorylierung stattfindet (Abb. 11D).

Alle folgenden Kinase-Tests wurden, soweit nicht anders angegeben, unter den hier ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen (pH 7,5; 5 mM Mn²⁺; 34°C; 1 h) durchgeführt

4.2.3.3 Aktivitätstests mit LmxMPK1Wt und Mutanten des Phosphorylierungsmotivs in der Aktivierungsschleife (TDY)

Um den Einfluss des Threonin- sowie des Tyrosinrestes im Aktivierungsmotiv (TDY) von LmxMPK1 auf Auto- und Substratphosphorylierung *in vitro* zu ermitteln, wurde ein Aktivitätstest mit LmxMPK1Wt und den oben bereits erwähnten Mutanten durchgeführt. Dabei wurde ca. 1 µg Kinase pro Ansatz eingesetzt und der Aktivitätstest unter den o. g. Bedingungen durchgeführt. Wie man in Abb. 12 erkennen kann, sind nur die Mutanten, die den Tyrosinrest noch besitzen, in der Lage, eine sichtbare Autophosphorylierung durchzuführen. Eine MBP-Phosphorylierung, wie sie bei LmxMPK1Wt zu beobachten ist, war sowohl bei diesen als auch bei den anderen Mutanten auch nach längerer Expositionsdauer nicht detektierbar.



Abb. 12: Kinase-Aktivitätstest mit 6xHis-LmxMPK1 und Mutanten in der Aktivierungsschleife, Substrat: MBP. 1: LmxMPK1Wt; 2: ADF-Mutante; 3: ADY-Mutante; 4: EDE-Mutante; 5: EDY-Mutante;
6: TDE-Mutante; 7: TDF-Mutante. Links: Coomassie-gefärbtes 12%-iges SDS-PA-Gel, rechts: Autoradiogramm, 24 h Exposition.

4.2.3.4 Autophosphorylierung an Tyrosin bei LmxMPK1 Wt und Mutanten in der Aktivierungsschleife (TDY)

Um festzustellen, ob die unter 4.2.3.3 beobachtete Autophosphorylierung von LmxMPK1Wt sowie der ADY- und der EDY-Mutante an einem Tyrosinrest stattfindet, wurde ein Kinase-Test mit nicht radioaktiv markiertem ATP durchgeführt. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Dort erfolgte nach Blockierung der freien Bindungsstellen mit BSA eine Detektion mit einem gegen phosphoryliertes Tyrosin gerichteten Antikörper (P-Tyr-100, CST, Beverly, MA, USA). Bereits nach kurzer Exposition des Films war zu erkennen, dass der Antikörper wiederum nur den Wildtyp sowie die beiden Mutanten, die den Tyrosinrest noch besitzen (ADY und EDY), erkannte (Abb. 13A). Auch nach längerer Exposition war bei den anderen Mutanten (ADF, EDE, TDE, TDF) keine Schwärzung des Films sichtbar. Darüber hinaus wurde mit 6xHis-LmxMPK1Wt ein Zeitverlaufsexperiment durchgeführt, indem je 2 µg Protein mit nicht radioaktivem ATP inkubiert und die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt wurde. Es wurde wie oben eine SDS-PAGE und Übertragung auf eine PVDF-Membran durchgeführt und erneut mit dem o.g. Anti-Phospho-Tyrosin-Antikörper detektiert. Wie in Abb. 13B zu erkennen ist, liegt LmxMPK1 schon direkt nach der Aufreinigung (t=0) aus E. coli an Tyrosin phosphoryliert vor. Der Grad der Phosphorylierung steigt dann wie erwartet mit der Zeit an und erreicht wie auch schon unter 4.2.3.2 beobachtet zwischen 45 und 60 min eine Sättigung.



Abb.13: Die Autophosphorylierung von LmxMPK1Wt, LmxMPK1ADY und LmxMPK1EDY findet an einem Tyrosinrest statt und liegt bereits nach Aufreinigung aus *E. coli* vor. **A**) Immunoblot mit anti-Phosphotyrosin-Antikörper (P-Tyr-100, CST, Beverly, MA, USA) nach Aktivitätstest mit nicht radioaktiv markiertem ATP. **1:** LmxMPK1Wt; **2:** ADF-Mutante; **3:** ADY-Mutante; **4:** EDE-Mutante; **5:** EDY-Mutante; **6:** TDE-Mutante; **7:** TDF-Mutante **B**) Immunoblot mit anti-Phosphotyrosin-Antikörper nach Zeitverlaufsexperiment mit LmxMPK1Wt und nicht radioaktiv markiertem ATP. Jeweils oben: Immunoblot; unten: Coomassie-gefärbtes 12%-iges SDS-PA-Gel

4.2.3.5 Die Autophosphorylierung von LmxMPK1 an Tyrosin folgt einem intramolekularen Mechanismus

Es sollte nun überprüft werden, ob die beobachtete Autophosphorylierung an einem Tyrosinrest einem Reaktionsmechanismus erster oder zweiter Ordnung folgt, d.h. ob es sich hier um eine intra- oder intermolekulare Reaktion handelt. Zu diesem Zweck wurden Aktivitätstests mit steigenden Konzentrationen von LmxMPK1Wt durchgeführt und der Einbau radioaktiven Phosphats anschließend quantifiziert. Die Reaktionsdauer betrug in diesem Fall nur 10 Minuten, um nicht im Bereich der Sättigung zu messen. Trägt man nun die Menge eingebauten Phosphats gegen die Enzymkonzentration auf, erkennt man schon, dass es sich um eine Reaktion erster Ordnung handeln muss (Abb. 14A). Gewissheit erbringt hier der van 't Hoff-Plot, bei dem jeweils die Logarithmen der Menge an eingebautem Phosphat und Enzymkonzentration gegeneinander aufgetragen werden (Abb. 14B). Die errechneten Werte ergeben eine Gerade, deren Steigung ungefähr eins beträgt. Es handelt sich also um eine intramolekulare Reaktion.

Um dies zu bestätigen, wurde zusätzlich ein Kinase-Test mit 6xHisLmxMPK1Wt und GST-LmxMPK1K43M durchgeführt, um festzustellen, ob die Wt-Kinase in der Lage ist, die inaktive Mutante zu phosphorylieren. Abb. 14C zeigt, dass das nicht der Fall ist, nur 6xHisLmxMPK1Wt wird autophosphoryliert, die Mutante ist im Autoradiogramm nicht zu detektieren. Damit bestätigt sich, dass es sich bei der Autophosphorylierung von LmxMPK1 um eine intramolekulare Reaktion handelt.



Abb. 14: Die Autophosphorylierung von LmxMPK1 ist eine intramolekulare Reaktion. **A**) Aktivitätstest mit steigender LmxMPK1-Konzentration. Aufgetragen ist die Menge inkorporierten Phosphats pro Minute gegen die Enzymkonzentration (n=3). **B**) van't Hoff-Diagramm von A). Aufgetragen sind der Logarithmus der Menge eingebauten Phosphats gegen den Logarithmus der Enzymkonzentration (Steigung = 0,88; Regressionskoeffizient = 0,989). **C**) Phosphorylierungstest mit je 2 μg Kinase-inaktiver GST-LMXMPK1K43M und 6xHis-LmxMPK1Wt. **1:** GST-LmxMPK1K43M; **2:** 6xHis-LmxMPK1Wt; **3:** 6xHis-LmxMPK1Wt und GST-LmxMPK1K43M. Die Proteine wurden auf einem 12% SDS-PA-Gel aufgetrennt, Coomassie-gefärbt (links) und auf das getrocknete Gel für 24 h ein Röntgenfilm aufgelegt (rechts).

4.2.3.6 Kinetische Parameter der Autophosphorylierung von LmxMPK1

Um die Kinetik der beobachteten Autophosphorylierung weiter zu untersuchen, wurden Aktivitätstests mit gleich bleibender Menge LmxMPK1Wt und steigenden ATP-Konzentrationen für eine Dauer von 10 Minuten durchgeführt. Dabei wurde die Menge des radioaktiv markierten ATPs konstant gehalten, während die Menge des unmarkierten ATPs von 2 bis 100 μ M variierte. Die Reaktion gehorcht einer typischen Michaelis-Menten-Kinetik; aus dem doppelt reziproken Lineweaver-Burk-Plot konnte eine Michaelis-Menten-Konstante (K_M) für ATP von 14,7 μ M sowie eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} von 91 pmol/min/mg ermittelt werden (Abb. 15).



Abb. 15: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von LmxMPK1 von der ATP-Konzentration; Lineweaver-Burk-Diagramm. V_{max} = 91 pmol/min/mg; K_M (ATP)= 14,7 μ M.

4.2.4 Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von LmxMPK1 in vivo

4.2.4.1 Phosphorylierungsstatus von LmxMPK1Wt in Promastigoten und *in vitro*differenzierten Amastigoten

Nachdem mithilfe der rekombinanten Enzyme nun der Einfluss des Threonins und des Tyrosins im Aktivierungsmotiv auf die Autophosphorylierung, d.h. in Abwesenheit eines Aktivators, untersucht wurde, sollte nun versucht werden, näheres über den Phosphorylierungsstatus von LmxMPK1 *in vivo*, d.h. in Anwesenheit eines Aktivators, herauszufinden. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Aufreinigung der phosphorylierten Proteine sowohl aus *L. mexicana* Wt-Promastigoten als auch aus *in vitro*-differenzierten Amastigoten durchgeführt (48 h differenziert). Zusätzlich wurde bei beiden Aufreinigungen die Fraktion der nicht-phosphorylierten Proteine (Durchlauf der Säule) aufgefangen. Die erhaltenen Eluate 2 bis 4 sowie der Durchlauf wurden nun mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf PVDF-Membranen übertragen und die freien Bindungsstellen mit Milchpulver blockiert. Anschließend wurde mithilfe eines gegen ein C-terminales Peptid von

LmxMPK1 gerichteten Antikörpers die Kinase in den verschiedenen Fraktionen nachgewiesen.

Wie in Abb. 16 zu sehen ist, liegt LmxMPK1 sowohl in Promastigoten als auch in den *in vitro*differenzierten *L. mexicana*-Amastigoten in der Fraktion der Phosphoproteine vor. Bei der anderen sichtbaren Bande in den Promastigoten-Immunoblots handelt es sich vermutlich um eine Kreuzreaktion mit einem unbekannten Phosphoprotein aus *L. mexicana*.



Abb.16: Aufreinigung der nicht phosphorylierten sowie der phosphorylierten Proteine aus *L. mexicana*-Promastigoten und *in vitro*-differenzierten Amastigoten. **1 und 5:** Durchlauf = nicht phosphorylierte Proteine; **2 und 6:** Eluat 2; **3 und 7:** Eluat 3; **4 und 8:** Eluat 4. Jeweils links: Silbergefärbtes 12%-iges SDS-PA-Gel; rechts: Immunoblot. 1. Antikörper: α -C-termImpk 1:100, 30 min Exposition.

4.2.4.2 Phosphorylierungsstatus von LmxMPK1Wt und Mutanten im Aktivierungsmotiv *in vivo*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass LmxMPK1Wt sowohl in Promastigoten als auch in Amastigoten in phosphorylierter Form vorliegt, sollte nun mithilfe der *L. mexicana*-LmxMPK1-Mutanten im Aktivierungsmotiv untersucht werden, inwiefern die Mutanten *in vivo* phosphoryliert werden können. So wäre es möglich zusätzliche Erkenntnisse über den Aktivierungsmechanismus der Kinase *in vivo*, d.h. in Anwesenheit und unter Beteiligung eines Aktivators, zu erlangen.

Es wurde erneut eine Aufreinigung der phosphorylierten Proteine aus *L. mexicana* Wt-Promastigoten sowie Promastigoten der verschiedenen Mutanten im Aktivierungsmotiv durchgeführt. Bei allen Aufreinigungen wurde wie oben zusätzlich die Fraktion der nicht phosphorylierten Proteine aufgefangen. Die erhaltenen Proben wurden wie beschrieben mittels Immunoblot auf ein Vorhandensein von LmxMPK1 untersucht (Abb.17).



Abb.17: Aufreinigung der nicht phosphorylierten sowie der phosphorylierten Proteine aus *L. mexicana*-Promastigoten. **1:** Durchlauf = nicht phosphorylierte Proteine; **2:** Eluat 2; **3:** Eluat 3; **4:** Eluat 4. Jeweils links: Silbergefärbtes 12%-iges SDS-Gel; rechts: Immunoblot. 1. Antikörper: α -C-termImpk 1:100, 30 min Exposition.

Die Situation in Promastigoten stellt sich dabei wie folgt dar: Die ADF-Mutante findet sich ausschließlich unter den nicht phosphorylierten Proteinen im Durchlauf, ebenso wie die beiden Threonin-Mutanten EDY und ADY. LmxMPK1Wt liegt ausschließlich in der phosphorylierten Fraktion vor, während die beiden Tyrosin-Mutanten TDE und TDF sowohl in der phosphorylierten als auch in der nicht phosphorylierten Fraktion erscheinen und dabei im Gegensatz zum Wt, der hauptsächlich in Eluat 3 zu finden ist, außerdem über alle drei Eluate verteilt sind.

Da bisher nicht genauer untersucht wurde, ob das Fehlen von LmxMPK1 auch auf das promastigote Lebensstadium Auswirkungen zeigt, sollten nun Wachstumskurven des *L. mexicana* Wt, der Deletionsmutante sowie der im Aktivierungsmotiv von LmxMPK1 mutierten episomalen "add backs" erstellt werden. Somit sollte festgestellt werden, ob das Fehlen von LmxMPK1 auch im promastigoten Stadium Auswirkungen auf die Proliferation der Parasiten zeigt, wenn auch nicht einen völligen Proliferationsstop, wie im amastigoten Lebensstadium. Anhand der Mutanten sollte überprüft werden, inwieweit diese in der Lage sind, im promastigoten Stadium das Fehlen von LmxMPK1 zu kompensieren, um diese Ergebnisse dann mit den ermittelten Phosphorylierungsstadien in Korrelation stellen zu können.

Zu diesem Zweck wurde je 1 ml Medium mit jeweils 5x10⁵ Promastigoten beimpft, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Alle 24 h wurde nun über einen Zeitraum von 72h die Zellzahl bestimmt und so Wachstumskurven der verschiedenen Promastigoten erstellt (Abb. 18).



Abb. 18: Proliferation von *L. mexicana* Wt, Δ LmxMPK1 -/- und Mutanten im Aktivierungsmotiv im promastigoten Lebensstadium. Je 1 ml SDM-Medium wurde mit jeweils 5x10⁵ Promastigoten, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, angeimpft und bei 27°C inkubiert. Alle 24 h wurde die Zellzahl bestimmt (n = 3).

Anhand der Wachstumskurven ist zu erkennen, dass nur die Parasiten, die die EDY-Mutante von LmxMPK1 exprimieren ebenso schnell wachsen, wie die Wt-Parasiten. Die ADF-, die ADY- sowie die TDE-Mutante enthaltenden Klone teilen sich ca. genauso langsam, wie die beiden Deletionsmutanten-Klone. Diese unterscheiden sich nur darin, dass der Klon del9.8 vor Beginn des Versuchs schon lange in Kultur gehalten wurde, während ein Stabilat des Klons del1.10 erst einige Wochen vorher aufgetaut wurde. Die Parasiten, die die TDF-Mutante exprimieren, teilen sich etwas schneller als die eben erwähnten Parasiten, der Wt und die EDY-Mutante vier- bis fünfmal so schnell.

4.3 Die Suche nach Aktivatoren von LmxMPK1

Eine typische MAP-Kinase-Kaskade setzt sich wie bereits beschrieben aus drei Hauptelementen zusammen: den MAPKKKs, den MAPKKs und den MAP-Kinasen, in der Reihenfolge ihrer Aktivierung. Die aktivierten MAP-Kinasen sind in der Lage, z.B. in den Kern zu translozieren und dort Substrate wie Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren. Dabei weisen aktivierte MAP-Kinasen im Vergleich zu ihren nicht-aktivierten oder nur partiell autoaktivierten Formen eine vielfach verstärkte Aktivität auf (Prowse und Lew, 2001). Die Substratsuche kann also mit einer aktivierten Kinase deutlich einfacher sein als mit der nichtaktivierten Form, die nur eine Basalaktivität aufweist. Außerdem kann es sich bei den Aktivatorkinasen im Falle von LmxMPK1 um zusätzliche potentielle Zielstrukturen für die medikamentöse Therapie der Leishmaniose handeln. Inhibiert man zwei Komponenten einer Kaskade simultan, so ist es für den Parasiten ungleich schwieriger, eine mögliche Resistenz zu entwickeln, als wenn nur eine Komponente, z.B. die MAP-Kinase, inhibiert wird.

4.3.1 Test verschiedener bereits vorhandener potentieller Aktivatoren

Zum Beginn der Arbeit waren im Labor bereits einige putative MAPKKs sowie einige andere mögliche Aktivatorkinasen identifiziert, kloniert und zum Teil auch schon untersucht worden. Insgesamt lagen zu diesem Zeitpunkt drei putative MAPKKs (MKK, PK2 und PK4) sowie zwei putative Calcium-/ Calmodulin-abhängige Kinasen, die ursprünglich bei der Suche nach MAPKKs in L. mexicana mithilfe degenerierter Oligonukleotide identifiziert worden waren, vor (PK1 und PK3). Von allen fünf Kinasen waren bereits Expressionskonstrukte für eine Expression in E. coli vorhanden, in allen Fällen handelte es sich hier um GST-Fusionsproteine. Für MKK und PK2 waren außerdem konstitutiv aktivierte Mutanten konstruiert worden, da die jeweiligen Wt-Enzyme im Kinase-Test keine Auto- und Substratphosphorylierungsaktivität aufwiesen. Hierzu wurde eine Region in der Aktivierungsschleife durch eine homologe Region aus einer konstitutiv aktivierten Mutante der murinen MKK1 ersetzt, in der Serin- bzw. Threoninreste, an denen eine Phosphorylierung stattfinden kann, durch Aspartatreste ersetzt wurden (Mansour et al., 1996). Die konstitutiv aktivierten Mutanten werden im Folgenden als "Mut2" bezeichnet. Alle vorhandenen Expressionsplasmide wurden zur Expression in E. coli BL21 transformiert und für die bisher nicht exprimierten Kinasen (PK1, PK2, PK3) zunächst wieder Testexpressionen durchgeführt, um die optimalen Expressionsbedingungen zu ermitteln. Für alle drei Kinasen erwies sich eine Induktion mit 100 µM IPTG und eine anschließende Expression bei 18°C üN unter Schütteln als sinnvoll. Für MKK und PK4 waren optimale Expressionsbedingungen bereits bestimmt worden, auch hier war eine Expression üN bei 18°C nach Induktion mit 100 µM IPTG am erfolgreichsten (Scholz, 2003; Kuhn, 2004). Nun wurden die fünf Aktivatorkandidaten mittels Affinitätschromatographie über Glutathion

Uniflow Resin aufgereinigt. Für MKK (41 kD + 26 kD) und PK4 (38,9 kD + 26 kD) war dies bereits erfolgreich etabliert, die anderen drei Kinasen konnten in mehr oder weniger guten Ausbeuten erhalten werden. Besonders die Kinase PK2, die ein sehr hohes Molekulargewicht besitzt (120 kD + 26kD GST), wurde nur in sehr geringer Konzentration aufgereinigt, obwohl bis zu 500 ml *E. coli* Kultur als Ausgangsmaterial eingesetzt wurden. Darüber hinaus wiesen die Eluate von PK2, PK1 (95 kD + 26 kD) und PK3 (52 kD + 26 kD) viele zusätzliche Banden auf, bei denen es sich sowohl um Abbauprodukte als auch um Produkte eines vorzeitigen Kettenabbruchs bei der Proteinsynthese handeln kann (Abb. 19). Vor allem bei PK1 und 3 fällt je eine zusätzliche Bande auf, die jeweils ungefähr auf der Höhe der nicht-GST-gekoppelten Kinase läuft. Zusätzlich sieht man in diesen beiden Spuren auch je eine Bande die der GST entsprechen könnte (26 kD).



Abb. 19: Aufreinigung der MAPKK MKK, PK2, PK1, 3 und 4 als GST-Fusionsproteine, gezeigt ist jeweils das 1. Eluat einer Aufreinigung im Coomassie-gefärbten 12%-igen SDS-PA-Gel. Die jeweiligen GST-Fusionsproteine sind rot markiert. **1:** GST-LmxPK1; **2:** GST-LmxPK3; **3:** GST-LmxPK2Mut2; **4:** GST-LmxMKKMut2; **5:** GST-LmxPK4.

Zunächst wurden die aufgereinigten Kinasen in einem Standard-Test mit MBP als Substrat auf ihre Phosphorylierungsaktivtät überprüft. Dabei zeigten die drei putativen MAPKKs MKK(Mut2), PK2(Mut2) sowie PK4 deutliche und starke Aktivität, vor allem gegenüber MBP als Substrat, wiesen aber auch eine Autophosphorylierung auf. Auch PK3 zeigte eine deutliche MBP-Phosphorylierung unter Reaktionsbedingungen für MAPKKs, obwohl es sich hierbei laut Parsons *et al.* (2005) um eine Calcium-/Calmodulin-abhängige Kinase handeln sollte. Auch eine schwache Autophosphorylierung ist hier zu erkennen, sowohl auf der Höhe von GST-LmxPK3 als auch auf der Höhe von LmxPK3. Allein PK1 zeigte weder Auto- noch Substratphosphorylierungsaktivität (Abb. 20). Aus diesem Grund wurde diese Kinase noch einmal, zusammen mit PK3, unter für Calcium-/Calmodulin-abhängige Kinasen geeigneten Bedingungen getestet (50 mM Tris-HCl pH8; 10 mM MgCl₂; 5 μ M β -Mercaptoethanol; 0,4 mM EGTA; 0,7 mM CaCl₂; 20 ng/ μ l Calmodulin), doch auch hier wies das rekombinante Enzym keine Aktivität auf, während PK3 aktiv war (nicht gezeigt).



Abb. 20: Kinase-Aktivitätstest mit den Kinasen MKKMut2, PK1, PK2Mut2, PK3 und PK4 und MBP als Substratprotein unter Standardbedingungen für MAPKK (pH 7,2; 2 mM Mn²⁺; 10 mM Mg²⁺; 34°C); **1:** GST-LmxPK1+MBP; **2:** GST-LmxPK3+MBP; **3:** GST-LmxPK4+MBP; **4:** GST-LmxMKKMut2+MBP; **5:** GST-LmxPK2Mut2+MBP; Links: Coomassie-gefärbtes 12%-iges SDS-PA-Gel; rechts: Autoradiogramm, 20h Exposition.

Um festzustellen, ob es sich bei einer der genannten putativen Aktivatorkinasen tatsächlich um den Aktivator von LmxMPK1 handelt, wurden zwei verschiedene Tests durchgeführt: Zum einen wurde in einem Aktivierungstest die jeweilige Aktivatorkinase in geringer Menge (ca. 750 ng) zusammen mit einer größeren Menge (5 µg) LmxMPK1 Wt und nichtmarkiertem ATP inkubiert. Ein Zehntel dieses Ansatzes wurde anschließend in einen Aktivitätstest mit MBP als Substrat und radioaktiv markiertem ATP eingesetzt, um festzustellen, ob sich die MBP-Phosphorylierung von LmxMPK1 verstärkt hatte. Die Stärke der Phosphorylierung wurde im Szintillationszähler quantifiziert (Tab. 3). Als Kontrollen wurden hier jeweils LmxMPK1Wt, die zuvor allein inkubiert worden war, so wie die verschiedenen MAPKK, die zuvor ohne LmxMPK1 inkubiert worden waren eingesetzt.

Ansatz	cpm
MPK1	1731
PK1	347
РКЗ	1156
PK4	763
MKKMut2	936
PK2Mut2	1574
PK1+MPK1	856
PK3+MPK1	1584
PK4+MPK1	3926
MKKMut2+MPK1	1414
PK2Mut2+MPK1	1265

Tab. 3: Aktivierungstest mit LmxMPK1 und putativen Aktivatorkinasen (cpm = counts per minute, Maß für den Einbau radioaktiven Phosphats in MBP)

Wie in Tab.3 zu sehen ist, ließ sich keine Aktivierung von LmxMPK1 durch eine der getesteten Aktivatorkinasen beobachten. Einzig in Kombination mit LmxPK4 zeigt sich eine leichte Verstärkung der MBP-Phosphorylierung, im Falle einer echten Aktivierung sollte sich die MBP-Phosphorylierung jedoch mindestens um ca. das 30-fache erhöhen (Erdmann *et al.*, 2006).

Zum anderen wurde in einem "klassischen" Aktivitätstest überprüft, ob einer der putativen Aktivatoren in der Lage wäre, die inaktive K43M-Mutante (von der zuvor der GST-Anteil mittels Thrombinverdau abgespalten wurde) von LmxMPK1 zu phosphorylieren; dies wurde wiederum mittels Autoradiographie visualisiert (Abb. 21). LmxPK1 wurde hier trotz bisher nicht messbarer Aktivität mitgetestet, da es z.B. auch Kinasen gibt, die keine oder kaum Autophosphorylierung zeigen (Wiese und Mitarbeiter, unveröffentlicht) und/oder für die MBP kein gutes Substrat ist, was vor allem auch auf MAPKK zutrifft (Zheng und Guan, 1993; Wang *et al.*, 2005).



Abb. 21: Phosphorylierungstest mit LmxMPK1K43M und verschiedenen Aktivatorkinasen; 1: GST-LmxMPK1K43M bzw. LmxMPK1K43M; 2: GST-PK2Mut2 + LmxMPK1K43M; 3: GST-PK1 + LmxMPK1K43M; 4: GST-PK3 + LmxMPK1K43M; 5: GST-PK4 + LmxMPK1K43M; 6: GST-MKKMut2 + LmxMPK1K43M. Links: Coomassie-gefärbtes 12%-iges SDS-PA-Gel; rechts: Autoradiogramm, 24 h Exposition.

In Spur 1 erkennt man LmxMPK1K43M ohne Aktivatorkinase, allerdings ist im Coomassiegefärbten Gel auch noch ein großer Anteil GST-LmxMPK1K43M zu sehen, da der Thrombinverdau offensichtlich nicht vollständig war. Spur 2 zeigt nur eine leichte Autophosphorylierung von LmxPK2Mut2, in Spur 3 ist die Reaktion mit LmxPK1 abgebildet. Hier hat erneut keinerlei Phosphorylierung stattgefunden. In Spur 4 sind zwei dominante Banden zu erkennen, dabei handelt es sich um die Autophosphorylierung von GST-LmxPK3 sowie die Autophosphorylierung von LmxPK3 ohne GST. Diese rührt daher, dass sich in der zugegebenen LmxMPK1K43M noch Reste von Thrombin befinden, welches nun ebenfalls von den MAPKK den GST-Anteil abspaltet. Dieses Phänomen lässt sich auch in Spur 5 und 6 feststellen: Hier sieht man ebenfalls nur die Autophosphorylierung der putativen Aktivatorkinasen mit und ohne GST. Bis auf eine sehr schwache, wahrscheinlich unspezifische Phosphorylierung in den Spuren 2-4 phosphoryliert keine der getesteten Aktivatorkinasen LmxMPK1K43M.

4.3.2 Identifikation neuer putativer MAPKKs aus *L. mexicana*

Zu Beginn der Arbeit waren nur fünf bzw. drei putative MAPKKs in *Leishmania* bekannt (s.o.). Da bis dahin aber schon neun MAP-Kinasen identifiziert wurden, deren Zahl sich mittlerweile auf 15 erhöht hat, müssen, selbst wenn man davon ausgeht, dass manche MAPKKs evtl. mehrere Substrate haben oder dass die MAP-Kinasen vielleicht nicht ausschließlich von MAPKKs aktiviert werden, noch weitere MAPKK-Homologe in *Leishmania* vorliegen. Ein kürzlich erschienener Artikel von Parsons *et al.* (2005), welcher sich mit dem Kinom (Gesamtheit aller Kinasen) der Trypanosomatiden beschäftigt, nennt drei weitere putative MAPKK-Homologe in *L. major* mit den zugehörigen Genen LmjF36.0860, LmjF32.1020 und LmjF 07.0250. Die zugehörigen Proteine werden im Folgenden als PK5, PK6 und PK7 bezeichnet.

Basierend auf konservierten Regionen der *L. major*-Sequenzen, die durch einen Vergleich mit den korrespondierenden Genen in *L. infantum* ermittelt wurden, wurden Digoxigeninmarkierte Sonden zum Durchsuchen einer *L. mexicana*-gDNA-Bank erstellt. Dafür wurde im Fall von PK5 eine PCR mit den Oligonukleotiden PK5.for und PK5.rev auf genomischer DNA von *L.mexicana* und *L. major* durchgeführt, für PK6 und PK7 wurden respektive die Oligonukleotide PK6.for und PK6.rev, sowie PK7.for und PK7.rev verwendet. Dabei ergab sich für die PK5-Sonde nur bei der PCR auf *L. major*-DNA ein Produkt. Alle drei Sonden, die jeweils 363 (PK5), 368 (PK6) bzw. 435 bp (PK7) umfassten, wurden in den Vektor pCR2.1TOPO zwischenkloniert und sequenziert. Mithilfe dieser Sonden konnten Phagen aus der gDNA-Bank isoliert und deren DNA präpariert werden. Nach Restriktionsspaltungen der Phagen-DNA mit *Eco*RI, *Not*I und *Xba*I wurden gDNA enthaltende Fragmente in den pBluescript II SK(+)-Vektor kloniert. Dabei ergaben sich die Gene für drei neue MAPKK-Homologe aus *L. mexicana* identifiziert und anschließend sequenziert.

Für LmxPK5 gelang es leider nicht, den offenen Leserahmen (ORF) komplett auf einem Insert zu erhalten, da der C-Terminus durch eine im Gen liegende *Xba*l-Schnittstelle abgespalten wurde. Mit den anderen beiden Restriktionsendonukleasen wurden keine positiven Klone generiert. Aus diesem Grund wurde ein 629 bp langer C-terminaler Bereich unter Zuhilfenahme der Oligonukleotide PK5.2for und PK5.4rev auf Phagen-DNA des Phagen-Klons 571 amplifiziert und in pCR2.1TOPO subkloniert. Das Oligonukleotid PK5.4rev wurde dabei auf Basis einer zwischen den *Leishmania*-Spezies *L. major* und *L.*

infantum stark konservierten Sequenz der stromabwärts von *LmaPK5* gelegenen Region generiert. Nachdem vier unabhängige Klone des PCR-Produktes sequenziert wurden und die Sequenz in allen vier Fällen übereinstimmte, wurde ein 346 bp großes Fragment mit den Restriktionsenzymen *Xba*l und *Not*l aus pCR2.1.TOPOPK5C-term ausgeschnitten und mit pBSKPK571X4*Acc*IRel., der mit den gleichen Restriktionsenzymen vorbehandelt worden war, ligiert. Dieser Vektor war zuvor mittels Spaltung durch *Acc*I und Religation von pBSKPK571X4 hergestellt worden, durch die Spaltung mit *Acc*I wurde ein ca. 1,8 kb großes Fragment entfernt, welches die stromaufwärts des Gens gelegenen *Xba*I-und *Not*I-Schnittstellen enthielt, so dass diese Restriktionsendonukleasen nun zum Einfügen des C-terminalen Fragmentes in pBSKPK571X4*Acc*IReI. verwendet werden konnten. Das dabei entstandene Konstrukt trägt den Namen pBSKPK5+C-term.

Die vollständigen Sequenzen aller drei neuen MAPKKs aus *L. mexicana* wurden in der NCBI Nukleotid-Datenbank unter den jeweiligen Zugangsnummern DQ812908 (LmxPK5), DQ812909 (LmxPK6) und DQ812910 (LmxPK7) veröffentlicht.

4.3.2.1 Homologievergleich mit Kinasen aus anderen Spezies und Eigenschaften der neuen MAPKK

PK5: Das LmxPK5-Gen umspannt 1578 bp und codiert für ein 526 Aminosäuren (As) großes Protein. Ein Homologievergleich von PK5 mit der Aminosäuresequenz der putativen Kinase aus dem *L. major* Friedlin Genomprojekt, welches momentan noch als MAP Kinase annotiert ist, zeigt eine Übereinstimmung von 89%. Das zugehörige Gen, LmjF36.0860, befindet sich auf Chromosom 36 von *L. major* Friedlin. Stromaufwärts befindet sich der ORF für ein bisher nicht weiter charakterisiertes, 888 As großes, konserviertes Protein, stromabwärts das Gen für eine 942 As große, putative RNA-Helicase, die möglicherweise an Spleißvorgängen beteiligt ist. Bei *Trypanosoma brucei* und *T. cruzi* konnten ebenfalls Homologe zu LmxPK5 gefunden werden (Tb10.70.1800 bzw. Tc00.1047053506679.40), deren Primärsequenz zu ungefähr 60% mit der von LmxPK5 übereinstimmt. In beiden Fällen bezieht sich hier die Homologie auf die gesamte Sequenz; Homologien mit MAP Kinase Kinasen aus anderen Organismen, wie vor allem *Arabidopsis thaliana, Nicotiana tabacum* oder *Zea mays*, konnten vor allem in der katalytischen Domäne ausgemacht werden und betrugen zwischen 36 und 43%. Ein Alignment cer Kinase-Domänen von LmxPK6 und ihren Homologen findet sich im Anhang.

Die Proteinkinase-Domäne umfasst die As 59-317. In den Subdomänen VIa bis IX liegen die meisten hochkonservierten Aminosäuren vor; hier ermöglichen bestimmte Sequenzmotive eine Klassifizierung der Kinasen in Serin-/Threonin- oder Tyrosin-Kinasen (Hanks *et al.*, 1988); (Hanks und Quinn, 1991). Typische Serin-Threonin-Kinase-Sequenzen befinden sich

in den Subdomänen VIb (D-L-K-P-E-N) und VIII (G-T/S-X-X-Y/F-X-A-P-E), Tyrosin-Kinasen weisen dagegen die Sequenzen D-L-R-A-A-N oder D-L-A-A-R-N und P-I/V-K/R-W-T/M-A-P-E auf. Im Falle von LmxPK5 befinden sich an diesen Stellen die Sequenzen D-L-K-P-S-N und G-T-V-T-Y-M-S-P-E, was eher auf eine Spezifität dieser Kinase für Serin-/Threoninreste hindeutet. Für Dual-spezifische Proteinkinasen, zu denen die MAPKK gehören, wurden allerdings noch keine eigenen Sequenzmotive gefunden, einen Anhaltspunkt liefert das Vorliegen einer kleinen, ungeladenen Aminosäure in Subdomäne VIb zwischen Prolin und Asparagin (Lindberg *et al.*, 1992). Bei LmxPK5 handelt es sich hier um Serin, eine zwar kleine, jedoch geladene Aminosäure.

Eine Aktivierung der MAPKK erfolgt im Falle der Säuger- und Hefekinasen durch Phosphorylierung an bestimmten Serin- und/oder Threoninresten zwischen Subdomäne VII und VIII (S-X-X-S/T; (Robinson und Cobb, 1997) in der Aktivierungsschleife. Die Kinetoplastiden-Proteine weisen an dieser Stelle eine S-X-X-X-X-T-Abfolge auf (Kuhn, 2004), bei LmxPK5 handelt es sich um die Sequenz S-S-N-L-E-C-T, interessant ist hier der Serinrest zweiter Position. zusätzliche an da er eine zusätzliche mögliche Phosphorylierungsstelle darstellt.

Unter Verwendung des PSORT II Servers konnten in der Primärsequenz von LmxPK5 weder NH₂-terminale Signalpeptide noch Transmembrandomänen oder Lokalisierungsmerkmale identifiziert werden.

PK6: Das Gen der MAPKK LmxPK6 umspannt 2436 bp und codiert für ein 812 As großes Protein. Auch mit der hier ermittelten Aminosäuresequenz von LmxPK6 wurde ein Homologievergleich mit der putativen Kinase aus dem L. major Friedlin Genomprojekt durchgeführt. Dabei ergibt sich eine Übereinstimmung von 91%. Das zugehörige Gen LmjF32.1020, welches 2436 bp umfasst befindet sich auf Chromosom 32. Stromaufwärts gelegen befindet sich ein 423 As großes Protein, welches schwache Homologien zu Tyrosin-Phosphatasen aufweist, stromabwärts befindet sich das Gen für ein weiteres konserviertes, 221 As großes Protein. Auch hier finden sich bei T. brucei und T. cruzi homologe Proteine (Tb11.01.5880 bzw. Tc00.1047053511725.230). In diesem Fall stimmt die Primärsequenz nur zu 47 bzw. 51% mit der von LmxPK6 überein, zudem weisen die beiden Proteine putative Signalpeptide auf, die in dem Leishmanien-Protein nicht vorhanden sind. Im Homologievergleich mit nur anderen Organismen ergaben sich wiederum Übereinstimmungen in der Kinase-Domäne z.B. mit der Kinase SLK aus Homo sapiens (34%), MPK2 aus Nicotiana tabacum (32%) oder mit der CAMK Kinase aus Trichomonas *vaginalis* (34%). Bei diesen Kinasen handelt es sich interessanterweise nicht um klassische MAPKK. Auch hier ist ein Alignment der Kinase-Domänen im Anhang zu finden.

Im Falle von LmxPK6 befindet sich die Kinase-Domäne weit am C-terminalen Ende des Proteins (As 376-728), es besitzt somit einen langen N-Terminus, dem bisher keine weiteren Funktionen zugesprochen werden konnten. Auch die oben erwähnten Motive zur Klassifizierung von Serin-/Threonin- bzw. Tyrosinkinasen finden sich in der Kinase-Domäne von LmxPK6. Wie auch im Falle von LmxPK5 deuten die Motive D-L-K-P-A-N in Subdomäne VIb und G-T-I-L-Y-K-A-P-E in Subdomäne VIII eher auf eine Serin-Threonin-Kinase – Funktion des Enzyms hin. Die kleine ungeladene Aminosäure zwischen Prolin und Asparagin ist bei LmxPK6 mit Alanin vorhanden, was dafür sprechen kann, dass es sich hier um eine Dual-spezifische Kinase handelt.

Im Gegensatz zu LmxPK5 und den anderen bekannten *L. mexicana* MAPKK findet sich bei LmxPK6 nicht das typische Aktivierungsmotiv S-X-X-X-X-T in der Aktivierungsschleife gleich nach dem hochkonservierten DFG-Motiv. Hier findet sich nur ein Serinrest, der nächstgelegene Threoninrest ist ganze 17 Aminosäuren entfernt und schon Teil eines anderen Motivs.

Eine Eingabe der Primärsequenz von LmxPK6 in den PSORT II Server ergab eine mögliche nukleäre Lokalisation für LmxPK6 (60,9% Wahrscheinlichkeit), allerdings nur ausgehend von der Annahme, dass es sich hier um ein "tierisches (animal)" Protein handelt. Dies ist insofern mit Vorsicht zu bewerten, da es sich hier um ein Kinetoplastiden-Protein handelt, welche sich phylogenetisch relativ stark von den höheren Eukaryoten unterscheiden.

PK7: Das sehr große *LmxPK7*-Gen umspannt insgesamt 5199 bp und codiert für ein 1733 As großes Protein. Ein Homologievergleich der Primärsequenz von LmxPK7 mit der in *L. major* Friedlin vorliegenden Kinase ergab eine Übereinstimmung von 83% der Sequenz. Das *LmxPK7*-Gen, LmjF 07.0250, befindet sich auf Chromosom 7 und wird stromaufwärts von dem Gen für ein 607 As großes hypothetisches Protein und stromabwärts von dem Gen einer 366 As großen putativen Homoserin-Dehydrogenase flankiert. Die homologen Proteine in *T. brucei* und *T. cruzi* (Tb927.8.1780 und Tc00.1047053505071.140 bzw. Tc00.1047053511393.60) weisen 42 bzw. ca. 60% Übereinstimmung in der Primärsequenz, hauptsächlich in der Kinase-Domäne, auf, dabei gibt es in *T. cruzi* zwei Orthologe zu LmxPK7, wobei es sich aber um ein und das selbe Protein handeln könnte. Auch hier gibt es Übereinstimmungen zu Sequenzen aus anderen Organismen ausschließlich in der Kinase-Domäne, dabei gewinnt man außerdem den Eindruck, dass in dem LmxPK7-Gen einige Insertionen stattgefunden haben müssen, da nur Teile der Kinase-Domäne hohe Übereinstimmung mit anderen Organismen aufweisen. Dabei bestehen z.B. 34 bzw. 31% Übereinstimmung zu MAPKK aus *A. thaliana, S. cerevisiae* oder *Mus musculus* (siehe 9.3.5).

Wie auch bei LmxPK6 befindet sich in LmxPK7 die Kinase-Domäne am C-terminalen Ende des Proteins (As 1228-1826), wobei hier eine sehr lange N-terminale Domäne vorhanden ist (1227 As), die außerdem ein putatives Signalpeptid enthält (As 1-26). Da die orthologen Proteine in *T. brucei* und *T. cruzi* deutlich kleiner sind (ca. 80 kD verglichen mit 190 kD) kann man vermuten, dass bei *Leishmania* möglicherweise Insertionen im PK7-Genlokus stattfanden, die die lange N-terminale Domäne erzeugt haben. In Subdomäne VIb kann die Sequenz D-I-K-P-G-N identifiziert werden, im Anschluss an das DFG-Motiv findet sich die potentielle Aktivierungsstelle mit der Sequenz S-Q-R-C-D-S. Direkt im Anschluss, wie bei den anderen MAPKK liegt hier weder eine Erkennungssequenz für Serin-/Threonin- noch für Tyrosinkinasen vor. Stattdessen findet man eine ca. 150 As große Insertion, was die oben aufgestellte Hypothese bestätigt. Erst dann taucht die Serin/Threoninkinasen-Sequenz G-T-D-K-Y-M-S-P-E auf. Die kleine ungeladene Aminosäure Glycin zwischen Prolin und Asparagin könnte auf eine Dual-spezifische Kinase hindeuten, dabei spricht aber die große Insertion kurz nach der Aktivierungsstelle eher dafür, dass es sich evtl. um ein nicht funktionelles Protein handelt.

Eine Untersuchung der LmxPK7-Aminosäuresequenz mithilfe des PSORTII-Servers ergab auch für diese Kinase eine hohe Wahrscheinlichkeit einer nukleären Lokalisation (82%), wobei dies allerdings, wie auch bei LmxPK6, nur auf zwei relativ kurzen und einfachen NLS (nukleären Lokalisationssequenzen) beruht: einem Motiv aus drei oder vier basischen As gefolgt von einem Prolin- oder einem Histidinrest und einem zweiten Motiv, welches mit einem Prolinrest beginnt, dem innerhalb von drei weiteren As ein Motiv aus vier As folgt, von denen mindestens drei basisch sind. Solche relativ unkomplizierten Motive sind in einem so großen Protein wie LmxPK7 natürlich mit einer größeren Wahrscheinlickeit vorhanden als in einem kleineren Protein, weshalb eine nukleäre Lokalisation nur durch experimentelle Studien endgültig nachgewiesen werden kann.

