

Aus dem Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
Prof. Dr. Bernhard Fleischer

**Molekulare Charakterisierung der Mitogen-aktivierten
Proteinkinasen LmxMPK11 und LmxMPK12
aus *Leishmania mexicana***

Promotion

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Mareike Windelberg
aus Hannover

Hamburg, 5. Juli 2006

**Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 03.05.2007**

**Veröffentlicht mit der Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. B. Fleischer

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. A. Guse

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD Dr. M. Jücker

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	9
Aufgabenstellung	11
1 Einleitung	12
1.1 Leishmanien und Leishmaniosen	12
1.1.1 Erreger	12
1.1.2 Vektor und Reservoir	13
1.1.3 Übertragungszyklus	14
1.1.4 Vorkommen	15
1.1.5 Pathogenese	15
1.1.6 Krankheitsbilder	16
1.1.7 Diagnostik	18
1.1.8 Therapie	18
1.1.9 Prävention und Bekämpfung	19
1.2 Drug targets	20
1.3 MAP-Kinasen	20
1.4 Signaltransduktion in Trypanosomatidae	22
2 Material	23
2.1 Geräte	23
2.2 Verbrauchsmaterialien	24
2.3 Chemikalien	24
2.4 Antibiotika und Kulturmedien	26
2.4.1 Medien für Bakterienkulturen	26
2.4.2 Medien für Phagen	26
2.4.3 Medien für Leishmanienkulturen	26
2.4.4 Antibiotika-Stammlösungen	27
2.5 E. coli Bakterienstämme	27
2.6 Leishmanien und Versuchstiere	27
2.7 Plasmide	27
2.8 Oligonukleotide	28
2.9 Phagenbank	29
2.10 Antikörper	30

2.11 Enzyme	30
2.12 Molekularbiologische Kits	30
2.13 DNA-und Protein-Größenstandards	30
2.14 Puffer und weitere Lösungen.....	30
3 Methoden.....	33
3.1 Zellbiologische Methoden	33
3.1.1 Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i> -Bakterien.....	33
3.1.2 Kultivierung von <i>L. mexicana</i> -Promastigoten.....	33
3.1.3 Leishmanien-Stabilate zur Langzeitlagerung.....	33
3.1.4 <i>In vitro</i> Differenzierung von Promastigoten zu Amastigoten	34
3.1.5 Zählen von Leishmanien	34
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	34
3.2.1 Transformation von <i>E. coli</i> XL1-Blue und BL-21	34
3.2.2 Blau-Weiß-Selektion	34
3.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	35
3.2.3.1 Plasmid-DNA Minipräp nach Zhou et al. (1990).....	35
3.2.3.2 Plasmid-DNA Minipräparation anhand des QIAprep® Spin Miniprep Kits ...	35
3.2.3.3 Plasmid-DNA Midipräparation anhand des QIAgen Plasmid Midiprep Kits ..	35
3.2.4 Phagen-DNA-Isolierung nach Qiagen.....	36
3.2.5 Transfektion von Leishmanien	36
3.2.6 Isolierung genomischer DNA aus <i>L. mexicana</i>	37
3.2.7 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	37
3.2.8 Anwendung DNA-modifizierender Enzyme	37
3.2.8.1 Sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	37
3.2.8.2 Ligation von DNA-Fragmenten	38
3.2.8.3 Dephosphorylierung des 5' Endes von DNA-Fragmenten.....	38
3.2.8.4 Auffüllreaktion mit Klenow-Polymerase	39
3.2.9 Phenol-Chloroform-Extraktion einer wässrigen DNA-Lösung.....	39
3.2.10 Ethanol-fällung einer wässrigen DNA-Lösung	39
3.2.11 Agarosegelelektrophorese von DNA.....	40
3.2.12 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	40
3.2.13 <i>In vitro</i> -Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR	40
3.2.14 Klonierung eines PCR-Produkts mit Hilfe des TOPO TA Cloning® Kit.....	41
3.2.15 Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden	41