4.3.2.2 Subklonierung in Expressionsvektoren, Expression und Aufreinigung der MKK-Homologen PK5, 6 und 7

PK5: Um das in pBSKPK5+C-term vorliegende PK5-Gen für nachfolgende Klonierungen zugänglich zu machen, wurde unter Verwendung der Olignukleotide PK5exp.for und PK5exp.rev ein 1623 bp großes *LmxPK5*-Fragment amplifiziert und in pCR2.1TOPO kloniert, was zum neuen Plasmid pCR2.1TOPOPK5 führte. Durch die Oligonukleotide wurden zusätzlich Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Eco*RI, *Bg*/II und *Pci*I

stromaufwärts des Startcodons sowie für *Hin*dIII und *Sna*BI hinter dem Stopcodon eingefügt. Über die Schnittstellen *Pci*I und *Hin*dIII erfolgte eine Klonierung in den *E. coli*-Expressionsvektor pGEX-KG, der zuvor mit den Restriktionsendonukleasen *Nco*I und *Hin*dIII linearisiert worden war. Dies ergab das Plasmid pGEX-KGPK5. Zur Expression des PK5-Proteins wurde das Plasmid in *E. coli* BL21 transformiert. Anders als vorher wurden hier zur Expression sofort Standardbedingungen (100 µM IPTG, Expression üN bei 18°C) verwendet, die bisher auch bei allen anderen exprimierten Proteinen zum Erfolg geführt hatten. Die Aufreinigung erfolgte wie bereits beschrieben über den GST-Anteil. Im Eluat nach der Aufreinigung aus 100 ml *E. coli*-Kultur ist im Coomassie-gefärbten SDS-PA-Gel eine Bande der richtigen Größe (84 kD) zu erkennen (Abb. 22). Zusätzlich sind einige kleinere Banden vorhanden, bei denen es sich um Abbauprodukte handeln kann.

PK6: LmxPK6 lag im Phagen-DNA-Insert des Plasmides pBSKPK681X1 vor und wurde unter Verwendung der Oligonukleotide PK6exp.for und PK6exp.rev mittels PCR amplifiziert (2462 bp) und ebenfalls in den pCR2.1TOPO-Vektor zwischenkloniert. Durch die Oligonukleotide wurden hier die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen BamHI, BspHI und EcoRV stromaufwärts und SnaBI stromabwärts eingefügt. Es erfolgte ebenfalls eine Klonierung in den pGEX-KG-Vektor unter Benutzung der Ncol und der HindIII-Schnittstellen. Dabei wurde der Vektor zunächst mit HindIII linearisiert, anschließend mit Klenow-Polymerase aufgefüllt, um ein "stumpfes Ende", welches kompatibel mit SnaBI ist, zu erhalten, und nach Phenol-Chloroform-Extraktion und Fällung mit Ncol geschnitten. Das resultierende Konstrukt wurde als pGEX-KGPK6 bezeichnet. Zur Proteinexpression wurde auch dieses Konstrukt in den Bakterienstamm E. coli BL21 transformiert. Wie bei PK5 wurde auch hier eine "Standardproteinexpression" (s.o.) durchgeführt, aufgrund der geringen erhaltenen Proteinmenge im Eluat allerdings in Kulturvolumina von bis zu 1 l. Die Proteinaufreinigung erfolgte ebenfalls über den GST-Anteil des Proteins. In den Eluaten der Aufreinigung erkennt man im Coomassie-gefärbten SDS-PA-Gel vor allem GST und einige andere Banden. bei denen sich Abbauprodukte es um oder vorzeitige Kettenabbruchprodukte handeln kann. Eine sehr schwache Bande der zu erwartenden Größe (116 kD) ist ebenfalls zu erkennen (Abb. 22).

<u>PK7</u>: Aufgrund der Größe von *LmxPK7* und den zu erwartenden Schwierigkeiten bei dem Versuch der Expression und Aufreinigung eines Vollängenproteins wurde zunächst beschlossen, nur den C-Terminus der Kinase, welcher die Kinase-Domäne umspannt, subzuklonieren und zu exprimieren. Zu diesem Zweck wurde auch hier eine PCR unter Verwendung der Oligonukleotide PK7n.for und PK7c.rev durchgeführt, durch welche stromaufwärts des Startcodons die Schnittstellen für *Nde*l und *Bam*HI und hinter dem

Stopcodon Schnittstellen für *Eco*RV und *Hin*dIII eingefügt wurden. Das 2050 bp große PCR-Produkt wurde wiederum wie oben in pCR2.1TOPO subkloniert und über die *Bam*HI und *Hin*dIII-Schnittstellen in die pQE8- und pASK-IBA7-Expressionsvektoren, die mit den entsprechenden Enzymen linearisiert worden waren, ligiert. Die Proteinexpression wurde in beiden Fällen in dem Bakterienstamm XL1 blue durchgeführt. Es wurde wie oben unter "Standardbedingungen" (His-LmxPK7: 100 µM IPTG, üN, 18°C; Strep-LmxPK7: 0,2 µg/mI AHT, üN, 18°C) in einem Kulturvolumen von 400 ml exprimiert und aufgereinigt. Das Coomassie-gefärbte SDS-PA-Gel der Eluate der beiden Aufreinigungen zeigt, dass beide Aufreinigungen, vor allem aber die von His-LmxPK7 nicht besonders erfolgreich waren (Abb. 22).



Abb. 22: Aufreinigung der neuen putativen MAPKK PK5, 6 und 7 als GST- bzw. Strep-Fusionsproteine. Gezeigt sind jeweils die 1. Eluate einer jeden Aufreinigung auf Coomassie-gefärbten SDS-PA-Gelen. Links: **1:** GST-LmxPK5; **2:** GST-LmxPK6 (12%iges-SDS-PA-Gel); rechts: **1:** His-LmxPK7C-term; **2:** Strep-LmxPK7C-term (8%iges SDS-PA-Gel).

Die Eluate der His-LmxPK7-Aufreinigung enthalten viele Banden, allerdings keine in der richtigen Größe (73 kD), so dass nicht klar ist, ob es sich bei den gefärbten Banden um Abbauprodukte oder Proteine handelt, die unspezifisch an die Cobalt-Sepharose gebunden haben. Im Eluat der Strep-LmxPK7-Aufreinigung erkennt man eine -allerdings sehr schwache- Bande der richtigen Größe, sowie eine Bande um 45 kD, bei der es sich um ein Abbauprodukt handeln könnte.

4.3.2.3 Kinase-Aktivitätstests mit PK 5, 6 und 7 und Aktivatortests in Kombination mit LmxMPK1

Zunächst wurden die rekombinanten Proteine in einem einfachen Kinase-Aktivitätstest mit MBP als Substrat auf Aktivität überprüft. Zu diesem Zweck wurden ca. 2 µg jeder der drei aufgereinigten Kinasen zusammen mit MBP und radioaktiv markiertem ATP in Standard-Kinase-Puffer für 1 h bei 34°C inkubiert. Die Detektion von Kinase-Aktivtät erfolgte wie oben beschrieben mittels Autoradiographie. Abb. 23A zeigt, dass GST-LmxPK5 eine starke Aktivität gegenüber MBP als Substrat aufweist. GST-LmxPK6 hingegen, sowie Strep-LmxPK7C-term zeigen unter den gewählten Bedingungen im Test keinerlei Aktivität. GST-LmxPK5 wurde daraufhin wie schon beschrieben in einem kombinatorischen Aktivitätstest

mit der inaktiven K43M-Mutante von LmxMPK1 als Substrat eingesetzt. Wie Abb. 23B zeigt konnte leider auch hier keine Phosphorylierung von GST-LmxMPK1K43M festgestellt werden.



Abb. 23: A) Kinase-Aktivitätstests mit GST-LmxPK5, GST-LmxPK6 und Strep-LmxPK7 und MBP als Substrat. 1: GST-LmxPK6 + MBP; 2: GST-LmxPK5 + MBP; 3: Strep-LmxPK7C-term + MBP. Links: 1 und 2: Coomassie-gefärbtes SDS-PA-Gel, 3: Silbergefärbtes SDS-PA-Gel, rechts: Autoradiogramm nach 24 h. B) Phosphorylierungstest mit LmxMPK1K43M und LmxPK5. 1: GST-LmxMPK1K43M bzw. LmxMPK1K43M; 2: GST-LmxPK5 + (GST-)LmxMPK1K43M. Links: Coomassie-gefärbtes SDS-PA-Gel, rechts: Autoradiogramm nach 24 h.

4.3.2.4 Konstruktion einer konstitutiv aktivierten Mutante von LmxPK6

Um zu versuchen, LmxPK6 zu aktivieren, wurde wie auch schon zuvor für die beiden L. mexicana-MAPKK LmxMKK und LmxPK2 eine konstitutiv aktivierte Mutante hergestellt. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine in der LmxPK6-Sequenz enthaltene Schnittstelle des Restriktionsenzyms HindIII mittels PCR-Mutagenese unter Zuhilfenahme der Oligonukleotide PK6Pci.for und LmxPK6Nhe.rev sowie PK6Mfe.rev und LmxPK6Nhe.for entfernt und zur Überprüfung des Produktes eine *Nhe*l-Schnittstelle eingefügt. Anschließend wurde auf dem Produkt eine erneute PCR-Mutagenese durchgeführt, dieses Mal mit den Oligonukleotid-Paaren PK6Pci.for und LmxPK6akt.rev sowie PK6Mfe.rev und LmxPK6akt.for. Während dieses Schrittes werden zwischen bp 2494 und bp 2510 Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Hindlll und Acc65I eingefügt. Alle diese Schritte wurden auf Basis eines pCR2.1TOPO-Konstruktes durchgeführt, welches bei dem zweiten Schritt der Mutagenese (PCR mit den Oligonukleotiden PK6Pci.for und PK6Mfe.rev auf den Produkten der ersten beiden PCRs und Subklonierung des Produkts) entstanden war. Nachdem nun das letzte Produkt, pCR2.1TOPOPK6aktFr. HindIII/Acc651 erfolgreich seguenziert worden war, wurde mithilfe der Restriktionsendonukleasen Eagl und Mfel ein 481 bp großes Fragment ausgeschnitten und in pGEX-PK6, der zuvor mit den gleichen Enzymen behandelt worden war, kloniert. Das aus dem pGEX-KGPK6-Vektor entfernte Fragment wurde dabei verworfen. Das entstandene Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und

*Acc*65I linearisiert. Mit dem linearisierten Vektor sowie den beiden Mutagenese-Oligonukleotiden ImmkkMut2.sense und ImmkkMut2.anti, die zuvor durch Erhitzen und langsames Abkühlen aneinander angelagert wurden, wurde nun eine Ligationsreaktion durchgeführt.

Die Proteinexpression und –aufreinigung erfolgte wie unter 4.3.2.2 angegeben. In Abb. 24A ist das erste Eluat der Aufreinigung von GST-LmxPK6Mut2 zu erkennen, welches sich nicht wesentlich von dem GST-LmxPK6-Eluat (s. Abb. 22) unterscheidet. Mit der rekombinanten Kinase wurden ebenfalls die oben beschriebenen Kinase-Aktivitätstests unter Standardbedingungen durchgeführt, zum einen mit MBP als Substrat zum anderen mit GST-LmxMPK1K43M. Wie in Abb. 24B zu erkennen ist, zeigt auch die aktivierte Mutante von LmxPK6 keinerlei Aktivität, weder gegenüber MBP noch gegenüber GST-LmxMPK1K43M.



Abb. 24: Aufreinigung von und Kinase-Aktivitätstests mit GST-LmxPK6Mut2. **A)** 1. Eluat der Aufreinigung von GST-LmxPK6Mut2 aus 500 ml *E. coli*-Kultur. **B)** Aktivitätstests: **1:** GST-LmxPK6Mut2 + MBP; **2:** GST-LmxMPK1K43M; **3:** GST-LmxPK6Mut2 + GST-LmxMPK1K43M. Links: Coomassie-gefärbtes SDS-PA-Gel, rechts: Autoradiogramm nach 48 h Exposition.

4.3.3 Aktivatortest mit zwei anderen Zellzyklus-regulierenden Kinasen

Zusätzlich zu den oben beschrieben putativen MAPKK wurden zwei andere Kinasen auf ihre Fähigkeit überprüft, LmxMPK1 zu aktivieren. Beide Kinasen spielen eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus. Da eine Deletion des LmxMPK1-Gens in *L. mexicana* zu einer Mutante führt, bei der das Fortschreiten des Zellzyklus zumindest im Säugerstadium des Parasiten unterbrochen ist, sollte überprüft werden, ob eine Aktivierung durch am Zellzyklus beteiligte Kinasen möglich ist.

Bei der ersten Kinase handelt es sich um eine sogenannte Polo-Kinase aus *L. mexicana*. Polo-Kinasen sind eine kürzlich beschriebene neue Proteinfamilie, deren Mitglieder an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind. Das hier verwendete Homolog aus *L. mexicana* wurde in unserem Labor wie auch die oben beschriebenen Gene mittels Durchforsten einer gDNA-Phagenbank isoliert und zur Proteinexpression in den Vektor pASKIBA7 subkloniert. Zur Proteinexpression wurde das Konstrukt in *E. coli* BL21 transformiert. Es wurde unter Standardbedingungen in einem Kulturvolumen von 500 ml exprimiert und wie beschrieben aufgereinigt. In Abb. 25 ist das erste Eluat der Aufreinigung zu sehen. Es ist eine schwache Bande in Höhe von Strep-LmxPolo (78 kD) zu erkennen, sowie zwei zusätzliche Banden in Höhe von 65-70 so wie 17-20 kD, bei denen es sich um Abbauprodukte handeln kann.

> kD 174,0 — 83,0 — 62,0 — 47,5 — 32,5 — 25,0 —

Abb. 25: Aufreinigung von Strep-LmxPolo; dargestellt ist das erste Eluat einer Aufreinigung aus einem Kulturvolumen von 500 ml auf einem Coomassie-gefärbten 12%-igen SDS-PA-Gel.

Zusätzlich zu der Polo-Kinase aus *L. mexicana* wurde eine weitere zellzyklusspezifische Kinase aus *L. mexicana*, CRK3 (cdc2 related kinase 3), auf ihre Fähigkeit, LmxMPK1 zu aktivieren, getestet. Bei CRK3 handelt es sich um eine Kinase, die ähnlich zu sogenannten zyklinabhängigen Kinasen (cyclin dependent kinases, cdc) bei höheren Eukaryoten ist und in *L. mexicana* bei der Regulation des Überganges von der G2-Phase zur Mitose eine Rolle spielt (Hassan *et al.*, 2001). Diese Art von Kinasen wirken nur in Zusammenhang mit einem zugehörigen Zyklin, welches an der Aktivierung beteiligt ist. Für den Phosphorylierungstest mit LmxMPK1 wurde uns rekombinante, aktive LmxCRK3 freundlicherweise von Prof. J. Mottram (Glasgow, UK) zur Verfügung gestellt. Abb. 26 stellt die Kinase-Tests mit den beiden putativen Aktivatorkinasen und MBP sowie in Kombination mit LmxMPK1K43M dar. Für LmxPolo wurde außerdem überprüft, ob sie in einem gemeinsamen Ansatz mit LmxMPK1Wt die Substratphosphorylierungsaktivität der MAP Kinase gegenüber MBP verstärken würde.

Zusätzlich wurde getestet, ob LmxCRK3 in der Lage ist, LmxMPK1 Wt zu phosphorylieren, nachdem diese sich zuvor an Tyrosin autophosphoryliert hat. Dazu wurde zunächst die Autophosphorylierungsreaktion mit 5 µg LmxMPK1Wt und nicht-radioaktiv markiertem ATP unter Standardbedingungen für 1 h (Sättigung) durchgeführt und anschließend die Hälfte dieser Reaktion in einen Ansatz mit der LmxCRK3 und radioaktiv markiertem ATP gegeben. Ursprung dieses Versuchs war die Idee, dass es sich bei LmxMPK1 um eine neuartige

Kinase handeln könnte, die durch Autophosphorylierung an Tyrosin und Phosphorylierung an Threonin durch einen Aktivator aktiviert wird. Ein derartiger Mechanismus ist erst kürzlich für die humane Intestinale Zell-Kinase (ICK) beschrieben worden (Fu *et al.*, 2005). Das Ergebnis dieses Tests ist in Abb. 26B dargestellt.



Abb. 26: A) Aktivitätstest mit LmxPolo und LmxMPK1Wt bzw. LmxMPK1K43M. 1: LmxMK1Wt + MBP; 2: LmxPolo + MBP; 3: LmxPolo + LmxMPK1Wt; 4: GST-LmxMPK1K43M; 5: LmxPolo + LmxMPK1K43M. B) Phosphorylierungstest mit LmxCRK3 und an Tyrosin autophosphorylierter LmxMPK1Wt (LmxMPK1Wt(Au)) sowie GST-LmxMPK1K43M. 1: LmxMPK1Wt(Au) + LmxCRK3; 2: LmxMPK1Wt(Au) + MBP; 3: LmxMPK1Wt + MBP; 4: LmxCRK3 + MBP; 5: GST-LmxMPK1K43M; 6: LmxCRK3 + GST-LmxMPK1K43M. Links: Coomassie-gefärbte SDS-PA-Gele (12%); rechts: Autoradiogramme (24 h).

Wie man unschwer erkennen kann, sind sowohl die Polo-Kinase als auch CRK3 aus L. sowohl mexicana sehr aktiv. Die Polo-Kinase weist Autoals auch Substratphosphorylierungsaktivität auf, LmxCRK3 ausschließlich MBP während phosphoryliert und keine Autophosphorylierung zeigt (35,6 kD). Im kombinatorischen Test mit der inaktiven LmxMPK1K43M zeigt sich allerdings leider, dass weder die eine noch die andere Kinase die inaktive Mutante von LmxMPK1 phosphoryliert. LmxPolo ist darüber hinaus nicht in der Lage, die Aktivität von LmxMPK1Wt zu verstärken, stattdessen wird durch die gemeinsame Inkubation die Autophosphorylierung von LmxPolo vermindert.

Interessanterweise ist LmxMPK1Wt trotz der vorher bis zur Sättigung durchgeführten Autophosphorylierung in der Lage, sich noch weiter (vermutlich an Tyrosin) zu phosphorylieren, an der stärkeren Autophosphorylierung der Kinase ohne vorherige Absättigung (Abb. 25B, Spur 3) sieht man aber, dass zumindest ein Teil des Tyrosins schon durch das nicht-radioaktiv markierte ATP belegt worden sein muss. Im Zusammenhang mit LmxCRK3 zeigt sich keine weitere Verstärkung der Phosphorylierung von LmxMPK1Wt(Au).

4.4 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1

In den höheren Eukaryoten sind bereits vielfältige Substrate von MAP-Kinasen bekannt. So phosphorylieren sie z.B. Transkriptionsfaktoren und sind somit in der Lage direkten Einfluss auf die Regulation der Genexpression in diesen Organismen zu nehmen. Solch typische Substrate wie Transkriptionsfaktoren konnten bisher in Trypanosomatiden nicht identifiziert werden, ebenso konnte bisher nur ein funktioneller RNA-Polymerase II-Promotor identifiziert werden (Saito *et al.*, 1994), der aber nur der Transkription der SL (Spliced leader)-DNA dient, die bei der Prozessierung der mRNAs beteiligt ist. Darüber hinaus wird bei diesen Organismen die Genexpression nicht auf der Transkriptionsebene reguliert. In Leishmanien entstehen bei der Transkription lange polycistronische mRNAs, die dann über den einzigartigen Mechanismus des Trans-Spleißens in ihre endgültige Form umgewandelt werden (Ullu *et al.*, 1993; Matthews *et al.*, 1994; Clayton, 2002). Regulationsmechanismen finden daher wahrscheinlich eher auf dieser oder der Translationsebene statt. Es ist also möglich, dass die Substrate von MAP-Kinasen in Leishmanien neue, bisher unbekannte genregulatorische Moleküle darstellen, die insofern natürlich auch als potentielle Zielstrukturen für die medikamentöse Therapie interessant sind.

Auf der Suche nach Substraten von LmxMPK1 wurden verschiedenste bereits von anderen Gruppen etablierte, aber auch relativ neue Methoden mit unterschiedlichem Erfolg getestet und eingesetzt. So wurden zum Beispiel λ -ZAP cDNA-Expressionsbibliotheken von *L. mexicana* Pro- und Amastigoten mit rekombinanter LmxMPK1 im radioaktiven Aktivitätstest durchsucht, um Phagenplaques zu identifizieren, in denen ein potentielles Substrat der Kinase exprimiert wird (nach Fukunaga und Hunter, 1997). Es wurden Leishmanien-Lysate hergestellt und ebenfalls im radioaktiven Aktivitätstest mit rekombinanter LmxMPK1 eingesetzt, um dann im Autoradiogramm Banden zu identifizieren, die durch die Kinase phosphoryliert wurden (nach Knebel *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Aktivitätstests sowie zum Zweck eines Vergleichs des Phosphorylierungsstatus von *L. mexicana*-Wt und Deletionsmutante wurde mit ProQ-Diamond (Invitrogen, Karlsruhe) außerdem eine phosphospezifische Färbemethode sowie zwei phosphospezifische Antikörpersets (anti-Phospho-Threonin von Calbiochem, Merck, Darmstadt) verwendet.

Zusätzlich wurde auch versucht über Coomassie-gefärbte 2D-SDS-PA-Gele Unterschiede im Expressionsprofil zwischen Wt und Deletionsmutante in Pro- und in Amastigoten sowie in verschiedenen Stadien der Differenzierung auszumachen. Eine weitere vergleichende Methode stellt die Aufreinigung der phosphorylierten Proteine aus L. mexicana Wt und Deletionsmutante (Pro- und Amastigote) mithilfe des Phosphoprotein Purification Kit® (Qiagen, Hilden) dar. Die erhaltenen Eluate können anschließend auf das Fehlen bestimmter Banden bei der Deletionsmutante untersucht werden. Zwei indirekte Methoden, die zur Substratsuche durchgeführt wurden, sind die Anwendung des PREDIKIN-Servers (Brinkworth et al., 2003) sowie das Durchsuchen eines Peptidchips, der Peptide enthält, die Phosphorylierungsstellen bekannter MAP-Kinase-Substrate umfassen (Hayashi et al., 2005). Diese Methoden werden als indirekt bezeichnet, da hier nicht direkt (z.B. in Lysaten) nach Leishmania-spezifischen wird. Substraten gesucht sondern vielmehr eine Konsensussequenz für Phosphorylierungsstellen potentieller Substrate von LmxMPK1 erstellt wird. Mithilfe dieser Sequenz kann dann in silico eine L. major oder L. infantum-Datenbank durchsucht und so putative Substratproteine identifiziert werden, die natürlich anschließend noch verifiziert werden müssen.

4.4.1 In silico-Substratsuche mithilfe des PREDIKIN-Servers

Bei PREDIKIN handelt es sich um ein Programm, welches entworfen wurde, um anhand der Primärsequenz der katalytischen Domäne einer Kinase Vorhersagen bezüglich der Zusammensetzung der Phosphorylierungsstellen von potentiellen Substraten dieser Kinase zu machen (Brinkworth *et al.*, 2003). In dieses Programm wurde die Primärsequenz von LmxMPK1 eingegeben und daraufhin folgende Konsensussequenz einer Phosphorylierungsstelle eines möglichen Substrates erhalten: X-[PVALS]-X-[ST]-P-[PFLI]-[RKQSL].

Mithilfe dieser Konsensussequenz wurde eine *L. major*-Datenbanksuche unter <u>http://www.genedb.org/genedb/leish/blast.jsp</u> durchgeführt, die zu einer Reihe interessanter möglicher Substratproteine führte. Eine Auswahl der Kandidaten ist in Tab. 4 dargestellt.

Tab.	4:	Beispiele	für	mögliche	Substratproteine	von	LmxMPK1,	ermittelt	mithilfe	der	PREDIKIN-
Kons	ens	ussequen	z								

Protein	mögliche Phosphorylierungsstelle
Transkriptionsinitiationsfaktor IID	NVCSPIR
Replikationsprotein A Untereinheit 1	DSLTPFL
putatives RNA-Bindeprotein	ELSSPIK
Poly A-Bindeprotein 1	VPETPPL
MEKK Kinase (MAPKKK)	GPFSPLL

Von den erhaltenen möglichen Substraten wurde eines zur näheren Überprüfung ausgewählt. Bei dem Protein LmjF19.1390 handelt es sich um ein Transkriptionsinitiationsfaktor IID-ähnliches Protein. Das zugehörige Gen hat eine Länge von 882 bp, das daraus resultierende Protein besitzt 293 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 31,1 kDa.

4.4.1.1 Klonierungen sowie Expression und Aufreinigungen von LmxTFIID

Um zu testen, ob es sich bei LmxTFIID tatsächlich um ein Substrat von LmxMPK1 handelt, sollte ein in vitro-Phosphorylierungstest mit rekombinantem LmxTFIID und LmxMPK1 durchgeführt werden. Zu diesem Zweck musste zunächst LmxTFIID isoliert und in E. coli-Expressionsvektoren umkloniert werden. Um LmxTFIID für Klonierungen zugänglich zu machen wurde eine PCR auf genomischer DNA von L. mexicana unter Verwendung der Oligonukleotide TFII 1.for und TFII 1.rev durchgeführt und das entstandene Produkt in den pCR2.1TOPO-Vektor ligiert. Es wurde ein 885 bp großes Fragment, welches den ORF von LmxTFIID umspannt, über die Restriktionsschnittstellen BamHI und HindIII in den E. coli-Expressionsvektor pGEX-KG, der mit den gleichen Restriktionsendonukleasen linearisiert worden war, ligiert. Das resultierende Konstrukt trägt die Bezeichnung pGEX-KGTFIIDKI. 5. Zur Proteinexpression von LmxTFIID wurde das Expressionskonstrukt in E. coli BL21 transformiert und eine Proteinexpression in 100 ml LB-Medium durchgeführt. Es wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,9 mit 100 µM IPTG induziert und anschließend bei 18°C üN unter Schütteln exprimiert. Nach der anschließend erfolgten Aufreinigung über Glutathion Uniflow Resin sind im Eluat neben einer deutlichen Bande der erwarteten Größe (57 kD) mehrere Banden zu erkennen, bei denen es sich um Abbauprodukte handeln kann (Abb. 27).



Abb. 27: Proteinaufreinigung vom GST-LmxTFIID aus *E. coli.* Dargestellt ist das erste Eluat einer Aufreinigung aus 100 ml Kultur auf einem Coomassie-gefärbten 12%-igen SDS-PA-Gel.

4.4.1.2 Phosphorylierungstest mit rekombinantem GST-TFIID und LmxMPK1

Um nun zu überprüfen, ob TFIID tatsächlich von LmxMPK1 phosphoryliert wird, wurde ein Kinase-Test mit rekombinanter 6xHis-LmxMPK1 und dem rekombinanten GST-TFIID durchgefürt. Zu diesem Zweck wurden je 2 µg der beiden Proteine gemeinsam in einen

Ansatz mit radioaktiv markiertem [γ³²-P]ATP eingesetzt. Als Kontrollen dienten die Kinase sowie GST-LmxTFIID allein. Wie man in Abb. 28 sehen kann, zeigt sich auch ohne LmxMPK1 eine leichte Phosphorylierung von GST-LmxTFIID, die allerdings von LmxMPK1 tatsächlich verstärkt wird. Leider ist die Phosphorylierung von GST-LmxTFIID durch LmxMPK1 nicht so stark wie z.B. die des "künstlichen" Substrates MBP, so dass nicht eindeutig festgestellt werden kann, ob es sich bei LmxTFIID um ein "echtes" Substrat von LmxMPK1 handelt.



Abb. 28: Phosphorylierungstest mit LmxMPK1Wt und GST-LmxTFIID. **1:** LmxMPK1Wt; **2:** GST-LmxTFIID; **3:** LmxMPK1Wt + GST-LmxTFIID. Links: Coomassie-gefärbtes 12%-iges SDS-PA-Gel; rechts: Autoradiogramm, 24 h Exposition.

4.4.2 Substratsuche mithilfe eines Peptid-Mikrochips

Eine weitere Methode, die zur Substratsuche von LmxMPK1 angewandt wurde war der Einsatz eines Peptid-Mikrochips (Pepscan, Lelystad; Niederlande). Dieser trägt Peptide, die Phosphorylierungsstellen bekannter Kinase-Substrate darstellen. Führt man nun auf dem Chip einen Aktivitätstest mit rekombinanter Kinase und radioaktiv markiertem ATP und eine anschließende Autoradiographie durch, so wird die Kinase bestimmte Peptide präferentiell phosphorylieren, die dann als Punkte auf dem Autoradiogramm erscheinen. Aus den Sequenzen der zugehörigen Peptide lässt sich dann ein Konsensus erstellen, mit dem eine Datenbanksuche nach passenden Substratproteinen durchgeführt werden kann.

Dieser Versuch wurde, vor allem zur Etablierung der Reaktionsbedingungen, zweimal mit einem sogenannten "Trial Chip", der insgesamt 192 Peptide im Duplikat enthält, durchgeführt. Anschließend wurde die Kinase-Reaktion auf den sogenannten "Full slide" angewendet (Abb. 29).



Abb. 29: Autoradiogramm des "Full slide"-Peptidchips, 48 h Exposition. Die 24 Felder auf der linken Seite sind ein Duplikat der 24 Felder auf der rechten Seite.

Die Auswertung der phosphorylierten Peptide erfolgte in Ermangelung einer entsprechenden Software durch Jos Joore von der Firma Pepscan. Anhand der am stärksten phosphorylierten Peptide wurde der in Abb. 30 dargestellte Konsensus erstellt, mit dem anschließend eine Datenbanksuche unter <u>http://www.genedb.org/genedb/leish/blast.jsp</u> durchgeführt wurde. Ein konserviertes, hypothetisches Protein, welches die höchste Übereinstimmung mit dem Konsensus aufwies, LmjF32.3350, wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt. Im folgenden wird dieses Gen als LmxUP für "unknown protein" bezeichnet.

K	K	R	А	I	S	Ρ	R	А	А
	R	К			Т	V	А	К	
						R			

Abb. 30: Mögliche Konsensussequenzen für Phosphorylierungsstellen putativer Substrate von LmxMPK1.

4.4.2.1 Eigenschaften von LmxUP und Homologien zu anderen Proteinen

Bei LmxUP handelt es sich um ein 3951 bp langes Gen, welches für ein unbekanntes, 1317 As umspannendes Protein mit einem Molekulargewicht von 142,3 kD codiert. Das Homologe Protein aus L. major stimmt ebenso wie ein Homologes aus L. infantum in seiner Aminosäuresequenz zu 83 % mit LmxUP überein. Eine Suche in den T. brucei- und T. cruzi-Datenbanken ergibt keine signifikante Sequenzhomologie über die gesamte Sequenz, Τ. allerdings existieren in cruzi zwei sogenannte Orthologe. die Proteine Tc00.1047053503839.19 und Tc00.1047053507089.220, die über bestimmte Sequenzbereiche Gemeinsamkeiten mit LmxUP aufweisen, aber ein viel geringeres Molekulargewicht (91,1 kD statt 142,3 kD) besitzen. Ein Vergleich der Sequenzen zeigt an, dass hier -wie auch bei LmxPK7- möglicherweise Insertionen stattgefunden haben.
Eine Datenbanksuche mit der Proteinsequenz in der NCBI-Datenbank ergibt keine weiteren homologen Proteine in anderen Organismen. Als nächste Verwandte werden hier das Homolog aus *L. major* sowie die beiden Orthologen aus *T. cruzi* angegeben. Einzige Gemeinsamkeit zu Proteinen aus anderen Organismen ist das einzige strukturelle Merkmal von LmxUP: Wie auch die beiden Orthologen aus *T. cruzi* weist es eine sogenannte "B-Box-Zinkfingerdomäne" auf (As 761-803), die z. B. auch in Transkriptionsfaktoren oder DNA-modifizierenden Proteinen vorkommt und über die die Proteine mit Nukleinsäuren interagieren können. Eine Untersuchung der Aminosäuresequenz von LmxUP ergibt mit einer Wahrscheinlichkeit von 62,5 % eine nukleäre Lokalisation. Dies ergänzt die Vermutung, dass es sich um ein DNA-Interaktionsprotein handeln könnte. Ohne weitere Untersuchungen lässt sich aber keine Aussage über die Funktion von LmxUP treffen.

4.4.2.2 Isolierung des LmxUP-Gens aus einer *L. mexicana-* gDNA-Phagenbank und weitere Klonierungsschritte

Unter Verwendung der Oligonukleotide UP1.for und UP1.rev, die eine in Trypanosomatiden konservierte Region von *LmxUP* umspannen, wurde mittels PCR eine Digoxigenin-markierte Sonde hergestellt. Mit dieser wurde dann eine *L. mexicana* gDNA-Phagenbank durchsucht. Es konnten positive Phagenklone isoliert und die DNA aufgereinigt werden. Nach präparativen Spaltungen mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI, *Not*I und *Xba*I und Ligation in den pBlueskript II (-)-Vektor konnte ein positiver Klon erhalten und sequenziert werden. Er enthält ein Insert, welches größer als 10 kb ist, auf dem der komplette ORF von *LmxUP* vorhanden ist. Das Plasmid trägt die Bezeichnung pBSKUP1.3.

Um das Gen für weitere Klonierungssschritte zugänglich zu machen, wurde auf dem o. g. Plasmid eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden UP1*Bam*HI/*Nco*I.for und UP1*Hin*dIII.rev durchgeführt und das Produkt in pCR2.1TOPO ligiert. Es wurde erneut sequenziert, um auszuschließen, dass bei der PCR Fehler eingebaut wurden. Anschließend wurde aus dem Vektor pCR2.1TOPOUP ein 3935 bp großes Fragment mithilfe der Restriktionsendonukleasen *Nco*I und *Hin*dIII ausgeschnitten und in pGEX-KG, der mit den gleichen Enzymen behandelt worden war, ligiert. Das resultierende Plasmid trägt die Bezeichnung pGEX-KGUPKI.5.

4.4.2.3 Expression in *E. coli* und Aufreinigung von GST-UP

Um in einem Kinase-Test zu überprüfen, ob es sich bei LmxUP tatsächlich um ein Substrat von LmxMPK1 handelt, wurde versucht, das Protein rekombinant in *E. coli* zu exprimieren und aufzureinigen. Zu diesem Zweck wurde das Plasmid pGEX-KGUPKI.5 in *E. coli* BL21 transformiert und wie oben eine Testexpression durchgeführt, um die optimalen Induktionsbedingungen zu ermitteln. Bei Induktion mit 250 µM IPTG und Expression bei 18°C üN konnte eine Bande in der richtigen Größe festgestellt werden, woraufhin eine

Expression und Aufreinigung von GST-LmxUP aus 500 ml *E. coli*-Kultur erfolgte. Im Eluat konnte eine Bande identifiziert werden, deren Größe in etwa der von rekombinantem GST-UP entspricht (168,3 kD). Leider konnte nur sehr wenig Protein erhalten werden, zudem waren im Eluat zahlreiche andere Banden in größeren Mengen zu erkennen, bei denen es sich evtl. um Abbauprodukte oder die Produkte eines frühzeitigen Kettenabbruchs bei der Proteinsynthese handeln könnte (Abb. 31).



Abb. 31: Aufreinigung von GST-LmxUP aus 500 ml *E. coli*-Kultur. Dargestellt ist das 1. Eluat auf einem Coomassie-gefärbten 12%-igen SDS-PA-Gel.

4.4.2.4 Phosphorylierungstest von LmxMPK1 mit GST-LmxUP

Um zu überprüfen, ob es sich bei LmxUP tatsächlich um ein Substrat von LmxMPK1 handelt, wurde ein Phosphorylierungstest mit 2 µg LmxMPK1, der maximalen Menge (25 µl auf 50 µl Reaktionsvolumen; eine aussagekräftige Proteinmengenbestimmung war aufgrund der vielen kontaminierenden/ Abbau-Banden nicht möglich) rekombinantem GST-UP und radioaktiv markiertem ATP durchgeführt.

In Abb. 32 erkennt man ein ähnliches Ergebnis wie auch schon bei LmxTFIID. GST-LmxUP allein zeigt hier kaum Phosphorylierungsaktivität, nur eine sehr schwache Bande ist zu erkennen, die allerdings nicht auf der Höhe von GST-LmxUP läuft. In Spur 2 (LmxMPK1Wt) sieht man neben der Autophosphorylierung von LmxMPK1Wt auch wieder zwei kontaminierende Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 62 kD, die leicht phosphoryliert werden (grüner Pfeil; siehe auch Abb. 10). Befinden sich die Kinase und GST-LmxUP im Ansatz (Spur 1), sieht man eine deutliche Verstärkung der Bande aus Spur 3, sowie einige andere phosphorylierte Banden, bei denen es sich wahrscheinlich ebenfalls um Abbauprodukte von GST-LmxUP handelt. Allerdings ist diese Phosphorylierung nicht besonders stark, z. B. im Vergleich mit dem künstlichen Substrat MBP und wird außerdem von der kontaminierenden Bande aus Spur 2 überlagert.

Trotzdem sollte überprüft werden, ob es sich bei dem zugehörigen Protein um ein Kettenabbruchprodukt von GST-UP handelt. Dazu wurde eine massenspektrometrische Analyse der Bande durchgeführt, die allerdings ohne Ergebnis blieb.

Somit lässt sich auch hier nicht eindeutig sagen, ob es sich bei LmxUP um ein *in vitro* - Substrat von LmxMPK1 handelt.



Abb. 32: Phosphorylierungstest mit LmxMPK1Wt und GST-LmxUP. **1:** LmxMPK1Wt + GST-LmxUP; **2:** LmxMPK1Wt (Pfeil = kontaminierende Proteine); **3:** GST-LmxUP. Links: Coomassie-gefärbtes 8%iges SDS-PA-Gel; rechts: Autoradiogramm, 30 h Exposition.

4.4.3 Phosphorylierung von Leishmanien-Lysaten mit rekombinanter LmxMPK1

Eine direkte Methode, die zur Identifikation von Substraten von LmxMPK1 angewandt wurde, war eine Phosphorylierung von Leishmanien-Lysaten mit der rekombinanten Kinase und Dazu wurden Lysate aus 2x10⁹ Wt-Promastigoten radioaktiv markiertem ATP. (spätlogarithmische Wachstumsphase) bzw. aus 4x10⁹ Wt-Amastigoten, die zuvor über 3 differenziert worden waren, hergestellt in vitro und anschließend Tage die Phosphorylierungsreaktionen durchgeführt. Die Proben wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und ein Autoradiogramm der Coomassie-gefärbten und getrockneten Gele erstellt. Es wurde immer jeweils ein Lysat, welches mit LmxMPK1Wt inkubiert worden war, mit einem allein inkubierten Lysat verglichen, um autophosphorylierende Proteine im Lysat von den von LmxMPK1Wt phosphorylierten unterscheiden zu können. Zunächst wurden die Versuche mit einfach präparierten Lysaten (Zentrifugationsüberstände ohne weitere Vorbehandlung) durchgeführt. Dabei stellte sich jedoch schnell heraus, dass durch das in den Lysaten vorhandene intrazelluläre ATP der Einbau an radioaktiv markiertem ATP zu gering war (nicht gezeigt). Daher wurden im Folgenden die Lysate vor der Inkubation mit dem radioaktiv markierten ATP wie von Knebel et al. (2001) beschrieben mithilfe einer Sephadex G-25-Säule (GE Healthcare) von Salzen und intrazellulärem ATP befreit. Darüber hinaus wurden Versuche durchgeführt, Hitzeinaktivierung die mittels

Autophosphorylierungsaktivität in den Lysaten auszuschalten. Dazu wurden die Lysate vor der Inkubation mit LmxMPK1Wt bei 45 bzw. bei 60°C für 10 min inkubiert. Eine derartige Vorbehandlung führte allerdings nur dazu, dass auch in den kombinatorischen Ansätzen mit LmxMPK1 kaum noch Proteine phosphoryliert wurden, daher wurden weitere Tests nur mit den nativen, entsalzten Lysaten durchgeführt.

In Abb. 33 ist ein Beispiel eines solchen Versuchs dargestellt. Dabei wurden die Inkubationen zusätzlich wie bei Knebel et al. (2001) beschrieben jeweils mit unterschiedlichen Mengen ATP mit unterschiedlicher spezifischer Radioaktivität durchgeführt. Geringe Mengen (20 nm) an radioaktivem ATP mit einer hohen spezifischen Aktivität (3x10⁶ cpm/pmol) sollten dabei zu besseren Ergebnissen führen als große Mengen ATP (100 µM) mit geringer spezifischer Aktivität (1000 cpm/pmol). Links sind die Promastigoten-Lysate aufgetragen, rechts die Amastigoten-Lysate.



Abb. 33: Phosphorylierungsversuch mit entsalzten Pro- und Amastigoten-Lysaten und rekombinanter LmxMPK1Wt. Die Versuche wurden mit jeweils unterschiedlichen ATP-Mengen unterschiedlicher spezifischer Radioaktivität durchgeführt. Oben: Coomassie-gefärbtes 8%-iges SDS-PA-Gel; Mitte und unten: Autoradiogramme, Expositionszeit: 7 h (Mitte) und 24 h (unten).

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Inkubation mit dem ATP höherer spezifischer Radioaktivität zu einem größeren Einbau radioaktiven Phosphats in die LeishmanienProteine geführt hat. Dabei sind die Promastigoten-Proteine deutlich stärker phosphoryliert als die Amastigoten-Proteine, die allerdings auch in etwas geringerer Menge vorliegen. Außerdem ist LmxMPK1Wt in den jeweiligen Spuren gut an ihrer eigenen Autophosphorylierung zu erkennen. Leider sind allerdings die phosphorylierten Proteine in so großer Menge vorhanden, dass sie auf dem SDS-PA-Gel wahrscheinlich teilweise übereinander laufen, weshalb aus dem Gel bzw. Film kaum noch einzelne Banden detektierbar sind. Es sind einige Bereiche zu erkennen, die in den Proben, vor allen den Amastigoten-Lysaten, mit LmxMPK1Wt stärker radioaktiv erscheinen, als in den zugehörigen Spuren ohne die Kinase. Dabei muss berücksichtigt werden, dass auch ein Ansatz mit LmxMPK1Wt allein einige zusätzliche Banden erzeugt (siehe z.B. Abb. 32), so dass nicht klar ist, ob es sich bei zusätzlichen phosphorylierten Bereichen wirklich um Leishmanien-Proteine oder nur um Kontaminationen aus der LmxMPK1Wt-Aufreinigung handelt. Grundsätzlich stellte sich bei diesem Versuch das Problem der schlechten Auflösung phosphorylierten Β. der Proben. Daher war eine weitere. z. massenspektrometrische, Analyse nicht möglich.

4.4.4 Analyse der Phosphoproteine aus *L. mexicana* Wt und ∆LmxMPK1 -/- (Pro- und Amastigote)

Die zweite direkte Methode, die zur Identifikation von LmxMPK1-Substraten eingesetzt wurde und hier näher dargestellt werden soll, ist die Aufreinigung von Phosphoproteinen aus *L. mexicana*-Lysaten von Wildtyp und LmxMPK1-Deletionsmutante mithilfe des Phosphoprotein Purification Kit[®] (Qiagen, Hilden). Dabei ist die zugrunde liegende Idee die, dass Substrate von LmxMPK1 in der Deletionsmutante nicht mehr phosphoryliert werden und daher in einer Aufreinigung aller Phosphoproteine ausschließlich von LmxMPK1 phosphoryliert ist natürlich, dass diese Proteine ausschließlich von LmxMPK1 phosphoryliert werden. Vergleicht man nun die aufgereinigten Phosphoproteine aus Wildtyp und Deletionsmutante, sollten im Wildtyp eine oder mehrere Banden auftreten, die in der Aufreinigung der Deletionsmutante nicht vorliegen. Diese Banden könnten dann möglicherweise massenspektrometrisch untersucht und die zugehörigen Proteine identifiziert werden.

Zu diesem Zweck wurden nach Herstellerangaben (Qiagen) Lysate aus 2x10⁹ Promastigoten (spätlogarithmische Wachstumsphase) bzw. 4x10⁹ Amastigoten (nach drei Tagen *in vitro*-Differenzierung) hergestellt und wie angegeben aufgereinigt. Der Proteingehalt der erhaltenen fünf Eluate der Phosphoaufreinigungssäule wurde mittels Bradford-Test bestimmt, dabei wiesen die Eluate 3 und 4 die höchsten Proteinmengen auf. Nun wurden die Eluate nebeneinander (Wt und Deletion) auf einem SDS-PA-Gel aufgetrennt und mit einer für die Massenspektrometrie geeigneten Silberfärbung angefärbt. In Abb. 34 sind einige

schwache Banden zu erkennen, die im Wt vorliegen, in den Aufreinigungen der Deletionsmutante jedoch nicht.



Abb. 34: Aufreinigung der Phosphoproteine aus *L. mexicana* Wt und ΔLmxMPK1-/- (Pro- und Amastigote). Links: Promastigote. **1:** Wt Eluat 3 (E3); **2:** ΔLmxMPK1-/- E3; rechts: Amastigote. **1:** E2 Wt, **2:** ΔLmxMPK1-/- E2; **3:** Wt E3; **4:** ΔLmxMPK1-/- E3; **5:** Wt E4; **6:** ΔLmxMPK1-/- E4. Die grünen Pfeile weisen auf Bereiche hin, die massenspektrometrisch untersucht wurden. Silbergefärbte 8%-iges SDS-PA-Gele.

Leider ist in diesem silbergefärbten Gel vor allem in den Promastigoten-Eluaten der Bereich unterhalb 80 kD aufgrund der Stärke der Färbung kaum noch auswertbar, hier laufen wahrscheinlich auch viele Proteine übereinander. Die beobachteten unterschiedlich vorhandenen Banden wurden mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Leider konnten nur wenige Peptide detektiert werden, was wohl vor allem an den äußerst geringen Proteinmengen sowie der großen Gesamtproteinmenge liegt (mehrere Banden könnten sich überlagert haben). In Tabelle 5 sind die erhaltenen Peptide so wie die möglichen zugehörigen Proteine dargestellt.

Die den Peptiden zugeordneten Proteine entsprachen leider alle in Bezug auf ihr Molekulargewicht nicht den jeweiligen Banden im SDS-PA-Gel, so dass keine klare Aussage möglich ist, um welche Proteine es sich hier wirklich handelt. **Tab. 5:** Massenspektrometrische Analyse einiger Unterschiede im Phosphoproteom von *L. mexicana* Wt und ΔLmxMPK1-/- in Pro- und Amastigoten.

Peptide	mögliches entsprechendes Protein
TPSSPHSLLGLRVPNPLR	LmjF34.0100
QVRAAAAELSRPSSPTSSAR	Hypothetisches Protein, unbekannte Funktion
INAHYEDSIRAYYVFQK	
LVAIRNALFPPLSTEELVR	
LKDLESIVTTLGSVAK	LmjF36.0400
SQTPKCTSPLPLHLHVSR	Hypothetisches Protein, unbekannte Funktion
SASAKGRPSSPPPASPGPPAQR	
GDGGEFGAAATGAGSAHATSSTGPASRTDR	
TVHLPGVYVHR	LmjF30.1930
KIITSYVGENSVLSDR	Succinyl-CoA:3-Ketoazid-Koenzym A-
AAGAGLPAFYTPTGYGTAVAEGR	Transferase-ähnliches Protein
VPLTGTGVVDLLITELCTFR	
GTKQLTLIAGTTSGPENGTGPLAR	
AAGAGLPAFYTPTGYGTAVAEGRLPVR	
LRAAGAGLPAFYTPTGYGTAVAEGR	
GGINEMWLSELSEGVTLEEVRAK	
QTVTMSKSGASLFDSAESFSMIR	

4.5 Herstellung und Test einer inhibitorsensitiven Mutante von LmxMPK1

Deletionsmutanten stellen in der Molekularbiologie eine gute Möglichkeit dar, die Funktionen eines bestimmten Proteins in einer Zelle zu untersuchen. Ein Problem bei dieser Art von Studien ist jedoch, dass es durch den kompletten Wegfall eines bestimmten Gens und die oftmals lange Kulturdauer bis zum Erhalt einer Deletionsmutante und auch danach bei Genen, die für den jeweiligen Organismus eine wichtige Rolle spielen, zu "Ausweicherscheinungen", d.h. Mutationen kommen kann.

Der Organismus versucht so, das Fehlen eines bestimmten Gens auszugleichen; man spricht in diesem Fall auch von "Kompensation". Um diese Problematik zu umgehen, ist es vonnöten ein kurzfristig induzierbares System zu haben, in dem man durch einen bestimmten Stimulus die Expression eines Gens oder Aktivität eines bestimmten Proteins unterdrücken bzw. ausschalten kann. In *T. brucei* und *T. cruzi* gibt es z. B. die sehr erfolgreich eingesetzte Methode der sogenannten RNA-Interferenz. Dabei werden Konstrukte in die Zellen transfiziert, die auf einen bestimmten Stimulus hin einsträngige RNAs produzieren, die die endogenen Ziel-mRNAs komplementieren und damit deren Translation verhindern.

So kann man in den Trypanosomen z. B. relativ einfach Rückschlüsse auf die Funktionen bestimmter Gene ziehen. Bei Leishmanien konnte diese Methode leider aufgrund des Fehlens der nötigen endogenen zellulären Komponenten bisher nicht erfolgreich eingesetzt werden (Robinson und Beverley, 2003). Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit ein System etabliert werden, welches die gezielte Ausschaltung der Aktivität bestimmter MAP-Kinasen in *L. mexicana* durch Inhibitoren *in situ* ermöglichen sollte. Um dies zu erreichen, wurde eine inhibitorsensitive Mutante von LmxMPK1 erstellt. Zu diesem Zweck wird eine Aminosäure (F93 \rightarrow G) in der katalytischen Tasche der Kinase mutiert, um so eine Strukturveränderung zu schaffen, die auf der einen Seite die Aktivität der Kinase nicht beeinflusst, und gleichzeitig eine spezifische Blockierung des aktiven Zentrums der zu untersuchenden Kinase ermöglicht (Bishop *et al.,* 2001; Abb. 35).

Die Inhibitoren 1-NA (1-Naphthyl-pyrazolo(3,4 *d*)pyrimidine) sowie 1- und 2-NM (1-/2-Naphthylmethylpyrazolo(3,4*d*)pyrimidine) wurden uns freundlicherweise von Prof. Kavita Shah (Purdue University, Department of Chemistry, West Lafayette, USA) zur Verfügung gestellt.



Abb. 35: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips einer inhibitorsensitiven Kinase.

4.5.1 Klonierungen zur Herstellung einer inhibitorsensitiven Mutante

Zunächst wurde der Vektor pBSK(+) mit *Ngo*MIV verdaut, Nuclease-behandelt und religiert, um die *Ngo*MIV-Schnittstelle zu entfernen. Nun wurde aus dem Vektor pX5Impk mithilfe der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Acc*65I ein 1143 bp großes Fragment ausgeschnitten, welches den ORF von LmxMPK1 umspannte und anschließend in den mit den gleichen Enzymen linearisierten pBSK(+)(-*Ngo*MIV)-Vektor ligiert. Auf diesem Konstrukt wurden nun zwei PCRs durchgeführt, zum einen mit dem Oligonukleotid-Paar F93G.for und *Sca*I-Primer.rev und zum anderen mit dem Paar F93G.rev und *Sca*I-Primer.for, wobei die F93G-Oligonukleotide jeweils die einzufügende Mutation tragen. Die resultierenden Fragmente wurden Phenol-Chloroform-extrahiert, gefällt und anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *Bgl*II und *Sca*I gespalten. Im Anschluss an die Spaltung wurde eine Gelextraktion durchgeführt und die beiden Fragmente ligiert, was zu dem Konstrukt pBSK(+)ImpkF93G führte. Aus diesem wurde nun der LmxMPK1-ORF mithilfe der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Acc*65I wieder ausgeschnitten und zurück in den pX5-Vektor (s. o.) ligiert. Mithilfe der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Acc*65I wieder ausgeschnitten und *Sac*II wurde dann ein 738 bp großes Fragment aus dem pBSK(+)ImpkF93G-Konstrukt isoliert und in den Vektor pGEX-KGImpk, der mit den selben Enzymen behandelt und isoliert worden war, ligiert, was in dem Konstrukt pGEX-KGImpkF93G resultierte.

4.5.2 Expression und Aufreinigung der rekombinanten Enzyme und Aktivitätstests mit Inhibitoren

4.5.2.1 Expression und Aufreinigung von LmxMPK1Wt und LmxMPK1F93G als GST-Fusionsproteine

Zur Expression der rekombinanten Enzyme LmxMPK1Wt und LmxMPK1F93G als GST-Fusionsproteine wurden 100 ml *E. coli*-Kulturen einer OD₆₀₀ von 0,9 mit 50 μ M IPTG induziert und üN bei 18°C schütteln gelassen. Die Aufreinigung erfolgte wie beschrieben über Glutathion Uniflow Resin[®], die rekombinanten Proteine wurden auf Coomassiegefärbten SDS-Gelen sichtbar gemacht (Abb. 36). Man erkennt in beiden Fällen deutlich eine Bande der erwarteten Größe (ca. 67 kD).



Abb. 36: Aufreinigung von GST-LmxMPK1Wt und GST-LmxMPK1F93G. **1:** GST-LmxMPK1Wt; **2:** GST-LmxMPK1F93G. Gezeigt sind jeweils die ersten Eluate einer Aufreinigung aus 100 ml *E. coli*-Kultur im Coomassie-gefärbten 12%-igen SDS-Gel.

4.5.2.2 Aktivitätstest mit GST-LmxMPK1Wt und GST-LmxMPK1F93G mit und ohne Inhibitoren

Um zu testen, ob das rekombinante mutierte Protein in seiner Substrat- und Autophosphorylierungsaktivität auf die zu testenden Inhibitoren reagiert und um den am besten geeigneten Inhibitor sowie seine optimale Konzentration zu ermitteln, wurden Kinase-Aktivitätstests mit Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Außerdem war es für die Funktionalität des Systems wichtig, nachzuweisen, dass das Wt-Enzym keine Reaktion auf die Inhibitoren zeigt, diese also im *in vivo*-Test nur das mutierte Protein beeinflussen können. Zu diesem Zweck wurde wie oben bereits beschrieben ein

Aktivitätstest mit je 2 μ g rekombinantem Enzym und 5 μ g MBP als Substrat unter optimalen Bedingungen mit radioaktiv markiertem ATP durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss von DMSO (Lösungsmittel-Kontrolle) sowie je drei verschiedener Konzentrationen (0,1 ,1 und 100 μ M) der Inhibitoren 1-NA, 1-NM und 2-NM ermittelt (Abb. 37).



Abb. 37: Überprüfung der Inhibitoren im Kinase-Aktivitätstest mit rekombinanter GST-LmxMPK1Wt und GST-LmxMPK1F93G und MBP als Substrat. Pro Inhibitor wurden je drei verschiedene Konzentrationen getestet. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit dem Lösungsmittel der Inhibitoren, DMSO. 1NA: 1-Naphthyl-pyrazolo(3,4 *d*)pyrimidine; 1/2NM: 1-/2-Naphthylmethylpyrazolo(3,4*d*)pyrimidine. Links: Coomassie-gefärbte Gele; rechts: Autoradiogramme (48 h).

Wie zu sehen ist, beeinflusst keiner der Inhibitoren das Wt-Enzym, gleich in welcher Konzentration. Damit ist eine Voraussetzung für die Anwendbarkeit des Systems *in vivo* erfüllt. Außerdem ist aber festzustellen, dass die rekombinante F93G-Mutante ausschließlich von hohen Inhibitorkonzentrationen beeinflusst wird (100 μ M), dabei reagiert auch sie auf alle Inhibitoren gleich. Im *in vivo*-Test musste nun gezeigt werden, ob mutierte Kinase und Inhibitoren die an sie gestellten Anforderungen auch im lebenden Parasit erfüllen würden.

4.5.3 Transfektion einer episomal exprimierten inhibitorsensitiven Mutante von LmxMPK1 in den Deletionshintergrund

4.5.3.1 Analyse der erhaltenen Klone

Um für *in vivo*-Tests Leishmanien zur Verfügung zu haben, die nur noch die mutierte Form von LmxMPK1 exprimieren, wurde das Konstrukt pX5lmpkF93G in die LmxMPK1-Deletionsmutante del 6.4 transfiziert. Vier Phleomycin-resistente Klone wurden auf Anwesenheit des Plasmides mittels Immunoblot mit einem LmxMPK1-spezifischen Antikörper überprüft (antiC-term-Impk, Wiese, 1998). Wie in Abb. 38 dargestellt, erreicht die Expression von LmxMPK1 in den vier Mutanten annähernd Wt-Niveau. Als Ladekontrolle ist das entsprechende Coomassie-gefärbte SDS-Gel dargestellt. Von allen Klonen wurden Stabilate angefertigt, Klon Nr. 7 wurde für alle weiteren Inhibitortests sowie für die Infektionsexperimente verwendet.



Abb. 38: Immunoblot: **1:** *L. mexicana*-Promastigote; **2:** ΔLmxMPK1-/- + pX5ImpkF93G KI. 1; **3:** ΔLmxMPK1-/- + pX5ImpkF93G KI. 4; **4:** ΔLmxMPK1-/- + pX5ImpkF93G KI. 7; **5:** ΔLmxMPK1-/- + pX5ImpkF93G KI. 9. 2x10⁷ Zellen/Spur, 1. Antikörper: anti-C-termImpk. Links: Coomassie-gefärbtes 12%-iges SDS-Gel; rechts: Immunoblot, 7 min Exposition.

4.5.3.2 Infektionsexperimente mit ∆LmxMPK1-/- + pX5ImpkF93G KI. 7

Um festzustellen, ob die inhibitorsensitive Version von LmxMPK1, die in Klon 7 episomal exprimiert wird, in der Lage ist, die Deletion von LmxMPK1 zu komplementieren und die Infektiösität dieser Mutante wieder herzustellen, wurden 5 Balb/c-Mäuse mit je 1 x 10⁷ Promastigoten des o. g. Klons infiziert. Der Infektionsverlauf wurde über ein Jahr mittels Messung der Fußdicke des infizierten im Vergleich zum gesunden Fuß dokumentiert (Abb. 39A). Darüber hinaus wurden nach ca. einem Jahr mittels Punktion Amastigote aus der Läsion einer Maus isoliert, rückdifferenziert und wieder in Kultur genommen. Mit diesen "adaptierten" Promastigoten wurde erneut eine Infektion von 5 Balb/c-Mäusen durchgeführt und der Verlauf der Infektion ebenfalls dokumentiert. Außerdem wurde erneut mittels Immunoblot nachgewiesen, dass LmxMPK1F93G in den Parasiten auch nach einem Jahr in der Maus noch exprimiert wird (Abb. 39B).





Abb. 39: Infektionsexperimente mit *L. mexicana* Wt, ΔLmxMPK1-/-, ΔLmxMPK1-/- + pX5Impk und ΔLmxMPK1-/- + pX5ImpkF93G KI. 7 vor und nach Maus. A) 1. Infektionsexperiment: Δ: *L. mexicana* Wt; x: ΔLmxMPK1-/- + pX5Impk; \bigstar : ΔLmxMPK1-/- + pX5ImpkF93G KI. 7 vor Maus; \blacksquare : ΔLmxMPK1-/- + pX5ImpkF93G KI. 7 nach Maus; Δ: ΔLmxMPK1-/-. B) Immunoblot: 1: *L. mexicana* Wt; 2: ΔLmxMPK1-/- + pX5ImpkF93G KI. 7 vor Maus; 3: ΔLmxMPK1-/- + pX5ImpkF93G KI. 7 nach Maus (Reinfektion). 2x10⁷ Zellen/Spur, 1. Antikörper: anti-C-termImpk. Links: Coomassie-gefärbtes 12%-iges SDS-Gel; rechts Immunoblot, 5 min Exposition .

Im Infektionsexperiment ist zu sehen, dass der Verlauf der Infektion verglichen mit *L. mexicana* Wt und dem episomalen Addback von LmxMPK1Wt langsamer voran geht. Nichtsdestotrotz bilden sich bei vier von fünf Mäusen nach einer Zeit von 24-27 Wochen deutliche Läsionen aus, was bei der Deletionsmutante nicht der Fall ist. Dabei ist kein Unterschied zwischen den ursprünglichen Parasiten und solchen, die bereits eine Mausinfektion durchlaufen haben, zu erkennen.

Das Experiment zeigt, dass die mutierte Version von LmxMPK1 auch *in vivo* Aktivität zeigt und den Verlust des Wt-Enzyms kompensieren kann, wenn auch in geringerem Maße, als das Wt-Enzym selbst, so dass es zu einem langsameren Wachstum der Parasiten kommt.

4.5.4 Inhibitortests mit Promastigoten

Mittels der Infektionsexperimente konnte die Aktivität der mutierten Kinase *in vivo* gezeigt werden; nun musste die Funktionalität der Inhibitoren *in vivo* bewiesen werden. Sind die Substanzen in der Lage die Leishmanien-Zellmembran zu passieren und die mutierte Kinase zu blockieren? Sind die Folgen die gleichen, wie bei einer "klassischen" Deletionsmutante? Zu diesem Zweck wurden nun Wt- und mutierte *L. mexicana*-Promastigote, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, auf eine Zelldichte von 1x10⁶ /ml verdünnt und in 24-well-Platten ausgesät. Nun wurden in je drei wells entweder DMSO oder verschiedene Konzentrationen der drei Inhibitoren zugegeben (Endkonzentrationen: 0,1/1/10 µM 1-NA, 1-NM und 2-NM, jeweils in 5 µl). Drei wells wurden als Kontrolle ohne Zusätze belassen. Nun wurde über einen Zeitraum von maximal vier Tagen die Zellzahl in jedem well ca. alle 24 h bestimmt. Für eine übersichtliche Auswertung wurden die gemessenen Zellzahlen normiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellzahlen durch die Zellzahl mit DMSO zum jeweiligen Zeitpunkt geteilt. DMSO, das Lösungsmittel der Inhibitoren, zeigte ebenfalls leichte Effekte

auf die Proliferation, was sich im Vergleich mit den Zellzahlen ohne Zusätze herausstellte (nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Auswertung sind in Abb. 40 dargestellt. Ein Wert unter 1 (Zellzahl der getesteten Probe < Zellzahl mit DMSO) zeigt eine gestörte Proliferation der jeweiligen Parasiten. Außerdem wurden nach drei Tagen Proben für die Mikroskopie abgenommen und die Morphologie der Zellen im Durchlichtmikroskop visualisiert (Abb. 41).



Abb. 40: Inhibitortest mit *L. mexicana* Wt- und ∆LmxMPK1-/- + pX5lmpkF93G KI. 7-Promastigoten (F93G). Promastigote wurden in einem Volumen von je 1 ml mit verschiedenen Konzentrationen der drei Inhibitoren 1-NM, 2-NM und 1-NA inkubiert. Die Zellzahl bei Beginn des Versuchs betrug 1x10⁶. Nach verschiedenen Zeiträumen wurden die Zellzahlen bestimmt (n=3) und auf die jeweiligen Zellzahlen mit Lösungsmittel (DMSO) normiert. Ein Wert unter 1 (rote Linie) zeigt eine gestörte Proliferation der Parasiten an.

Wie man sehen kann, zeigen alle drei Inhibitoren erst ab einer Konzentration von 10 μ M einen Effekt auf die Proliferation der Wt-Zellen, bei niedrigeren Konzentrationen ist kein

Effekt zu beobachten. Interessanterweise zeigt die inhibitorsensitive Mutante schon bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen und ab Tag 1 eine stark verminderte Proliferation.

Auch morphologisch lässt sich dies bestätigen (Abb. 41): Die Wt-Promastigoten zeigen auch bei hohen Inhibitorkonzentrationen nur geringe Veränderungen in ihrer Morphologie, während die inhibitorsensitive Mutante schon bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen eine stark gestörte Morphologie aufweist. Die Inhibition von LmxMPK1F93G *in vivo* zeigt in Promastigoten also Effekte, die bei der Deletionsmutante von LmxMPK1 in diesem Ausmaß nicht zu beobachten waren.





Abb. 41: Inhibitortest mit *L. mexicana* Wt- und △LmxMPK1-/- + pX5lmpkF93G KI. 7-Promastigoten: Morphologie der Zellen. Stellvertretend für alle drei Inhibitoren sind hier Zellen, die 72 h mit dem Inhibitor 1-NA bzw. dem Lösungsmittel DMSO inkubiert wurden, gezeigt.

4.5.5 Inhibitortests mit axenischen Amastigoten

Nun musste noch die Wirkung der Inhibitoren auf *in vitro*-differenzierte, axenische Amastigoten getestet werden. Zu diesem Zweck wurden Wt- und Δ LmxMPK1-/- + pX5ImpkF93G KI. 7-Promastigote, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, abzentrifugiert, in Differenzierungsmedium gewaschen und zu einer Dichte von 2- $4x10^6$ /ml darin aufgenommen. Anschließend wurden die Parasiten für 48 h bei 34°C und 5 %

 CO_2 zu Amastigoten differenziert. Nach Ablauf von 48 h wurden die Parasiten erneut abzentrifugiert, wiederum zu einer Dichte von $4x10^6$ / ml aufgenommen und in 24-well-Platten ausgesät. Die weitere Vorgehensweise entsprach der unter 4.5.4 angegebenen: Die wells wurden mit DMSO oder Inhibitor versetzt, und die Parasiten bei 34°C und 5 % CO_2 weiter wachsen gelassen. Es wurden wiederum ca. alle 24 h die Zellzahlen bestimmt, die wie oben ausgewertet wurden und nach drei Tagen Proben für die Durchlichtmikroskopie abgenommen. Die Ergebnisse der Zellzahlbestimmungen sind in Abb. 42 dargestellt.



Abb. 42: Inhibitortest mit *L. mexicana* Wt- und ∆LmxMPK1-/- + pX5ImpkF93G KI. 7-Amastigoten (F93G). Promastigote wurden zunächst für 48 h *in vitro* zu Amastigoten differenziert und anschließend in einem Volumen von je 1 ml mit verschiedenen Konzentrationen der drei Inhibitoren 1-NM, 2-NM und 1-NA inkubiert. Die Zellzahl bei Beginn des Versuchs betrug 4x10⁶. Nach verschiedenen Zeiträumen wurden die Zellzahlen bestimmt (n=3) und auf die jeweiligen Zellzahlen mit Lösungsmittel (DMSO) normiert. Ein Wert unter 1 (rote Linie) zeigt eine gestörte Proliferation der Parasiten an.

Die Proliferation der Wt-Amastigoten zeigt sich hier auch bis zu Konzentrationen von 10 μ M Inhibitor relativ unbeeinflusst, während die inhibitorsensitiven Amastigoten sich schon ab Tag 1 kaum noch teilen (Ratio jeweils ½ Ratio des Vortags; normal: eine Teilung in ca. 24 h).

Die mikroskopische Auswertung der Morphologie der Amastigoten bestätigt dies (Abb. 43): die Wt-Amastigoten zeigen sich auch in ihrer Morphologie wenig beeindruckt von den Inhibitoren, es sind kaum Unterschiede zur Kontrolle mit DMSO zu erkennen. Die Morphologie der inhibitorsensitive Mutante hingegen ist auch bei niedrigsten Inhibitorkonzentrationen (0,1 μ M) schon stark gestört, die Zellen sehen aus, als ob sie absterben, Zelltrümmer sind zu erkennen.

Dies bestätigt die an der Deletionsmutante gemachten Beobachtungen; ohne LmxMPK1 sowie mit inaktivierter LmxMPK1 ist keine Proliferation im amastigoten Stadium möglich.









Wt DMSO

0,1 µM Inhibitor

1 µM Inhibitor

10 µM Inhibitor



Abb. 43: Inhibitortest mit *L. mexicana* Wt- und Δ LmxMPK1-/- + pX5lmpkF93G Kl. 7-Amastigoten: Morphologie der Zellen. Wt- und mutierte Promastigote wurden für 48 h *in vitro* zu Amastigoten differenziert, anschließend auf 4x10⁶ Zellen/ml verdünnt und mit den Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen versetzt. Stellvertretend für alle drei Inhibitoren sind hier Zellen, die 72 h mit dem Inhibitor 1-NM bzw. dem Lösungsmittel DMSO inkubiert wurden, gezeigt.

Diskussion 115

5 Diskussion

In höheren Eukaryoten sind die MAP Kinase-Signalwege an vielen verschiedenen Prozessen in der Zelle beteiligt wie z.B. Proliferation, Reaktion auf Stresssignale und Apoptose (Cobb und Goldsmith, 1995). Obwohl Trypanosomatiden sich in vielerlei Eigenschaften von höheren Eukaryoten unterscheiden, sind die drei Hauptelemente dieser Signalkaskaden, die MAPKKKs, MAPKKs und MAP Kinasen, auch in ihnen in hochkonservierter Form vorhanden (Parsons et al., 2005). In vorhergehenden Studien hat sich herausgestellt, dass MAP Kinase-Signalwege auch in Trypanosomatiden eine wichtige Rolle bei Morphogenese, Differenzierung und Proliferation spielen. In Trypanosoma brucei sind bisher vier MAP Kinase Homologe beschrieben worden. Für Kfr1 wurde gezeigt, dass sie an der Proliferation der Blutstromform der Parasiten beteiligt ist, die durch Interferon-y induziert wird (Hua und Wang, 1997). TbMAPK2 ist wichtig für die Differenzierung der Blutstrom-Form der Trypanosomen zur prozyklischen Form, die in Abwesenheit der Kinase eine Blockade des Zellzyklus in allen Stadien aufweist (Müller et al., 2002). Eine dritte Kinase, TbECK1, die sowohl Eigenschaften von MAP Kinasen als auch von Zyklin-abhängigen Kinasen aufweist, besitzt eine regulatorische C-terminale Domäne und scheint eine Rolle im Zellzyklus zu spielen (Ellis et al., 2004), während TbMPK5, die erst kürzlich beschrieben wurde, direkt an der Differenzierung der Blutstrom- zur prozyklischen Form beteiligt zu sein scheint (Domenicali et al., 2006).

Auch in Leishmanien sind bereits viele Komponenten der MAP Kinase Kaskaden bekannt und z.T. charakterisiert. So sind die MAP Kinasen LmxMPK3 und LmxMPK9 sowie die MAPKK LmxPK4 und LmxMKK an der Regulation der Flagellenlänge in Leishmania mexicana beteiligt, für LmxPK4 wird ebenfalls eine Rolle bei der Differenzierung vom pro-(Insekten-) zum amastigoten (Säuger-) Stadium des Parasiten diskutiert (Erdmann et al., 2006; Bengs et al., 2005; Kuhn und Wiese, 2005). Bei der MAP Kinase LmxMPK4, die in beiden Lebensstadien exprimiert wird, handelt es sich um ein essentielles Gen, das möglicherweise eine Rolle bei der Proliferation der Leishmanien spielt (Wang et al., 2005). Für LmxMPK1, ein MAP Kinase Homolog aus L. mexicana, das bereits 1998 identifiziert wurde (Wiese, 1998), konnte gezeigt werden, dass es an der Proliferation der Amastigoten beteiligt ist. Da es sich hierbei um das Säugerstadium des Parasiten handelt, stellt diese Kinase eine geeignete Zielstruktur für eine medikamentöse Therapie der Leishmaniasis dar. Diese Kinase ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Das rekombinante Enzym sollte biochemisch charakterisiert und der Mechanismus seiner Aktivierung untersucht werden. Zudem wurde versucht, die Kinase in eine Kaskade einzuordnen, um mehr über ihre tatsächliche Funktion herauszufinden. Zu diesem Zweck sollten Aktivator/en und Substrat/e

gefunden werden. Um das Potential der Kinase als therapeutische Zielstruktur zu evaluieren und mehr über eine mögliche Rolle der Kinase im promastigoten Lebensstadium der Parasiten herauszufinden, in dem sie ebenfalls exprimiert wird, wurde eine Mutante des Enzyms konstruiert, die –eingebracht in den Deletionshintergrund- mittels Einsatz spezifischer Inhibitoren gehemmt wurde.

5.1 Biochemische Charakterisierung und Aktivierungsmechanismus von LmxMPK1

5.1.1 Aufreinigung von rekombinanter LmxMPK1 und Mutanten aus *E. coli*

LmxMPK1Wt wurde sowohl als GST- als auch als 6xHis-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt, um anschließend in Aktivitätsstudien eingesetzt zu werden. Des Weiteren konnte eine inaktive K43M-Mutante als GST-Fusionsprotein sowie verschiedene Mutanten des Phosphorylierungsmotivs in der Aktivierungssschleife (TDY) als 6xHis-Fusionsproteine erfolgreich rekombinant exprimiert und aufgereinigt werden.

Durch eine Analyse der Eluate im SDS-PA-Gel wurde festgestellt, dass bei allen Aufreinigungen mehr oder weniger geringe Verunreinigungen durch andere Proteine vorhanden waren. Da aber ausgeschlossen werden konnte, dass bei der Durchführung der Kinase-Aktivitätstests mit GST-LmxMPK1 sowie 6xHis-LmxMPK1 die nachgewiesene Phosphorylierungsaktivität auf verunreinigenden Bakterienkinasen beruht (siehe 4.2.3.1 und 4.2.3.3), konnte auf weitere Aufreinigungsschritte wie z.B. eine Ionenaustauscherchromatographie verzichtet werden. Obwohl ein großer Teil der rekombinanten LmxMPK1 nach der Zelllyse unlöslich blieb und im Zelllysat-Niederschlag vorlag, konnten für 6xHis-LmxMPK1Wt noch ca. 580 µg bzw. für GST-LmxMPK1Wt noch 350 µg Protein aus jeweils 100 ml *E. coli*-Kultur gewonnen werden, wobei ein kleiner Anteil der Proteinmenge auf die kontaminierenden Proteine zurückzuführen ist. Da für die Aktivitätstests meist nur wenige µg rekombinantes Protein benötigt wurden, wurde keine weitere Optimierung der Ausbeute durchgeführt.

Vergleicht man GST-LmxMPK1Wt und GST-LmxMPK1K43M im SDS-PA-Gel miteinander, so fällt zunächst auf, dass die inaktive K43M-Mutante nur in geringerer Ausbeute erhalten werden konnte als die Wildtyp-Kinase. Dies gilt ebenfalls und in noch stärkerem Maß für die 6xHis-Fusionsproteine von LmxMPK1Wt sowie der Mutanten im Aktivierungsmotiv, die im Gegensatz zur Wt-Kinase nur in sehr geringer Ausbeute erhalten wurden. Möglicherweise kommt es durch die jeweiligen Mutationen an diesen Resten zu Konformationsänderungen, die dann entweder zum vorzeitigen Abbau der Proteine führen oder die Löslichkeit dieser erheblich verschlechtern. Auf die Ausbeute der GST-markierten Mutante hat die Mutation dabei weniger Auswirkungen als auf die Ausbeuten der 6xHis-markierten Mutanten. Dies liegt daran, dass der große GST-Anteil (26 kD) der Fusionsproteine, der ja selbst ein komplettes Protein darstellt (Glutathion-S-Transferase), eine stabilisierende Wirkung auf die rekombinanten Proteine hat, während der sehr kleine 6xHis-"Tag", der nur aus zehn Aminosäuren (M-R-G-S-H-H-H-H-H) besteht, keine Stabilisierung des Proteins bewirkt.

Während 6xHis-LmxMPK1Wt und die 6xHis-Mutanten als je eine klare Bande im SDS-PA-Gel zu sehen sind, erkennt man bei ausreichender Verdünnung der Probe bei GST-LmxMPK1Wt und der GST-K43M-Mutante eine Doppelbande. Dabei ist nach einem Aktivitätstest bei der Wt-Kinase die obere der beiden Banden stärker ausgeprägt, bei der inaktiven K43M-Mutante die untere Bande (siehe Abb. 10). Bei den beiden Banden könnte es sich um die nicht phosphorylierte (untere Bande) und die phosphorylierte Form der Kinase handeln. Eine Phosphorylierung an einem Serin-, Threonin- oder Tyrosinrest erhöht z.B. das Molekulargewicht eines Proteins um 80 Dalton (Erickson *et al.*, 1990). Wie unter 4.2.3.2 gezeigt, ist LmxMPK1Wt in der Lage eine relativ starke Autophosphorylierung durchzuführen, während die K43M-Mutante so gut wie gar keine Autophosphorylierung zeigt. Zudem wird, wie gezeigt, LmxMPK1Wt schon leicht phosphoryliert aus *E. coli* aufgereinigt, was erklärt, warum beide Banden auch ohne Aktivitätstest vorhanden sind.

Da allerdings 6xHis-LmxMPK1Wt während der Autophosphorylierungsreaktion (Abb. 11D) kein nennenswertes Verrutschen der Proteinbande zu höheren Molekulargewichten hin zeigt, kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den beiden Banden um unterschiedliche Konformationen der GST-Fusionsproteine handelt, von denen eine aufgrund der K43M-Mutation bevorzugt wird.

5.1.2 Erste Aktivitätstests

5.1.2.1 GST-LmxMPK1Wt, GST-LmxMPK1K43M und 6xHis-LmxMPK1Wt: Auto- und Substratphosphorylierung

Rekombinant exprimierte GST-LmxMPK1Wt, GST-LmxMPK1K43M und 6xHis-LmxMPK1Wt sollten in einem Kinasetest auf ihre Fähigkeit, sich selbst und/oder ein artifizielles Kinase-Substrat (Myelin Basisches Protein: MBP) zu phosphorylieren, untersucht werden. Dabei wurde die jeweilige Kinase mit dem Substrat in Anwesenheit von radioaktiv markiertem (γ-³²P)ATP und zweiwertigen Kationen wie Mg²⁺ und Mn²⁺ inkubiert, die mit dem ATP einen Komplex bilden und für die Kinase-Aktivität essentiell sind (Waas *et al.*, 2004; siehe auch Abb. 11C). Es wurde gezeigt, dass sowohl GST-LmxMPK1Wt als auch 6xHis-LmxMPK1Wt in aktiver Konformation aus *E. coli* isoliert werden konnten. Beide Proteine zeigen eine starke Autophosphorylierung und phosphorylieren MBP, wobei die Autophosphorylierung in beiden Fällen stärker ausgeprägt ist, als die Substratphosphorylierung. 6xHis-LmxMPK1Wt zeigt dabei stärkere Aktivität, wie die kürzere Expositionszeit des Films beweist (24h im

Gegensatz zu 48h), so dass für die weiteren Charakterisierungsversuche wenn möglich diese Variante verwendet wurde. Als weitere mögliche artifizielle Substrate wurden Histon H1 und Casein getestet, die ebenfalls putative Phosphorylierungsstellen für (MAP) Kinasen besitzen. Dabei konnte beobachtet werden, dass MBP das beste Substrat ist, da es im Verhältnis zur eingesetzten Proteinmenge am stärksten phosphoryliert wurde.

Die inaktive GST-K43M-Mutante, in der ein konservierter Lysinrest, der für die richtige Orientierung des ATP bei der Phosphatübertragungsreaktion verantwortlich ist, gegen Methionin ausgetauscht wurde (Matte *et al.*, 1998), zeigt wie erwartet keine Substratphosphorylierung und nur sehr geringe Autophosphorylierung die erst nach langer Expositionszeit zu detektieren ist (nicht gezeigt).

5.1.2.2 Optimierung der in vitro-Kinase-Aktivität

Als nächstes wurde eine detaillierte Analyse und Optimierung der Kinase-Aktivität von 6xHis-LmxMPK1Wt durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Parameter wie Temperatur und pH bei den Aktivitätstests verändert, um aus den Ergebnissen mögliche Rückschlüsse auf die zelluläre Funktion des Enzyms ziehen zu können und eine Substratsuche zu erleichtern.

Zunächst wurde die Abhängigkeit der Kinase-Aktivität von der Reaktionstemperatur unter Standardbedingungen (2 mM Mn²⁺; 10 mM Mg²⁺) untersucht. Dabei war zu beobachten, dass die Aktivität mit steigender Temperatur ebenfalls ansteigt. Die Autophosphorylierungsaktivität ist dabei schon bei 4°C sehr stark, bei dieser Temperatur ist noch keine MBP-Phosphorylierung zu beobachten. Von 25°C bis 40°C steigt letztere dann kontinuierlich an, während die Autophosphorylierung schon bei ca. 28°C ein Maximum erreicht hat und bei höheren Temperaturen kaum noch ansteigt. Ein scheinbares Optimum lässt sich bei Temperaturen um 37-40°C beobachten. Dies korreliert mit der Tatsache, dass die Kinase im amastigoten Säugerstadium der Parasiten essentiell ist, d.h. bei Temperaturen um 37°C optimale Aktivität aufweisen sollte (Wiese, 1998). LmxMPK1 liegt allerdings auch im Insektenstadium der Parasiten, den Promastigoten, vor, die bei Temperaturen um 27°C wachsen (Zilberstein und Shapira, 1994).

Weiterhin konnte eine starke Präferenz für Mn²⁺ als Kofaktor für ATP nachgewiesen werden (siehe Abb. 11B), was für *Leishmania*-Kinasen aber auch für Kinasen höherer Eukaryoten *in vitro* nicht ungewöhnlich ist (Wiese *et a*l., unveröffentlicht; Erdmann *et al.*, 2006; Mayrose *et al.*, 2004). Mn²⁺ erhöht dabei sowohl die Substrat- als auch die Autophosphorylierung der Kinase bis zu Konzentrationen von 5 mM. Eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 10 mM bewirkt keine weitere Erhöhung der Aktivität. Ist ausschließlich Mg²⁺ als Kofaktor vorhanden, ist vor allem die Substratphosphorylierung deutlich geringer. Diese Präferenz

kann auf den nicht-aktivierten Status der Kinase zurückzuführen sein. Dabei ist es möglich, dass das größere Mn²⁺-Ion die Konformation der Kinase dergestalt verändert, dass sie eine höhere Aktivität aufweist. Ist eine MAP Kinase allerdings aktiviert, zeigt sie keine besondere Präferenz mehr für das eine oder andere Metallion, wie z.B. für die von LmxMKK aktivierte LmxMPK3 gezeigt werden konnte, die im nicht aktivierten Zustand ebenfalls eine Präferenz für Mn²⁺ aufweist (Erdmann, 2004). In Abwesenheit zweiwertiger Ionen weist die Kinase keinerlei Aktivität auf. Trotz dieser *in vitro*-Beobachtungen kann man nicht sicher sein, ob *in vivo* Mn²⁺ oder Mg²⁺ als Kofaktor für ATP eine größere Rolle spielt. Mn²⁺ liegt zwar nicht in so großen Mengen wie Mg²⁺ vor, welches nach Kalium intrazellulär die zweitgrößte Menge an divalenten Kationen stellt (Reinhart, 1988), trotzdem ist aber auch Mn²⁺ sehr wichtig, z.B. für die Regulation vieler Enzymaktivitäten (Maggini *et al.*, 1993). Für die p21-aktivierte Kinase γ-PAK aus Kaninchen-Retikulozyten konnte gezeigt werden, dass Mn²⁺ *in vitro* zwar zu einer bis zu fünffach stärkeren Autophosphorylierung der Kinase führt, die Kinase aber in Abwesenheit von Mg²⁺ artifizielle Substrate wie MBP oder Histon H1 deutlich schlechter phosphoryliert (Tuazon *et al.*, 1998).

Eine zweite Bindungsstelle für zweiwertige Kationen, wie sie in manchen Kinasen vorliegt (Sun und Budde, 1997; Waas und Dalby, 2003), ist in LmxMPK1 nicht vorhanden, die Kinase weist selbst bei niedrigsten Ionenkonzentrationen (50 μ M) Aktivität auf. Wäre eine zweite Bindungsstelle vorhanden, so würde zunächst das vorliegende ATP durch Ionen gebunden und anschließend durch Bindung von weiteren Ionen an die zweite Bindungsstelle die Aktivität induziert. Aktivität wäre erst dann nachweisbar, wenn die Ionenkonzentration die des ATP übersteigt (100 μ M).

Weiterhin lässt sich beobachten, dass LmxMPK1 sich selbst und ihr künstliches Substrat MBP am besten bei pH-Werten im neutralen Bereich um pH 7 phosphoryliert, optimale Aktivität findet man bei pH 7,5 (Abb. 11C). Dies ist ebenfalls für alle bisher untersuchten *Leishmania*-Kinasen so (Wiese *et al.*, unveröffentlicht), was dafür spricht, dass im Zytosol der Parasiten, dem angenommenen Wirkungsort der Kinasen, ein neutraler pH-Wert vorherrscht. Tatsächlich konnte bereits von Zilberstein und Shapira (1994) gezeigt werden, dass Leishmanien trotz stark variierender extrazellulärer pH-Werte ihren cytosolischen pH durch streng kontrollierte Homöostase stets zwischen 6,5 und 7,4 halten.

Beobachtet man den zeitlichen Verlauf der Phosphorylierungsreaktion, so stellt man fest, dass die Autophosphorylierung vor der Substratphosphorylierung beginnen muss, da sie schon nach kurzer Zeit deutlich ausgeprägter vorliegt als die MBP-Phosphorylierung. Möglicherweise muss die Kinase sich *in vitro* zunächst durch die Autophosphorylierung selbst aktivieren, um dann in der Lage zu sein, MBP zu phosphorylieren. Eine Sättigung ist

zwischen 45 und 60 Minuten zu beobachten, weshalb im weiteren mit Ausnahme der kinetischen Analysen diese Zeitdauer für alle Kinase-Aktivitätstests gewählt wurde.

5.1.3 Aktivität von LmxMPK1Wt und Mutanten in der Phosphorylierungsstelle des Aktivierungsmotivs (TDY) *in vitro*

Als nächstes wurde der Autoaktivierungsmechanismus des Enzyms untersucht, schließlich konnte gezeigt werden, dass LmxMPK1 auch im nicht-aktivierten Zustand (ohne Aktivator) Basalaktivität besitzt und in der Lage ist, sich selbst und MBP zu phosphorylieren (siehe oben). Aus diesem Grund wurden verschiedene Mutanten in der Aktivierungsschleife des Enzyms, die bereits in Leishmanien-Expressionsvektoren vorlagen, in den pQE8lmpk-*E.coli*-Expressionsvektor umkloniert. MAP Kinasen besitzen hier ein hochkonserviertes TXY-Motiv, in welchem bei höheren Eukaryoten sowohl der Threonin- als auch der Tyrosinrest phosphoryliert sein müssen, um volle Aktivität der betreffenden Kinase zu erreichen (Cobb und Goldsmith, 1995).