3.2.16 DNA-Analyse durch Southern Blot.....	42
3.2.16.1 Restriktionsspaltung genomischer DNA und Agarosegelelektrophorese	42
3.2.16.2 Southern Blot.....	42
3.2.16.3 Hybridisierung mit einer DIG-markierten Sonde.....	42
3.2.16.4 Nachweis der Digoxigenin-Markierung.....	43
3.2.16.5 Abwaschen der gebundenen Sonde („stripping“).....	43
3.3 Protein- und Immunochemische Methoden.....	44
3.3.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	44
3.3.2 Färben von Protein in SDS-Polyacrylamidgelen.....	44
3.3.2.1 Coomassie Brilliant Blue R-250-Färbung.....	44
3.3.2.2 Trocknen der Gele	44
3.3.3 Immunoblot	45
3.3.3.1 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran.....	45
3.3.3.2 Immunologische Detektion	45
3.3.3.3 Abwaschen des gebundenen Antikörpers („stripping“)	46
3.3.4 Herstellung von Leishmanienlysaten für SDS-PAGE.....	46
3.3.5 Weitere proteinchemische Methoden.....	46
3.3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	46
3.3.5.2 Ultrafiltration.....	46
3.4 Proteinexpression und -isolierung	47
3.4.1 Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	47
3.4.1.1 Expression des Fusionsproteins.....	47
3.4.1.2 Isolierung des Fusionsproteins	47
3.4.2 Expression des Strep-tag-Fusionsproteins.....	48
3.4.2.1 Expression des Fusionsproteins.....	48
3.4.2.2 Isolierung des Fusionsproteins	48
3.5 Kinase-Aktivitätstests der rekombinant exprimierten Proteine.....	49
3.6 Infektion von BALB/c-Mäusen.....	49
3.7 Isolierung von Amastigoten aus Mausläsionen.....	50
4 Ergebnisse.....	51
4.1 Vorarbeiten.....	51
4.1.1 Ausgangsmaterial	51
4.1.2 Sequenzierung des <i>LmxMPK11</i> -Gens und Vergleich mit anderen Spezies	51
4.2 Diverse Klonierungen mit <i>LmxMPK11</i>	51

4.2.1 Einfügung von Schnittstellen/Vektorklonierung	51
4.2.2 Herstellung der inaktiven Mutante von LmxMPK11	52
4.2.3 Rekombinante Expression der GST-Fusionsproteine	53
4.2.4 Antikörper - Herstellung	54
4.3 In-vitro Aktivitätstest (Kinase-Assay) mit der GST-LmxMPK11	55
4.3.1 Temperaturoptimum und optimale Ionenkonzentration	55
4.4 Herstellung von LmxMPK11-Deletionsmutanten	56
4.4.1 Nachweis des <i>LmxMPK11</i> -Gens als single copy Gen	56
4.4.2 Klonierungsarbeiten zur Herstellung eines linearen DNA-Konstruktes zur Transfektion von <i>L. mexicana</i>	57
4.4.3 Deletion beider <i>LmxMPK11</i> -Allele	58
4.5 Analyse der LmxMPK11 Deletionsmutanten	59
4.5.1 Southern Blot Analyse	59
4.5.2 Immunoblot Analyse	61
4.6 Episomale Expression von LmxMPK11	62
4.6.1 Herstellung des <i>LmxMPK11</i> -tragenden Plasmids pX63polPAC3LmxMPK11	62
4.6.2 Episomale Expression im WT	63
4.6.3 Episomale Komplementation	64
4.7 Phänotypische Analyse von LmxMPK11(-/-) Doppeldeletionsmutanten	64
4.7.1 Morphologische Betrachtung	64
4.7.2 Wachstum der Promastigoten in vitro	65
4.7.3 In vitro Differenzierung zu Amastigoten	65
4.7.4 In-vitro Differenzierung mit WT-Amastigoten aus der Mausläsion	67
4.8 Infektion von BALB/c- Mäusen	68
4.8.1 Auswirkung der Deletion und episomalen Komplementation von <i>LmxMPK11</i> auf den Infektionsverlauf	68
4.9 Diverse Klonierungen mit LmxMPK12	71
4.9.1 Klonierungen mit <i>LmxMPK12</i>	71
4.9.2 Herstellung von pGEX-KG4LmxMPK12 für die Expression in <i>E. coli</i>	71
4.9.3 Herstellung der inaktiven Mutante von LmxMPK12	71
4.9.4 Expression und Aufreinigung mit dem GST-tag	73
4.9.5 Expression und Aufreinigung mit dem Strep-tag	75
4.10 In-vitro Aktivitätstest (Kinase-Assay) mit der GST-LmxMPK12	76
4.11 Erzeugung einer (-/-) LmxMPK12-Doppeldeletionsmutante	77