Es waren jeweils drei Mutanten vorhanden, in denen die betreffenden, Hydroxylgruppen enthaltenden Reste durch korrespondierende unpolare Aminosäuren ersetzt wurden: die ADY-, TDF- und die ADF-Mutante. Außerdem lagen Mutanten vor, in denen je einer oder beide Reste durch Glutamat ersetzt wurden (EDY, TDE und EDE). Hier sollte überprüft weden, ob die negative Ladung des Glutamats in der Lage wäre, eine Phosphorylierung vorzutäuschen, um so eine konstitutive Aktivierung der Kinase herbeizuführen. Dieser Mechanismus ist z.B. bei MAPKK erfolgreich angewendet worden (Mansour *et al.*, 1996; Wiese *et al.*, 2003).

Alle mutierten Kinasen sowie LmxMPK1Wt wurden zunächst rekombinant in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Im Kinase-Aktivitätstest konnte festgestellt werden, dass im Gegensatz zum Wildtyp keine der Mutanten in der Lage war, MBP signifikant zu phosphorylieren. Dies könnte bedeuten, dass die Phosphorylierungslippe mit dem Aktivierungsmotiv eine bestimmte Konformation einnehmen muss um volle Aktivität zu besitzen, was in den Mutanten nicht mehr möglich ist. Möglicherweise ist auch MBP kein optimales Substrat für LmxMPK1, so dass es evtl. von den Mutanten so schlecht phosphoryliert wird, dass die Phosphorylierung unterhab des Detektionslimits liegt. Waas *et al.* (2004) postulieren, dass das endogene Substrat einer Kinase notwendig ist, um Substratphosphorylierung zu untersuchen, da z.B. Peptid- aber auch andere kleine artifizielle Substratproteine keine guten Substrate sind. Für andere MAP Kinasen sind die Ergebnisse hier unterschiedlich: Während eine EEY-Mutante der humanen MAP Kinase ERK2 MBP noch genauso gut phosphoryliert wie eine nicht aktivierte Wt-ERK2 (Her *et al.*, 1993), zeigt z.B. die aus Zellen immunpräzipitierte TXF-Mutante der Hefe-MAP Kinase Hog1 *in vitro*

keine Aktivität, ist aber in der Lage, eine Hog1-Deletionsmutante *in vivo* zu komplementieren (Bell und Engelberg, 2003).

In LmxMPK1 zeigten außerdem nur die Mutanten, die den katalytischen Tyrosinrest im TDY-Motiv noch besaßen, Autophosphorylierungsaktivität (siehe 4.2.3.3). Dies deutet darauf hin, dass die Kinase entweder an diesem Tyrosin autophosphoryliert oder den Rest benötigt, um sich an einem anderen Rest selbst zu phosphorylieren. Um herauszufinden, ob die Phosphorylierung an einem Tyrosinrest stattfindet, wurde erneut eine Phosphorylierungsreaktion durchgeführt, dieses Mal allerdings mit nicht radioaktiv markiertem ATP. Die Proben wurden einem Immunoblot mit einem anti-Phospho-Tyrosin-Antikörper unterzogen. Wie erwartet, zeigten wieder nur die Mutanten, die den Tyrosinrest noch enthielten so wie der Wt eine Autophosphorylierung an Tyrosin, die direkt nach der Aufreinigung aus E. coli schon vorliegt, aber im Reaktionsverlauf noch deutlich ansteigt. Dies spricht dafür, dass die beobachtete Autophosphorylierung auf LmxMPK1 selbst zurückgeht und nicht von einer bakteriellen Tyrosinkinase wie Wzc verursacht wird (Vincent et al., 1999).

Für andere MAP Kinasen wie z.B. ERK2 ist bekannt, dass diese an dem katalytischen Tyrosin im TXY-Motiv der Aktivierungsschleife autophosphorylieren können (Seger et al., 1991; Wu et al., 1991; Rossomando et al., 1992; (Mayrose et al., 2004; Klevernic et al., 2006). Dies, so wie die Tatsache, dass die LmxMPK1-Mutanten, in denen der Tyrosinrest mutiert ist, keine Autophosphorylierung mehr aufwiesen, spricht dafür, dass die beobachtete Autophosphorylierung ebenfalls am katalytischen Tyrosin stattfindet. Um festzustellen, ob es sich bei der beobachteten Autophosphorylierung um eine inter- oder eine intramolekulare Phosphatübertragung handelte, sollte die Reaktionsordnung bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden Kinasetests mit verschiedenen Konzentrationen von LmxMPK1 durchgeführt und der Einbau radioaktiven Phosphats anschließend quantifiziert. Die Reaktionsdauer betrug in diesem Fall nur 15 Minuten, um nicht im Bereich der Sättigung zu messen. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Einbau des Phosphats linear von der Kinasekonzentration abhängig ist. Der van't Hoff-Plot bestätigt, dass es sich hier um eine Reaktion erster Ordnung, also eine intramolekulare Reaktion, handelt. Hier gibt die Steigung der Gerade, die in diesem Fall ungefähr 1 beträgt, die Reaktionsordnung an. Zusätzlich wurde ein Kinasetest 6xHis-LmxMPK1Wt und der Kinase-inaktiven Mutante GST-LmxMPK1K43M mit durchgeführt. Wie zu beobachten war, fand eine Phosphorylierung ausschließlich an 6xHis-LmxMPK1Wt statt, die Kinase-inaktive Mutante wurde nicht phosphoryliert. Es handelt sich also bei der Autophosphorylierung an Tyrosin sicher um eine intramolekulare Reaktion. Auch dies wurde bereits für andere MAP Kinasen höherer Eukaryoten nachgewiesen (Mayrose et al., 2004; Her et al., 1993, Wu et al., 1991; Abe et al., 2001). Zusätzlich wurde als weiterer

kinetischer Parameter der Autophosphorylierung die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration bestimmt und ein Lineweaver-Burk-Diagramm erstellt (siehe 4.2.3.6). Die Reaktion folgt einer typischen Michaelis-Menten-Kinetik. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit beträgt 91 pmol/min/mg, die Kinase besitzt eine Michaelis-Menten-Konstante, die in diesem Fall ein Maß für die Affinität zu dem Substrat ATP ist, von 14,7 μ M. Dies scheint normal für eine nicht-aktivierte Kinase; so weist z.B. die nicht aktivierte MAP Kinase LeMPK3 aus *Lycopersicum esculentum* einen K_M für ATP von 9,5 μ M auf (Mayrose *et al.,* 2004).

5.1.4 Aktivität und Phosphorylierungsstatus von LmxMPK1Wt und den Mutanten im Aktivierungsmotiv (TDY) *in vivo*

Wie unter 1.2.5 erwähnt, wurden die Mutanten im Aktivierungsmotiv bereits vor Beginn dieser Arbeit hergestellt und in Leishmanien-Expressionsvektoren kloniert. Mit diesen Konstrukten, sowie einem Wt-Konstrukt wurde eine Deletionsmutante von LmxMPK1 transfiziert und rekombinante Leishmanien ("add-backs") erhalten, die nur noch die jeweilige Mutante von LmxMPK1 oder aber den Wt episomal exprimierten. Eine Überprüfung der Proteinexpression in Promastigoten mittels Immunoblot zeigte, dass die Kinase- inaktive Mutante (K43M) weniger gut exprimiert wurde als ein Wt-addback, die EDE-Mutante war gar nicht nachweisbar (Melzer und Wiese, 2007). Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass diese Mutationen, vor allem die EDE-Mutation, eine instabilisierende Wirkung auf die Kinase haben und diese daher schneller abgebaut oder gar nicht erst richtig gefaltet wird.

Da bisher keine Rolle für LmxMPK1 in Promastigoten bekannt war, sollte zunächst untersucht werden, ob das Fehlen von LmxMPK1 evtl. doch Auswirkungen auf das promastigote Lebensstadium der Parasiten hat. Zu diesem Zweck wurden Wachstumskurven des Wt. der Deletionsmutante sowie der jeweiligen "add-back"-Mutanten im Aktivierungsmotiv erstellt. Dabei ließ sich feststellen, dass die LmxMPK1-Deletionsmutante eine deutlich verlangsamte Proliferation aufweist. Die Parasiten teilten sich im Schnitt bis zu fünfmal langsamer als Wt-Promastigote. Möglicherweise spielt LmxMPK1 also auch bei der Proliferation und/oder Teilung der Promastigoten eine Rolle, für die Proliferation des amastigoten Lebensstadiums ist die Kinase essentiell (Wiese, 1998). Für eine Aufgabe der Kinase in Promastigoten spricht ebenfalls die Tatsache, dass die Kinase in diesem Lebensstadium exprimiert wird und, wie gezeigt (4.2.4.1) sowohl in Pro- als auch in Amastigoten ausschließlich in phosphorylierter, d.h. vermutlich aktivierter Form vorliegt.

Von allen Mutanten im Aktivierungsmotiv ist nur die EDY-Mutante in der Lage, die Wt-Proliferationsrate in Promastigoten zu erreichen (siehe 4.2.4.3). Im Infektionsexperiment konnte die Mutante ebenfalls die Deletionsmutante komplementieren und die Infektiosität der Parasiten wieder herstellen (Melzer und Wiese, 2007). Interessanterweise liegt die EDY-Kinase in Promastigoten ausschließlich unter den nicht-phosphorylierten Proteinen vor. Dies deutet darauf hin, dass die *in vitro* beobachtete Tyrosin-Autophosphorylierung *in vivo* keine Rolle spielt. Unterstützend kommt hinzu, dass auch die ADY-Mutante, die allerdings sowohl in Pro- als auch in Amastigoten die Deletionsmutante nicht komplementieren kann, ebenfalls ausschließlich unter den nicht-phosphorylierten Proteinen zu finden ist. Es muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass in beiden Mutanten der Threonin-Rest mutiert ist. Vielleicht ist dessen Vorhandensein für eine Phosphorylierung an Tyrosin *in vivo* notwendig.

Da die EDY-Mutante biologische Aktivität aufweist, bedeutet das, dass der negativ geladene Glutamatrest in der Lage ist, für ein phosphoryliertes Threonin zu substituieren und die Kinase zu aktivieren, wenn auch nachweisbar nur *in vivo*, da die rekombinante EDY-Mutante *in vitro* keine MBP-Phosphorylierung zeigt. In anderen Studien war eine konstitutive Aktivierung einer MAP Kinase durch Ersatz eines oder beider Reste im Aktivierungsmotiv durch geladene Aminosäuren nicht möglich (Her *et al.*, 1993; Robbins *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1995). Hier konnte bei einigen Kinasen, wie z.B. der MAP Kinase Hog1 aus *S. cerevisiae*, durch Ersatz bestimmter Reste außerhalb des Aktivierungsmotivs eine Verstärkung der Aktivität bzw. eine konstitutive Aktivierung erreicht werden (Bell *et al.*, 2001; Bell und Engelberg, 2003). Auch für ERK2 konnten sogenannte "gain of function"-Mutanten außerhalb des Aktivierungsmotivs identifiziert werden, die vor allem zu einer stärkeren Autophosphorylierung der Kinasen an Tyrosin und Threonin führen und die Kinase damit fast unabhängig von einer Aktivierung durch MKK1 machen (Emrick *et al.*, 2001). In dieser Hinsicht unterscheidet sich LmxMPK1 also deutlich von MAP Kinasen höherer Eukaryoten.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die EDY-Mutante -und wahrscheinlich auch die Wt-Kinase- von keiner anderen Kinase *in vivo* an Tyrosin phosphoryliert wird. Im Gegensatz dazu wurde für ERK2 gezeigt, dass sowohl eine EEY- als auch eine TEE-Mutante *in vivo* phosphoryliert werden (Her *et al.*, 1993). Darüber hinaus zeigten beide Mutanten in Immunopräzipitationsexperimenten mit anschließendem Kinasetest keine Substratphosphorylierung gegenüber MBP, wie auch die rekombinant exprimierten korrespondierenden Mutanten von LmxMPK1. Da die beiden ERK2-Mutanten allerdings nicht in einem ERK2-Deletionshintergrund exprimiert wurden, lässt sich keine Aussage über ihre biologische Aktivität treffen.

Da die ADF-Mutante, die ebenfalls in beiden Lebensstadien nicht in der Lage war, das Fehlen von LmxMPK1 zu kompensieren, auch ausschließlich unter den nichtphosphorylierten Proteinen zu finden ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass LmxMPK1 *in vivo* an keinem anderen Rest phosphoryliert wird, als an dem Threonin des Aktivierungsmotivs. Für eine andere MAP Kinase aus *L. mexicana*, LmxMPK3, ist bekannt, dass sie ebenfalls an keinem Rest außerhalb des Aktivierungsmotivs phosphoryliert wird (Erdmann *et al.*, 2006), zusätzlich konnte auch bei dieser Kinase in der durch LmxMKK aktivierten Form eine Tyrosinphosphorylierung bisher nicht zuverlässig nachgewiesen werden (Wiese und Mitarbeiter, unveröffentlicht).

Für andere MAP Kinasen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sie nicht außerhalb des Aktivierungsmotivs (Her *et al.*, 1993; Payne *et al.*, 1991), trotz allem aber auch an dem Tyrosinrest des Aktivierungsmotivs phosphoryliert werden.

Einen weiteren Hinweis, der die Hypothese stützt, dass eine Phosphorylierung an Threonin für eine Aktivität von LmxMPK1 ausreichend ist, findet man bei Betrachtung der Eigenschaften der TDF-Mutante. Diese Mutante ist trotz des kompletten Fehlens des Tyrosinrestes in der Lage, sowohl in Pro- als auch in Amastigoten zumindest zumTeil das Fehlen von LmxMPK1Wt zu kompensieren. In Promastigoten proliferiert diese Mutante zwar langsamer als der Wt und die EDY-Mutante, aber deutlich schneller als die anderen Mutanten. In Infektionsexperimenten kann diese Kinase die Infektiosität der Parasiten in demselben Maß wiederherstellen, wie die EDY-Mutante. *In vitro* zeigt die Mutante keine Substratphosphorylierung, was entweder daran liegen kann, dass MBP, wie schon erwähnt, ein schlechtes Substrat darstellt, aber auch daran, dass die Kinase *in vitro* nicht an Threonin phosphoryliert ist, da ein Aktivator fehlt. In Promastigoten liegt die Mutante zum Teil in phosphoryliertem Zustand vor, ist aber auch unter den nicht-phosphorylierten Proteinen zu finden. Möglicherweise ist hier die Threoninphosphorylierung durch den Aktivator nicht so effektiv wie beim Wt, da der mutierte Phenylalaninrest die Phosphatübertragung stört.

Im Gegensatz dazu ist die TDE-Mutante nicht befähigt, die Proliferationsrate sowie die Infektiosität der Leishmanien wiederherzustellen, obwohl sie, genau wie die TDF-Mutante, in Promastigoten auch bis zu einem gewissen Grad phosphoryliert und somit aktiviert wird. Hier gibt es zwei Möglichkeiten, dies zu erklären: entweder ist durch den geladenen Glutamat-Rest anstelle des –normalerweise scheinbar nicht-phosphorylierten- Tyrosins die Substratbindung oder die Phosphatübertragung auf das Substrat nicht möglich, oder eine Phosphorylierung an Tyrosin (die durch das Glutamat vorgetäuscht wird) inaktiviert die Kinase zielgerichtet. Da in der TDF-Mutante nur der ungeladene Phenylalaninrest vorliegt, wird ein nicht-phosphoryliertes Tyrosin vorgetäuscht und die Substratphosphorylierung *in vivo* ist möglich, wenn auch wahrscheinlich schlechter als bei LmxMPK1Wt.

Für die Hefe-MAP Kinase Hog1 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Tyrosinrest des Aktivierungsmotivs nicht essentiell für die biologische Aktivität ist. In diesem Fall war eine

TXF-Mutante von Hog1 in der Lage eine Hog1-Deletionsmutante zu komplementieren, obwohl die immunpräzipitierte TXF-Mutante *in vitro* keine Aktivität zeigte (Bell und Engelberg, 2003). Trotz allem ist aber nicht klar, ob der Tyrosinrest in der Wt-Hog1 phosphoryliert wird oder nicht. Auch für die Säuger-MAP Kinase ERK8 wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung an Threonin eine größere Rolle bezüglich der enzymatischen Aktivität spielt. Hier zeigte eine rekombinante ERK8, die an Tyrosin dephosphoryliert wurde eine um 15-20% reduzierte Aktivität, während eine Dephosphorylierung an Threonin zu einer 95%-igen Reduktion der Aktivität führte (Klevernic *et al.*, 2006). Bei dieser Kinase sowie auch bei der Säuger-MAP Kinase ERK7, handelt es sich um MAP-Kinase-Homologe, die sich durch Autophosphorylierung an Threonin und Tyrosin selbst aktivieren können (Abe *et al.*, 2001; Klevernic *et al.*, 2006; Abe *et al.*, 2002). Dies kann für LmxMPK1 mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da sie sich nicht an Threonin autophosphoryliert (siehe 4.2.3.3).

Es konnte gezeigt werden, dass im Fall von LmxMPK1 *in vivo* eine Phosphorylierung an Tyrosin nicht stattfindet und für eine Aktivität der Kinase offensichtlich auch nicht nötig ist, was einen deutlichen Unterschied zu den MAP Kinasen höherer Eukaryoten darstellt.

Die oben diskutierte Hypothese einer Inaktivierung der Kinase durch Phosphorylierung an Tyrosin wäre allerdings ein völlig neuer, auf keine andere bekannte MAP Kinase zutreffender Mechanismus, daher ist diese Theorie bis zu ihrem Beweis reine Spekulation. Normalerweise müssen MAP Kinasen sowohl an Threonin als auch an Tyrosin phosphoryliert sein, um maximale Aktivität zu erreichen (Cobb und Goldsmith, 1995). Könnte man diese Hypothese allerdings bestätigen, böte sich hier durch den gravierenden Unterschied zu MAP Kinasen höherer Eukaryoten ein höchst interessanter Ansatzpunkt für eine medikamentöse Therapie der Leishmaniasis.

5.2 Die Suche nach Aktivatoren von LmxMPK1

Um die Kaskade, deren Teil LmxMPK1 ist -zumindest zum Teil- aufzuklären aber vor allem auch, um bei der Substratsuche eine aktivierte Kinase zur Verfügung zu haben, sollte versucht werden, den Aktivator von LmxMPK1 zu identifizieren. Normalerweise besteht eine klassische MAP Kinase Kaskade, wie schon beschrieben, aus drei Kernelementen: den MAP Kinase Kinase Kinasen (MAPKKK), den MAP Kinase Kinasen (MAPKK) und den MAP Kinasen in der Reihenfolge ihrer Aktivierung. Die ersten MAP Kinase Kaskaden, die Anfang der neunziger Jahre aufgeschlüsselt wurden, fanden ihren Ursprung in der Entdeckung zweier Kinasen, die, durch Insulin stimuliert, das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2) phosphorylierten, daher auch die Bezeichnung MAP-Kinase (Ray und Sturgill, 1987). Später wurde der Name dieser Kinasen in anbetracht der Tatsache, dass sie in vielen Zelltypen durch Mitogene und Wachstumsfaktoren aktiviert werden, in Mitogen-aktivierte

Proteinkinasen geändert. Bei diesen Kinasen handelt es sich um die bis heute am besten untersuchten und meistzitierten MAP-Kinasen, ERK1 und ERK2, die 83% Sequenzidentität untereinander aufweisen. Wenig später entdeckte man, dass diese Kinasen durch zweifache Phosphorylierung an einem Threonin- und einem Tyrosinrest phosphoryliert werden (Anderson et al., 1990), katalysiert durch sogenannte dual-spezifische MAP Kinase Kinasen, in diesem Fall MEK1 und 2 (MAP Kinase/ERK Kinase1/2; Ahn et al., 1991; Gomez und Cohen, 1991). Bis zum heutigen Tag sind viele dieser klassischen Kaskaden in diversen Organismen von der Hefe bis zum Menschen aufgedeckt worden. So werden die MAP Kinase Kaskaden in höheren Eukaryoten in drei verschiedene Hauptgruppen eingeteilt: Zum einen die ERK-Gruppe, die aus der MAPKKK Raf, den MAPKK MEK1 und 2 sowie ERK1 und 2 besteht, zum anderen die p38-Gruppe, zusammengesetzt aus TAK/ASK/TAO, MEK3, 4 und 6 auf der Stufe der MAPKKs und den vier p38-Kinasen (Hommes et al., 2003). Die dritte Gruppe wird von MEKK1 bis 4, MEK4 und 7 sowie den JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinases/Stress-activated protein kinases) gebildet. Zusätzlich gibt es auch noch eine klassische Kaskade, die über ERK5 verläuft, sowie einige andere MAP-Kinasen, die entweder nicht in klassische Kaskaden eingebunden sind, oder noch nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, wie z.B. ERK7 und ERK8, die sich scheinbar selbst aktivieren, oder MAK (Male germ cell-associated Kinase; Abe et al., 2001; Abe et al., 2002; Klevernic et al., 2006; Chen et al., 2001). Insgesamt wurden bisher 22 Säuger-MAP-Kinasen identifiziert, dem gegenüber stehen 7 bereits identifizierte MAPKKs (Pearson et al., 2001). Wie die MAP-Kinasen werden auch MAPKKs durch Phosphorylierung an zwei Resten in der Aktivierungsschleife zwischen Subdomäne VII und VIII aktiviert (Alessi et al., 1994; Zheng und Guan, 1993). Im Gegensatz zu den MAP Kinasen handelt es sich bei den beiden Resten allerdings um Serin- bzw. Threoninreste in einem S/T-X-X-S/T-Motiv und jede Phosphorylierung für sich reicht schon für eine partielle Aktivierung der Kinase aus. Ebenfalls unterscheiden sich MAPKK von ihren Substraten, den MAP Kinasen dadurch, dass sie sich durch Mutation der Phosphorylierungsstellen zu negativ geladenen Aminosäuren (Aspartat und Glutamat) konstitutiv aktivieren lassen (Mansour et al., 1996; Whalen et al., 1997).

MAPKKs besitzen im Gegensatz zu den meisten anderen Proteinkinasen eine sehr hohe Substratspezifität. Außer den ihnen untergeordneten MAP-Kinasen phosphorylieren sie so gut wie keine anderen zellulären Proteine (Nishida und Gotoh, 1993; Chen *et al.*, 2001). Für die MAPKK MEK1 und 2 wurde beispielsweise eine Auswahl an Proteinen und Peptiden getestet, um mögliche *in vitro*-Substrate für Aktivitätstests zu identifizieren, jedoch ohne Erfolg (Seger *et al.*, 1992). Für MEK4 allerdings konnte gezeigt werden, dass sie wenigstens ein Protein phosphoryliert, welches keine MAP Kinase ist (Lee *et al.*, 2000), was darauf schließen lässt, dass auch andere MAPKK evtl. noch andere Substrate besitzen. Interessanterweise phosphorylieren die meisten MAPKK höherer Eukaryoten keine artifiziellen Substratproteine wie z.B. Myelin basisches Protein (MBP), welches ein Standardsubstrat für den Aktivitätstest mit MAP Kinasen ist (Zheng und Guan, 1993). Meist wird die Aktivierung der MEKs durch respektive Aktivierung und MBP-Phosphorylierung der zugehörigen MAP Kinase gezeigt. Dagegen konnte gezeigt werden, dass rekombinant exprimierte Pflanzen MAPKK, wie z.B. ZmMEK1 aus *Zea mays* und NtMEK1 aus *Nicotiana tabacum* auch MBP phosphorylieren können (Hardin und Wolniak, 1998; Calderini *et al.*, 2001). Die Pflanzen-MAPKK weisen wie auch die meisten MAPKK aus *Leishmania* eine um zwei Aminosäuren verlängerte Konsensussequenz in der Aktivierungsschleife auf (S/T-X-X-X-X-X-S/T). Möglicherweise verändert sich das Substratspektrum der Enzyme durch diesen Unterschied, da die Subdomäne VIII der MAPKK normalerweise auch an der Substraterkennung beteiligt ist. Interessanterweise gibt es in *Leishmania* auch MAPKK wie z.B. LmxPK4, die auch ohne eine "gain of function"-Mutation der Phosphorylierungsstellen bereits in rekombinanter Form aktiv sind, während andere, wie z.B. LmxMKK in ihrer Wt-Form keinerlei Aktivität zeigen (Kuhn, 2004; Scholz, 2003; Wiese *et al.*, 2003).

Um den Aktivator einer MAP-Kinase zu identifizieren, gibt es nur wenige Möglichkeiten. So kann z.B. versucht werden, eine Aktivierung einer markierten oder an ein festes Material gebundenen MAP-Kinase durch Präinkubation mit Zelllysaten zu erreichen. Meist müssen diese zuvor einem Stimulus ausgesetzt werden, der bekannt sein muss, damit die im Lysat enthaltenen MAPKK aktiviert werden. Im Anschluss an die Präinkubation wäscht man das Lysat von der MAP Kinase und testet nun deren Aktivität z.B. gegenüber MBP. Findet man eine Aktivierung vor, kann man nun beginnen das Zelllysat zu fraktionieren und den Aktivierungstest mit den einzelnen Fraktionen zu wiederholen, so lange bis man eine distinkte Aktivatorkinase findet. Mit diesem Ansatz wurde z.B. erfolgreich der Aktivator von ERK2 identifiziert (Nakielny *et al.*, 1992). Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies auch für LmxMPK1 versucht, allerdings ohne Erfolg. Möglicherweise fehlte ein bestimmter Stimulus um im Lysat eine aktive MAPKK zu erhalten (nicht gezeigt).

Ein weiterer Ansatz, einen Aktivator zu finden besteht darin, bekannte und vorhandene MAPKK oder andere Kinasen auf ihre Fähigkeit, die MAP-Kinase zu aktivieren bzw. zu phosphorylieren, zu testen. Dieser Ansatz wurde im Rahmen dieser Arbeit verfolgt.

5.2.1 Test verschiedener bereits vorliegender putativer Aktivatoren

Wie bereits unter 4.3.1 beschrieben waren zu Beginn der Arbeit einige putative Aktivatorkinasen in unserem Labor bereits identifiziert, kloniert und teilweise auch schon untersucht worden. Zur Untersuchung standen die drei putativen MAPKK LmxMKK, LmxPK4 und LmxPK2 zur Verfügung. Darüber hinaus lagen zwei weitere Kinasen vor, die bei einer

Suche nach MAPKK mittels degenerierter Oligonukleotide identifiziert worden waren, die in einer aktuellen Studie jedoch als potentielle Calcium-/Calmodulin-regulierte Kinasen (CRK) eingestuft wurden (Parsons et al., 2005). Dabei handelt es sich um die Kinasen LmxPK1 und LmxPK3. Die beiden MAPKK LmxPK4 und LmxMKK waren bereits recht gut charakterisiert und untersucht worden. So zeigte LmxPK4 bereits in ihrer Wt-Form Phosphorylierungsaktivität gegenüber MBP und war bereits als möglicher Aktivator von LmxMPK9 diskutiert worden (Kuhn und Wiese, 2005; Kuhn, 2004). LmxMKK hingegen zeigte nur in einer konstitutiv aktivierten Form (Mut2) Aktivität. Hier war eine Region aus konstitutiv aktivierter Maus-MKK1 in die Aktivierungsschleife eingefügt worden (Mansour et al., 1996; Wiese et al., 2003a). LmxMKK war bereits erfolgreich als Aktivator von LmxMPK3 identifiziert worden; beiden Kinasen wird eine Rolle bei der Flagellenmorphogenese zugeschrieben (Erdmann et al., 2006). Für LmxPK2 lag neben Wt-Konstrukten ebenfalls eine wie oben hergestellte konstitutiv aktivierte Mutante (Mut2) vor, diese Kinase war aber bisher nicht weiter untersucht worden. In Aktivitätstests zeigte sich, dass hier ebenfalls nur die konstitutiv aktivierte Mutante in der Lage war, starke Auto- und MBP-Phosphorylierung durchzuführen. Auch LmxPK1 und PK3 waren zuvor nicht untersucht worden und wurden hier zum ersten Mal auf ihre Aktivität getestet.

In der Proteinexpression und Aufreinigung als GST-Fusionsprotein zeigten sich für alle fünf Kinasen große Unterschiede: LmxMKKMut2 sowie LmxPK4 ließen sich in großer Menge und relativ sauber aufreinigen während LmxPK1 und 3 auch in relativ großer Menge aufgereinigt wurden, jedoch viele weitere Proteinbanden in den Eluaten aufwiesen. Dabei kann es sich sowohl um Abbauprodukte als auch um mögliche vorzeitige Kettenabbruchprodukte bei der Proteinexpression handeln, die aufgrund des N-terminalen GST-Tags ebenfalls mit aufgereinigt wurden. Bei der Proteinexpression von Leishmanien-Proteinen in E. coli kommt es häufig zu Kettenabbrüchen, da viele Leishmanien-Gene im Gegensatz zu Genen anderer Organismen sehr GC-reich sind, also häufig die Basen Guanin und Cytosin enthalten. Bei der Proteinexpression in E. coli kann es dann passieren, dass bestimmte tRNAs nicht in ausreichender Menge vorhanden sind und es daher zum vorzeitigen Kettenabbruch der Proteinsynthese kommt. Zum Teil kann man diese Problematik durch Verwendung bestimmter E. coli-Stämme umgehen. LmxPK2Mut2 hingegen war im Eluat nur in sehr geringer Menge vorhanden, dafür aber relativ sauber. Hier handelt es sich allerdings um ein sehr großes Protein (mit GST: 146 kD). Große Proteine lassen sich erfahrungsgemäß eher schlecht exprimieren und aufreinigen, da es neben den erwähnten Kettenabbrüchen auch zu falschen Faltungen und Abbau kommen kann und die Proteine oft nicht oder nur schlecht löslich sind.

Im zunächst durchgeführten Kinase-Test mit MBP als Substrat zeigten die beiden bereits charakterisierten Kinasen LmxPK4 und LmxMKKMut2 wie erwartet starke Auto- und Substratphosphorylierungsaktivität, wie auch LmxPK2Mut2, die trotz geringer Proteinmenge eine sehr starke Auto- und eine gute MBP-Phosphorylierung aufwies. LmxPK3 zeigte unter den für MAPKK gewählten Bedingungen ebenfalls gute Aktivität, obwohl es sich laut Parsons *et al.* (2005) hier um eine Calcium-/Calmodulin-abhängige Kinase handeln sollte. LmxPK1 zeigte als einzige Kinase keine Aktivität. Eine leichte Autophosphorylierung ist zu erkennen, allerdings lag auch nach langer Expositionszeit eines Films keinerlei MBP-Phosphorylierung vor. Diese Kinase wurde daraufhin gemeinsam mit LmxPK3 auch noch einmal unter für Calcium-/Calmodulin-abhängige Kinasen geeigneten Bedingungen getestet. Auch hier zeigte sie allerdings keine Aktivität, während LmxPK3 aktiv war. Dies kann allerdings auch daran liegen, dass in dem zugehörigen Puffer auch Mg²⁺-Ionen vorlagen, so dass es sich bei LmxPK3 möglicherweise doch um eine MAPKK handelt.

Zur Untersuchung der putativen Aktivatoren auf ihre Fähigkeit, LmxMPK1 zu aktivieren, gab es nun zwei verschiedene Möglichkeiten. Zum einen wurden die Aktivatoren mit LmxMPK1Wt präinkubiert und anschließend deren Fähigkeit, MBP zu phosphorylieren im Vergleich mit einer ohne Aktivator präinkubierten LmxMPK1Wt getestet. Zum anderen wurde untersucht, ob die Aktivatoren in der Lage waren, die inaktive Mutante LmxMPK1K43M zu phosphorylieren. Im Aktivierungstest mit rekombinanter LmxMPK1Wt zeigte keine der getesteten Kinasen eine potentielle Aktivatorfunktion. Einzig in Kombination mit LmxPK4 zeigte sich eine leichte Verstärkung der MBP-Phosphorylierung; im Falle einer echten Aktivierung wird die Aktivität allerdings um mindestens das 30-fache (Erdmann *et al.*, 2006) aber teilweise auch bis zu 1000-fach (Khokhlatchev *et al.*, 1997; Robbins *et al.*, 1993) gesteigert.

Auch im Phosphorylierungstest mit inaktiver LmxMPK1K43M ließ sich keine signifikante Phosphorylierung durch eine der getesteten Aktivatorkinasen nachweisen, was dafür spricht, dass keine der getesteten Kinasen LmxMPK1 aktiviert. Eine Ausnahme stellt LmxPK1 dar, die überhaupt keine Aktivität zeigte und daher noch näher untersucht werden muss.

5.2.2 Identifikation neuer putativer MAPKKs aus *L. mexicana*

Da keine der bereits vorliegenden MAPKK aus *L. mexicana* in der Lage war, LmxMPK1Wt zu aktivieren, wurde nach neuen putativen MAPKK gesucht. Parsons *et al.* beschreiben in ihrer Veröffentlichung drei weitere putative MAPKK-Homologe in *L. major* mit den zugehörigen Genen LmjF36.0860, LmjF32.1020 uns LmjF07.0250. Basierend auf konservierten Regionen der *L. major*-Sequenzen wurden Sonden erstellt, mit denen einen gDNA-Phagenbank von *L.*

mexicana durchsucht wurde, da das *L. mexicana*-Genomprojekt zu diesem Zeitpunkt noch nicht weit fortgeschritten war. Alle drei Gene konnten identifiziert und subkloniert werden.

Die Proteinsequenzen der drei neuen MAPKKs weisen vor allem zu Kinasen aus den anderen Trypanosomatiden hohe Homologie von 60 bis über 90% auch außerhalb der Kinase-Domäne auf. Im Vergleich mit MAPKK aus anderen Organismen findet sich nur Homologie in der Kinase-Domäne. Während die Sequenzen der katalytischen Domänen von bestimmten MAPKK aus Mensch, Ratte oder *Drosophila* eine 70-90%-ige Identität ihre Aminosäuren untereinander aufweisen (Li *et al.*, 1996), liegt diese für alle drei neuen MAPKKs aus *L. mexicana* nur bei 27-ca. 40%. Auch die bereits untersuchten MAPKK LmxPK4 und LmxMKK weisen nur 30-40% Homologie in ihrer Kinase-Domäne zu MAPKK anderer Organismen auf, was drauf hindeutet, dass sich die Trypanosomatiden-MAPKK schon zu einem frühen evolutionären Zeitpunkt von gemeinsamen Vorläuferproteinen abgespalten haben.

LmxPK5 ist von den drei neuen MAPKK mit 58 kD das kleinste Protein. Sie besitzt eine klassische katalytische Domäne, die alle bekannten Eigenschaften einer MAPKK aufweist (siehe 4.3.2.1) und einen circa 200 Aminosäuren umfassenden C-terminalen Bereich, für den bisher keine Funktion bekannt ist. Die Kinase-Domäne beginnt bei Aminosäure (As) 59, kurz darauf folgt der in Kinasen hoch konservierte so genannte Phosphatanker, eine glycinreiche Region (G-X-G-X-X-G; bei LmxPK5: G-K-G-S-S-G), die an der ATP-Bindung beteiligt ist. Subdomäne II weist an Position 88 einen invarianten Lysinrest auf, der essentiell für die Phosphatübertragung ist (Matte et al., 1998; Hanks et al., 1988). Auch die klassische Aktivierungsstelle ist in LmxPK5 vorhanden, hier findet sich die Sequenz S-S-N-L-E-C-T, die mit den beiden Serinresten sogar drei potentielle Phosphorylierungsstellen aufweist. Eine klassische MAPK Docking-Domäne zur Interaktion mit einer MAP Kinase besitzt LmxPK5 in dem Sinne nicht. Hierbei handelt es sich um eine Abfolge mindestens zweier basischer Reste, die durch einen Spacer von einer bis fünf As getrennt sind von einer L/I/V-X-L/I/V-Sequenz und die sich am äußersten N-terminalen Ende der MAPKK befindet (Bardwell et al., 2001; Jacobs et al., 1999). Bei LmxPK4 findet man hier z.B. die Sequenz K-R-P-Q-A-L-E-K-L-H-V. Bei LmxPK5 finden sich zwar zwei basische Reste, die jedoch durch einen Leucinrest getrennt sind und denen dann sofort das o. g. Motiv nachfolgt (R-L-K-I-N-L).

Die zweite neue MAPKK, LmxPK6, weist ein Molekulargewicht von 89 kD auf und stellt damit schon ein recht großes Protein dar. Hier findet man die geringste Homologie der Aminosäuresequenz aller drei neuen MAPKK zu *T. brucei* und *T. cruzi* (47 bzw. 51%). Zudem weisen die beiden Trypanosomen-Kinasen Signalpeptide auf, die in dem Leishmanien-Protein nicht zu finden sind. Auch LmxPK6 besitzt die klassische KinaseDomäne, hier befindet sie sich jedoch weit am C-terminalen Ende des Proteins. Dem langen N-Terminus (375 As) konnte wie auch dem C-Terminus von LmxPK5 bisher keine Funktion zugesprochen werden. Auch in LmxPK6 findet sich kurz nach Beginn der Kinase-Domäne der Phosphatanker mit der Sequenz G-K-G-T-Q-G sowie der invariante Lysinrest an Position 403. Auch LmxPK6 besitzt keine klassische MAPK Docking-Domäne, hier finden sich zwar zwei basische Reste, die durch einen weiteren Rest von einem Leucin getrennt sind, jedoch fehlt der letzte Teil des Motivs, der zweite hydrophobe Rest, stattdessen findet sich hier ein Threoninrest (K-R-P-L-R-T). Ein weiterer Unterschied zu klassischen MAPKK findet sich bei LmxPK6 in der Aktivierungsschleife, hier findet sich nicht das S/T-X-X-X-X-S/T-Motiv, sondern nur ein einzelner Serinrest. Weiterhin wurde durch Einsatz des PSORT II Servers eine nukleäre Lokalisation vorhergesagt. Normalerweise finden sich MAPKK nicht im Zellkern. Sie phosphorylieren ihre Substrate, die MAP Kinasen, im Cytosol; die aktivierten MAP Kinasen wandern dann oftmals in den Zellkern, um dort z.B. Transkriptionsfaktoren zu aktivieren. Allerdings konnte für GFP (green fluorescent protein)- markierte LmxPK4 eine Lokalisation im Zellkern nachgewiesen werden (Kuhn, 2004).

Die ungewöhnlichste der neuen MAPKK ist LmxPK7. Hier handelt es sich um ein sehr großes Protein, in ihrer vollen Länge besitzt diese Kinase ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 190 kD. In den anderen Leishmania-Spezies findet man Homologe, die eine relativ hohe Sequenzidentität aufweisen. In den beiden Trypanosomen-Spezies jedoch existieren zwar auch Orthologe, diese besitzen jedoch nur ein Molekulargewicht von jeweils ca. 80 kD. LmxPK7 weist in ihrer Kinase-Domäne fast alle typischen MAPKK-Motive auf. So findet man bei As 1420 ein typisches Serin/Threonin-Kinase-Motiv (DIKPGN) und nach dem konservierten DFG-Motiv eine putative Aktivierungssequenz (SQRCDS). Anschließend folgt normalerweise ein weiteres Motiv, dass die Klassifizierung in Serin/Threonin-Kinasen oder Tyrosinkinasen erlaubt (G-T/S-X-X-Y/F-X-A-P-E bei Serin/Threoninkinasen, P-I/V-K/R-W-T/M-A-P-E; Hanks et al., 1988). Dieses Motiv findet sich bei LmxPK7 erst nach einem Einschub von ca. 150 As (G-T-D-K-Y-M-S-P-E), was darauf hindeuten kann, dass es sich bei LmxPK7 um ein nicht funktionelles Protein handelt. Möglicherweise hatten die Trypanosomatiden ein gemeinsames Vorläuferprotein, in welchem in den Leishmania-Spezies -- auch in der Kinase-Domäne- Insertionen stattgefunden haben, was den starken Größenunterschied erklären würde (siehe auch 9.3.5).

Nun wurden die drei neuen MAPKK (bei LmxPK7 nur die Kinase-Domäne) rekombinant in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Im Eluat von LmxPK5 liegt auch ein Protein der richtigen Größe in relativ guter Ausbeute vor, bei LmxPK6 stellte sich ein ähnliches Problem wie bei LmxPK2. Auch hier handelt es sich um ein recht großes Protein, was meist nur schlecht in

löslicher Form exprimiert wird. Zudem scheint es hier auch zu Abbau oder vorzeitigem Kettenabbruch gekommen zu sein, da einige andere, kleinere Proteinbanden zu erkennen sind. LmxPK7C-term konnte als 6xHis-Protein gar nicht und als Strep-Fusionsprotein nur in sehr geringer Menge, dafür aber recht sauber aufgereinigt werden. Im Kinase-Aktivitätstest mit MBP zeigte LmxPK5 als einzige der drei Kinasen eine relativ starke Autophosphorylierung sowie eine gute MBP-Phosphorylierung, LmxPK6 wies ebenso wie LmxPK7C-term keine Aktivität auf. Auch eine aktivierte Form der LmxPK6 (Mut2), die nach demselben Prinzip wie die aktivierten Formen von LmxMKK und LmxPK2 hergestellt worden war, zeigte keinerlei Aktivität. In Kombination mit der inaktiven K43M-Mutante von LmxMPK1 zeigte sich auch keine Phosphorylierung, so dass zumindest LmxPK5 auch sehr wahrscheinlich als Aktivator von LmxMPK1 ausgeschlossen werden kann.

Für LmxPK7 ist fraglich, ob es sich um eine funktionelle Kinase handelt. LmxPK6 muss noch weiter untersucht werden, möglicherweise kann die Kinase auf eine andere Weise aktiviert werden. Deletionsmutanten in *L. mexicana* könnten ebenfalls Aufschluss über mögliche Funktionen der Proteine geben.

Ein Alignment der Kinase-Domänen aller bisher bekannten und hier untersuchten MAPKKs wurde angefertigt und zeigte einige erstaunliche Gegebenheiten auf (siehe 9.3.2). So besitzt die inaktive Kinase LmxPK1 keine Phosphatankersequenz (G-X-G-X-X-G), was ein Grund für die fehlende Aktivität darstellen könnte. Auch LmxPK6 und LmxPK7 zeigen relativ große Unterschiede zu den anderen MAPKK und zeichnen sich (hier vor allem LmxPK7) durch große Insertionen in der Kinase-Domäne aus. Untersucht man die Ähnlichkeit der verschiedenen MAPKK untereinander so steht LmxPK6 außen vor, sie besitzt am wenigsten Ähnlichkeit zu den anderen Kinasen. Gruppen werden gebildet von LmxMKK und PK7, LmxPK5 und PK4 so wie –wie erwartet-LmxPK1 und PK3. LmxPK2 bildet mit den beiden letztgenannten eine Untergruppe, steht in dieser aber allein da.

5.2.3 Aktivatortest mit zwei anderen, Zellzyklus-regulierenden Kinasen

Wie bereits beschrieben, zeigt eine LmxMPK1-Deletionsmutante sowohl in Pro- als auch in Amastigoten starke Proliferationsdefekte. In Amastigoten ist in Abwesenheit der Kinase überhaupt keine Proliferation mehr möglich. Da Promastigote auch in Abwesenheit von LmxMPK1 überleben können, sich aber deutlich schlechter teilen, gibt es in diesem Lebensstadium wahrscheinlich noch eine oder mehrere andere Kinasen, die die Aufgaben von LmxMPK1 zumindest teilweise übernehmen können. So konnte z.B. auch für eine Deletionsmutante von ERK1 in Mäusen gezeigt werden, dass das Fehlen von ERK1 außer geringen Auswirkungen auf die Proliferation von Thymocyten keine Folgen hat, so dass man vermuten kann, dass viele Aufgaben, von ERK1 in diesem Fall auch von ERK2 übernommen werden können (Pages *et al.*, 1999). Zudem besitzen selbst MAP Kinasen aus verschiedenen Untergruppen wie z.B. ERK2 und p38 gemeinsame Substrate wie z.B. den Transkriptionsfaktor Pax6 (Walther und Gruss, 1991; Mikkola *et al.*, 1999).

Im Rahmen der Proliferation spielt natürlich der Zellzyklus eine entscheidende Rolle. Der Zellzyklus, der sich in verschiedene Phasen unterteilt, wird in proliferierenden Zellen nach jeder Teilung erneut durchlaufen. Nach jeder Mitose, der Teilung der zwei Tochterzellen, entscheidet sich aufs neue, ob die Zelle nach der Neubildung aller wichtigen Zellbestandteile und Organellen in der G₁-Phase in eine Ruhephase genannt G₀, übergeht oder sich erneut teilt. Im Falle einer Teilung geht die Zelle in die S (Synthese)-Phase über, in der die DNA verdoppelt wird. In der G₂-Phase wird die Zelle dann schließlich auf die Mitose vorbereitet und zellteilungsspezifische Proteine werden synthetisiert, bevor die neu entstandenen Tochterzellen sich während der M (Mitose)-Phase trennen. Am Fortschreiten des Zellzyklus sind viele verschiedene Proteinkinasen beteiligt. Eine wichtige Rolle spielen in höheren Eukaryoten z.B. die zyklinabhängigen Kinasen (Cyclin dependent kinases; cdks), die mit ihren Liganden, den Zyklinen die verschiedenen Phasen des Zellzyklus regulieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Zellzyklus-regulierende Kinasen aus *L. mexicana* auf ihre Fähigkeit, LmxMPK1 zu phosphorylieren überprüft. Dabei handelt es sich zum einen um eine Polo-Kinase. Polo-Kinasen wurden zuerst in *Drosophila melanogaster* entdeckt (Carmena *et al.*, 1998), wo sie eine Rolle bei mitotischen Prozessen spielen. Es wurden Mutanten identifiziert, die Defekte an ihren Spindelpolen aufwiesen und die daher nach den magnetischen Polen der Erde oder geomagnetischen Phänomenen, die mit den Polen assoziiert sind benannt wurden (Polo, Aurora; van de Weerdt und Medema, 2006). Zum anderen wurde die LmxCRK3-Kinase eingesetzt. Hier handelt es sich um eine Kinase, die Ähnlichkeit zu den oben erwähnten zyklinabhängigen Kinasen hat (CRK3: cdc2 related kinase 3). Diese Kinase ist wahrscheinlich aktiv am Übergang der Zellen von der G₂-Phase zur Mitose beteiligt (Hassan *et al.*, 2001) und essentiell für beide Lebensstadien der Leishmanien. Blockiert man diese Kinase mithilfe eines spezifischen Inhibitors, so findet man einen Block im Zellzyklus. Alle Zellen befinden sich nach einer gewissen Zeit in der G₂-Phase, was man durch eine Analyse des DNA-Gehalts mittels FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) herausfinden kann.

Beide Kinasen zeigten sich im Kinase-Test gegenüber MBP aktiv. Diese beiden Kinasen wurden nun wie oben erläutert in einen Assay mit rekombinanter LmxMPK1Wt sowie der inaktiven K43M-Mutante eingesetzt. LmxPolo ist nicht in der Lage, die inaktive K43M-Mutante von LmxMPK1 zu phosphorylieren, auch zeigt sie keine Verstärkung der Aktivität

von LmxMPK1Wt. LmxCRK3 zeigt ebenfalls keine Phosphorylierung von LmxMPK1K43M. Außerdem wurde getestet, ob LmxCRK3 in der Lage ist, LmxMPK1Wt zu phosphorylieren, die sich zuvor an Tyrosin autophosphoryliert hat. Hintergrund war die Tatsache, dass kürzlich mit der humanen Intestinalen Zell-Kinase (ICK) eine Kinase identifiziert worden war, die durch Autophosphorylierung an Tyrosin sowie Threonin-Phosphorylierung durch einen Aktivator aktiviert wird (Fu *et al.*, 2005). Leider konnte auch hier keine weitere Phosphorylierung von LmxMPK1Wt durch LmxCRK3 festgestellt werden. Daher können sowohl LmxPolo als auch LmxCRK3 ebenfalls als Aktivatoren von LmxMPK1

5.2.4 Zusätzliche Faktoren und andere Möglichkeiten der Aktivierung von MAP Kinasen

5.2.4.1 Gerüst- (Scaffold-) Proteine und MAP Kinase-Kaskaden

MAP Kinase-Kaskaden oder - Module setzen sich wie beschrieben aus drei sich sequenziell aktivierenden Enzymen in der Reihenfolge MAPKKK, MAPKK und MAPK zusammen. Dabei ist es möglich, dass die Interaktion innerhalb eines solchen Moduls sich auf einen reinen binären Austauch von Phosphat zwischen je zwei Molekülen beschränkt. Alternativ dazu kann es aber auch sein, dass die Kaskaden räumlich und zeitlich durch ein Gerüstprotein, das mit allen drei Kinasen interagiert, koordiniert werden. Anhand künstlicher Gerüstproteine konnte gezeigt werden, dass diese in der Lage sind, Signalweiterleitung durch ein MAP Kinase-Modul zu ermöglichen (Harris et al., 2001; Park et al., 2003). Anhand mathematischer Modelle wurde gezeigt, dass Gerüstproteine es vermögen, komplexe kinetische Reaktionsmechanismen auf MAP Kinase-Kaskaden zu übertragen (Ferrell, Jr., 2000), darüber hinaus kann mittels solcher Komplexe Aktivierung durch irrelevante Stimuli unterdrückt werden. Für S. cerevisiae ist z.B. das Gerüstprotein Ste5 essentiell für die Funktionalität des Moduls, welches für die sexuelle Reproduktion des Organismus ("mating") verantwortlich ist (Bardwell et al., 2001). In höheren Eukaryoten ist das Gerüstprotein KSR (kinase suppressor of Ras) verantwortlich für die korrekte Weiterleitung und Regulation der ERK-MAPK-Kaskaden (Morrison und Davis, 2003). Interessant dabei ist, dass das KSR-Protein eine Domäne enthält, die mit nur wenigen Unterschieden einer Kinase-Domäne entspricht, so dass zunächst auch eine entsprechende Aktivität vermutet wurde. KSR besitzt aber nicht den konservierten Lysinrest (s.o.), der für eine Kinase-Aktivität essentiell ist (Muller et al., 2000; Ohmachi et al., 2002). Ein anderes Protein, welches sowohl Kinase-Aktivität besitzt als auch als Gerüstprotein dient, ist die 195 kD große MAPKKK MEKK1. Wie z.B. auch LmxPK7 besitzt dieses Protein eine sehr lange N-terminale Domäne, die keine katalytische Funktion hat, sondern für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist (Xu et al., 1995). Daher ist es auch möglich, dass die beiden neuen potentiellen MAPKK LmxPK6 und LmxPK7 gar keine Funktion als MAPKK besitzen, sondern andere Aufgaben,
möglicherweise auch die eines Gerüstproteins, ausüben. Außerdem wäre es auch möglich, dass LmxMPK1 zur Aktivierung solch eine spezifische Interaktion mit einem Gerüstprotein benötigt. Bisher war es allerdings immer möglich, die Interaktion zwischen einer MAPKK und ihrer zugehörigen MAPK durch Phosphorylierung *in vitro* zu zeigen, was dafür spricht, das tatsächlich keine der getesteten Aktivatorkinasen die zu LmxMPK1 gehörige MAPKK darstellt. Es wäre aber sicher interessant und hilfreich, auch in *Leishmania* nach solchen Gerüstproteinen zu suchen, um dann z.B. über Präzipitation von Immunkomplexen an neue Komponenten der MAPK Kaskaden zu gelangen.

5.2.4.2 Ungewöhnliche, MAPK-ähnliche MAPK Kaskaden

Eine andere Möglichkeit, einen Aktivator für LmxMPK1 zu finden besteht darin, an anderer Stelle als unter den MAPKK zu suchen. Sucht man nach Sequenzhomologien zwischen LmxMPK1 und Kinasen höherer Eukaryoten, taucht zum Beispiel als nächst verwandter Nachbar aus dem Spektrum der humanen MAP Kinasen die Kinase ERK8 (48% Homologie) auf, die bereits weiter oben diskutiert wurde. Diese Kinase scheint keinen Aktivator zu besitzen und sich stattdessen durch Autophosphorylierung am Threonin- und Tyrosinrest des konservierten TXY-Motivs selbst zu aktivieren (Klevernic et al., 2006). Vermutlich wird die Aktivität dieser Kinase ausschließlich durch spezifische Phosphatasen reguliert, die sie inaktivieren können. LmxMPK1 phosphoryliert sich ebenfalls selbst, wenn auch scheinbar nur an Tyrosin. Zudem scheint diese Autophosphorylierung in vivo keine Rolle zu spielen. Um eine mögliche Autoaktivierung aber vollständig auszuschließen, sind weitere Studien notwendig. Darüber hinaus gibt es auch noch mit den MAP Kinasen verwandte Kinasen, die ebenfalls als MAP Kinasen klassifiziert werden, wie z.B. die Male germ cell associated kinase (MAK), die MAK related kinase (MRK), die Kinase MOK (MAPK/MAK/MRK overlapping kinase) oder die KKIALRE- und die KKIAMRE-Kinasen (Miyata und Nishida, 1999). Viele dieser Kinasen weisen sowohl Eigenschaften von MAP Kinasen als auch von Zellzyklus-regulierenden Kinasen auf. MAK und MRK, wie auch KKIALRE und KKAIMRE weisen in ihrer Aktivierungsschleife ebenso wie LmxMPK1 das Motiv TDY auf, welches sonst in keiner anderen klassischen MAP Kinase höherer Eukaryoten vorkommt. Zudem scheinen einige dieser Kinasen eine Rolle bei der Regulierung des Zellzyklus zu spielen, was möglicherweise auch auf LmxMPK1 zutreffen könnte. Als Aktivatoren wurden hier zum Beispiel die Kinase CAK (CDK activating kinase) für MAK/ICK sowie CCRK (cell cyclerelated kinase) für MRK identifiziert, außerdem scheint eine Autophosphorylierung an Tyrosin in beiden Kinasen eine Rolle zu spielen (Fu et al., 2005; Fu et al., 2006). Höchste Homologie zu diesen ungewöhnlichen Kinasen besitzt allerdings nicht LmxMPK1 sondern die drei L. mexicana MAP Kinasen LmxMPK9, LmxMPK13 und LmxMPK14 (Wiese, 2007).

Am sinnvollsten wäre es sicher in diesem Fall, ein System zu etablieren, welches z.B. unter Zuhilfenahme von Immunpräzipitation und nachfolgendem Kinase-Aktivitätstest erlaubt, LmxMPK1 aus verschiedenen Lebens- und Zellzyklusstadien des Parasits aufzureinigen und auf Aktivität zu testen. Kann man die Aktivität dann auf einen bestimmten Zeitraum oder ein Lebensstadium einschränken, sollte noch einmal versucht werden, die rekombinante Kinase mithilfe von Lysaten zu aktivieren, um dann über Fraktionierung der Lysate den Aktivator zu identifizieren.

5.3 Die Suche nach Substraten von LmxMPK1

Um Substrate von Kinasen im Allgemeinen wie auch von MAP Kinasen im Speziellen zu identifizieren, wurden bis zum heutigen Tag viele verschiedene Methoden beschrieben und mit mehr oder weniger Erfolg angewandt.

Zu den "klassischen" Identifikationstechniken gehört in Modellorganismen ein so genanntes "genetisches Screening". Hier sucht man nach Mutanten, die ähnliche Phänotypen aufweisen, bestimmt dann die Ursache des Phänotyps und versucht die Beobachtungen miteinander in Einklang zu bringen. So konnte z.B. in S. cerevisiae ein kompletter Signalweg, der von einem Pheromonsignal an der Zelloberfläche bis zu dem Transkriptionsfaktor Ste12p reicht, erfolgreich aufgeklärt werden (Sprague, 1991). Eine andere klassische und häufig angewandte Methode zur Identifikation von miteinander interagierenden Proteinen ist das "Yeast two-hybrid screening" (Yang et al., 1992). Diese Methode wurde in unserem Labor vor Beginn dieser Arbeit bereits auf LmxMPK1 angewandt und führte zur Identifikation möglicher Substratproteine, deren Interaktion mit LmxMPK1 bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte (Wiese und Mitarbeiter, unveröffentlicht). Die Interaktion von Kinasen mit ihren Substraten ist oft sehr transient, was eine Methode wie die oben genannte deutlich erschwert. und oft dazu führt, dass falsch-Positive identifiziert werden (Manning und Cantley, 2002). Ähnliches gilt auch für in vivo-Methoden, bei denen versucht wird, die Kinase im Komplex mit ihrem Substrat zu Co-immunopräzipitieren oder aufzureinigen (Rigaut et al., 1999). Zusätzlich erschwert sich die Situation, wenn -wie häufig bei MAP Kinase-Kaskaden-Gerüstproteine involviert sind, ohne die eine Interaktion oft nur schwach ist.

In früheren Studien wurden oft die Phosphorylierungsstellen in bestimmten Proteinen identifiziert und erst anschließend die für die Phosphorylierung verantwortliche Kinase gesucht. Meist erfolgte dies wie unter 5.2 erläutert mit Zelllysaten, die fraktioniert und auf Aktivität getestet wurden (Blenis *et al.*, 1987; Jeno *et al.*, 1989). Ein Problem hierbei stellt die Komplexität dieses Ansatzes dar. In den Lysaten sind viele, zum großen Teil aktive Kinasen vorhanden, die sich selbst und andere Proteine phosphorylieren, so dass es zu einem hohen Hintergrund kommt. Durch Anwendung bestimmter Bedingungen wie z.B. Variation der

Menge an radioaktiv markiertem ATP oder der Ionenkonzentrationen und Zusammensetzung des Reaktionspuffers konnten einige dieser Probleme umgangen werden (Knebel *et al.*, 2001). Daher wurde diese Methode auch im Rahmen dieser Arbeit (siehe 4.4.3) unter Anwendung der ebenfalls bestimmten optimalen Reaktionsbedingungen für LmxMPK1 (siehe 4.2.3.2) angewandt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die von Knebel *et al.* beschriebenen Bedingungen tatsächlich zu Verbesserungen führten. Allerdings war der Hintergrund in den Proben ohne zugesetzte LmxMPK1 sehr hoch, da die Kinase nicht aktiviert war und erlaubte daher keine massenspektrometrische Analyse der phosphorylierten Proteine. Trotzdem stellt diese Methode eine mittlerweile gut etablierte und zuverlässige Lösung dar, Kinase-Substrate zu identifizieren, allerdings unter der Voraussetzung, dass ein Aktivator bereits identifiziert ist und eine aktivierte Kinase verwendet werden kann (Cohen und Knebel, 2006).

Eine weitere Methode, die im Rahmen dieser Arbeit bei der Substratsuche angewandt wurde und ähnliche Probleme wie oben erläutert beinhaltete, war die Aufreinigung der phosphorylierten Proteine aus L. mexicana Wt und der LmxMPK1-Deletionsmutante jeweils aus Promastigoten und axenischen Amastigoten (siehe 4.4.4). Die aufgereinigten Phosphoproteine wurden dann mittels SDS-PAGE und Silberfärbung (aufgrund der geringen Proteinmenge) analysiert und der Wt mit der Deletionsmutante, in der ja bestimmte Banden nicht mehr vorliegen sollten, verglichen. Hier stellte sich ebenfalls das Problem, dass im Molekulargewichtsbereich zwischen 25 und 80 kD, in dem sich die meisten Proteine befinden, zu viele Proteine übereinander liefen, als dass eine Detektion einzelner Banden möglich gewesen wäre. Oberhalb von 90 kD waren nur noch wenige Proteine detektierbar, es konnten einige Unterschiede zwischen Wt und Deletionsmutante ausgemacht werden. Leider war dann häufig zu wenig Protein für eine massenspektrometrische Identifikation vorhanden, so dass nur wenige Peptide identifiziert werden konnten. Bei den zugehörigen Proteinen handelte es sich in zwei Fällen um hypothetische Proteine unbekannter Funktion. Zudem entsprachen die Proteine in ihren Molekülmassen nicht den analysierten Banden, so dass die Banden nicht endgültig bestimmten Proteinen zugeordnet werden konnten. Hier wäre es sicher sehr hilfreich, mit einer größeren Ausgangsmenge an Protein zu arbeiten und die erhaltenen phosphorylierten Proteine noch weiter z.B. über Ionenaustauscherchromatographie zu fraktionieren oder über 2-D-SDS-PAGE aufzutrennen und die Gele mittels einer speziellen Analyse-Software zu untersuchen (z.B. Nugent et al., 2004).

Darüber hinaus wurden zwei indirekte Methoden, ein Substrat von LmxMPK1 zu identifizieren angewandt. Bei der ersten Methode handelt es sich um eine *in-silico*-Analyse mithilfe des PREDIKIN-Servers. Hier wird anhand der Primärsequenz und der Art einer

Kinase eine Vorhersage für die Zusammensetzung von Phosphorylierungsstellen in möglichen Substraten gemacht (Brinkworth *et al.*, 2003). Eine Datenbanksuche unter Verwendung der erstellten Konsensussequenz ergab verschiedene potentielle Substratproteine von denen eines weiter untersucht wurde.

Der Transkriptionsinitiationsfaktor IID spielt, wie der Name schon sagt, eine Rolle bei der Aktivierung und Regulierung von eukaryotischen Promotoren (Horikoshi *et al.*, 1992). Dabei bindet TFIID an die TATA-DNA-Sequenz und initiiert so den Zusammenbau eines Präinitiationskomplexes, der unter anderem die RNA-Polymerase II beinhaltet (Horikoshi *et al.*, 1990). TFIID enthält zwei TBP- (TATA-Box-Binding) Domänen, die sich in einer "Sattelstruktur" auf die DNA "setzen" können (Jupp *et al.*, 1993). Die Konsensussequenz mitsamt der putativen Phosphorylierungsstelle (N-V-C-S-P-I-R) befindet sich an Position 196 der As-Sequenz, also schon in der TBP-Domäne. Eine Phosphorylierung von TBP, die dessen Fähigkeit, DNA zu binden negativ reguliert, wurde bisher nur in *S. cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* beschrieben (Maldonado und Allende, 1999).

In den Leishmania-Spezies liegt TFIID sehr konserviert vor, die einzelnen Proteine besitzen mehr als 90% Homologie untereinander. Auch Orthologe aus den beiden Trypanosomen-Spezies besitzen noch eine hohe Homologie von mehr als 50% zu LmxTFIID. In anderen Organismen finden sich nur geringe Homologien ausschließlich in den TBP-Domänen zu LmxTFIID, das ähnlichste Protein ist der TFIID des Dinoflagellaten Crypthecodinium cohnii mit 27% Homologie, der sich auch deutlich von den TFIID-Proteinen höherer Eukaryoten unterscheidet (Guillebault et al., 2002). Möglicherweise gab es hier einmal ein gemeinsames Vorläuferprotein, aus welchem sich dann das Protozoen-Protein völlig anders entwickelt hat als die Proteine der höheren Eukarvoten. Auch in höheren Eukarvoten enthalten Promotoren nicht immer eine TATA-Box, sondern besitzen oft ein so genanntes Initiator-Element, welches die Transkriptionsinitiationsstelle umfasst (Patikoglou et al., 1999). In Protisten findet man die klassische TATA-Box nur in Amöben, in Dictyostelium, in Ciliaten und in den Apikomplexa, wie Plasmodium (Wong et al., 1992; Liston and Johnson, 1998; Huang und Bateman, 1995). In den Trypanosomatiden wie auch in den Trichomonaden findet sich dieses Element - wie auch viele andere Elemente der "klassischen" Transkriptionsregulationin diesen Organismen die Genregulation hauptsächlich nicht. da auf der posttranskriptionellen Ebene erfolgt (Clayton, 2002). Trotzdem wurde auch hier ein Initiatorelement identifiziert, welches spezifisch für die jeweilige Gattung ist (Luo et al., 1999); (Quon et al., 1996). Außerdem wurde ein Promoterelement identifiziert, welches die Transkription der SL- (Spliced Leader) Sequenzen kontrolliert, die individuell und nicht als Teil einer polycistronischen Einheit transkribiert werden (Saito et al., 1994).

2004 wurde bereits ein weiteres Ortholog mit einer TBP-Domäne in *T. brucei* identifiziert (Das und Bellofatto, 2003). Dieses Protein, auch als TRF4 bezeichnet, spielt eine umfassende Rolle bei der Transkription durch alle drei RNA-Polymerasen (Ruan *et al.*, 2004). Dabei assoziiert es sowohl mit dem Multi-Untereinheits-Transkriptionsfaktor tSNAP als auch mit dem Transkriptionsfaktor IIA und initiiert die SL-RNA Expression (Das *et al.*, 2005; Schimanski *et al.*, 2005).

LmxTFIID wurde rekombinant als GST-Fusionsprotein exprimert und ließ sich gut aufreinigen. In einem Kinase-Test mit LmxMPK1 zeigte sich eine leichte Phosphorylierung von LmxTFIID durch LmxMPK1, allerdings wies auch ein allein inkubierter TFIID schon eine sehr leichte Phosphorylierung auf. Da über die Rolle von LmxTFIID in Leishmanien nichts bekannt ist, kann weder ausgeschlossen noch bestätigt werden, ob LmxTFIID tatsächlich mehr als nur ein *in vitro*-Substrat von LmxMPK1 ist. Da es sich aber um ein sehr wichtiges Protein handeln muss, da es sehr konserviert über die Trypanosomatiden-Spezies vorliegt und das oben beschriebene Ortholog in *T. brucei*, TRF4, essentiell für den Parasiten ist, kann es gut möglich sein, dass LmxTFIID mit LmxMPK1 interagiert, die ja ebenfalls, zumindest für das amastigote Stadium der Leishmanien, essentiell ist.

Als zweiter indirekter Weg, ein Substrat von LmxMPK1 zu identifizieren, wurde ein Chip untersucht, der Peptide trägt, die Phosphorylierungsstellen der verschiedensten Kinase-Substrate darstellen (Hayashi *et al.*, 2005). Es wurde aus den von LmxMPK1 am besten phosphorylierten Peptiden ein Konsensus erstellt, der der PREDIKIN-Konsensussequenz mit Ausnahme einer Aminosäure ähnelt. Mithilfe dieser Sequenz wurde erneut eine Datenbanksuche durchgeführt. Auch hier wurde eines der identifizierten Proteine weiter untersucht.

Das LmxUP-Protein aus *Leishmania mexicana* ist ein 142,3 kD großes hypothetisches Protein, das konserviert in den Leishmania-Spezies *L. mexicana, L. infantum* und *L. major* vorliegt. Interessant ist, dass hier, wie auch bei LmxPK7, auch in den beiden Trypanosomen-Spezies Orthologe vorliegen, die jedoch nur über bestimmte Sequenzbereiche Homologien zeigen und insgesamt deutlich kleiner sind, als LmxUP. In höheren Eukaryoten gibt es keine homologen Proteine für LmxUP, es handelt sich hier anscheinend um ein Trypanosomatiden-spezifisches Protein. Im Falle dass es sich hier um ein funktionelles Protein handelt, welches eine wichtige Funktion für *Leishmania* besitzt, würde es daher eine ideale Zielstruktur für die medikamentöse Therapie darstellen, da ein gegen dieses Protein gerichteter Wirkstoff wahrscheinlich kein Wirts-Protein direkt beeinflussen würde und die Nebenwirkungen somit gering wären. Die PSORT II-Analyse zeigt eine nukleäre Lokalisation von LmxUP mit 62,5%-iger Wahrscheinlichkeit an. Dies ist umso interessanter, wenn man

das einzige bekannte strukturelle Merkmal von LmxUP mit einbezieht. Das Protein weist von As 761 bis As 792 eine sogenannte "B-Box-Zinkfingerdomäne" auf, wie sie in DNAinteragierenden Proteinen, wie z.B. auch Transkriptionsfaktoren der Embryonalentwicklung in höheren Eukaryoten vorkommt (Borden et al., 1993; Torok und Etkin, 2001). Darüber hinaus konnte eine Andockstelle für Interaktion mit MAP Kinasen identifiziert werden. Eine DEF-"Domäne", die ausschließlich in ERK-Substraten vorkommt und aus dem Sequenzmotiv F-X-F-P besteht, findet sich am C-Terminus von LmxUP (F-L-F-P). In den entsprechenden Transkriptionsfaktoren höherer Eukaryoten (z.B. Elk-1) befindet sich diese Sequenz am Ende einer C-Box, die einige potentielle MAPK-Phosphorylierungsstellen enthält (TP oder SP; Jacobs et al., 1999). In LmxUP findet sich in diesem Bereich nur ein einziges TP-Motiv, außerdem zeigt LmxUP überhaupt keine Homologien zu bekannten Transkriptionsfaktoren. Das ist allerdings nicht verwunderlich, da klassische Transkriptionsfaktoren bisher in Trypanosomatiden nicht identifiziert werden konnten, obwohl z.B. das Leishmania major-Genomprojekt letztes Jahr abgeschlossen wurde (Clayton, 2002). Dieses Motiv findet sich allerdings ebenfalls in dem Gerüstprotein KSR und hier tatsächlich sogar mit einer identischen Sequenz zu LmxUP (F-L-F-P) (Jacobs et al., 1999). Darüber hinaus gibt es mit dem JunB-Protein ein weiteres Protein, welches solche eine Docking-Domäne besitzt aber keine Phosphoakzeptor-Rest stromaufwärts des Motivs (Kallunki et al., 1996). Für dieses Protein wurde eine Rolle bei der Rekrutierung der JNK-MAP Kinasen zu möglichen Substraten diskutiert.

Ein weiteres mögliches Interaktionsmotiv findet sich bei As 70. Hier gibt es mit der Sequenz KDVRELL eine mögliche DEJL- oder auch δ-Domäne. Diese Sequenz dient ebenfalls zur Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit MAP Kinasen und variiert mit ihrer Konsensussequenz K/R-X-X/K/R-K/R-X(1-4)-L/I-X-L/I nur geringfügig von der MAPKK Docking-Domäne, die bereits oben diskutiert wurde. Sie befindet sich in humanem c-Jun auch an ähnlicher Stelle wie in LmxUP, kann aber in anderen Transkriptionsfaktoren auch an völlig anderer Stelle vorliegen (Adler et al., 1992; Kallunki et al., 1996). Allerdings fehlt in LmxUP der variable Rest zwischen den beiden Leucinresten, so dass nicht klar ist, ob es sich hier tatsächlich um das beschriebene Motiv handelt. Die putative Phosphorylierungsstelle für LmxMPK1 liegt bei As 489, die Sequenzabfolge lautet K-R-A-T-S-P, was zum einen nicht der vollen ermittelten Konsensussequenz aus 10 As entspricht und zum anderen eine Variation zum Konsensus aufweist, der anstelle des Threoninrestes ein Isoleucinrest aufweist. Dieser findet sich allerdings in dem L. major-Homolog, welches in der Datenbank mithilfe des Konsensus ermittelt wurde.

Wie erwartet ließ sich LmxUP als GST-Fusionsprotein nicht in großer Menge aufreinigen, da es sich um ein sehr großes Protein handelt. Es sind viele Proteinbanden geringeren Molekulargewichts im Eluat der Aufreinigung vorhanden, bei denen es sich vermutlich um vorzeitige Kettenabbruch- oder Abbauprodukte handelt. Die leichte Phosphorylierung der angenommenen Abbauprodukte von LmxUP durch LmxMPK1 zeigt höchstens, dass das Protein ein mögliches *in vitro*-Substrat von LmxMPK1 sein könnte. Da aber für die phosphorylierten Proteine nicht gezeigt werden konnte, dass es sich tatsächlich um Abbauprodukte handelt ist selbst dies fraglich. So lange über die Funktion von LmxUP nichts bekannt ist und kein Aktivator für LmxMPK1 vorhanden ist, der für eine starke und spezifische Phosphorylierung der Substrate durch LmxMPK1 sorgt, ist keine Aussage darüber möglich, ob es sich bei LmxUP tatsächlich um ein Substratprotein von LmxMPK1 handelt. Über eine Deletionsmutante könnte man z.B. näheres über die Funktion von LmxUP erfahren, zusätzlich könnte man z.B. DNA-Interaktionsstudien durchführen, um zu testen ob die identifizierte Zinkfingerdomäne tatsächlich funktionell ist.

Bei den beiden erläuterten Methoden handelt es sich um relativ unsichere Wege zur Substratfindung. Bei der *in-silico*-Methode gibt es einen großen Unsicherheitsfaktor durch den sehr variablen Konsensus, der als Resultat viele mögliche Substratproteine liefert; außerdem ist dieser hypothetisch, da es sich ja um eine *in silico*-Methode handelt. Unter Verwendung des Peptidchips kann man zumindest sicherer sein, dass es sich bei den möglichen Substratproteinen um *in vitro*-Substrate handelt, denn dass eine präferentielle Phosphorylierung der entsprechenden Peptide tatsächlich vorliegt, hat man in dem Kinase-Test nachgewiesen. Allerdings ist auch hier der Konsensus sehr variabel, so dass man eine Fülle an möglichen Substratproteinen erhält. Bei beiden Methoden muss außerdem berücksichtigt werden, dass sie auf Kinasen höherer Eukaryoten zugeschnitten sind. Daher ist es fraglich, ob auf diesem Weg "echte" Substrate von Leishmanien-Kinasen, die sich teilweise beträchtlich von den humanen Homologen unterscheiden, identifiziert werden können.

Weitere Versuche, die Substrate von LmxMPK1 zu identifizieren, werden in der Zukunft unternommen. Ein viel versprechender Ansatz ist z.B. die Untersuchung der Phosphoproteome aus L. mexicana Wt und der Deletionsmutante mittels Massenspektrometrie (Zhou et al., 2001). So können Proteine, die in der Deletionsmutante nicht unter den phosphorylierten Proteinen vorliegen, identifiziert werden. Ein weiterer Ansatz ist das Untersuchen einer L. mexicana cDNA-Expressionsbibliothek mit aktiver LmxMPK1 (nach Fukanaga und Hunter, 1997). Diese Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls angewandt, allerdings ohne Erfolg. Voraussetzung für diese Methode ist

daher, dass vorher der Aktivator von LmxMPK1 identifiziert wird, um mit einer aktivierten Kinase arbeiten zu können. Zudem bestand Zweifel an der Qualität der vorhandenen cDNA-Klone. Es bestand auch beim Durchsuchen der Bank mit anderen Kinasen der Verdacht, dass zu selten die gesamten offenen Leseraster der Proteine in den Phageninserts vorlagen (Kuhn, 2004), so dass eine neue Expressionsbank in unserem Labor konstruiert werden sollte. Eine weitere, hochspezifische und gut untersuchte Methode, ein Substrat einer bestimmten Kinase in vivo zu identifizieren stellt die Verwendung veränderter, radioaktiver ATP-Analoga (bumped/ "ausgebeulte" ATP-Analoga) sowie einer entsprechend mutierten Kinase (holed/"ausgehöhlte" Kinase) dar (Shah et al., 1997; Habelhah et al., 2001; Eblen et al., 2003). Hier wird eine Kinase, deren Substrat gesucht wird, so mutiert, dass sie nur noch ein entsprechend verändertes ATP-Analogon zur Substratphosphorylierung verwenden kann, welches wiederum von den Wt-Kinasen nicht prozessiert wird. Dabei behält die Kinase trotz der Mutation ihre Funktion und Aktivität. Diese Methode kann sowohl in vivo angewandt werden, wobei sich allerdings das Problem stellt, eine ausreichende Menge an ATP-Analogon in die Zellen zu bringen, als auch in vitro, z.B. mit fraktionierten Lysaten und rekombinanter Kinase. Hier bietet sie den unschätzbaren Vorteil, dass jeglicher Hintergrund, der sonst durch Kinasen aus den Lysaten entsteht, ausgeschlossen werden kann.

Eine interessante Abwandlung dieser Methode stellt die Anwendung spezifischer Inhibitoren in Kombination mit den mutierten Kinasen dar, eine Methode, die im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls angewandt wurde und im Folgenden diskutiert wird.

5.4 Eine inhibitorsensitive Mutante von LmxMPK1

Zur weiteren Untersuchung der Funktion von LmxMPK1 in Leishmanien sowie zur Etablierung eines induzierbaren Systems zur Ausschaltung spezifischer Kinasen in vivo wurde eine inhibitorsensitive Mutante von LmxMPK1 konstruiert. Diese Methode wurde erstmals von Bishop und Mitarbeitern unter Verwendung der Tyrosinkinase c-Src beschrieben (1999) und anschließend an vielen verschiedenen Hefe-Kinasen erfolgreich getestet (Bishop et al., 2000). Um eine solche LmxMPK1-Mutante zu generieren, wurde der Position aroße Phenylalaninrest an 93 von LmxMPK1, der sich in der Phosphorylierungstasche befindet zu Glycin mutiert (F93G). Durch diese Mutation wird eine Art Einbuchtung erzeugt, die es erlaubt, das aktive Zentrum der Kinase mit speziellen Inhibitoren, bei denen es sich entweder um synthetische Pyrazolo-[3,4-d]-Pyrimidinsysteme oder natürliche Indolocarbazole handelt, zu blockieren. Dieser Ansatz stellt ein wertvolles Werkzeug zur Untersuchung der speziellen Funktion einer Kinase in der Zelle dar. Ein genetischer Ansatz, in dem versucht wird, beide Allele einer Kinase auszuschalten, scheitert in manchen Fällen, z.B. wenn die fragliche Kinase essentiell für den Organismus ist. Da ein induzierbarer Mechanismus wie RNAi in Leishmanien nicht angewandt werden kann, da

diesen Organismen die nötige enzymatische Ausstattung fehlt, besteht ein Bedarf an anderen induzierbaren Systemen. Ein zusätzlicher Vorteil dieser Methode ist, dass die Anwendung eines Inhibitors der Zelle nicht erlaubt, Ausweichmechanismen zu aktivieren, wie dies z.B. in Deletionsmutanten der Fall sein kann. Zudem können die Inhibitoren in verschiedensten Konzentrationen zugegeben werden, so dass ein abgestufter Effekt der Hemmung der Kinase beobachtet werden kann (Bishop et al., 2001). Diese Methode stellt einige Anforderungen an die zu untersuchende Kinase: zum einen muss der zu mutierende Wt-Rest groß genug sein, dass eine Mutation zu Alanin oder Glycin eine neue Bindungstasche bildet, bei dem Rest sollte es sich in anderen Kinasen des Organismus nicht um ein Alanin oder Glycin handeln um Kreuzreaktionen auszuschließen und natürlich sollte die Mutation die Kinase-Aktivität nicht beeinträchtigen (Bishop und Shokat, 1999). Diese Bedingungen wurden im Fall von LmxMPK1 erfüllt, da die mutierte (LmxMPK1F93G) Kinase noch Aktivität zeigt (siehe 4.5.2.2). Das rekombinante Enzym zeigte allerdings nur geringe Sensitivität gegenüber den drei getesteten Inhibitoren, außerdem schien die Aktivität im Vergleich mit der Wt-Kinase leicht vermindert, was z.B. auch für die Kinase c-Abl(T315G) gezeigt wurde (Liu et al., 2000).

Bei dem Test der Inhibitoren mit rekombinanten Leishmanien, die nur noch LmxMPK1F93G exprimieren, zeigten sich interessante Ergebnisse. Zunächst einmal konnte gezeigt werden, dass die inhibitorsensitive Kinase in der Lage ist den Phänotyp der Deletionsmutante zu kompensieren, allerdings nur zu einem bestimmten Grad. LmxMPK1F93G-Promastigoten teilen sich immer noch deutlich langsamer als L. mexicana Wt (nicht gezeigt) und auch eine Maus-Infektion mit den rekombinanten Leishmanien schreitet deutlich langsamer voran als eine Wt-Infektion, allerdings mit ähnlicher Geschwindigkeit wie eine Infektion mit einem Addback, der LmxMPK1Wt episomal exprimiert. Eine Zugabe von Inhibitor zu axenischen Amastigoten führte schon in niedrigen Konzentrationen zu einem völligen Proliferationsstop (siehe 4.5.5). Dabei zeigte der Inhibitor 1-NM die beste Wirkung. Auch morphologisch kann man Beobachtungen machen, die der Deletionsmutante von LmxMPK1 entsprechen. Die axenischen Amastigoten sehen drei Tage nach Inhibitorzugabe völlig zerstört aus, es sind nur noch Zelltrümmer zu erkennen. Möglicherweise wird hier ein apoptotischer Prozess ausgelöst, der zu der Zerstörung der Zellen führt. Wt-Amastigoten zeigen sich von den gleichen Inhibitorkonzentrationen unbeeinflusst in ihrer Morphologie und Proliferation mit Ausnahme von 1-NA, welches auch in niedrigen Konzentrationen leichte Auswirkungen auf den Wt zeigt. Interessanterweise hatten die drei Inhibitoren auch relativ starke Auswirkungen auf das promastigote Lebensstadium der LmxMPK1F93G-Mutante. Schon bei einer Konzentration von 1 µM Inhibitor zeigen sich die Promastigoten in ihrer Morphologie und Proliferation stark beeinträchtigt. Hier zeigte der Inhibitor 1-NA die schnellste Wirkung, wobei der Effekt nach einigen Tagen Inkubation aber bei allen drei Inhibitoren gleich stark ausgeprägt war (siehe 4.5.4). Effekte in diesem Ausmaß waren in der LmxMPK1-Deletionsmutante nicht zu beobachten. Diese teilt sich zwar langsamer als der Wt, zeigt sich aber in ihrer Morphologie nicht so stark beeinträchtigt. Dies bestätigt die Annahme, dass LmxMPK1 auch in Promastigoten eine (wichtige) Funktion hat, deren Ausfall in der Deletionsmutante aber wahrscheinlich teilweise durch andere Kinasen kompensiert werden kann. Somit konnte gezeigt werden, dass das System "inhibitorspezifische Kinasespezifischer Inhibitor" auch auf Leishmanien angewandt werden kann. Nun steht dieses System für Studien zur Funktion von Kinasen in Leishmanien zur Verfügung und wird z.B. bereits mit LmxMPK3 getestet, die an der Regulation der Flagellenlänge, einem sehr gut optisch zu verfolgenden Prozess beteiligt ist (Wiese und Mitarbeiter, nicht veröffentlicht; Erdmann *et al.*, 2006). Zudem kann diese Methode dabei helfen, essentielle Kinasen, wie z.B. LmxMPK4, die sich mit herkömmlichen Methoden nicht ausschalten ließ (Wang *et al.*, 2005), zu inhibieren und mehr über ihre Funktion herauszufinden.

Zusätzlich stellt die Methode eine weitere Möglichkeit zur Identifikation von Substraten dar, indem man z.B. die phosphorylierten Proteine in inhibierten und nicht inhibierten Parasiten untersucht. Hier kann man dann z.B. auch Phosphorylierungsprozesse und –kinetiken verfolgen anstatt nur einen stationären Zustand zu untersuchen, wie in einer Deletionsmutante.

6 Zusammenfassung

Leishmanien sind parasitische Protozoen, die für ein breites Spektrum an Erkrankungen des Menschen verantwortlich sind. Krankheitsbilder reichen von der selbstheilenden cutanen Leishmaniose bis zu generalisierten, viszeralen Infektionen, die unbehandelt einen tödlichen Verlauf nehmen können. Leishmanien besitzen einen digenetischen Lebenszyklus. In den Überträgerinsekten, den Sandmücken, liegen sie als begeißelte Promastigoten im Verdauungstrakt vor, die dann im Blut des Säugerwirts von Makrophagen aufgenommen werden. In den Phagolysosomen differenzieren sie zu den kleineren, unbegeißelten Amastigoten. Mit 12 Millionen Betroffenen und bis zu 2 Millionen Neuinfektionen im Jahr stellt die Krankheit, die vor allem in tropischen und subtropischen Gebieten aber auch im Mittelmeerraum vorkommt, ein wichtiges Gesundheitsproblem dar. Therapiemöglichkeiten sind bis zum heutigen Tage eingeschränkt. Viele der vorhandenen Medikamente zeichnen sich durch teilweise starke Nebenwirkungen und/oder hohe Behandlungskosten aus und sind daher für die Bevölkerung in den Endemiegebieten eher ungeeignet. Hinzu kommt eine zunehmende Resistenzentwicklung der Parasiten gegen die bestehenden Therapeutika.

Bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse konnte bis zum heutigen Tag eine Beteiligung von in Signalkaskaden eingebundenen Proteinkinasen nachgewiesen werden. Auch in den Trypanosomatiden liegen bereits konkrete Hinweise vor, dass Proteinkinasen wichtige Rollen z.B. bei Proliferation und Differenzierung spielen. Aufgrund der signifikanten Unterschiede zwischen Leishmanien-Kinasen und ihren Äquivalenten in höheren Eukaryoten, stellen diese wertvolle Zielstrukturen für neue Therapien der Leishmaniose dar. Eine besondere Rolle spielen Komponenten der Mitogen-aktivierten Protein (MAP) Kinase Kaskaden, die in *Leishmania mexicana* z.T. bereits gut untersucht sind. Ziel dieser Arbeit war die biochemische Charakterisierung der *Leishmania mexicana* MAP Kinase LmxMPK1, für die bereits 1998 eine essentielle Rolle bei der Proliferation des amastigoten Lebensstadiums gezeigt werden konnte. Darüber hinaus sollte versucht werden, diese Kinase durch Identifikation von Aktivatoren und Substraten in eine Signaltransduktionskaskade einzuordnen.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass LmxMPK1 auch bei der Proliferation des promastigoten Stadiums eine Rolle spielt, da eine Deletionsmutante deutlich langsamer proliferierte als Wildtyp-Parasiten. Eine Untersuchung der *in vitro*-Aktivität des rekombinanten Enzyms zeigte, dass LmxMPK1 auch ohne vorherige Aktivierung bereits basale Auto- und Substratphosphorylierungsaktivität gegenüber artifiziellen Substraten wie MBP besitzt. Die Kinase weist dabei eine Präferenz von Mn²⁺- gegenüber Mg²⁺-Ionen auf

und zeigt eine optimale Aktivität bei pH 7,5 und Temperaturen um 37°C. Die Autophosphorylierung der Kinase ist eine intramolekulare Reaktion und findet an dem Tyrosinrest des TXY-Aktivierungsmotivs in der Phosphorylierungslippe statt, einem Motiv in dem bei MAP Kinasen höherer Eukaryoten sowohl der Threonin- als auch der Tyrosinrest phosphoryliert sein müssen, um maximale Aktivität zu erzielen. Ich konnte hingegen zeigen, dass bei LmxMPK1 in vivo ausschließlich eine Phosphorylierung des Threoninrestes stattfindet, der essentiell für die Funktionalität des Enzyms ist. Außerdem kann die Kinase durch Austausch des Threonins gegen die negativ geladene Aminosäure Glutamat in vivo aktiviert werden. Alle bisher in L. mexicana bekannten MAPKK Homologe sowie drei neu identifizierte und im Rahmen dieser Arbeit untersuchte MAPKK Homologe wurden ohne Erfolg auf ihre Fähigkeit, LmxMPK1 zu aktivieren, getestet. Auch zwei Zellzyklusregulierende Kinasen, CRK3 und Polo-Kinase, zeigten keine Aktivierung von LmxMPK1. Bei verschiedenen Versuchen, Substrate von LmxMPK1 zu finden, konnten zwei mögliche Substratproteine identifiziert werden. Der Transkriptionsinitiationsfaktor TFII D ist in allen Organismen hochkonserviert und spielt eine Rolle bei der Initiation der RNA-Polymerase II-Transkription. Bei dem zweiten Protein handelt es sich um ein unbekanntes, hypothetisches Protein, das wie z.B. viele Transkriptionsfaktoren eine Zinkfingerdomäne besitzt und ausschließlich in den Trypanosomatiden vorkommt. Beide Proteine wurden in vitro schwach von LmxMPK1 phosphoryliert. Da diese aber nicht aktiviert war, konnte so keine abschließende Aussage getroffen werden, ob es sich in vivo tatsächlich um Substrate der Kinase handelt.