4.11.1 Nachweis des <i>LmxMPK12</i> -Gens als single-copy-Gen.....	77
4.11.2 Klonierungsarbeiten zur Herstellung eines linearen DNA-Konstruktes zur Transfektion von <i>L. mexicana</i>	78
4.11.3 Deletion beider <i>LmxMPK12</i> -Allele.....	81
4.12 Analyse der <i>LmxMPK12</i> Deletionsmutanten.....	82
4.12.1 Southern Blot Analyse.....	82
4.13 Episomale Expression von <i>LmxMPK12</i>	84
4.13.1 Herstellung des <i>LmxMPK12</i> -tragenden Plasmids pX63polPAC3 <i>LmxMPK12</i>	84
4.13.2 Episomale Komplementation	84
4.14 Phänotypische Analyse von <i>LmxMPK12</i> (-/-) Doppeldeletionsmutanten.....	85
4.14.1 Morphologische Betrachtung	85
4.14.2 Wachstum der Promastigoten in vitro	85
4.14.3 In-vitro-Differenzierung zu Amastigoten.....	85
4.15 Infektion von BALB/c- Mäusen	86
5 Diskussion	88
5.1 Aktivitätstests der rekombinant exprimierten Proteine	88
5.1.1 Expression und Aufreinigung des GST- <i>LmxMPK11</i> -Fusionsproteins.....	88
5.1.2 Expression und Aufreinigung der <i>LmxMPK12</i> -Fusionsproteine.....	88
5.1.3 In-vitro Aktivitätstests mit dem GST- <i>LmxMPK11</i> und <i>LmxMPK12</i> - Fusionsproteinen.....	88
5.2 Deletion des <i>LmxMPK11</i> und <i>LmxMPK12</i> -Gens aus dem <i>L. mexicana</i> Genom	89
5.2.1 Herstellung der Deletionsmutanten sowie episomale Komplementation.....	89
5.2.2 Phänotyp der Deletionsmutanten.....	90
5.3 Infektion von BALB/c Mäusen	91
5.3.1 Deletion von <i>LmxMPK11</i>	91
5.3.2 Deletion von <i>LmxMPK12</i>	92
5.4 Ausblick.....	93
5.4.1 Ausblick <i>LmxMPK11</i>	93
5.4.2 Ausblick <i>LmxMPK12</i>	94
6 Zusammenfassung	95
7 Literaturverzeichnis.....	96
8 Anhang	98
8.1 Nukleodid- und Aminosäuresequenz von <i>LmxMPK11</i> und den flankierenden Regionen	98

8.2 Nukleotid- und Aminosäuresequenz von LmxMPK12 und den flankierenden Regionen	100
8.3 Plasmidkarten LmxMPK11	102
8.4 Plasmidkarten LmxMPK12	104
8.5 Vergleich der Aminosäuresequenz von LmxMPK11 mit der anderer Kinasen	106
8.6 Vergleich der Aminoäuresequenz von LmxMPK12 mit der anderer Kinasen.....	107
9 Danksagung	109
10 Lebenslauf	110
11 Erklärung	111

Abkürzungsverzeichnis

-/-	Doppelalleldeletion
+/-	Einzelalleldeletion
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
BLE	Gen für das Phleomycin-bindende Protein
BSA	Rindeserumalbumin
ddH ₂ O	doppeltdestilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HYG	Gen für Hygromycin B-Phosphotransferase
iFCS	hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
kb	Kilobasenpaar
Lmx	<i>Leishmania mexicana</i>
LmxMPK	MAP Kinase-Homolog in <i>L. mexicana</i>
MAP	mitogen-aktiviertes Protein
MAPK	MAP Kinase
MAPKKK	MAP Kinase Kinase Kinase
MBP	Myelin basisches Protein
MeOH	Methanol
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MKK	MAP Kinase Kinase
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
PAC	Gen für Puromycin-N-Acetyltransferase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PHLEO	Phleomycin-Resistenz in rekombinanten Leishmanien durch BLE-Gen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Poly(vinyliden)difluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer (standard saline citrate)

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TLCK	N ^α -p-Tosyl-L-Lysin-Chloromethylketon- Hydrochlorid
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid

Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, zwei den MAP-Kinasen homologe Proteine aus *Leishmania mexicana* dahingehend zu analysieren, ob sie sich als Zielstrukturen für Hemmstoffe eignen, die schließlich als Medikamente gegen die Leishmaniose eingesetzt werden können. Dazu sollten die in Phagen vorliegenden Gene der LmxMPK11 und LmxMPK12 zunächst sequenziert und kloniert werden und die Enzyme im bakteriellen Expressionssystem exprimiert werden. In Kinase-Aktivitätstests sollte ihre in-vitro-Phosphorylierungsaktivität charakterisiert werden.