Durch Mutation eines Phenylalaninrestes in der katalytischen Tasche von LmxMPK1 zu Glycin konnte eine inhibitorsensitive Mutante generiert werden. Diese Kinase zeigte *in vitro* Substrat- und Autophosphorylierungsaktivität, die sich im Gegensatz zu der Wildtyp-Kinase durch Einsatz dreier spezifischer Inhibitoren in hohen Konzentrationen hemmen ließ. Die inhibitorsensitive Mutante wurde außerdem episomal in eine LmxMPK1-Deletionsmutante eingebracht und zeigte sich in der Lage, den Phänotyp der Deletionsmutante zu komplementieren. *In vivo*-Experimente mit Inhibitoren und rekombinanten Leishmanien zeigten erfolgreich die Funktionalität des Systems in Promastigoten sowie axenischen Amastigoten. Dabei konnten auch in Promastigoten starke Auswirkungen des "Ausschaltens" der Aktivität von LmxMPK1 beobachtet werden. Damit konnte ein System etabliert werden, welches es ermöglicht, die Aktivität einer bestimmten Kinase *in vivo* gezielt auszuschalten, um z.B. die Auswirkungen auf den Phosphorylierungsstatus der zellulären Proteine zu untersuchen.

Summary 147

7 Summary

Protozoan parasites of the genus *Leishmania* cause a broad range of human diseases ranging from self-healing cutane lesions to visceral infections which, if untreated, are fatal. *Leishmania* have a digenetic life cycle. In their insect vector, the phlebotomine sandfly, they live extracellularly in the midgut as flagellated promastigotes. Following infection, they are taken up by macrophages in the mammalian blood where they differentiate into smaller, non-flagellated amastigotes in the phagolysosomes. With 12 million people infected and up to 2 million new cases each year, Leishmaniasis, which is found mainly in tropical and subtropical areas but also in the Mediterranian, is a major health problem worldwide. Means of therapy are limited up to date with many of the available drugs leading to serious side effects or being unreasonably expensive for the population in the endemic areas. Moreover, resistances to existent drugs are already emerging in the parasites.

Protein kinases, integrated in diverse signalling cascades, have been proven to play major roles in a multitude of cellular processes. In the trypanosomatids, different protein kinases have already been shown to play important roles in differentiation and proliferation of the different life stages. Because of the significant differences between some *Leishmania* kinases and their equivalents in higher eucaryotes, these enzymes are valuable targets for medical treatment. *Leishmania* mitogen activated protein (MAP) kinase cascades which have already been examined to some extent in *Leishmania mexicana* are especially well-suited for drug development. The aim of the present study was the biochemical characterization of LmxMPK1, which was shown in 1998 to be essential for proliferation of the amastigote life stage. Additionally, putative activators were tested for their potential to activate this MAP kinase and various attempts to identify substrates of this enzyme were undertaken.

First, it could be shown that LmxMPK1 is also involved in proliferation of the promastigote life stage of the parasite, as a LmxMPK1 deletion mutant showed slower proliferation than the wild type parasites. It was shown that, even without prior activation, LmxMPK1 already possesses basal auto- and substrate phosphorylation activity *in vitro*. The enzyme shows a preference for Mn²⁺- over Mg²⁺-ions and has an optimal activity at pH7.5 and temperatures of around 37°C. Autophosphorylation is an intramolecular reaction and takes place at tyrosine 178 of the TDY motif of the phosphorylation lip. In MAP kinases of higher eucaryotes, both the threonine and the tyrosine residue have to be phosphorylated to generate maximum activity. In LmxMPK1, however, only the threonine residue, which is essential for LmxMPK1 activity, is phosphorylated *in vivo*. Additionally, the kinase can be activated *in vivo* by replacement of the threonine residue with a negatively charged residue like glutamate which substitutes for the phosphorylated threonine.

Summary 148

Every MAPKK homologue already known in *L. mexicana* as well as three newly identified MAPKKs, which have been isolated and subcloned during this study, were tested for their potential to activate LmxMPK1, albeit without success. Furthermore, two cell cycle-regulating kinases, CRK3 and polo-like kinase were also not able to activate LmxMPK1.

Using different methods for kinase substrate identification, two potential *in vitro*-substrates were identified and examined. The transcription initiation factor TFII D is highly conserved throughout all organisms and plays a major role in RNA-polymerase II dependent initiation of transcription. The second potential substrate is a hypothetical protein which, just as many transcription factors, possesses a B-box zinc finger domain and is highly conserved throughout the trypanosomatids with no close homologues in other species. Both proteins were weakly phosphorylated *in vitro* by LmxMPK1. However, as LmxMPK1 was not available in an activated state, it still remains to be verified if the two proteins are substrates of LmxMPK1 *in vivo*.

An inhibitor-sensitized mutant of LmxMPK1 was generated by mutating a phenylalanine residue in the catalytic pocket of LmxMPK1 to glycine. In spite of the mutation, this kinase shows auto- and substrate phosphorylation activity *in vitro* which could be inhibited by high concentrations of three specific inhibitors. The activity of the wild type enzyme was not affected by the compounds. Additionally, this mutant was expressed episomally in *Leishmania mexicana* in a LmxMPK1 deletion background and was shown to restore the non-proliferating phenotype of the deletion mutant. In *in vivo* experiments with inhibitors and recombinant parasites the functionality of this system could be shown in both pro- as well as axenic amastigotes. In the course of these experiments, strong effects on proliferation and morphology of the parasites could also be observed in the promastigote life stage.

Hence, a system could be established which allows to shut down the activity of a specific *Leishmania* kinase *in vivo* to study the impact on the phosphorylation status of the cellular proteins.

8 Literaturverzeichnis

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

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

Aboagye-Kwarteng,T., ole-MoiYoi,O.K., Lonsdale-Eccles,J.D. (1991) Phosphorylation differences among proteins of bloodstream developmental stages of *Trypanosoma brucei brucei Biochem.J.* **275**: 7-14.

Achterberg, V., Gercken, G. (1987) Cytotoxicity of ester and ether lysophospholipids on *Leishmania donovani* promastigotes *Mol.Biochem.Parasitol.* **23**: 117-122.

Adler, V., Franklin, C.C., Kraft, A.S. (1992) Phorbol esters stimulate the phosphorylation of c-Jun but not v-Jun: regulation by the N-terminal delta domain *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**: 5341-5345.

Agron, P.G., Reed, S.L., Engel, J.N. (2005) An essential, putative MEK kinase of *Leishmania major Mol.Biochem.Parasitol.* **142**: 121-125.

Ahn,N.G., Seger,R., Bratlien,R.L., Diltz,C.D., Tonks,N.K., Krebs,E.G. (1991) Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. *In vitro* activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase *J.Biol.Chem.* **266**: 4220-4227.

al Chalabi,K.A., Ziz,L.A., al Khayat,B. (1989) Presence and properties of cAMP phosphodiesterase from promastigote forms of *Leishmania tropica* and *Leishmania donovani Comp Biochem.Physiol B* **93**: 789-792.

Alessi, D.R., Saito, Y., Campbell, D.G., Cohen, P., Sithanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C.J., Cowley, S. (1994) Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1 *EMBO J.* **13**: 1610-1619.

Alexander, J., Russell, D.G. (1992) The interaction of *Leishmania* species with macrophages *Adv.Parasitol.* **31:175-254.**: 175-254.

Anderson, N.G., Maller, J.L., Tonks, N.K., Sturgill, T.W. (1990) Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase *Nature*. **343**: 651-653.

Andrade, C.R., Silva, O.A., Andrade, P.P., Kolk, A.H., Harith, A.E. (1987) A direct agglutination test discriminative toward Chagas' disease for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil: preliminary results *Ann.Inst.Pasteur Immunol.* **138**: 457-459.

Antoine, J.C., Prina, E., Lang, T., Courret, N. (1998) The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages *Trends Microbiol.* **6**: 392-401.

Bardwell,A.J., Flatauer,L.J., Matsukuma,K., Thorner,J., Bardwell,L. (2001) A conserved docking site in MEKs mediates high-affinity binding to MAP kinases and cooperates with a scaffold protein to enhance signal transmission *J.Biol.Chem.* **276**: 10374-10386.

Bates, P.A., Robertson, C.D., Tetley, L., Coombs, G.H. (1992) Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms *Parasitology* **105**: 193-202.

Bell,M., Capone,R., Pashtan,I., Levitzki,A., Engelberg,D. (2001) Isolation of hyperactive mutants of the MAPK p38/Hog1 that are independent of MAPK kinase activation *J.Biol.Chem.* **276**: 25351-25358.

Bell,M., Engelberg,D. (2003) Phosphorylation of Tyr-176 of the yeast MAPK Hog1/p38 is not vital for Hog1 biological activity *J.Biol.Chem.* **278**: 14603-14606.

Bengs, F., Scholz, A., Kuhn, D., and Wiese, M. (2005) LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in *Leishmania mexicana Mol.Microbiol.* **55**: 1606-1615.

Benne, R. (1994) RNA editing in trypanosomes *Eur.J.Biochem.* **221**: 9-23.

Berman, J.D. (1997) Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical Infectious Diseases* **24**: 684-703.

Berman, J.D., Gallalee, J.V. (1985) Semiautomated assessment of *in vitro* activity of potential antileishmanial drugs *Antimicrob.Agents Chemother.* **28**: 723-726.

Berman, J.D., Gallalee, J.V., Best, J.M. (1987) Sodium stibogluconate (pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty-acid beta- oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes *Biochemical Pharmacology* **36**: 197-201.

Beverley, S.M. (1991) Gene amplification in *Leishmania Annu.Rev.Microbiol.* 45: 417-444.

Bishop, A.C., Buzko, O., Shokat, K.M. (2001) Magic bullets for protein kinases *Trends Cell Biol.* **11**: 167-172.

Bishop, A.C., Shokat, K.M. (1999) Acquisition of inhibitor-sensitive protein kinases through protein design *Pharmacol.Ther.* **82**: 337-346.

Bishop,A.C., Ubersax,J.A., Petsch,D.T., Matheos,D.P., Gray,N.S., Blethrow,J., Shimizu,E., Tsien,J.Z., Schultz,P.G., Rose,M.D., Wood,J.L., Morgan,D.O., Shokat,K.M. (2000) A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase *Nature*. **407**: 395-401.

Blenis, J., Kuo, C.J., Erikson, R.L. (1987) Identification of a ribosomal protein S6 kinase regulated by transformation and growth-promoting stimuli *J.Biol.Chem.* **262**: 14373-14376.

Bogdan, C., Donhauser, N., Doring, R., Rollinghoff, M., Diefenbach, A., Rittig, M.G. (2000) Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis *J.Exp.Med.* **191**: 2121-2130.

Borden,K.L., Martin,S.R., O'Reilly,N.J., Lally,J.M., Reddy,B.A., Etkin,L.D., Freemont,P.S. (1993) Characterisation of a novel cysteine/histidine-rich metal binding domain from Xenopus nuclear factor XNF7 *FEBS Lett.* **335**: 255-260.

Boshart,M., Mottram,J.C. (1997) Protein phosphorylation and protein kinases in trypanosomatids. In *Trypanosomiasis and Leishmaniasis*. Hide,G., Mottram,J.C., Coombs,G.H., and Holmes,P.H. (eds). Wallingford, UK: CAB International, pp. 227-244.

Bringaud, F., Baltz, D., Baltz, T. (1998) Functional and molecular characterization of a glycosomal PPidependent enzyme in trypanosomatids: pyruvate, phosphate dikinase *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**: 7963-7968.

Brinkworth, R.I., Breinl, R.A., Kobe, B. (2003) Structural basis and prediction of substrate specificity in protein serine/threonine kinases *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100**: 74-79.

Brittingham, A., Mosser, D.M. (1996) Exploitation of the complement system by *Leishmania* Promastigotes. *Parasitology Today* **12**: 444-447.

Calderini,O., Glab,N., Bergounioux,C., Heberle-Bors,E., Wilson,C. (2001) A novel tobacco mitogenactivated protein (MAP) kinase kinase, NtMEK1, activates the cell cycle-regulated p43Ntf6 MAP kinase *J.Biol.Chem.* **276**: 18139-18145.

Carmena, M., Riparbelli, M.G., Minestrini, G., Tavares, A.M., Adams, R., Callaini, G., Glover, D.M. (1998) *Drosophila* polo kinase is required for cytokinesis *J.Cell Biol.* **143**: 659-671. Caux, C., Liu, Y.J., Banchereau, J. (1995) Recent advances in the study of dendritic cells and follicular dendritic cells *Immunol.Today* **16**: 2-4.

Chen, M., Christensen, S.B., Theander, T.G., Kharazmi, A. (1994) Antileishmanial activity of licochalcone A in mice infected with Leishmania major and in hamsters infected with *Leishmania donovani Antimicrob.Agents Chemother.* **38**: 1339-1344.

Chen,Z., Gibson,T.B., Robinson,F., Silvestro,L., Pearson,G., Xu,B., Wright,A., Vanderbilt,C., Cobb,M.H. (2001) MAP kinases *Chem.Rev.* **101**: 2449-2476.

Clayton, C.E. (1999) Genetic manipulation of kinetoplastida Parasitology Today 15: 372-378.

Clayton,C.E. (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again *EMBO J.* **21**: 1881-1888.

Cobb, M.H., Goldsmith, E.J. (1995) How MAP kinases are regulated J.Biol. Chem. 270: 14843-14846.

Cohen, P., Knebel, A. (2006) KESTREL: a powerful method for identifying the physiological substrates of protein kinases *Biochem.J.* **393**: 1-6.

Croft,S.L., Coombs,G.H. (2003) Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs *Trends Parasitol.* **19**: 502-508.

Croft,S.L., Neal,R.A., Pendergast,W., Chan,J.H. (1987) The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani Biochem.Pharmacol.* **36**: 2633-2636.

Croft, S.L., Yardley, V. (2002) Chemotherapy of leishmaniasis Curr. Pharm. Des. 8: 319-342.

Cruz, A., Coburn, C.M., Beverley, S.M. (1991) Double targeted gene replacement for creating null mutants *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**: 7170-7174.

Das,A., Bellofatto,V. (2003) RNA polymerase II-dependent transcription in trypanosomes is associated with a SNAP complex-like transcription factor *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**: 80-85.

Das,A., Zhang,Q., Palenchar,J.B., Chatterjee,B., Cross,G.A., Bellofatto,V. (2005) Trypanosomal TBP functions with the multisubunit transcription factor tSNAP to direct spliced-leader RNA gene expression *Mol.Cell Biol.* **25**: 7314-7322.

De Castro,S.L., Luz,M.R. (1993) The second messenger cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in pathogenic microorganisms with special reference to protozoa *Can.J.Microbiol.* **39**: 473-479.

Dell,K.R., Engel,J.N. (1994) Stage-specific regulation of protein phosphorylation in *Leishmania major Mol.Biochem.Parasitol.* **64**: 283-292.

Domenicali, P.D., Burkard, G., Morand, S., Renggli, C.K., Roditi, I., Vassella, E. (2006) A mitogenactivated protein kinase controls differentiation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei Eukaryot.Cell.* **5**: 1126-1135.

Eblen,S.T., Kumar,N.V., Shah,K., Henderson,M.J., Watts,C.K., Shokat,K.M., Weber,M.J. (2003) Identification of novel ERK2 substrates through use of an engineered kinase and ATP analogs *J.Biol.Chem.* **278**: 14926-14935.

Eliseev,L.N., Kellina,O.I. (1964) [On duration of the course of Leishmaniasis in *Rhombomys opimus Licht.*] *Med.Parazitol.(Mosk).* **33:101-2**.: 101-102.

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**: 1487-1499.

Emrick, M.A., Hoofnagle, A.N., Miller, A.S., Ten Eyck, L.F., Ahn, N.G. (2001) Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase 2 by synergistic point mutations *J.Biol.Chem.* **276**: 46469-46479.

Erdmann, M. (2004). Molekulare Analyse von LmxMPK3, einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase aus *Leishmania mexicana*. Diplomarbeit, Studiengang Biochemie/Molekularbiologie, Universität Hamburg.

Erdmann, M., Scholz, A., Melzer, I.M., Schmetz, C., Wiese, M. (2006) Interacting protein kinases involved in the regulation of flagellar length *Mol.Biol.Cell.* **17**: 2035-2045.

Erickson,A.K., Payne,D.M., Martino,P.A., Rossomando,A.J., Shabanowitz,J., Weber,M.J., Hunt,D.F., Sturgill,T.W. (1990) Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase *J.Biol.Chem.* **265**: 19728-19735.

Evans, T.G., Reed, S.S., Hibbs, J.B., Jr. (1996) Nitric oxide production in murine leishmaniasis: correlation of progressive infection with increasing systemic synthesis of nitric oxide *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **54**: 486-489.

Ferrell, J.E., Jr. (2000) What do scaffold proteins really do? Sci.STKE. 2000: E1.

Fournet, A., Barrios, A.A., Munoz, V., Hocquemiller, R., Cave, A. (1992) Effect of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis Trop.Med.Parasitol.* **43**: 219-222.

Fu,Z., Schroeder,M.J., Shabanowitz,J., Kaldis,P., Togawa,K., Rustgi,A.K., Hunt,D.F., Sturgill,T.W. (2005) Activation of a nuclear Cdc2-related kinase within a mitogen-activated protein kinase-like TDY motif by autophosphorylation and cyclin-dependent protein kinase-activating kinase *Mol.Cell Biol.* **25**: 6047-6064.

Fu,Z., Larson,K.A., Chitta,R.K., Parker,S.A., Turk,B.E., Lawrence,M.W., Kaldis,P., Galaktionov,K., Cohn,S.M., Shabanowitz,J., Hunt,D.F., Sturgill,T.W. (2006) Identification of yin-yang regulators and a phosphorylation consensus for male germ cell-associated kinase (MAK)-related kinase *Mol.Cell Biol.* **26**: 8639-8654.

Fujishiro,M., Gotoh,Y., Katagiri,H., Sakoda,H., Ogihara,T., Anai,M., Onishi,Y., Ono,H., Funaki,M., Inukai,K., Fukushima,Y., Kikuchi,M., Oka,Y., Asano,T. (2001) MKK6/3 and p38 MAPK pathway activation is not necessary for insulin-induced glucose uptake but regulates glucose transporter expression *J.Biol.Chem.* **276**: 19800-19806.

Fukunaga, R., Hunter, T. (1997) MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates *EMBO J.* **16**: 1921-1933.

Gale, M., Jr., Parsons, M. (1993) A *Trypanosoma brucei* gene family encoding protein kinases with catalytic domains structurally related to Nek1 and NIMA *Mol.Biochem.Parasitol.* **59**: 111-121.

Gessner, A., Bogdan, C., Röllinghoff, M. (1994) Leishmaniose. Aus: Immunologische und molekulare Parasitologie, Gustav Fischer Verlag, Jena/Stuttgart. S. 29-52.

Gibson,W., Bailey,M. (1994) Genetic exchange in Trypanosoma brucei: evidence for meiosis from analysis of a cross between drug-resistant transformants *Mol.Biochem.Parasitol.* **64**: 241-252.

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**: 1556-1564.

Gomez, N., Cohen, P. (1991) Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases *Nature*. **353**: 170-173.

Gossage,S.M., Rogers,M.E., Bates,P.A. (2003) Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle *Int.J.Parasitol.* **33**: 1027-1034.

Graham, T.M., Tait, A., Hide, G. (1998) Characterisation of a polo-like protein kinase gene homologue from an evolutionary divergent eukaryote, *Trypanosoma brucei Gene* **207**: 71-77.

Guan,K.L., Dixon,J.E. (1991) Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase *Anal.Biochem.* **192**: 262-267.

Guillebault,D., Sasorith,S., Derelle,E., Wurtz,J.M., Lozano,J.C., Bingham,S., Tora,L., Moreau,H. (2002) A new class of transcription initiation factors, intermediate between TATA box-binding proteins (TBPs) and TBP-like factors (TLFs), is present in the marine unicellular organism, the dinoflagellate *Crypthecodinium cohnii J.Biol.Chem.* **277**: 40881-40886.

Habelhah,H., Shah,K., Huang,L., Burlingame,A.L., Shokat,K.M., Ronai,Z. (2001) Identification of new JNK substrate using ATP pocket mutant JNK and a corresponding ATP analogue *J.Biol.Chem.* **276**: 18090-18095.

Handman, E. (2001) Leishmaniasis: current status of vaccine development *Clin.Microbiol.Rev.* **14**: 229-243.

Hanks,S.K., Quinn,A.M. (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members *Methods Enzymol.* **200:38-62**.: 38-62.

Hanks,S.K., Quinn,A.M., Hunter,T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains *Science* **241**: 42-52.

Hanson, S., Beverley, S.M., Wagner, W., Ullman, B. (1992) Unstable amplification of two extrachromosomal elements in alpha-difluoromethylornithine-resistant *Leishmania donovani Mol.Cell Biol.* **12**: 5499-5507.

Hardin,S.C., Wolniak,S.M. (1998) Molecular cloning and characterization of maize ZmMEK1, a protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen- and stress-activated protein kinase kinases *Planta.* **206**: 577-584.

Harris,K., Lamson,R.E., Nelson,B., Hughes,T.R., Marton,M.J., Roberts,C.J., Boone,C., Pryciak,P.M. (2001) Role of scaffolds in MAP kinase pathway specificity revealed by custom design of pathway-dedicated signaling proteins *Curr.Biol.* **11**: 1815-1824.

Hassan, P., Fergusson, D., Grant, K.M., Mottram, J.C. (2001) The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of *Leishmania mexicana Mol.Biochem.Parasitol.* **113**: 189-198.

Hayashi,M., Fearns,C., Eliceiri,B., Yang,Y., Lee,J.D. (2005) Big mitogen-activated protein kinase 1/extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway is essential for tumor-associated angiogenesis *Cancer Res.* **65**: 7699-7706.

Hepburn, N.C. (2003) Cutaneous leishmaniasis: an overview J.Postgrad.Med. 49: 50-54.

Her, J.H., Lakhani, S., Zu, K., Vila, J., Dent, P., Sturgill, T.W., Weber, M.J. (1993) Dual phosphorylation and autophosphorylation in mitogen-activated protein (MAP) kinase activation *Biochem.J.* **296**: 25-31.

Hermoso, T., Fishelson, Z., Becker, S.I., Hirschberg, K., Jaffe, C.L. (1991) Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system *EMBO Journal* **10**: 4061-4067.

Hommes, D.W., Peppelenbosch, M.P., van Deventer, S.J. (2003) Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets *Gut* **52**: 144-151.

Horikoshi,M., Bertuccioli,C., Takada,R., Wang,J., Yamamoto,T., Roeder,R.G. (1992) Transcription factor TFIID induces DNA bending upon binding to the TATA element *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**: 1060-1064.

Horikoshi, M., Yamamoto, T., Ohkuma, Y., Weil, P.A., Roeder, R.G. (1990) Analysis of structure-function relationships of yeast TATA box binding factor TFIID *Cell.* **61**: 1171-1178.

Hua,S.B., Wang,C.C. (1994) Differential accumulation of a protein kinase homolog in *Trypanosoma* brucei Journal of Cellular Biochemistry **54**: 20-31.

Hua,S.B., Wang,C.C. (1997) Interferon-gamma activation of a mitogen-activated protein kinase, KFR1, in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei Journal of Biological Chemistry* **272**: 10797-10803.

Huang,H., Werner,C., Weiss,L.M., Wittner,M., Orr,G.A. (2002) Molecular cloning and expression of the catalytic subunit of protein kinase A from *Trypanosoma cruzi Int.J.Parasitol.* **32**: 1107-1115.

Huang,W., Bateman,E. (1995) Cloning, expression, and characterization of the TATA-binding protein (TBP) promoter binding factor, a transcription activator of the *Acanthamoeba* TBP gene *J.Biol.Chem.* **270**: 28839-28847.

Huse, M., Kuriyan, J. (2002) The conformational plasticity of protein kinases Cell 109: 275-282.

Ilg,T. (2002) Generation of myo-inositol-auxotrophic *Leishmania mexicana* mutants by targeted replacement of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene *Mol.Biochem.Parasitol.* **120**: 151-156.

Jacobs, D., Glossip, D., Xing, H., Muslin, A.J., Kornfeld, K. (1999) Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase *Genes Dev.* **13**: 163-175.

Jeno, P., Jaggi, N., Luther, H., Siegmann, M., Thomas, G. (1989) Purification and characterization of a 40 S ribosomal protein S6 kinase from vanadate-stimulated Swiss 3T3 cells *J.Biol.Chem.* **264**: 1293-1297.

Jha,T.K. (2006) Drug unresponsiveness & combination therapy for kala-azar *Indian J.Med.Res.* **123**: 389-398.

Jha,T.K., Olliaro,P., Thakur,C.P., Kanyok,T.P., Singhania,B.L., Singh,I.J., Singh,N.K., Akhoury,S., Jha,S. (1998) Randomised controlled trial of aminosidine (paromomycin) v sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in North Bihar, India *BMJ.* **316**: 1200-1205.

Joiner,K.A. (1988) Molecular Basis of Interactions between Parasites and the Complement Cascade. In *The Biology of Parasitism*. Alan R. Liss, inc, pp. 309-328.

Junghae, M., Raynes, J.G. (2002) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates *Leishmania donovani* infection in macrophages *Infect.Immun.* **70**: 5026-5035.

Jupp,R., Flores,O., Nelson,J.A., Ghazal,P. (1993) The DNA-binding subunit of human transcription factor IID can interact with the TATA box as a multimer *J.Biol.Chem.* **268**: 16105-16108.

Kallunki, T., Deng, T., Hibi, M., Karin, M. (1996) c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions *Cell.* **87**: 929-939.

Kallunki, T., Su, B., Tsigelny, I., Sluss, H.K., Derijard, B., Moore, G., Davis, R., Karin, M. (1994) JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation *Genes Dev.* **8**: 2996-3007.

Kallunki, T., Deng, T., Hibi, M., a Karin, M. (1996) c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions *Cell.* **87**: 929-939.

Khokhlatchev,A., Xu,S., English,J., Wu,P., Schaefer,E., Cobb,M.H. (1997) Reconstitution of mitogenactivated protein kinase phosphorylation cascades in bacteria. Efficient synthesis of active protein kinases *Journal of Biological Chemistry* **272**: 11057-11062.

Killick-Kendrick, R. (1990) The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host *Ann.Parasitol.Hum.Comp.* **65 Suppl 1:37-42.**: 37-42.

Klevernic, I.V., Stafford, M.J., Morrice, N., Peggie, M., Morton, S., Cohen, P. (2006) Characterization of the reversible phosphorylation and activation of ERK8 *Biochem.J.* **394**: 365-373.

Knebel,A., Morrice,N., Cohen,P. (2001) A novel method to identify protein kinase substrates: eEF2 kinase is phosphorylated and inhibited by SAPK4/p38delta *EMBO J.* **20**: 4360-4369.

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**: 1025-1039.

Kuhn, D. (2004). *In vitro* und *in vivo* Analyse von LmxPK4, einer MAP Kinase Kinase aus *Leishmania mexicana*. Dissertation, 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**: 1169-1182.

L'Allemain,G., Her,J.H., Wu,J., Sturgill,T.W., Weber,M.J. (1992) Growth factor-induced activation of a kinase activity which causes regulatory phosphorylation of p42/microtubule-associated protein kinase *Mol.Cell Biol.* **12**: 2222-2229.

Laban, A., Tobin, J.F., Curotto de Lafaille, M.A., Wirth, D.F. (1990) Stable expression of the bacterial neor gene in *Leishmania enriettii Nature*. **343**: 572-574.

Laufer,G., Günzl,A. (2001) *In-vitro* competition analysis of procyclin gene and variant surface glycoprotein gene expression site transcription in *Trypanosoma brucei Mol.Biochem.Parasitol.* **113**: 55-65.

Lee,K., Du,C., Horn,M., Rabinow,L. (1996) Activity and autophosphorylation of LAMMER protein kinases *J.Biol.Chem.* **271**: 27299-27303.

Lee, H.Y., Suh, Y.A., Robinson, M.J., Hong, W.K.Woodgett, J.R., Cobb, M.H., Mangelsdorf, D.J., Kurie, J.M. (2000) Stress pathway activation induces phosphorylation of retinoid receptor X *J.Biol. Chem.* **275**: 32193-32199

Lee,S.A., Hasbun,R. (2003) Therapy of cutaneous leishmaniasis Int.J.Infect.Dis. 7: 86-93.

Li,S., Wilson,M.E., Donelson,J.E. (1996) *Leishmania chagasi*: a gene encoding a protein kinase with a catalytic domain structurally related to MAP kinase kinase *Exp.Parasitol.* **82**: 87-96.

Lindberg,R.A., Quinn,A.M., Hunter,T. (1992) Dual-specificity protein kinases: will any hydroxyl do? *Trends in Biochemical Sciences* **17**: 114-119.

Lira,R., Sundar,S., Makharia,A., Kenney,R., Gam,A., Saraiva,E., Sacks,D. (1999) Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani J.Infect.Dis.* **180**: 564-567.

Liston, D.R., Johnson, P.J. (1998) Gene Transcription in *Trichomonas vaginalis Parasitol. Today.* **14**: 261-265.

Liu,Y., Witucki,L.A., Shah,K., Bishop,A.C., Shokat,K.M. (2000) Src-Abl tyrosine kinase chimeras: replacement of the adenine binding pocket of c-Abl with v-Src to swap nucleotide and inhibitor specificities *Biochemistry*. **39**: 14400-14408.

Luo,H., Gilinger,G., Mukherjee,D., Bellofatto,V. (1999) Transcription initiation at the TATA-less spliced leader RNA gene promoter requires at least two DNA-binding proteins and a tripartite architecture that includes an initiator element *J.Biol.Chem.* **274**: 31947-31954.

Maggini,S., Stoecklin-Tschan,F.B., Morikofer-Zwez,S., Walter,P. (1993) A physiological role of Mn2+ in the regulation of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase from rat liver is unlikely *Biochem.J.* **292**: 365-370.

Mair,G., Shi,H., Li,H., Djikeng,A., Aviles,H.O., Bishop,J.R., Falcone,F.H., Gavrilescu,C., Montgomery,J.L., Santori,M.I., Stern,L.S., Wang,Z., Ullu,E., Tschudi,C. (2000) A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA *RNA*. **6**: 163-169.

Maldonado, E., Allende, J.E. (1999) Phosphorylation of yeast TBP by protein kinase CK2 reduces its specific binding to DNA *FEBS Lett.* **443**: 256-260.

Manning,B.D., Cantley,L.C. (2002) Hitting the target: emerging technologies in the search for kinase substrates *Sci.STKE*. **2002**: E49.

Mansour,S.J., Candia,J.M., Gloor,K.K., Ahn,N.G. (1996) Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAPKK1) and MAPKK2 mediate similar transcriptional and morphological responses *Cell Growth & Differentiation* **7**: 243-250.

Marcus, S., Polverino, A., Barr, M., Wigler, M. (1994) Complexes between STE5 and components of the pheromone-responsive mitogen-activated protein kinase module *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**: 7762-7766.

Martiny,A., Meyer-Fernandes,J.R., De Souza,W., Vannier-Santos,M.A. (1999) Altered tyrosine phosphorylation of ERK1 MAP kinase and other macrophage molecules caused by *Leishmania* amastigotes *Mol.Biochem.Parasitol.* **102**: 1-12.

Matte, A., Tari, L.W., Delbaere, L.T. (1998) How do kinases transfer phosphoryl groups? *Structure.* **6**: 413-419.

Matthews,K.R., 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**: 491-501.

Mayrose, M., Bonshtien, A., Sessa, G. (2004) *LeMPK3* is a mitogen-activated protein kinase with dual specificity induced during tomato defense and wounding responses *J.Biol.Chem.* **279**: 14819-14827.

Medina-Acosta, E., Cross, G.A. (1993) Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure *Mol.Biochem.Parasitol.* **59**: 327-329.

Melzer, I.M., Wiese, M. (2007). Biochemical characterization of LmxMPK1, a mitogen-activated protein kinase essential for the mammalian stage of the human parasite *Leishmania mexicana*. Eingereicht.

Mikkola,I., Bruun,J.A., Bjorkoy,G., Holm,T., Johansen,T. (1999) Phosphorylation of the transactivation domain of Pax6 by extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase *J.Biol.Chem.* **274**: 15115-15126.

Miyata,Y., Nishida,E. (1999) Distantly related cousins of MAP kinase: biochemical properties and possible physiological functions *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **%20;266**: 291-295.

Morrison, D.K., Davis, R.J. (2003) Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **19:91-118**.: 91-118.

Mottram, J.C. (1994) cdc2-related protein kinases and cell cycle control in trypanosomatids *Parasitol.Today.* **10**: 253-257.

Mottram, J.C., Kinnaird, J.H., Shiels, B.R., Tait, A., Barry, J.D. (1993) A novel CDC2-related protein kinase from *Leishmania mexicana*, LmmCRK1, is post-translationally regulated during the life cycle *Journal of Biological Chemistry* **268**: 21044-21052.

Mottram, J.C., McCready, B.P., Brown, K.G., Grant, K.M. (1996) Gene disruptions indicate an essential function for the LmmCRK1 cdc2-related kinase of *Leishmania mexicana Mol.Microbiol.* **22**: 573-583.

Müller, I.B., Domenicali-Pfister, D., Roditi, I., Vassella, E. (2002) Stage-specific requirement of a mitogen-activated protein kinase by *Trypanosoma brucei Mol.Biol.Cell* **13**: 3787-3799.

Müller, J., Cacace, A.M., Lyons, W.E., McGill, C.B., Morrison, D.K. (2000) Identification of B-KSR1, a novel brain-specific isoform of KSR1 that functions in neuronal signaling *Mol.Cell Biol.* **20**: 5529-5539.

Murray, H.W. (1994) Cytokines in the treatment of leishmaniasis *Baillieres Clinical Infectious Diseases* 1: 127-143.

Murray,H.W., Carriero,S.M., Donelly,D.M. (1986) Presence of a macrophage-mediated suppressor cell mechanism during cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis *Infect.Immun.* **54**: 487-493.

Nakaar, V., Gunzl, A., Ullu, E., Tschudi, C. (1997) Structure of the *Trypanosoma brucei* U6 snRNA gene promoter *Mol.Biochem.Parasitol.* **88**: 13-23.

Nakielny,S., Campbell,D.G., Cohen,P. (1992) MAP kinase kinase from rabbit skeletal muscle. A novel dual specificity enzyme showing homology to yeast protein kinases involved in pheromone-dependent signal transduction *FEBS Lett.* **308**: 183-189.

Nandan, D., Lo, R., Reiner, N.E. (1999) Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-FOS and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani Infect.Immun.* **67**: 4055-4063.

Naula, C., Seebeck, T. (2000) Cyclic AMP signaling in trypanosomatids *Parasitology Today* 16: 35-38.

Nishida, E., Gotoh, Y. (1993) The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways *Trends Biochem.Sci.* **18**: 128-131.

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.* **%20;102**: 283-295.

Nugent, P.G., Karsani, S.A., Wait, R., Tempero, J., Smith, D.F. (2004) Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation *Mol.Biochem.Parasitol.* **136**: 51-62.

Ohmachi,M., Rocheleau,C.E., Church,D., Lambie,E., Schedl,T., Sundaram,M.V. (2002) C. elegans ksr-1 and ksr-2 have both unique and redundant functions and are required for MPK-1 ERK phosphorylation *Curr.Biol.* **12**: 427-433.

Olmo,A., Arrebola,R., Bernier,V., Gonzalezpacanowska,D., Ruizperez,L.R. (1995) Coexistence of circular and multiple linear amplicons in methotrexate-resistant *Leishmania Nucleic Acids Research* **23**: 2856-2864.

Osmani,S.A., Pu,R.T., Morris,N.R. (1988) Mitotic induction and maintenance by overexpression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase *Cell* **53**: 237-244.

Pages,G., Guerin,S., Grall,D., Bonino,F., Smith,A., Anjuere,F., Auberger,P., Pouyssegur,J. (1999) Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice *Science*. **286**: 1374-1377.

Park,S.H., Zarrinpar,A., Lim,W.A. (2003) Rewiring MAP kinase pathways using alternative scaffold assembly mechanisms *Science* **299**: 1061-1064.

Parsons, M. (1990) Current concepts in stage-regulated gene expression in kinetoplastida *Parasitol.Today.* **6**: 244-245.

Parsons, M., Carter, V., Muthiani, A., Murphy, N. (1995) *Trypanosoma congolense*: developmental regulation of protein kinases and tyrosine phosphorylation during the life cycle *Exp.Parasitol.* **80**: 507-514.

Parsons, M., Ledbetter, J.A., Schieven, G.L., Nel, A.E., Kanner, S.B. (1994) Developmental regulation of pp44/46, tyrosine-phosphorylated proteins associated with tyrosine/serine kinase activity in *Trypanosoma brucei Mol.Biochem.Parasitol.* **63**: 69-78.

Parsons, M., Ruben, L. (2000) Pathways involved in environmental sensing in trypanosomatids *Parasitology Today* **16**: 56-62.

Parsons, M., Valentine, M., Carter, V. (1993) Protein kinases in divergent eukaryotes: identification of protein kinase activities regulated during trypanosome development *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**: 2656-2660.

Parsons, M., Worthey, E.A., Ward, P.N., Mottram, J.C. (2005) Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi BMC.Genomics* **6**: 127.

Patikoglou,G.A., Kim,J.L., Sun,L., Yang,S.H., Kodadek,T., Burley,S.K. (1999) TATA element recognition by the TATA box-binding protein has been conserved throughout evolution *Genes Dev.* **13**: 3217-3230.

Payne, D.M., Rossomando, A.J., Martino, P., Erickson, A.K., Her, J.H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Weber, M.J., Sturgill, T.W. (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogenactivated protein kinase (MAP kinase) *EMBO J.* **10**: 885-892.

Pearson,G., Robinson,F., Gibson,T.B., Xu,B.E., Karandikar,M., Berman,K., Cobb,M.H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions *Endocrine Reviews* **22**: 153-183.

Proudfoot,L., Odonnell,C.A., Liew,F.Y. (1995) Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric- oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages *Eur.J.Immunol.* **25**: 745-750.

Prowse, C.N., Lew, J. (2001) Mechanism of activation of ERK2 by dual phosphorylation *J.Biol.Chem.* **276**: 99-103.

Puentes, S.M., Da Silva, R.P., Sacks, D.L., Hammer, C.H., Joiner, K.A. (1990) Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9 *J.Immunol.* **145**: 4311-4316.

Quon,D.V., Delgadillo,M.G., Johnson,P.J. (1996) Transcription in the early diverging eukaryote *Trichomonas vaginalis*: an unusual RNA polymerase II and alpha-amanitin-resistant transcription of protein-coding genes *J.Mol.Evol.* **43**: 253-262.

Ray,L.B., Sturgill,T.W. (1987) Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **84**: 1502-1506.

Reinhart, R.A. (1988) Magnesium metabolism. A review with special reference to the relationship between intracellular content and serum levels *Arch.Intern.Med.* **148**: 2415-2420.

Rigaut,G., Shevchenko,A., Rutz,B., Wilm,M., Mann,M., Seraphin,B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration *Nat.Biotechnol.* **17**: 1030-1032.

Robbins, D.J., Zhen, E., Owaki, H., Vanderbilt, C.A., Ebert, D., Geppert, T.D., Cobb, M.H. (1993) Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 *in vitro J.Biol.Chem.* **268**: 5097-5106.

Robinson, M.J., Cobb, M.H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**: 180-186.

Robinson,K.A., Beverley,S.M. (2003) Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite Leishmania *Mol.Biochem.Parasitol.* **128**: 217-228.

Rogers, M.E., Chance, M.L., Bates, P.A. (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**: 495-507.

Rolin,S., Paindavoine,P., Hanocq-Quertier,J., Hanocq,F., Claes,Y., Le,R.D., Overath,P., Pays,E. (1993) Transient adenylate cyclase activation accompanies differentiation of *Trypanosoma brucei* from bloodstream to procyclic forms *Mol.Biochem.Parasitol.* **61**: 115-125.

Ross,D.T., Raibaud,A., Florent,I.C., Sather,S., Gross,M.K., Storm,D.R., Eisen,H. (1991) The trypanosome VSG expression site encodes adenylate cyclase and a leucine-rich putative regulatory gene *EMBO J.* **10**: 2047-2053.

Rossomando,A.J., Payne,D.M., Weber,M.J., Sturgill,T.W. (1989) Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **86**: 6940-6943.

Rossomando,A.J., Wu,J., Michel,H., Shabanowitz,J., Hunt,D.F., Weber,M.J., Sturgill,T.W. (1992) Identification of Tyr-185 as the site of tyrosine autophosphorylation of recombinant mitogen-activated protein kinase p42mapk *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**: 5779-5783.

Saito, R.M., Elgort, M.G., Campbell, D.A. (1994) A conserved upstream element is essential for transcription of the *Leishmania tarentolae* mini-exon gene *EMBO J.* **13**: 5460-5469.

Sanchez, M.A., Zeoli, D., Klamo, E.M., Kavanaugh, M.P., Landfear, S.M. (1995) A family of putative receptor-adenylate cyclases from *Leishmania donovani Journal of Biological Chemistry* **270**: 17551-17558.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **74**: 5463-5467.

Schimanski,B., Nguyen,T.N., Gunzl,A. (2005) Characterization of a multisubunit transcription factor complex essential for spliced-leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei Mol.Cell Biol.* **25**: 7303-7313.