Um mehr über die Funktion dieser Kinasen in Leishmanien zu erfahren, sollten die offenen Leseraster beider Gene durch homologe Rekombination ersetzt werden und dadurch Doppeldeletionsmutanten hergestellt werden. Kinasen, die für eines der Lebensstadien der Leishmanien essentiell sind, eignen sich dabei besonders als Zielstrukturen für Hemmstoffe. Daher sollte neben der morphologischen Betrachtung der Deletionsmutanten, auch ihre Fähigkeit zur in-vitro-Differenzierung von den Promastigoten zu den Amastigoten untersucht werden.

Durch eine Infektion von BALB/c-Mäusen mit den Deletionsmutanten sollte anschließend das Infektionsverhalten untersucht und Aufschluß über ihre Virulenz gewonnen werden.

1 Einleitung

1.1 *Leishmanien und Leishmaniosen*

1.1.1 Erreger

Leishmaniosen werden durch Protozoen der Gattung *Leishmania* verursacht. Die Leishmanien werden durch infizierte Sandmücken bei der Blutmahlzeit auf Säugetiere und Menschen übertragen. Abhängig von der Leishmanienspezies und der Immunantwort des Säugetierwirtes oder Menschen führt die Infektion zu Krankheitsbildern, die sich in der Haut (kutane Leishmaniose), der Schleimhaut (mukokutane Leishmaniose) oder den inneren Organen (viszerale Leishmaniose) manifestieren.

Leishmanien gehören zu den Hämoflagellaten aus der Familie der Trypanosomatidae. Sie sind sehr eng mit den Trypanosomen verwandt, Erregern der afrikanischen Schlafkrankheit (*Trypanosoma brucei*) und der Chagas-Krankheit in Südamerika (*Trypanosoma cruzi*). Leishmanien werden von den infizierten Sandmücken als begeißelte, promastigote Form übertragen. Im Menschen oder Reserviertier persistieren sie in der unbegeißelten, amastigoten Form meist in mononukleären Phagozyten. Beide Stadien sind infektiös. Die Promastigoten sind schmal und 15-25 µm lang, während die obligat intrazellulär vorkommenden Amastigoten eine eher rundliche Form mit einem Durchmesser von 1-5 µm haben. Charakteristisch für Leishmanien ist der DNS-haltige Kinetoplast, der mit dem Mitochondrium assoziiert ist und sich am Ursprung der Basalstruktur der Geißel befindet.

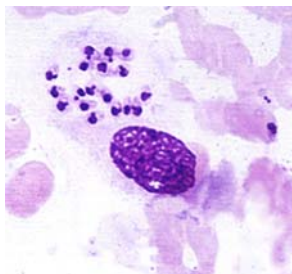


Abb. 1.1: *L. tropica* Amastigote im Makrophagen
(DPDx Image Library, www.cdc.gov)

Leishmanien wurden erstmals 1903 von Leishman und Donovan unabhängig voneinander beschrieben. Seitdem wurden allein 20 humanpathogene Arten entdeckt, von denen einige eine viszerale, andere eine kutane und wieder andere beide Krankheitsbilder hervorrufen können.

Je nach Vorkommen werden die humanpathogenen Leishmanienspezies in eine „Alte Welt“- und eine „Neue Welt“-Gruppe eingeteilt. In Tabelle 1 sind die wichtigsten humanpathogenen Leishmanien, ihr Vorkommen und die mit ihnen assoziierten Krankheitsbilder aufgezeigt.

Art	Vorkommen	Krankheitsbilder
Alte Welt		
<i>L. tropica</i>	Mittlerer Osten, Mittelmeer, Zentralasien	KL, LR (VL)
<i>L. major</i>	Mittlerer Osten, Mittelmeer, Sub-Sahara	KL, (MKL)
<i>L. aethiopica</i>	Äthiopien, Kenia, Sudan, Tansania	KL, DKL
<i>L. infantum</i>	Mittelmeer, China, Zentralasien	KL, VL
<i>L. donovani</i>	Indien, China, Ostafrika	VL, PKDL
Neue Welt		
Vianna Gruppe		
<i>L. braziliensis</i>	Tropenwälder in Süd- und Mittelamerika	KL, MKL
<i>L. panamensis</i>	Panama und Nachbarländer	KL, MKL
<i>L. guyanensis</i>	Guyana, Amazonasgebiet	KL, MKL
L. mexicana Gruppe		
<i>L. mexicana</i>	Mexiko, Guatemala, Belize, Texas	KL
<i>L. amazonensis</i>	Brasilien	KL, DKL
<i>L. peruviana</i>	Anden, Peru, Argentinien	KL
<i>L. chagasi</i>	Süd- und Mittelamerika	VL