Schlein,Y., Jacobson,R.L., Messer,G. (1992) *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**: 9944-9948.

Schlein,Y., Jacobson,R.L., Shlomai,J. (1991) Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector *Proc.Biol.Sci.* **245**: 121-126.

Schmidt, H. und Peter, F.M. (1938) Advances in the therapeutics of antimony. Georg Thieme Verlag, Leipzig.

Scholz, A. (2003). Charakterisierung eines MAP Kinase Kinase Homologs aus *Leishmania mexicana*. Diplomarbeit, Fachbereich Bio-, Chemie- und Verfahrenstechnik, Fachhochschule Lausitz.

Schuldt, K. (2003) Rekombinante Expression einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase aus *Leishmania mexicana.* Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Universität Hamburg.

Seger, R., Ahn, N.G., Posada, J., Munar, E.S., Jensen, A.M., Cooper, J.A., Cobb, M.H., Krebs, E.G. (1992) Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells *J.Biol.Chem.* **267**: 14373-14381.

Seger, R., Ahn, N.G., Boulton, T.G., Yancopoulos, G.D., Panayotatos, N., Radziejewska, E., Ericsson, L., Bratlien, R.L., Cobb, M.H., Krebs, E.G. (1991) Microtubule-associated protein 2 kinases, ERK1 and ERK2, undergo autophosphorylation on both tyrosine and threonine residues: implications for their mechanism of activation *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**: 6142-6146.

Sereno, D., Lemesre, J.L. (1997) *In vitro* life cycle of pentamidine-resistant amastigotes: stability of the chemoresistant phenotypes is dependent on the level of resistance induced *Antimicrob.Agents Chemother.* **41**: 1898-1903.

Shah,K., Liu,Y., Deirmengian,C., Shokat,K.M. (1997) Engineering unnatural nucleotide specificity for Rous sarcoma virus tyrosine kinase to uniquely label its direct substrates *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**: 3565-3570.

Sorensen, A.L., Hey, A.S., Kharazmi, A. (1994) *Leishmania major* surface protease Gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro *Aprils* **102**: 265-271.

Soto, J., Grogl, M., Berman, J., Olliaro, P. (1994) Limited efficacy of injectable aminosidine as singleagent therapy for colombian cutaneous leishmaniasis *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **88**: 695-698.

Soto, J., Toledo, J., Gutierrez, P., Nicholls, R.S., Padilla, J., Engel, J., Fischer, C., Voss, A., Berman, J. (2001) Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent *Clin.Infect.Dis.* **33**: E57-E61.

Sprague,G.F., Jr. (1991) Signal transduction in yeast mating: receptors, transcription factors, and the kinase connection *Trends Genet.* **7**: 393-398.

Stiles, J.K., Hicock, P.I., Shah, P.H., Meade, J.C. (1999) Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania Ann.Trop.Med.Parasitol.* **93**: 781-807.

Sun,G., Budde,R.J. (1997) Requirement for an additional divalent metal cation to activate protein tyrosine kinases *Biochemistry*. **36**: 2139-2146.

Sundar, S., Gupta, L.B., Makharia, M.K., Singh, M.K., Voss, A., Rosenkaimer, F., Engel, J., Murray, H.W. (1999) Oral treatment of visceral leishmaniasis with miltefosine *Ann.Trop.Med.Parasitol.* **93**: 589-597.

Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., Nishida, E. (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators *Nature Cell Biology* **2**: 110-116.

Tanoue, T., Nishida, E. (2002) Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades *Pharmacol.Ther.* **93**: 193-202.

Tanoue, T., Nishida, E. (2003) Molecular recognitions in the MAP kinase cascades *Cell Signal.* **15**: 455-462.

Taylor, M.C., Kelly, J.M., Chapman, C.J., Fairlamb, A.H., Miles, M.A. (1994) The structure, organization, and expression of the *Leishmania donovani* gene encoding trypanothione reductase *Mol.Biochem.Parasitol.* **64**: 293-301.

Thakur, C.P., Kumar, M., Pandey, A.K. (1991) Comparison of regimes of treatment of antimony-resistant kala-azar patients: a randomized study *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **45**: 435-441.

Titus,R.G., Theodos,C.M., Kimsey,P.B., Shankar,A., Hall,L., McGurn,M., Povinelli,L. (1992) Role of T cells in immunity to the intracellular pathogen, *Leishmania major Subcell.Biochem.* **18:99-129.** 129.

Torok, M., Etkin, L.D. (2001) Two B or not two B? Overview of the rapidly expanding B-box family of proteins *Differentiation*. **67**: 63-71.

Tu,X., Wang,C.C. (2004) The involvement of two cdc2-related kinases (CRKs) in *Trypanosoma brucei* cell cycle regulation and the distinctive stage-specific phenotypes caused by CRK3 depletion *J.Biol.Chem.* **279**: 20519-20528.

Tu,X., Wang,C.C. (2005) Pairwise knockdowns of cdc2-related kinases (CRKs) in *Trypanosoma brucei* identified the CRKs for G1/S and G2/M transitions and demonstrated distinctive cytokinetic regulations between two developmental stages of the organism *Eukaryot.Cell.* **4**: 755-764.

Tuazon,P.T., Chinwah,M., Traugh,J.A. (1998) Autophosphorylation and protein kinase activity of p21activated protein kinase gamma-PAK are differentially affected by magnesium and manganese *Biochemistry*. **37**: 17024-17029.

Ullu,E., Matthews,K.R., Tschudi,C. (1993) Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts *Mol.Cell Biol.* **13**: 720-725.

van de Weerdt,B.C., Medema,R.H. (2006) Polo-like kinases: a team in control of the division *Cell Cycle*. **5**: 853-864.

Veeken,H., Ritmeijer,K., Seaman,J., Davidson,R. (2000) A randomized comparison of branded sodium stibogluconate and generic sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis under field conditions in Sudan *Trop.Med.Int.Health.* **5**: 312-317.

Vincent,C., Doublet,P., Grangeasse,C., Vaganay,E., Cozzone,A.J., a Duclos,B. (1999) Cells of *Escherichia coli* contain a protein-tyrosine kinase, Wzc, and a phosphotyrosine-protein phosphatase, Wzb *J.Bacteriol.* **181**: 3472-3477.

Waas,W.F., Dalby,K.N. (2003) Physiological concentrations of divalent magnesium ion activate the serine/threonine specific protein kinase ERK2 *Biochemistry*. **42**: 2960-2970.

Waas,W.F., Rainey,M.A., Szafranska,A.E., Cox,K., Dalby,K.N. (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**: 81-87.

Walther, C., Gruss, P. (1991) Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS *Development.* **113**: 1435-1449.

Wanders, P. (2004). *In vitro* und *in vivo* Charakterisierung einer *LmxMPK5*-Deletionsmutante in *Leishmania mexicana*. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover.

Wang,Q., Melzer,I.M., 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.

Whalen,A.M., Galasinski,S.C., Shapiro,P.S., Nahreini,T.S., Ahn,N.G. (1997) Megakaryocytic differentiation induced by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase *Mol.Cell Biol.* **17**: 1947-1958.

Wong,J.M., Liu,F., Bateman,E. (1992) Isolation of genomic DNA encoding transcription factor TFIID from *Acanthamoeba castellanii*: characterization of the promoter *Nucleic Acids Res.* **20**: 4817-4824.

Wiese, M. (1991). Klonierung des Gens einer membrangebundenen, sauren Phosphatase von *Leishmania mexicana*. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, 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 Journal* **17**: 2619-2628.

Wiese, M., Goercke, I. (2001) Homologues of LMPK, a mitogen-activated protein kinase from *Leishmania mexicana*, in different *Leishmania* species *Med.Microbiol.Immunol.* **190**: 19-22.

Wiese, M., Kuhn, D., Grunfelder, C.G. (2003) Protein kinase involved in flagellar-length control *Eukaryot.Cell* **2**: 769-777.

Wiese, M., Wang, Q., Gorcke, I. (2003) Identification of mitogen-activated protein kinase homologues from *Leishmania mexicana Int.J.Parasitol.* **33**: 1577-1587.

Wiese, M. (2007) Leishmania MAP kinases-familiar proteins in an unusual context. Eingereicht.

Wilson,K., Beverley,S.M., Ullman,B. (1992) Stable amplification of a linear extrachromosomal DNA in mycophenolic acid-resistant *Leishmania donovani Mol.Biochem.Parasitol.* **55**: 197-206.

Wu,J., Rossomando,A.J., Horng-Her,J., Weber,M.J., Sturgill,T.W. (1992) Apparent sufficiency of a dual-specificity tyrosine/threonine kinase for activation of MAP kinase poses new questions for the dual-phosphorylation mechanism *Biochem.Soc.Trans.* **20**: 675-677.

Wu,J., Rossomando,A.J., Her,J.H., Del Vecchio,R., Weber,M.J., Sturgill,T.W. (1991) Autophosphorylation in vitro of recombinant 42-kilodalton mitogen- activated protein kinase on tyrosine *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**: 9508-9512.

Xu,S., Robbins,D., Frost,J., Dang,A., Lange-Carter,C., Cobb,M.H. (1995) MEKK1 phosphorylates MEK1 and MEK2 but does not cause activation of mitogen-activated protein kinase *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**: 6808-6812.

Yang,S.H., Yates,P.R., Whitmarsh,A.J., Davis,R.J., Sharrocks,A.D. (1998) The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a mitogen-activated protein kinase targeting motif *Mol.Cell Biol.* **18**: 710-720.

Yang,X., Hubbard,E.J., Carlson,M. (1992) A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system *Science*. **257**: 680-682.

Zhang,R., Murakami,S., Coustry,F., Wang,Y., de Crombrugghe,B. (2006) Constitutive activation of MKK6 in chondrocytes of transgenic mice inhibits proliferation and delays endochondral bone formation *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **103**: 365-370.

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

Zheng,C.F., Guan,K.L. (1993) Cloning and characterization of two distinct human extracellular signalregulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2 *J.Biol.Chem.* **268**: 11435-11439.

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

Zhou, C., Yang, Y., Jong, A.Y. (1990) Mini-prep in ten minutes *Biotechniques*. 8: 172-173.

Zhou, H., Watts, J.D., Aebersold, R. (2001) A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation *Nat.Biotechnol.* **19**: 375-378.

Zijlstra, E.E., Musa, A.M., Khalil, E.A., el Hassan, I.M., el Hassan, A.M. (2003) Post-kala-azar dermal leishmaniasis *Lancet Infect.Dis.* **3**: 87-98.

Zilberstein, D., Shapira, M. (1994) The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites *Annu.Rev.Microbiol.* **48**: 449-470.

9 Anhang

9.1 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

9.1.1 LmxTFIID

DNA, offener Leserahmen:

0	ATGGACGATG	ACTATGCTTT	CTTCGAATCG	GACAACTTAG	TCGAGGAGGA	GCTGCCAGTC
61	ATCGGTGCCT	TTCCTGACCC	CGTTGCCGAG	TTTGGCGGCG	TCGTCGGGAC	CACCGGTGCA
121	ATTGGCGATT	TGGCTCTGAC	AGCGGACGGT	CATCTCGCTG	CTGCCGCAGC	CACGCTGCCC
181	GGCGGCGACG	GCGCTGCTCC	CAAGCTGGAC	TTTGACGAGC	TCCCTCCACC	CATCAAGAAT
241	GTCCAAGAGT	TCCTGCCGAA	TGTTCACCCG	GACGCCTTCC	CCGTTGTCGT	AGCCGTGCAA
301	GCGCAGGCCA	GTATTCCAGT	CGGCATTAAC	CTCGCTGAAC	TTAGCTGTGC	CACACGCAAC
361	GTGGAGTACA	TGCCGAACAA	CCGAATTCCA	TCTGCGACGA	TGCGGCTGCA	TGAGCCGACT
421	GCCGTCGTCA	TGATGCACAA	CTCAGGGGCT	CTCAGCATCA	TCGGCGCAGC	TAGCGTCAGT
481	GAAGCGCGCC	AGGCGGCGGA	GCTGGCGGCC	CGTATCATCC	GCAAAGCTCT	CAACCTCAAC
541	TTCTCATCCC	TCAAGTTCCG	CGTCCGCTCC	ATCGCGGCGC	GCTTCAACGT	GTGCAGTCCG
601	ATTCGTCTCG	ACAAGCTCGC	CGCCTACAAA	TTAGACCCCG	CCATGTCGAT	CGGGGTGGCG
661	AAGCTGCAGG	TCAGCTACGA	GCCAGAGCGC	TTCAACGGCT	GCGTGCTTCG	CCTCGTCGGC
721	AAGTCCTCGC	GCGGGGACAA	CCAGTGGAGT	GTGAGCTGCA	GCGTGTTTGT	GACCGGCAAG
781	GTGCAGTTGA	TGGGCGCCCG	AAGCATGGAT	GAACTGCGCT	TTGCCTTCAA	CGCGTTTGTG
841	CCCATCATTG	CCAAGAATTT	GGACGAGCGG	AAGACTGCCT	AG	

Protein:

```
    MDDDYAFFES DNLVEEELPV IGAFPDPVAE FGGVVGTTGA IGDLALTADG
    HLAAAAATLP GGDGAAPKLD FDELPPPIKN VQEFLPNVHP DAFPVVVAVQ
    AQASIPVGIN LAELSCATRN VEYMPNNRIP SATMRLHEPT AVVMMHNSGA
    LSIIGAASVS EARQAAELAA RIIRKALNLN FSSLKFRVRS IAARFNVCSP
    IRLDKLAAYK LDPAMSIGVA KLQVSYEPER FNGCVLRLVG KSSRGDNQWS
    VSCSVFVTGK VQLMGARSMD ELRFAFNAFV PIIAKNLDER KTA
```

9.1.2 LmxUP

DNA, offener Leserahmen:

ATGACGA	CGACCTCGCC	CACATCGTTC	CAGCGGACGT	ACTTGCGCAT	TGTAGTGTAC
TGCGACGATT	CGCAGGAGCC	GCACACCTTA	CCGGATGTGC	GTGTGCCGCG	GAGCATCGGC
GAGGTGCAGC	GACTCGTGGA	GGACCGTGTA	GGACAGCGCG	CAAAGGTACT	TTCCTACTGG
AATTACACAC	ACAGTCGCTA	CGAGCTCCTG	AAGGATGTGC	GCGAACTACT	GCAGACAGGC
GGGCATCTGC	TTTCGCAGCG	GTTACACACC	TCAGAGAATG	AGGCCACGGA	GACGGCAGAG
GCGGATGGGA	CGACGAACAC	GGACGGCGGA	GCCACCTCCG	CCAGCGAGCT	GGACGCCAAC
CATTCAAAGC	TCTGCATCTA	TCGCTGCCAG	CTGTGGATGG	AGGCAACACT	GATTCAGCTG
GAGCCGCTGG	ATAAACGGCG	CGACAAGATC	GAGTACGATG	AGCTGTGCAG	TCACGTTGCT
TGCTGGCTGG	GCAACAAGCA	TGTCAGCTTC	GAAGTGCAGG	ATGCGATGCG	CATTCGTTGC
CCTTTCCTGA	CTCGCATGTT	TGACGAGACG	CGAAGCAGAC	GGCTGTCAGC	CAATCAGGAC
AAGGTGCAGC	TGCTCTACTA	CAGTAACAAC	GCGTGGGGCG	TGCGCGACGT	GCTGCAGTAT
GGATTCCTGC	TCAGCAACGG	CGTCCCTCAG	TCGCTGGAAG	CCATGCTGCA	GTCCTGCGGC
GACTCGGACG	TGTCAAGCGG	TACTGAGTCG	CGGTCGAGCA	ATCCTGTGCC	ACATGTCGGG
GATAGTGCTT	CGGCGAGGAC	CTCTCCGTCG	TCCGCGCCGC	TAACCGCGGC	GAACACGCGA
CGCATGCCTT	TTGTTTTCAC	CTCCTCGATG	CTTGGCGCGC	ATGTAAAGTA	TTTGCCACCC
AACACCGCGT	CTCAGAAGGT	GCTGCTGTGC	GAAGTTGCAC	CTGGCCGCCG	TTTCATGACT
GACCAAGGCC	TCACTGGCGA	GAGCCCCGAC	AAGCAGGCCT	ACCCCACCCC	TCCTGTGAAG
CCACCACGCG	ACTACGACAG	TATCTGCTAC	ATGCGGGCGC	ACAAGCAGAA	GTCCAGCCTG
CGCACCGAGG	GCGCCGTTGA	AATCGCCGCA	GAAGACCTCT	CCCTTGTGCA	GGTGCAGGTG
CAGCACAGCT	ACCAGGCACT	GCCCCGCTAT	CTACTGACGG	TGGTCCCCTC	CGCCGCCACC
CCGTCGTCAC	AGCAGCCCCG	CAAGAGCAGG	CGGTATGCCA	TAACCAGCCC	GGTCCGGGCA
CCAGGGATGA	CAGCACATTC	CGCGGCAGCG	AGGGAGGACG	AGAAGAGGAT	GAACCGTGCG
GGAAGGGTCC	CACCGCCGCT	GCCGTCCCCA	TCGTCCCCAT	CGTCCCCATC	GTCCCCGTCT
TCCCCGTCCA	AGACCTACAA	CATGAAGGAG	TGGTTCAAGT	CCAGCCCGAG	GCGGGGCCCA

GTGTCGGGGG	ACAAGGGCGC	GAATGCGAAG	CGGGCCACCT	CCCCGCATAG	CACCAGCAGT
GTCTTCAGGG	GAGTGCGCTA	CGCAGACAGC	ACAGCACCCC	GTCAACGAGC	TGCCTCAGCC
ACCACGCCGG	GCCGCTGTGA	GTCTTCCAAA	CAGCACCGTG	CCGCGCGGGG	AACCCGGGTC
GAGTGCGACG	AGGACAACAC	CGTGTATCAC	GGCGGTGACG	GACTGATTGA	GCCCTGGACG
CTAGACTCCA	TGCCTGCAAG	AGGCACATGG	ACTGCAGGGA	GCAGTGGCCT	GGTGACAAGC
TCGCCGTGGA	CGTCAGAGGT	GTACTCAGCC	GGCAACGGCG	GCCTTCGCAG	CGCTTCGCCC
AGCAAATGTG	TCTCTTGCGA	CGGTGTTCGT	GCCACTTCGG	CACCCCGCGC	ACCACCGACG
TGGCACCTGT	CGCCACTTAG	TCCATCCGCC	GCCCAAGTCT	CGCCGAGCAT	GAATTCGGCG
TGGGCGACTG	GCGGCATGGT	GCTGCCTCCG	TCGCTCCAGG	ACGCCTACAA	TGCGCACTCG
AGTCGCGACG	GGCTGCTCTA	CGAAAGCCTG	CCCTGTGGTC	ACAGCGCCAC	GAGCCACGAC
GCAGCATATC	GGCTAGTACC	TGCTGCCGCG	GGCAGAAGCG	CTGGTAGGAG	AGCCGCAAGC
GCTGGCGCGC	CACTGGCAGC	TGTCCATTAT	GGCGCCCCCT	CACGTCCTCC	CCTTCTACCG
CACGAGGGCG	CGTGCGTTGG	CGGCGCGATG	GGCGGCGGGG	GCATCGTTGG	CCCGACGCTG
AAGACAGTGC	CGCCCGCCTC	GTCCACAGTC	CCATTTTCAC	AGCGGCAGGC	GCCACCGGCA
GTCTTGGATC	AGTTTACCTG	CAACGTTCAT	CCCCGCCAGC	TCAAGTCGCT	CTACTGCATA
GCGTGCGAGG	AGCTGACGTG	CCCGTACTGC	GCCAGCGTTG	GGGCGCATCG	TTCTCACGTG
GTGGTGGAGG	CAGCGAAACG	AGCAACAGCT	GTGTGTGCTA	AGGCGGAGGC	ACTGCAGGAG
GCTCTGCGCC	ACTGGCTGAC	CCAGTGCAAG	CAAACGGAGG	AGCAGCTGAG	GGCAGAGCAG
GCCCGCTACG	CTGCGCGGCA	GCAGCGAGAT	CTGCGCTTCG	TCCAGCAACA	GTTCTCGACA
CTCAATCAGG	CGCTTCAGCA	GGCGGAGTGC	TCCATGACGC	AGACGGTGCA	GGAGGCGCAG
CGCAGGCTGC	CCCTCGCCGA	GGCTGCCGCC	GTGGTCACCA	AGTACACGCA	AGCGCTCGCC
GCTCTAGACG	TGGCGTTGCG	TCGTTATTAC	AGCACAGTAG	CTGCCAGCGG	TAGTGGGCCG
TGCACAGAGC	GCGCTTGCGA	TCCCACGAGC	AGCTTGCTTG	AGTTGTTGCA	CTTCCTTCGC
ACGACCCCGT	CGTTGATTCG	CCGCGTGCGA	CGCAGTTTTG	GTCGGCGCCA	GGACGAGGAG
AAGCGTCTGC	GTGACGCCAT	CGCGGACTGC	GAGGCTCAGG	TGCAGACGAA	TGAGACATGC
TTTCAACAGG	TTAACTGGGC	AGGCCTGCGT	CGGCTGCTTG	CGAGCATCGG	CAACGTCCGC
ACCAATATAC	TCAACGTAGC	AGAGCCGCAG	CTGTCTACCT	CGGTGGGGCC	ATTTCACAGT
AGCAGGGCCG	CGTCTCCGTC	ACTGTACGAG	GCCACCGCCC	TCTTTATGCC	TGGTGCAGCG
CAAAGCCGGC	CAAACTCTGC	CAAGGTGCGA	GCGCACACTC	AGACGCCGAT	GGTACTCTCG
TCACCGCACC	CTGACCCCGG	CAGCGACGTA	TCGCAGCGGC	TGTTGGACAG	TCTACCTCTC
GGTACCCTTA	TGCAAAGCGA	AAACGGTGCC	GCCACATCGC	CGCCGACGCG	GCAGAATCTC
GGCCTGCACC	GCTGTCTGAG	GGACCTCCAG	AGAGGCTACA	TTTGGGTCAT	CCAGAGTGCC
AGGTCTTACT	TCGCACCTGG	GCAACGGAGG	ACAGTCTGCT	CCACACCATT	CCGCCTGCTC
GATGTATCGT	GGGAGCTGCG	CGTTGCTCCG	CTCCCGCGAG	CGCGTTGCCC	CGACGGCAGC
GCGTCCTCCA	CGCCGATGGT	GGAGGCGGGG	ATCAGCGGCG	GCGTGATGGA	CACCGCAGCT
TCTAGGTTGA	CACCACCCAG	TGTGATGGAG	GGTGGCGGCA	GGGGGGCTCAG	CGGTGGCCAG
GCGCACACCT	CACGCCTTCT	CACGCGCTCC	ACGCAGGAGC	ACCACTACAC	GTTCGCGGCA
GAGGACGTCG	ACGACACCGT	CGTAACGGCC	GCGCCCTCGT	CCGACGAGGG	AGAGGAGGAG
TGGCTTGGCC	TCTTTCTCTT	TCCCTTGCAA	CACCGTCTGC	GCGTAGACTT	CCGCGTTATC
GCCTTCTCCG	AGGTGGCATG	GGCGGAGTGG	CAGGTGACGG	GGTGGACGGT	GCAATTTGCC
GGGAAGGGAT	GGGGCCTCTA	CCCCTTCCTG	CAACGCAGAG	AGCTGATGCG	GACCGACAAG
CTGGTGCGCG	ATAACATGGT	GAAGATTTGC	ATAGCCCCCA	TTAGCGACCT	GTATTAG

Protein, hervorgehoben sind die putativen Kinase-Andockstellen (gelb hinterlegt), die putative Phosphorylierungsstelle (blau) und die putative Zinkfingerdomäne (rot):

P			(
0	MTTTSPTSFQ	RTYLRIVVYC	DDSQEPHTLP	DVRVPRSIGE	VQRLVEDRVG
51	QRAKVLSYWN	YTHSRYELL <mark>K</mark>	DVRELL QTGG	HLLSQRLHTS	ENEATETAEA
101	DGTTNTDGGA	TSASELDANH	SKLCIYRCQL	WMEATLIQLE	PLDKRRDKIE
151	YDELCSHVAC	WLGNKHVSFE	VQDAMRIRCP	FLTRMFDETR	SRRLSANQDK
201	VQLLYYSNNA	WGVRDVLQYG	FLLSNGVPQS	LEAMLQSCGD	SDVSSGTESR
251	SSNPVPHVGD	SASARTSPSS	APLTAANTRR	MPFVFTSSML	GAHVKYLPPN
301	TASQKVLLCE	VAPGRRFMTD	QGLTGESPDK	QAYPTPPVKP	PRDYDSICYM
351	RAHKQKSSLR	TEGAVEIAAE	DLSLVQVQVQ	HSYQALPRYL	LTVVPSAATP
401	SSQQPRKSRR	YAITSPVRAP	GMTAHSAAAR	EDEKRMNRAG	RVPPPLPSPS
451	SPSSPSSPSS	PSKTYNMKEW	FKSSPRRGPV	SGDKGANA <mark>KR</mark>	ATSP HSTSSV
501	FRGVRYADST	APRQRAASAT	TPGRCESSKQ	HRAARGTRVE	CDEDNTVYHG
551	GDGLIEPWTL	DSMPARGTWT	AGSSGLVTSS	PWTSEVYSAG	NGGLRSASPS
601	KCVSCDGVRA	TSAPRAPPTW	HLSPLSPSAA	QVSPSMNSAW	ATGGMVLPPS
651	LQDAYNAHSS	RDGLLYESLP	CGHSATSHDA	AYRLVPAAAG	RSAGRRAASA
701	GAPLAAVHYG	APSRPPLLPH	EGACVGGAMG	GGGIVGPTLK	TVPPASSTVP
751	FSQRQAPPAV	LD QFTCNVHP	RQLKSLYCIA	CEELTCPYCA	SVGAHRSHVV
801	VE AAKRATAV	CAKAEALQEA	LRHWLTQCKQ	TEEQLRAEQA	RYAARQQRDL

```
851 RFVQQQFSTL NQALQQAECS MTQTVQEAQR RLPLAEAAAV VTKYTQALAA
901 LDVALRRYYS TVAASGSGPC TERACDPTSS LLELLHFLRT TPSLIRRVRR
951 SFGRQDEEK RLRDAIADCE AQVQTNETCF QQVNWAGLRR LLASIGNVRT
1001 NILNVAEPQL STSVGPFHSS RAASPSLYEA TALFMPGAAQ SRPNSAKVRA
1051 HTQTPMVLSS PHPDPGSDVS QRLLDSLPLG TLMQSENGAA TSPPTRQNLG
1101 LHRCLRDLQR GYIWVIQSAR SYFAPGQRRT VCSTPFRLLD VSWELRVAPL
1151 PRARCPDGSA SSTPMVEAGI SGGVMDTAAS RLTPPSVMEG GGRGLSGQH
1201 TSRLLTRSTQ EHHYTFAAED VDDTVVTAAP SSDEGEEEWL GLFLFPLQHA
1251 RLRVDFRVIA FSEVAWAEWQ VTGWTVQFAG KGWGLYPFLQ RRELMRTDKL
1301 VRDNMVKICI APISDLY
```

9.1.3 LmxPK5 (NCBI Acc. Nr.: DQ812908)

DNA, offener Leserahmen:

1	atgtctcgac	tgaaaataaa	ccttgacgcc	atcgagcgcg	atggtgctag	cgcgacagag
61	ggcttctgcg	ccgacggcgt	ccgcatcggc	tcgcttctag	tgtcgtctga	gggagtacgg
121	gataatcagg	gcaacttgtg	cgtgctgtct	ctcagtgacc	ttgaggtggt	tccggaaacg
181	gagggcggct	tcttaggcaa	aggcagcagc	ggctctgttc	gccgcgcggt	tcaccggggc
241	agcaataagg	tggtcgccct	caaggaaatc	aaagtgacag	ggcagacgca	catcaatgaa
301	attcgacgag	agctcgagac	gctgcacgct	ggcgacttcg	caacgccgta	cctcgtcagt
361	ttttacggtg	cgttcgcaca	tgaggggtcc	gtcttcatcg	cgatggaagc	gatggacggc
421	tctctgcacg	agctatacaa	acccgtccca	ccacctgtct	tggcgtgcat	cacgcgactg
481	atgctgaagg	ggctcacgta	cctgcatcgt	aaccgccatc	tcattcatcg	cgatttgaag
541	cccagcaacg	tcctctacaa	cagccgcacc	ggcgacatca	agatatccga	ctttggtgtg
601	agctctaatc	tggagtgcac	caaggcagat	gcccacagct	ttgttggcac	ggtcacgtac
661	atgagtcctg	agcggcttcg	aggcgagcac	tactcgtacg	gagccgatat	atggtctctg
721	gggctcgttg	tcgcagagct	ggcggtgggg	gtgtgcccgt	atgccggttt	gcgcggcggc
781	agcagcgagg	cgcgcttctg	ggcactgtta	cagcatctca	acggtgacgg	tacggcgcta
841	gagctaccgc	cggagatgga	tagcgacctg	gctgacttca	taagcgcgtg	tgtcgtgaaa
901	tcccctgaca	ggcggcccac	gtgcactgag	ttgctccgtc	acccgttcat	tgtgagatac
961	acaggtgcgg	cgccagaggc	ggaggcgaaa	ccgttctcga	ccaccactcc	cactgttctt
1021	gctcctggag	gactctcttc	gctgctgaat	cgcgcctcgc	ctgcggcagg	gtcagccttg
1081	ccccttgcca	gcgagggggg	tacgcccaag	gctacttcgc	catctcctgc	gccggtgtcg
1141	ccgctgacgc	tttcgtgtcc	ccttgagcgg	cacgacggcg	aaacggatgc	tgatatcgca
1201	gaccgaaccg	tcgttgcgcg	atggatccac	gctgtaatga	aacgggcggt	gttgcacaaa
1261	gcgagagggc	acgggcgcga	agagctgcac	caggagccac	ttgctgccgt	gtcggcgtcc
1321	gtggccacag	attcgggtga	gggaggcggg	gcggcgggcg	tttctgcggc	tagcttagac
1381	aatggacagg	ccgcacagca	tagggagttc	cgcgccgaga	ggaatctaga	tgggcactcg
1441	ggtgatggtg	gcagtgcccc	tgtggaggaa	gattgcaccg	ctggcgtacg	ctctctcacg
1501	tgtgacgacc	tgcggtggac	ctccacgggt	gaaccgtctg	tcaacctcga	tgatgaacta
1561	aacaggcttc	tcttctga				

Protein:

1	MSRLKINLDA	IERDGASATE	GFCADGVRIG	SLLVSSEGVR	DNQGNLCVLS
51	LSDLEVVPET	EGGFLGKGSS	GSVRRAVHRG	SNKVVALKEI	KVTGQTHINE
101	IRRELETLHA	GDFATPYLVS	FYGAFAHEGS	VFIAMEAMDG	SLHELYKPVP
151	PPVLACITRL	MLKGLTYLHR	NRHLIHRDLK	PSNVLYNSRT	GDIKISDFGV
201	SSNLECTKAD	AHSFVGTVTY	MSPERLRGEH	YSYGADIWSL	GLVVAELAVG
251	VCPYAGLRGG	SSEARFWALL	QHLNGDGTAL	ELPPEMDSDL	ADFISACVVK
301	SPDRRPTCTE	LLRHPFIVRY	TGAAPEAEAK	PFSTTTPTVL	APGGLSSLLN
351	RASPAAGSAL	PLASEGGTPK	ATSPSPAPVS	PLTLSCPLER	HDGETDADIA
401	DRTVVARWIH	AVMKRAVLHK	ARGHGREELH	QEPLAAVSAS	VATDSGEGGG
451	AAGVSAASLD	NGQAAQHREF	RAERNLDGHS	GDGGSAPVEE	DCTAGVRSLT
501	CDDLRWTSTG	EPSVNLDDEL	NRLLF		

9.1.4 LmxPK6 (NCBI Acc. Nr.: DQ812909)

DNA, offener Leserahmen:

1	atgcgtgcga	agcgcccgct	ccgtacgtcg	gggccgtgct	tcgacctggc	cgggctcatg
61	gatcatgcag	cccctgagct	gcaggtgcag	caaaagaatg	agcaggagct	caacaagttc
121	ttcatcgacg	tggatgacaa	tatcgtttca	ccgatgatca	cgacaggccc	gagctttcgc
181	acgacgaact	cggcgggtct	ctcgagcaac	aactccacgg	tcgaattgac	ggcaatggag
241	atggcgggca	ccggtggcag	cacgtcggtg	gagcagagga	cgatggcgtc	cccgcaaaac
301	gaggccaagt	ttattcacgt	caacgacacc	aacatcttcg	tgctgattga	cggcatctcg
361	atgtttgtgg	agggaaagag	cacgttcacc	gggacagaag	acgcacgtct	gctggtggaa
421	cggttgcgac	agaagaaact	tgcccgttcc	gtggacacgg	ttcaggaggc	catcttgaac
481	attcaaatgt	cggctgacca	ctgcggctgc	gaggagacat	ctccggtggt	atctgccatc
541	ccctctggct	cccctgttct	gccagcagaa	agatcttcaa	tgcagtccac	agcgaacact
601	ctcccaatga	gcgtgccagc	gcttcagaac	accgtcgccc	ccaccgcgct	acctgtgccg
661	ccgccgccca	cgaagccggt	ccccatcgcg	aatccgtggg	cgtcgctgtt	tgaagacgcc
721	aaggtgccat	ctggctcacc	tctgtttcgc	tccttcaagg	ccaagtctct	aggcagcacc
781	agcagctacg	gctttcctcc	tgcagacagc	acgctgctgt	gtgagagcgc	cgaatcgggt
841	gcgacgtcat	cctcgcctac	gacaacagtt	ttccctgcga	cggtggccac	cccgacatcg
901	gcgttttcgt	ccaccactgg	cctcaacgcc	tctagccgtc	tcacgcactc	cgtcagcttc
961	cccagcctgc	gtcatcaaga	cagctcgtcg	tccctcctgt	caacgacctc	gggtgccggc
1021	caccgccaca	gcgggcaccc	cagccgcggc	gcagcagcgc	ggcggacaaa	gcagatttcg
1081	gtggaggaga	tcggccacag	caactgctcg	cttgacatgg	atgaggtggt	ggttgaggcg
1141	atgattggaa	aaggcactca	gggaacggtg	ttccgcgtcc	gcttggacgg	caagctgtac
1201	gctctcaagt	gcatgaatat	tgatgaggcg	ctgaacgcga	caaacgacgt	ggagcggcag
1261	gggtacaaga	aagggctcgt	gaaggagttg	accatgatca	ctctgcaacg	atcgcgtcca
1321	ccgccggcgt	accttatgca	aatgttcaac	gccgtggcct	cactggacgc	ggagaagaag
1381	cagctgagca	tcctgatcga	gctgatgtcc	tttacagtag	aaaacattca	acagatggtc
1441	tctcgcatcc	ctagcgagga	gttgatgcgg	gtcactcagt	cgacgtttcg	aaactacatg
1501	tccggcggct	cgtcagcgaa	gcaggcaatg	aaggagtgtt	gcacgggcca	gctcctttac
1561	gggtcttcgc	ggcatgctct	ggggcgcaac	acgtacaagg	agccggccgc	atgggagaag
1621	aacgtgaagc	gtgagacacc	aatgccggaa	gtgctgctct	caatgctggc	tcgggacgtg
1681	ttgatgggtc	tgaacgagct	gcacaccgac	tactccatca	ttcactgtga	tctaaagcct
1741	gccaacgtga	tgctctgcta	tgatcagcag	aagttcaagc	ttgccgactt	cggctgcggc
1801	tctgtgatgg	aggaccggca	gcacgtcgag	cggcgaggca	tcgacctcgg	caccatactg
1861	tacaaagcac	cagaacgctt	cgcagcgaac	attttacacc	gcatcgccga	catcgacgac
1921	ggcggcaccg	gcgaggcggt	ggtgttcacg	gccaaggcgg	acgtgtggtc	cttgggcatc
1981	atgctaatgg	aattggcggc	tggcattcac	ccctgtgatc	agttcaagtc	tgatttctgg
2041	aactacggca	ccaagttgaa	gctatccaag	atgaacaagc	cgctcaattg	gtcagagtcg
2101	ttttacgact	ttattctccg	gagcgtttgt	gtcgatgtct	ccttgcgatg	gtctgtgcag
2161	cagctcttga	aacacccgtt	tgtcatcaag	ttcaatcacg	tgccgcgcga	gaagctgaaa
2221	cagttcgtgc	agcgcttgga	ggtcgacagc	aagacgttcc	acaagcgcca	gcagagcgag
2281	ttgctcaagg	aacagatcct	gctcagcacg	acgcgtcggc	ataaggacac	gttccagctg
2341	cagagcagga	aggtgtggtc	gacgtacacc	gcttacctga	agcaggcgcc	gcccaccaag
2401	gatcaaacca	tgtttccgga	gctgcgtcac	acgtag		

Protein:

0	MRAKRPLRTS	GPCFDLAGLM	DHAAPELQVQ	QKNEQELNKF	FIDVDDNIVS
51	PMITTGPSFR	TTNSAGLSSN	NSTVELTAME	MAGTGGSTSV	EQRTMASPQN
101	EAKFIHVNDT	NIFVLIDGIS	MFVEGKSTFT	GTEDARLLVE	RLRQKKLARS
151	VDTVQEAILN	IQMSADHCGC	EETSPVVSAI	PSGSPVLPAE	RSSMQSTANT
201	LPMSVPALQN	TVAPTALPVP	PPPTKPVPIA	NPWASLFEDA	KVPSGSPLFR
251	SFKAKSLGST	SSYGFPPADS	TLLCESAESG	ATSSSPTTTV	FPATVATPTS
301	AFSSTTGLNA	SSRLTHSVSF	PSLRHQDSSS	SLLSTTSGAG	HRHSGHPSRG
351	AAARRTKQIS	VEEIGHSNCS	LDMDEVVVEA	MIGKGTQGTV	FRVRLDGKLY
401	ALKCMNIDEA	LNATNDVERQ	GYKKGLVKEL	TMITLQRSRP	PPAYLMQMFN
451	AVASLDAEKK	QLSILIELMS	FTVENIQQMV	SRIPSEELMR	VTQSTFRNYM
501	SGGSSAKQAM	KECCTGQLLY	GSSRHALGRN	TYKEPAAWEK	NVKRETPMPE
551	VLLSMLARDV	LMGLNELHTD	YSIIHCDLKP	ANVMLCYDQQ	KFKLADFGCG
601	SVMEDRQHVE	RRGIDLGTIL	YKAPERFAAN	ILHRIADIDD	GGTGEAVVFT
651	AKADVWSLGI	MLMELAAGIH	PCDQFKSDFW	NYGTKLKLSK	MNKPLNWSES
701	FYDFILRSVC	VDVSLRWSVQ	QLLKHPFVIK	FNHVPREKLK	QFVQRLEVDS
751	KTFHKRQQSE	LLKEQILLST	TRRHKDTFQL	QSRKVWSTYT	AYLKQAPPTK
801	DQTMFPELRH	Т			

9.1.5 LmxPK7 (NCBI Acc. Nr.: DQ812910)

DNA, offener Leserahmen:

1	atgcacacca	ctgagcctcg	cgcgctgaga	gacacacttc	cgactccgcc	aatgcaggat
61	cagtcaggct	cagagggtgg	catcgacgct	gccgctgcgc	agccctgcat	gaagactcct
121	cgcgacacca	gctctgccgg	tacacccacc	atcatgtcct	ctacgaagac	cgccgtcagc
181	ggtggcgttg	acgccacctc	cgcgcggcac	agctctttgt	cccttgtaaa	ggcgggcagt
241	gatgcaacac	ccgacatgac	tqqcaqqaqq	aqcqcqqctc	ctaqttcqcc	gctcaagccg
301	caqtcqatct	ccctqcaacc	qqaqqaqaqt	qcqaqaqtcq	ctqtaqatqc	qqqatcccqq
361	qqctctqcaq	qqcaqcaqcc	caqcqcaqqt	qqqqacctqa	caacqatqac	qacqacqqqc
421	accaccacca	acaccaccac	agcagcaagc	ggattgcctc	gcaagatgct	atctatcaca
481	ctaccaacat	gractaccat	gaacgggtcc	gagacaccat	catttcaaac	agaatcatta
541	atactaccac	tagacaataa	cacaccacca	aattactcaa	tagaggagg	aataacaacc
601	atatcagaac	cacaccataa	aaaacaacac	cracratrac	tettteaag	ctcaacacca
661	ccgacgactt	ttctgaccgt	caccaccaca	cccatactaa	tracgread	tatcaacata
721	ccagaggaete	catcactcac	acaccaaca	acacacacaa	cattttat	ctctcaaacc
781	aaccaataac	tacacataca	gaegeeageg	acgeatgega	ctctccccgc	cacacataga
9/1	atagagaga	agaatatta	cgcgcagcgg	ttatagatat	taggaggg	agagagagaga
01	gracecagee	taccatette	tagagagaga	ataaaaaaa	taccyacyca	cgacaacygc
901	gguggugagg	ryyacycaya	cyyayaycyy	claadacacyc	Lageggleag	gegagaeteg
1001	cacgagilgg	cyyayacacy	gligeedalg	agreeegeee	celalgegae	lycycacyly
1021	aaguugeega	cagleligee	gacaaccica	ccgccgclcc	galeeggeeg	geeggeeeae
1081	cctatcgctg	cccaacaaca	ccgtgccgca	tgtgaaagac	aaaggagcct	caccggcagc
1141	agtggtacat	cgacggcggc	ccactacaga	gcggcgggcg	ccatcacacc	ggccgccgtc
1201	gcaccagttt	caacaccgtt	gagtgcgacg	atgtcccact	acgggtcttt	tcaagccggc
1261	tacgcttccg	ccgctgccgc	tggcggtgct	gtgacaccga	acgcgacacc	gctgttgagc
1321	aacagcagct	tgtgcgggtt	cgccaaccac	ttcggcgccg	gcagcttcgg	cactgggagt
1381	acgccagcgg	cgtcgctcag	caccgcgacc	cccaccgctg	gtgtcaaccg	acttcagccg
1441	ccttccgcag	cgcgtctatc	ggtgactggc	gcgggtggtg	gcggtgctgc	tgctgcggct
1501	gccggggtct	tgtcgccgct	ttctctgtcc	ggagctgctg	cgagtgctcg	gacagcgcgc
1561	cgccgtgcac	cgccgccgtt	actgttgcgt	cttcgctcgc	cggtcggccc	agcgtcgctc
1621	agcaccgccg	tcagtgcgaa	cgatacaagc	ggtgagatga	cttctcccgc	atcagctgcg
1681	ccgccgtcgt	cagcgaaccg	agccgccatc	tcgtctgctg	ccactgctgc	tgctgctgcc
1741	agcgccagcg	ccggcgccgg	cgcctccgca	ctgacctctc	ctccgctgaa	ttcgcggtcc
1801	atggggatga	ctatgcacag	tggcagcgca	agcgatttgg	tgagcacgac	agcagatcga
1861	cccgcacgcg	gaagcggctg	caaccccccg	gccacacccg	ctcgacccgg	ccccttcgcc
1921	cgcacccatg	gcagcgcagg	tcagagcctg	agcacctttt	cctccggcac	tcgcagcggc
1981	gggcttgtgc	gcatctcaca	agatcgtcgc	accctcgtcg	cggggatgtt	ccgcgtgtcg
2041	cgggaaggtt	gtctcacggt	gcgtaacatg	cttctcctca	acccaacccg	cattgacgcc
2101	ggcagcgcca	ctggcggagc	ggccggtcca	ggcggcacct	gtggcagttt	catgggcagc
2161	agcacaaccg	gaactagcgg	tggtggcagc	aagagtcggc	cgctacagct	gctgcatccg
2221	cagcgatctg	cggccagcta	ctcgcccgtg	agcagcaacg	ggggccttgt	ggggcgcatg
2281	caactactcg	gtcccggcgg	cggcaatgac	atcgggggtg	gtgggggtgt	tggcggcggt
2341	gcgggtggac	taggtcccat	gacaccgaac	acaaccggct	ccgactggcc	tttgccccat
2401	gcgtaccacg	gcggtggctg	ctcgggcaac	gcgcgcaaca	tgcacaacag	cggcggcgga
2461	ggaggggggg	ccagcgccac	ggcgaacgcg	tctttcactc	tcttctctac	cagtatggac
2521	acgcccttca	gcccgatcac	gtactcaatg	qacaqccaqc	qqatqqcqct	cccaaqcccc
2581	ctcqqcccqc	actacqataq	aqccqqtqct	qccqctqqqc	cqccqccqca	gctcctgagc
2641	acaqtttqca	acqacactqc	qqcctctcac	ttcctcqqcq	cqaacqqctc	cctccatcaq
2701	caqccqcaqc	aqcatqaaqq	cttactacct	qqtqcqcatc	acqtaacaqa	caccaacqct
2761	tcqcctaccc	qaaaccttqq	ctacqqcatq	qtqaccqctq	ataccactac	aqtqacqcaq
2821	caqcaqcaqq	tcqccacacc	caactccacc	accccacttq	qqcaqccttt	taacaacaat
2881	qqcqqcaaca	tctgccacgc	gcagetgegg	tctcaggcga	gcaacggttg	attaccagag
2941	acattaaata	caacaaacac	aatctcacca	tccccttta	casccacaaa	caaaacsaaa
3001	agratattag	acaccaacac	ctttacagac	accoacacoo	tgaacagtet	actactaccc
3061	tacgccgata	tacctaccta	traagarart	attacctca	caactactac	cagetatata
3121	adasaccat	cragaratar	aaaccettet	aacttoooo	ccaccaccac	adragasaca
2121	agaatagaaa	caacaacaac	atatataat	agatagagag	caactactac	cacatactta
32/11	ggaacggegg		gattagata	gyuuayyya	agatectec	
J 4 1 ⊥ 2 2 ∩ 1	agtappaga	actograda	adattaata	aggatagag	acaleeteete	gacyacity
22C1	ggggtgaaggCg	agatagaaat	ayuyuuuyuu	tagetage	ageceaecyg	
2/01	geogradad	tatagaataa	tagastasa		gattatat	tagagagata
2401	aycyycyceg	course age of the	agganese	tagericage	guallylydl	
340⊺	cayylyctgc	accicactta	ccycayccca	llcalygtca	ayyıcıacaa	LYCCLLCTTC