Tabelle 1: wichtige humanpathogene Leishmanien, ihr Vorkommen und Krankheitsbilder

KL=kutane Leishmaniose, VL=viszerale Leishmaniose, MKL=mukokutane Leishmaniose, DKL=diffuse kutane Leishmaniose, PKDL= Post-Kala-Azar-Hautleishmaniose, LR=Leishmaniosis recidivans

1.1.2 Vektor und Reservoir

Einzig bekannter Überträger der Leishmanien ist die in den Tropen und Subtropen weit verbreitete Sandmücke (engl. Sandfly) der Gattung *Phlebotomus* (alte Welt: semiaride Gebiete in Afrika und Eurasien) und *Lutzomyia* (neue Welt: Waldgebiete Süd- und Mittelamerikas).

Sandmücken sind 2 mm lang und behaart. Sie beißen besonders im Freien während der Abend- und Nachtstunden. Übliche Moskitonetze können sie aufgrund ihrer geringen Größe leicht durchdringen.

Abhängig von der Leishmanienspezies können neben dem Menschen verschiedene Säugetiere, wie z.B. Affen, Hunde, Meerschweinchen, Füchse, Faultiere, Gürteltiere und Ameisenbären mit Leishmanien infiziert werden. Die meisten Tiere sind an Leishmanien gut angepasst und entwickeln nur milde Infektionen, die jedoch Jahre persistieren können, so dass Reservoir in der Natur entstehen. Eine Ausnahme ist der Hund, der sehr oft eine schwere Allgemeinerkrankung mit tödlichem Ausgang erleidet.

1.1.3 Übertragungszyklus

Weibliche Sandmücken nehmen Amastigote aus der Haut oder dem Blut eines infizierten Menschen (Anthroponose) oder Tieres (Zoonose) während der Blutmahlzeit auf. Im Darm der Mücke werden die Amastigoten aus den Makrophagen (mononukleären Phagozyten) freigesetzt, entwickeln sich zu prozyklischen Promastigoten und vermehren sich durch einfache Zweiteilung. Vom Darm wandern die Promastigoten dann in den Rüssel (Proboscis) und können bei der nächsten Blutmahlzeit übertragen werden. Die Entwicklung von den Amastigoten zu den Promastigoten in der Mücke dauert 5-26 Tage. Nach Inokulation in die Haut des Menschen werden die Leishmanien innerhalb von Minuten von Monozyten oder Makrophagen phagozytiert. Das Phagosom fusioniert mit Lysosomen zu einem Phagolysosom, in dem die Umwandlung von Promastigoten in Amastigote stattfindet. Nach intrazellulärer Replikation platzen die Wirtszellen, und die freigesetzten Amastigoten werden von anderen Monozyten oder Makrophagen aufgenommen.