3541	cttgctgagg	tggcggcgct	ggacattgtg	atggagttca	tgcactatgg	cggcctcgat
3601	cacctcgcca	actgcctaca	acagcatgcg	cggatggtgc	gagggtcgca	acaagagcgt
3661	caccgactgc	tcaccaccga	cgatgatgac	gacggtgacg	gcggccgccg	cggcagtggg
3721	catggtggta	gcccatccgt	tccgcctctg	ctctctgacg	ctcccgaggc	gccgcaggtt
3781	gctgagggct	ctctgaagga	tgcctcggcg	gttggcgttg	gcaggagcgg	tactggcggc
3841	ggtgtcgccg	ccgccgacac	cgagcggcat	ccgtccatga	acagcatctc	acctaagctg
3901	ctcgactctc	ggcgtactct	cgcagagcgg	gcaccgtcgt	cggcgccgag	gccgtgcata
3961	ccaacagccg	ccggcactac	cggtaggagc	gatgcggata	gcacggcatg	cggcggtggt
4021	ggtgttccgt	gtcaccctct	cagcggcgct	tacaagcaca	tctacggcag	caatgacagc
4081	cttctgctcg	actcgtactc	cgtgaagagc	gactgcggca	cagacgactc	ggagtcggac
4141	gacggcagcg	gtctcgtcga	ggaacctctt	ggcgtcacag	agcgcctggt	tgccgttgtg
4201	ggagagcagt	tgctacgcgg	tgtccgcgac	atgcactccc	gtggctacat	ccatcaagac
4261	atcaaacccg	gtaacgtcct	tgtgaatgaa	cacggggtcg	tgaagctcag	cgactttgga
4321	ctgtcgcagc	gctgcgacag	caacggcatc	ggcatcaaga	acgacatgct	gacgtacatg
4381	ccacccccct	ccgtcgcccc	ggcgcagtct	atcacgccac	tgcagtcacc	gtcgcttaca
4441	tccttgcaac	tgacaggcgc	acgtggccgt	cgcgcgccgt	tcatctggca	cgctcaacgt
4501	ggcagcatcg	gcgcaggcat	tagcggccag	cttggcagcg	gcatggtcgg	cacgaccccg
4561	cccgagatgg	ggagctccgc	agaggggtta	gtgctcagca	gcaccacgaa	cagcctgctg
4621	gcgcagcgcg	acggcatgga	tgtgctggag	gcggagtcga	catcgtcgga	ggagggctcg
4681	ggcgaatggg	acgctacccg	aaggggactg	agcccatcgt	cgtcgtccga	cgaagccggg
4741	gactgctgcg	gcacggacaa	gtacatgagt	cccgaacgcc	agcgcggcga	gccgtacggc
4801	aagcccgctg	acatctgggc	cgttggcgtc	accctcgcag	agttcgcggt	gggcgagtac
4861	ccctatgacc	tcacggacgt	catcgacgag	tttgaccgcg	tgtcgcggat	ggataagccg
4921	gtggacgtgt	ttcagttcaa	caagcaccgc	gctgtgccgc	tgggcaccgt	cttcgcggac
4981	ttctgccgac	tggcaacact	accgacagct	tcgcagcggc	cgaccgcaca	ggagctgctc
5041	gagcacccct	tcttcaagca	gtggcaccgt	ccgttcaacc	tcaaggacta	cctcgctgcc
5101	cgcgtgcccg	tgccgtcgaa	ccgcctgaag	gaggactacc	ttgcgaagca	gcgcgagcgc
5161	ccgccggagg	ggcagcagcc	ggccggcccg	ctgggctaa		

Protein:

0	MHTTEPRALR	DTLPTPPMQD	QSGSEGGIDA	AAAQPCMKTP	RDTSSAGTPT
51	IMSSTKTAVS	GGVDATSARH	SSLSLVKAGS	DATPDMTGRR	SAAPSSPLKP
101	QSISLQPEES	ARVAVDAGSR	GSAGQQPSAG	GDLTTMTTTG	TTTNTTTAAS
151	GLPRKMLSVT	LPACTTMNGS	ETPSFQAGSL	MLPLGDGAPP	SCSVEEAMAA
201	VSGPRREKRR	PPSLFSSSAP	PTTFLTVAAR	PVLITPAVGI	PEDRSLTTPA
251	TQATFSVSQT	NQWLHVPVQR	PPAPLPRTPG	VPSPPSSTLV	LSVLPTHDNG
301	GGEVDADGER	LNTLAVRRDS	HELAETRLPM	SPAPYATAHV	KLPTVLPTTS
351	PPLRSGRPAH	PIAAQQHRAA	CERQRSLTGS	SGTSTAAHYR	AAGAITPAAV
401	APVSTPLSAT	MSHYGSFQAG	YASAAAAGGA	VTPNATPLLS	NSSLCGFANH
451	FGAGSFGTGS	TPAASLSTAT	PTAGVNRLQP	PSAARLSVTG	AGGGGAAAAA
501	AGVLSPLSLS	GAAASARTAR	RRAPPPLLLR	LRSPVGPASL	STAVSANDTS
551	GEMTSPASAA	PPSSANRAAI	SSAATAAAAA	SASAGAGASA	LTSPPLNSRS
601	MGMTMHSGSA	SDLVSTTADR	PARGSGCNPP	ATPARPGPFA	RTHGSAGQSL
651	STFSSGTRSG	GLVRISQDRR	TLVAGMFRVS	REGCLTVRNM	LLLNPTRIDA
701	GSATGGAAGP	GGTCGSFMGS	STTGTSGGGS	KSRPLQLLHP	QRSAASYSPV
751	SSNGGLVGRM	QLLGPGGGND	IGGGGGVGGG	AGGLGPMTPN	TTGSDWPLPH
801	AYHGGGCSGN	ARNMHNSGGG	GGGASATANA	SFTLFSTSMD	TPFSPITYSM
851	DSQRMALPSP	LGPHYDRAGA	AAGPPPQLLS	TVCNDTAASH	FLGANGSLHQ
901	QPQQHEGLLP	GAHHVTDTNA	SPTRNLGYGM	VTAGAAAVTQ	QQQVATPNST
951	TPLGQPFGGS	GGNICHAQLR	SQASNGWLPG	ALGTTNTVSP	SPFATAGGAG
1001	SMLGAGAFTD	TDTVNSLLLP	YADIPAYRGA	IASTTAGSCM	GSPSGHTNPC
1051	GFRTTTTAET	GMAAAAPMMG	GSGTTHNTSF	PPLPPNVVRL	RDLDILPTTC
1101	GEGASATVFV	AIHKPTGRRL	AVKRVDLSPL	CLGCSSPFMR	SGAVSSGRIS
1151	QLQRIVIREL	QVLHLTYRSP	FMVKVYNAFF	LAEVAALDIV	MEFMHYGGLD
1201	HLANCLQQHA	RMVRGSQQER	HRLLTTDDDD	DGDGGRRGSG	HGGSPSVPPL
1251	LSDAPEAPQV	AEGSLKDASA	VGVGRSGTGG	GVAAADTERH	PSMNSISPKL
1301	LDSRRTLAER	APSSAPRPCI	PTAAGTTGRS	DADSTACGGG	GVPCHPLSGA
1351	YKHIYGSNDS	LLLDSYSVKS	DCGTDDSESD	DGSGLVEEPL	GVTERLVAVV
1401	GEQLLRGVRD	MHSRGYIHQD	IKPGNVLVNE	HGVVKLSDFG	LSQRCDSNGI
1451	GIKNDMLTYM	PPPSVAPAQS	ITPLQSPSLT	SLQLTGARGR	RAPFIWHAQR
1501	GSIGAGISGQ	LGSGMVGTTP	PEMGSSAEGL	VLSSTTNSLL	AQRDGMDVLE

1551	AESTSSEEGS	GEWDATRRGL	SPSSSSDEAG	DCCGTDKYMS	PERQRGEPYG
1601	KPADIWAVGV	TLAEFAVGEY	PYDLTDVIDE	FDRVSRMDKP	VDVFQFNKHR
1651	AVPLGTVFAD	FCRLATLPTA	SQRPTAQELL	EHPFFKQWHR	PFNLKDYLAA
1701	RVPVPSNRLK	EDYLAKQRER	PPEGQQPAGP	LG	



9.2 Plasmidkarten






9.3 Sequenzalignments

Alle hier gezeigten Alignments wurden mithilfe des ClustalW-Servers angefertigt (<u>http://www.ebi.ac.uk/clustalw/</u>).

9.3.1 Alignment HsERK8-LmxMPK1 (48% Identität)

LmxMPK1 HsERK8	MTSYGIDGEVEQRYRILRHIGSGAYGVVWCALDRRTGKCVALKKVYDAFGNVQDAQRTYR -MCTVVDPRIVRRYLLRRQLGQGAYGIVWKAVDRRTGEVVAIKKIFDAFRDKTDAQRTFR . :* .: :** : *::*.********************	60 59
LmxMPK1 HsERK8	EVMLLQRLRHNPFIVGILDVIRAANDIDLYLVFELIETDLTAIIRKN-LLQRDHKRFLTY EITLLQEFGDHPNIISLLDVIRAENDRDIYLVFEFMDTDLNAVIRKGGLLQDVHVRSIFY *: ***.: .:* *:.:****** ** *:*****:::***.*:***. *** * * : *	119 119
LmxMPK1 HsERK8	QLLRTVAQLHAQNIIHRDLKPANVFVSSDCSIKLGDFGLARTFRSGYDNEQEFLDLTDYI QLLRATRFLHSGHVVHRDQKPSNVLLDANCTVKLCDFGLARSLG-DLPEGPEDQAVTEYV ****:. **: :::*** **:**::::** ******:: . : * :::*:	179 178
LmxMPK1 HsERK8	ATRWYRSPEILVKSRAYSTAMDMWAIGCVIGEMLLGRPLFEGRNTLDQLRLIIEAIGVPS ATRWYRAPEVLLSSHRYTLGVDMWSLGCILGEMLRGRPLFPGTSTLHQLELILETIPPPS ******:**:*:*: *: .:***::**** ***** * .**.*** **	239 238
LmxMPK1 HsERK8	DADVRSLHSPELEKLINSLPTPLIFSPLVGNKNLKDSEATDLMMKLIVFNPKRRLSAVEA EEDLLALGSGCRASVLHQLGSRPRQTLDALLPPDTSPEALDLLRRLLVFAPDKRLSATQA : *: :* * .::::* :** **: :*:** *.:****.:*	299 298
LmxMPK1 HsERK8	LQHPYVAPFVQHG LQHPYVQRFHCPSDEWAREADVRPRAHEGVQLSVPEYRSRVYQMILECGGSSGTSREKGP ****** * .	312 358
LmxMPK1 HsERK8	ELEKIQGIQGELEK	319 418
LmxMPK1	LDPLVLPLVD	329
HSERK8	LQTALLGNGERPPGAKEAPPLTLSLVKPSGRGAAPSLTSQAAAQVANQALIRGDWNRGGG	478
LmxMPK1	EKIYTKEEYKANLYDEIGMRYRYHITDVY	358
HSERK8	VRVASVQQVPPRLPPEARPGRRMFSTSALQGAQGGARALLGGYSQAYGTVCHSALGHLPL :: : ::* * * .*	538
LmxMPK1		
HsERK8	LEGHHV 544	

 \star = identische Aminosäuren; : = stark konservierte Aminosäuren; . = konservierte Aminosäuren

9.3.2 Alignment der Kinase-Domänen aller bisher bekannten Leishmania mexicana MAPKKs

LmxMKK	(62)YSSKRNV <mark>GAGASGDV</mark> FFAR-LKNG-TSI <mark>ALKRI</mark> PISSKAHRDEVD <mark>RELQV</mark> FM
LmxPK5	(58)ETEGGFL <mark>GKGSSGSV</mark> RRAV-HRGSNKVV <mark>ALKEI</mark> KVTGQTHINEIR <mark>RELET</mark> LH
LmxPK2	(7)YQIIESI <mark>GEGSFGKV</mark> YKAR-IKGTGQIV <mark>AMKFI</mark> VKKGKNEKELKNLRSE <mark>IEILT</mark> KL
LmxPK3	(28)YVLIEKI <mark>GSGSYGDV</mark> WSATRRTGAKDVY <mark>AVKRI</mark> DKRHAGILRKGSVMGE <mark>VETMS</mark> LL
LmxPK4	(72)LRIGSEL <mark>GKGSOGKV</mark> RVAO-HKLTGEKY <mark>AMKYI</mark> AFDGDSDDMRSALE <mark>AELRO</mark> VA
LmxPK1	(12) YRLDTSIASGAFSTVWRCS-ELSSGRTYAVKIVEKKAALRNKMTGALIREVNALE
LmxPK6	(375)vvveami <mark>gkgtogtv</mark> frvrldgkly <mark>alkcm</mark> nidealnatndverogykkglv <mark>keltm</mark> it
LmxPK7	(1093)DILPTTCGEGASATVFVAI-HKPTGRRLAVKRVDLSPLCLG(13)SGRISOLORIVIRELOVLH
	I II II
TmrrMIZIZ	
LIIIXPK5	AGDFAIPILVSFIGAFAHEGSVFIAMEDSLELIRVVPPVLAIIRMLA
LMXPK2	NHPHIIMLFDSFETDSDFVVVMeIAQGELYDILED-EKQLPAREVQIAKQLIQ
LmxPK3	SHPNIVKLEETYQDEACLSIVMEYLPGGSLQHRID-RQNVSELETRFITQLLM
LmxPK4	AVKHHNVVSSYEAFFRDGRLYIVLEYMDCGTMNNLIDRHPEGFSEDMLAIARELFK
LmxPKI	IAGSSPYVTRLVDKMVSKHNYLVMDLAEGGTLLDIIRERRQELRQLQVS(25)YFKQLLL
LmxPK6	LQRSRPPPAYLMQMFNAVASLDAEKKQLSILIELMSFTVENIQQMVSRIPSEELMRV(63)LARDVLM
LmxPK7	LTYRSPFMVKVYNAFFLAEVAALD1VMEFMHYGGLDHLANCLQQHARMVRG(184)VGEQLLR
	LV V
LmxMKK	GLVYLHDVKRVLHRDLKPSNLLIS-ETGHVKIADFGVSKLIQTLAVSSTYVGTMCFMAPERLE
LmxPK5	GLTYLHRNRHLIHRDLKPSNVLYNSRTGDIKISDFGVSSNLECTKADAHSFVGTVTYMSPERLR
LmxPK2	ALNYLHSN-RIIHRDMKPONILIG-ONGAVKLADFGFARSMSYNTIVLTSIKGTPLYMAPELVO
LmxPK3	AVEYIHEK-GIVHRDLKPSNCLLSONDLVVKISDFGLSVFAGNKOCLTTCCGTLHFMAPEILL
LmxPK4	GLEFLHHL-NMIHRDIKPANVLAN-TKGEIKISDFGVAKTLSGGDLOTLSAOGSVPYMSPERIO
LmxPK1	ALSALHDR-NIVHRDVKPENILLNKHRTRLLSDFGFACHSMLG-AQLHR-ACGTLKYCAPELLHE
LmxPK6	GLNELHTDYSIIHCDLKPANVMLCYDOOKFKLADFGCGSVMVMEDROHVERRGIDLGTILYKAPERFA
LmxPK7	GVRDMHSR-GYIHODIKPGNVLVN-EHGVVKLSDFGLSORC(125)SPSSSSDEAGDCCGTDKYMSPEROR
	VIa VIb VII VIII
T'mxMKK	● ● OGM-YGES <mark>SDVWSLGLT</mark> MTGAVTGKNPWAPPEEMNLYO <mark>LLGKMANGSTPT</mark> LPTSDAESDDVKDEV
LmxPK5	GEH-YSYGADTWSLGUWVAELAVGVCPVAGLRCGSSEARFWALLOHLN-GDGTALELP-PEMDSDLADFT
LmxPK2	FRA YDNRYDLWSI GCTI VFL VYCKDFYTN NI FAL IKK IV CFDVKYDSKAN-DDI SDFFK SFL
LmxDK3	EKN YGK DYDMUADGCMAHIMFFGRYDFOARTFAALTKDICPGYLDPFFGGGGGLCCDSLLODFI
LmxPK4	SKD-VSENSDTWSACI, TTAFCAFREYDESI, KDKI, FFL, COATASCHAK, TNWDDRFTKESDEFK FFT
LmvDK1	
ImyDK6	
LINXFRO ImyDK7	
Duixer(/	TY Y
LmxMKK	KQCLERDPDARPTCAELLQHQFF(53)
LmxPK5	SAC <mark>VVKSPDRRPTCTELLRHPFI</mark> (208)
LmxPK2	SGL <mark>LTKSASSRLNWPELLNHPFV</mark> (828)
LmxPK3	SQLLLYDPHRRMSAKDALKHPWI (185)
LmxPK4	ELCLR-PEATRPSATEMLSHSLI(19)
LmxPK1	QHMLCIDSAQRWSVKQLLQHPWI (574)
LmxPK6	LRS <mark>VCVDVSLRWSVOOLLKHPFV(83)</mark>
LmxPK7	RLATLPTASORPTAOELLEHPFF(47)
	XI

●= identische Aminosäure;●= konservierte Aminosäure; I-XI = katalytische Domänen

Phylogenetischer Stammbaum der *L. mexicana* MAPKKs:

	Lm	nxMKK
Г	1 Im	nyDK7
	Lm	nxPK1
	Lm	nxPK3
\vdash		
	Lm	IXPRZ
	L	nxPK6
	l m	NUTICA
L	LII	ПХРП4
	Im	nxPK5

9.3.3 Alignment der Kinase-Domänen von LmxPK5 und homologen MAPKK

LmxPK5	(58) ETEGGFLGKGSSGSVRRAVHRGSNKVVALKEIKVTGQTHINEIR-RELETLHAGDFATPYL
LmaPK5	(58)ETAGGFLGKGSSGSVRRAVHRGSKKMVAVKEIKVTGQTHINEIR-RELETLHAGDFATPYL
TbPK5	(55) VNNTSFL <mark>GRGSSGSVR</mark> RATHRKTGKEI <mark>ALKEIKF</mark> TGQTRMMEIR <mark>-RELE</mark> TLHRGGGP <mark>SPYI</mark>
TcPK5	(54) VSETGFL <mark>GQGSSGSVR</mark> RATHRRTGEVL <mark>ALKEIKI</mark> TSHAHLQEIR <mark>-RELE</mark> TLHRDGNN <mark>SPNI</mark>
NtNPK2	(82)MRVFGAI <mark>GSGASSVVQ</mark> RAIHIPTHRII <mark>ALKKINI</mark> FEKEKRQQLL <mark>-TEIR</mark> TLCEAP-C <mark>CQGL</mark>
AtMKK3	(82)MRVFGAI <mark>GSGASSVVQ</mark> RAIHIPNHRIL <mark>ALKKINI</mark> FEREKRQQLL <mark>-TEIR</mark> TLCEAP-C <mark>HEGI</mark>
ZmMEK1	(70)LEMIQVI <mark>GKGSGGVVQ</mark> LVRHKWVGTLF <mark>ALKGIQM</mark> NIQESVRKQI <mark>VQELK</mark> INQATQ <mark>SPHI</mark>
	I II III IV
T	
LIIIXPK5	VSFIGAFA-HEGSVFIAMEAMD-GSLHELIKPVPPVLACIIRLMLKGLIILHRNR
LMaPK5	VSFYGAFAHEGSVFIAMEAMD-GSLHELYKPVPPVLASITRLMLKGLTYLHRTR
TDPK5	VDFYGAFCHEGSVFIAMECMD-GSLDGVAGSVPFKVLECTTRSILRGLSYLHKDR
TCPK5	VDFYGAFCHEGSVFIAMECMD-GSLATVKKPVPIEALASISKSILLGLWDLHGNR
NtNPK2	VEFYGAFYTPDSGQISIALEYMDGGSLADIIKVRKSIPEAILSPMVQKLLNGLSYLHGVR
AtMKK3	VDFHGAFYSPDSGQISIALEYMNGGSLADILKVTKKIPEPVLSSLFHKLLQGLSYLHGVR
ZmMEK1	VMCHQSFYHNGVIYLVLEYMDRGSLADIVKQVKTILEPYLAVLCKQVLEGLLYLHHQR
	V VIa
LmxPK5	HLI <mark>HRDLKPSNVL</mark> YNSRTGDI <mark>KISDFGVSS</mark> NLECTKADAHS <mark>FVGTVTYMSPERL</mark> RGEHYS
LmaPK5	HLI <mark>HRDLKPSNVL</mark> YNSRTGDI <mark>KISDFGVSS</mark> NLECTKADAHS <mark>FVGTVTYMSPERL</mark> RGEHYS
Tbpk5	HLI <mark>HRDIKPSNIL</mark> Y-SRDGSI <mark>KISDFGASS</mark> CLECTRGNAFS <mark>FVGTLTYMSPERL</mark> KGEPYS
TcPK5	HLI <mark>HRDLKPSNIL</mark> F-SRDGRI <mark>KISDFGVSS</mark> FLECTRGDAHS <mark>FVGTLTHMSPERL</mark> KGESYS
NtNPK2	HLV <mark>HRDIKPANLL</mark> V-NLKGEP <mark>KITDFGISA</mark> GLESSIAMCAT <mark>FVGTVTYMSPERI</mark> RNENYS
AtMKK3	HLV <mark>HRDIKPANLL</mark> I-NLKGEP <mark>KITDFGISA</mark> GLENSMAMCAT <mark>FVGTVTYMSPERI</mark> RNDSYS
ZmMEK1	HVI <mark>HRDIKPSNLL</mark> V-NRKGEV <mark>KITDFGVSA</mark> VLASSIGQRDT <mark>FVGTYNYMAPERI</mark> SGSTYD
	VIb VII VIII
LmxPK5	● ●● ●● YGADIWSLGLVVAELAVGVCPYAGLRGGSSEAR <mark>FWALLOHLNGDGTAL</mark> ELPPE
LmaPK5	YG <mark>ADIWSLGLV</mark> VAELAVGVCPYAGLRGGSSEAR <mark>FWALLOHLNGDGAAL</mark> ELPPE
TbPK5	FP <mark>ADIWSLGLA</mark> VAELALGKCPFIDRLSRANGSTEGC <mark>FWVLLOHLNGDGPVI</mark> SLPSS
TcPK5	FAADVWSFGLVVAELALGRCPFIDKLTRSKSSTEAGFWVLLOHLNSDRPVITLPOT
NtNPK2	YP <mark>ADIWSLGLA</mark> LFECGTGEFPYTANEGP <mark>VNLMLOILDDPSPSL</mark> S-GHEFSPE
AtMKK3	YPADIWSLGLALFECGTGEFPYIANEGPVNLMLOILDDPSPTPP-KOEFSPE
ZmMEK1	YKSDIWSLGLVILECAIGREPYIPSEGEGWLSFYELLEAIVDOPPPSAPADOFSPE
	IX X
LMXPK5	MDSDLADFISACVVKSPDRRPTCTELLRHPFI(208)
LmaPK5	MDSDLADFISACVVKSPDRRPTCTELLRHPFI(197)
TDPK5	MNASMTDFITTCIQREPSKRPTCDELRRHPFV(63)
TCPK5	MDPSLADFISMCIQKDPQSRPTCKELLRHSFV(57)
NtNPK2	FCSFIDACLKKNPDDRLTAEQLLSHPFI(179)
AtMKK3	FCSFIDACL <mark>QKDPDARPTADQLLSHPFI</mark> (181)
ZmMEK1	FCSFISSCI <mark>QKDPAQRMSASELLNHPFL</mark> (25)
	IX

●= identische Aminosäure; ●= konservierte Aminosäure; I-XI = katalytische Domänen Lma=*L. major*, Tb = *T. brucei*; Tc = *T. cruzi*; Nt = *Nicotiana tabacum*; At = *Arabidopsis thaliana*; Zm = *Zea mays*.

9.3.4 Alignment der Kinase-Domänen von LmxPK6 und homologen MAPKK

HsSLK	(33)-WEIIGELGDGAFGKVYKAQNKETSVLAAAKVIDTKSEEELEDYMVEIDILASC
TVCAMK	(3) -YKLIOOI <mark>GEGSFGRVF</mark> KARRKYTGRMV <mark>AIKTI</mark> OKGNMKDEDLVNFR <mark>REVDI</mark> LKKV
NTMPK2	(81) - LERINRIGSGAGGTVYKULHEPTGRIYALKVIYGN-HEDSVELOMCREIEILEDV
Lmx DK 6	(375) - WWEAMIGKCTOCTVERVELD-CKLVALKCMNIDEALNATN (12) KELTMITLORSED
ImaDK6	(375) = VVVIIIII (CVCTOCTVVEDIVE) = -CVI VALVOVIIII (11) (11) (VTTTTIOCED
THURFICO	(3) VEV CONCERNED AND A CONCERNED AND AND AND AND AND AND AND AND AND AN
IDPK6	(322) - VEVLEF VGRGIQGAVIRVIED - NREIGERCEDVRELIEASS (11) RELIMITEL RESS
TCPK6	(326) - VQKLDF1 <mark>GRGSQGTVH</mark> RVMLDEKLY <mark>ALKRI</mark> DVKEVTEATN(12) <u>KELNM</u> IRLQRSRE
HsSLK	D <mark>HPNIVKLLDAF</mark> YYENN <mark>LWILIEFC</mark> AGGAVDAVMLE
TVCAMK	DHPNIMRLLEYFETDSEFCLVTELGRG-DLFQIISD
NtMPK2	DNPNVVRCHDMFDHNGEIOVLLEFMDKGSLEGIHIP
LmxPK6	PPAYLMOMFNAVASLDAEKKOLSILIELMSFTVENIOOMVSRIPSEELMRVTOSTFRNYM
LmaPK6	PPAYLMOMENAVASLDAEKKOLSTLMELMSFTVENTOOMVSRTPSEELMRVTOSTERNYM
There	
TOPK6	
ICPKO	PPRILING VENAV AT LDNERQHLI V UMELMSES VEDAQAMLSREP VHEMMAMIQSTERAH
HsSLK	LERPLTESQIQVVCKQT
TVCAMK	TQR-LPEEQLKPIAAQL
NtMPK2	KESALSDLTRQV
LmxPK6	SGGSSAKQAMKECCTGQLLYGSSRHALGRNTYKEPAAWEKNVKRETPMPEVLLSMLARDV
LmaPK6	SGDPSAOOAMRECCKDOLLYGSPRHALGRSTYKEPATWEKNVKRETPMPEVLLSMLARDV
TbPK6	AGSHSVKLKPDTFLORNSESCVHLTGRRSYKTPEDWEMNIDROTPVPEIILSMLAADV
TOPK6	AGSALVOKOTEKILKOOSASCMHLTGESSYNVPEDWELSIDEOTPAPETILSILASDV
10110	
HsSLK TvCAMK NtMPK2 LmxPK6 LmaPK6 TbPK6 TcPK6	LDALNYLHDN-KIIHRDLKAGNILFTLDGD-IKLADFGVSAKNTRTIQRRDSFIGTP VSALNHLHQK-KIIHRDLKPQNILVSDNSS-IKLCDFGFARALSRTTLVLNSIKGTP LSGLYYLHRR-KIVHRDIKPSNLLINSRRE-VKIADFGVSRVLAQTMDPCNSSVGTI LMGLNELHTDYSIIHCDLKPANVMLCYDQQKFKLADFGCGSVME-DRQHVERRGIDLGTI LMGLNELHTDYSIIHCDLKPANVMLCCDQQKFKLADFGCGSVME-DRQHVERRGIDLGTI LGGLKELHEDYAIVHCDIKPANILIDYDMERFRLADFGCGCQMDPQSRKTRPVTFDLGSK LKGLRELHEEYSIVHCDLKPANVLLDFNKRCFKIADFGCGCQMDPNTQLVRRTGVDLGSK VIa VID VII
	••
HsSLK	YWMAPEVVMCETSKDRPYDYKADVWSLGITLIEMAEIEPPHHELNPMR
TVCAMK	<mark>LYMAPELV</mark> QEYPYTEK <mark>IDIWSLGII</mark> LYELYYGKPPYFT-DSMY
NtMPK2	AYMSPERINTDLNHGQYDGYAGDIWSLGVSILEFYLGRFPFSVGRSGD
LmxPK6	LYKAPERFAANILHRIADIDDGGTGEAVVFTAKADVWSLGIMLMELAAGIHPCDOFKSDF
LmaPK6	LYKAPERFAANILHRIADIDDGGTGEAVVFTAKADVWSLGIMLMELAAGIHPCDOFKSDF
ThPK6	LYKADERL SNELYN - AGVEGGLS - EVEFSEDADWSLGVTLLELENGVHPCHDEKSDY
TOPK6	
ICERO	
UGCIK	
TISSUL	VIJICIARSEFFIJAUFSRWSSNERUFJERRUELERNVDARWIISUULURFV(134)
	NUTVELINE TIME TIME TIME TO THE ACTION OF TH
NTMPK2	WASLMCATCMSHGTAPANASREFRDFIACCLQRDPARRWTAVQLLRHPF1(36)
LmxPK6	W <mark>NYGTK-LKLSKMNKP</mark> LNWSESFYDFILRS <mark>VCVDVSLRWSVQQLLKHPFV</mark> (83)
LmaPK6	W <mark>NYGTM-LKLSKMTKP</mark> LNWSESFYDFILRS <mark>VCVDVSLRWSVQQLLKHPFV</mark> (83)
TbPK6	W <mark>NYRNN-LKLSRMVKP</mark> VSWSYSFYDFIVRC <mark>LMRKPEQRWSVSRLLQHPFK</mark> (133)
ТсРКб	W <mark>NYVNN-LKLSRMVKP</mark> LAWSSAFYDFIVRC <mark>LVRDPSQRWTVNMLLQHPFI</mark> (81)
	X XI

•= identische Aminosäure; •= konservierte Aminosäure; I-XI = katalytische Domänen Lma= *L. major*, Tb = *T. brucei;* Tc = *T. cruzi*; Nt = *Nicotiana tabacum*; Hs = *Homo sapiens*; Tv = *Trichomonas vaginalis*.

9.3.5 Alignment der Kinase-Domänen von LmxPK7 und homologen MAPKK

ScMKK2	(213)ITTLGILGEGAGGSVAKCRLKNGKKVFALKTINTMNTD
MmMap2k5	(165)IRYRDTL <mark>GHGNGGTV</mark> YKAHHVPSGKIL <mark>AVKVI</mark> LLDIT
2+WKK 2	
ACMINZ	
	(1093)DILPIIGEGASAIV VAIHKPIGRRLAVKRVDLSPLCLGCSSPFMRSGAVSSGRI
LmaPK7	(1227)DILSTTC <mark>GEGASATV</mark> FVAIHKPTGRRL <mark>AVKRV</mark> DLSPLCLGCSSPFLRSGAVSSGRI
TcPK7	(360)LRIMSQI <mark>GVGASACV</mark> FMAEHVPTERLL <mark>AVKRI</mark> DLSPLFFDWNMLRGSNLQRLKSTTRL
TbPK7	(295)VKLKSIV <mark>GEGASANV</mark> YMAEHYPTGKLL <mark>AVKRI</mark> DLSSMIYGWEHMNICRTHSVRASPYI
	_
ScMKK2	SEYQKQIF <mark>RELQF</mark> N-KSFKS <mark>DYIVQYYGMF</mark> TDEQSSS <mark>IYIAMEYM</mark> GGKSLEATYKNL
MmMap2k5	LELQKQIM <mark>SELEI</mark> L-YKCDS <mark>SYIIGFYGAF</mark> FVENR <mark>ISICTEFM</mark> DGGSLDVYRK
A+MKK2	EATRA TAOELKIN-OSSOCPHIVTSYOSEYDNGAISLILEYMDGGSLADELKS
I myDK7	
LmaPK/	NQLQRIVIRELQVLHLTYRSPFMVKVYNAFFLAEVAALDIVMEFMHYGSLDHLADCLQQH
TcPK7	RQLQLIVV <mark>RELQV</mark> LHLAYRS <mark>PFMVKVYNAF</mark> YTEDIMA <mark>LDLVMEYM</mark> HYGGLDHLQ
TbPK7	RQLHRFVL <mark>RELQT</mark> LHMAYRNPFMVKVYNAFFNKEEMA <mark>LDFVMEYM</mark> HYGGLDRLQ
~	
SCMKK2	
MmMap2k5	
AtMKK2	
LmxPK7	ARMVRGSOOERHRLI,TTDDD-DDGDGGRRGSGHGGSPSVPPLI,SDAPEAPOVAEGSI,
LmaDK7	
ICPK/	
T'DPK'/	GVSTGNDVNCQVVSAGGSRT
SCMKK2	
MmMan 2kF	
марако	
AtMKK2	
LmxPK7	KDASAVGVGRSGTGGGVAAADTERHPSMNSISPKLLDSRRTLAERAPSSAPRPCIPTAAG
LmaPK7	KDASAAGVGRSGSGEGVAAADAEWRPSMTSTSPTLLDSQRTLAEWALPSAPRPCISRVLG
TcPK7	DNAVEDDLGRAGRTKRKTEVP
Ther7	
1211	
COMPRO	
SCMRRZ	
MmMap2K5	
AtMKK2	
LmxPK7	TTGRSDADSTACGGGGVPCHPLSGAYKHIYGSNDSLLLDSYSVKSDCGTDDSESDDGSGL
LmaPK7	${\tt TTGSSGVDSMVCDGGGVPCHPLTGGYKHIYDSNDSLLLDSYSVKSNCGTDDSESDDGSGL$
ТсРК7	
Thor7	
IDER/	
~	
ScMKK2	LKRGGRISERVIGKIAESVLR <mark>GLSYLH</mark> -ERKVI <mark>HRDIKPQNIL</mark> LNEKGEI <mark>KLCDFGVSGE</mark>
MmMap2k5	IPEHVLGRIAVAVVK <mark>GLTYLW</mark> -SLKIL <mark>HRDVKPSNML</mark> VNTGGQV <mark>KLCDFGVSTQ</mark>
AtMKK2	VKAIPDSYLSAIFROVLOGLIYLHHDRHII <mark>HRDLKPSNLL</mark> INHRGEVKITDFGVSTV
LmxPK7	VEEPL GVTERLVAVVGEOLLEGVRDMH-SRGYTHODIK PGNVLVNEHGVVKLSDFGLSOR
LmoDK7	
	VEEPAGVIERLVAVVGEQLLRGVRDMA-SRGIInQDIRPGNVLVNEAGVVRLSDFGLSQR
TCPK7	ERLVAVVGEQLLR <mark>GVQHMH</mark> -ERGY1 <mark>HRD1KPGNVL</mark> VNKKG1V <mark>KLSDFGLSQR</mark>
TbPK7	-RKVVSVPERLVAVVGEQLLR <mark>GVEHMH</mark> -SRGFV <mark>HRDIKPGNVL</mark> INNRGIV <mark>KLGDFGLSSR</mark>
	VIa VIb VII
ScMKK2	AVN
MmMan 225	 T.V/N
NHWERO	ት / እ
ALMKKZ	
LmxPK7	CDSNG1G1KNDMLTYMPPPSVAPAQSITPLQSPSLTSLQLTGARGRRAPFIWHAQRGSIG
LmaPK7	CDSNGVGIKNDMLTYMPPPSVAPTQSITPLQSPSLTALPLTGARGRRAPYAWRAQRGSIG
TcPK7	CDAVNERVGDKKNKTHHVSGTKKEKSSPPMQKALSSGGS
TbPK7	CTGEEESVVSLPHFPADFIASGDTGADVKIKSRDDSCEERRCNPRVNNKRGSVD

ScMKK2 MmMap2k5 AtMKK2 LmxPK7 LmaPK7 TcPK7 TbPK7	AGISGQLGSGMVGTTPPEMGSSAEGLVLSSTTNSLLAQRDGMDVLEAESTSSEEGSGEWD AGISGQLGSVMVGTTPPEMGSSAEGLVFS-TTNSLLAQRDGMDVLEAESTSSEESPGEWD NGFESDAASNMSGNGYGHSINGIHTGSGYES
ScMKK2 MmMap2k5 AtMKK2 LmxPK7 LmaPK7 TcPK7 TbPK7	Construction of the second sec
ScMKK2 MmMap2k5 AtMKK2 LmxPK7 LmaPK7 TcPK7 TbPK7	PFES-DKITQNVAPIELLTMILTFSPQLKDEPELDI-SWSKTFRSFIDYCLKKDARERPS PYPQPLQLLQCIVDEDSPVLPLGEFSEPFVHFITQCMRKQPKERPA PYAPPNQEETWTSVFELMEAIVDQPPPALPSGNFSPELSSFISTCLQKDPNSRSS PYDLTDVIDEFDRVSRMDKPVDVFQFNKHRAVPLGTVFADFCRLATLPTASQRPT PYDLKDVIDEFDRVSRMDKPVDVLQFNKHRAVPLGTVFADFCRLATLPTGSQRPT PVDLTDCEDAFDRASRIAAPLNLRKYARSCPLSEEFLDFIRISRLPLAAERPT PVDLTDCADPFVTIHRMEEPLDLRKFPRDVPLSDAFLDFIHSCMDPEPRRPT X XI
ScMKK2 MmMap2k5 AtMKK2 LmxPK7 LmaPK7 TcPK7 TbPK7	PRQMLKHPWI(35) PEELMGHPFI(39) AKELMEHPFL(33) AQELLEHPFF(47) AQELLEHPFF(47) AGELLEHPFF(23) ARELLSHPFF(26)

●= identische Aminosäure; ●= konservierte Aminosäure; I-XI = katalytische Domänen Lma= *L. major*, Tb = *T. brucei*; Tc = *T. cruzi*; At = *Arabidopsis thaliana*; Mm = *Mus musculus*; Sc = *Saccharomyces cerevisiae*.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Dr. Martin Wiese für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Gruppe am BNI durchzuführen, sowie die Themenstellung und die Betreuung danken. Danke auch für viele spannende und hilfreiche Diskussionen sowie eine fast unendliche Fülle an Ideen!

Bei Prof. Dr. Bernhard Fleischer und Prof. Dr. Reinhard Bredehorst möchte ich mich für die Übernahme der Betreuung sowie für ihre Tätigkeit als Gutachter bedanken. Vielen Dank auch an PD Dr. Joachim Clos für die Durchführung der MALDI-TOF-Analysen.

Für die Finanzierung eines Großteils dieser Arbeit möchte ich mich sehr beim Evangelischen Studienwerk e.V. Villigst bedanken. Besonderen Dank an Frau Lühmann!

Ganz besonderer Dank gilt auch meinen Eltern: Meiner Mutter für die vielen aufmunternden Worte und meinem Vater für das ständige aufrichtige Interesse und viele lange Gespräche! Danke auch an meine Schwester Tina für viele Ablenkungsmanöver bei Stress und ihre ehrlichen Kommentare!

Allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern aus Labor 3 danke ich für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit und viel praktische und moralische (!) Unterstützung: Danke an Danny, Stephani und Petra für die Einarbeitung und große Hilfsbereitschaft im ersten Jahr! Danke an Gela, für ein spannendes und lustiges Jahr als Banknachbarinnen! Danke an Anne für ständige freundschaftliche Konkurrenz, die mir immer wieder geholfen hat, mich aufzuraffen und viele lange Gespräche bei Kaffee oder Mai-Tai. Danke an Maja für Trost- und lustige Stunden, du wirst mir fehlen! Danke an Mona, dafür dass du immer so fröhlich bist! Bleib so! Danke an Annette und Mareike, das dynamische Duo! Danke an Anne M. für viel mütterliche Unterstützung!

Vielen Dank auch an Frau Dr. Borchert für Freundschaft auch in schweren Zeiten, rock on!

And last but not least, wie man immer so schön sagt,....der größte Dank von allen an Olaf, für unendliche Geduld, Ehrlichkeit und den ab und zu doch mal nötigen Tritt in den.... Ich hab dich lieb!