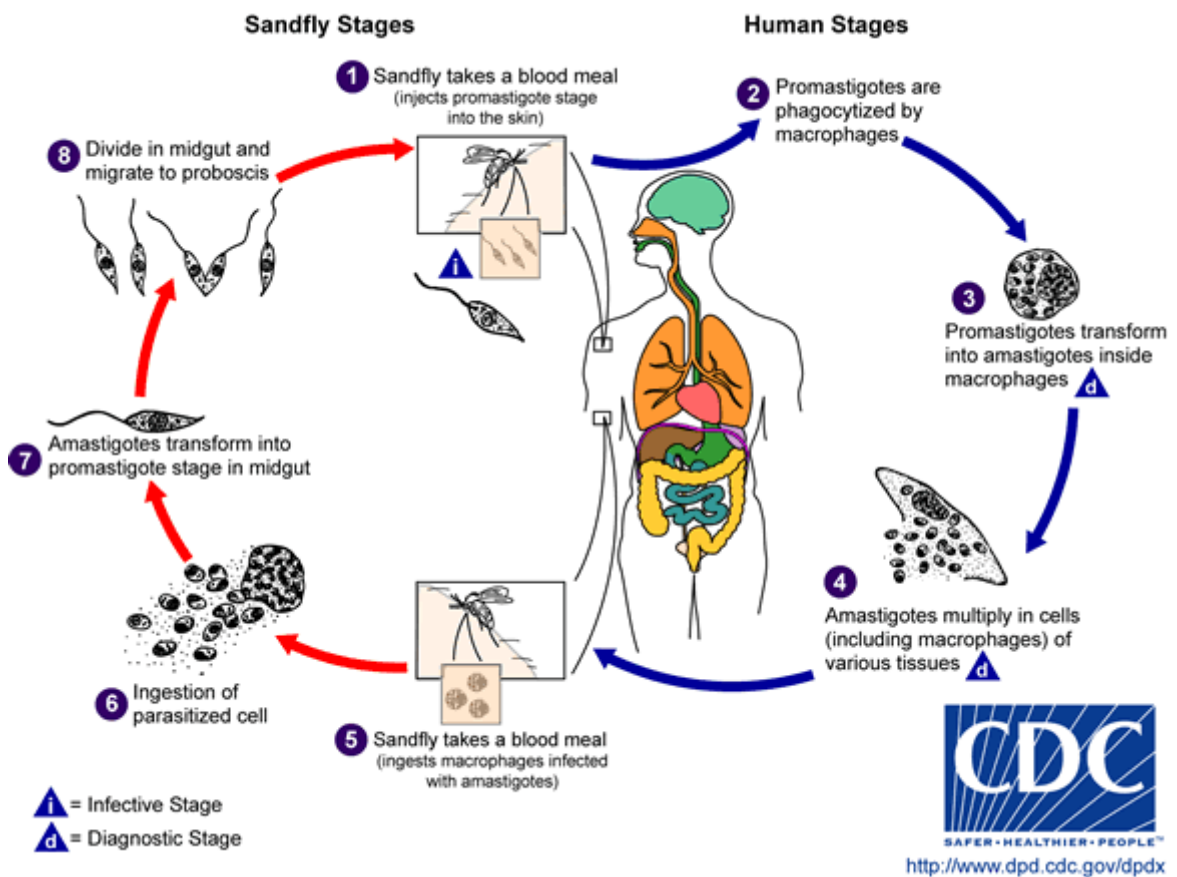


Abb. 1.2: Lebenszyklus der Leishmanien

Meist findet die Übertragung der Leishmanien zwischen Säugetieren statt. Eine Übertragung zwischen den Menschen wird bei *Leishmania donovani* und *Leishmania tropica* beobachtet (Croft and Yardley 2002).

1.1.4 Vorkommen

Es wird geschätzt, daß weltweit 12 Millionen Menschen mit Leishmanien infiziert sind und 350 Millionen dem ständigen Risiko einer Infektion ausgesetzt sind (World Health Organization). Jedes Jahr kommt es zu 1,5-2 Millionen Neuerkrankungen (75% kutan, 25% viszeral) und 70.000 Todesfällen. Die Hälfte der Infektionen betrifft Kinder.

Die Erkrankungen sind in 88 Ländern und auf allen Kontinenten mit Ausnahme Australiens verbreitet. Besonders betroffen sind Zentral- und Südamerika, das südliche Europa, Nord- und Ost-Afrika, der Mittlere Osten und der indische Subkontinent (WHO, 2005).

Doch aufgrund des zunehmenden Tourismus und der langen Inkubationszeiten sind diese Erkrankungen mittlerweile auf der ganzen Welt zu finden.

In den letzten 10 Jahren kam es in verschiedenen Ländern zu Epidemien der viszeralen Leishmaniose. Sie tritt auch immer häufiger als wichtige opportunistische Infektion bei immunkomprimierten Patienten, insbesondere bei Patienten mit HIV-Infektion, in Erscheinung. Auch die kutane Leishmaniose bleibt ein immer wiederkehrendes Problem vor allem für die Bevölkerung im Mittleren Osten und in vielen Gegenden Süd- und Mittelamerikas.

1.1.5 Pathogenese

Parasitäre Faktoren und Wirtsmechanismen sind in der Pathogenese eng miteinander verbunden und variieren mit der Leishmanienspezies. Die von mononukleären Phagozyten aufgenommenen Promastigoten differenzieren innerhalb der Zelle zu Amastigoten, die sich teilen und die intrazelluläre Infektion aufrecht erhalten.

Im Falle der viszeralen Leishmaniose transportieren nach einer Infektion epidermale Langerhanszellen die Leishmanien in regionale Lymphknoten, wo die Antigene dem Immunsystem präsentiert werden. Durch den Befall von Makrophagen in Milz und Leber kommt es zur Hepatosplenomegalie der Kala-Azar.

Die Immunantwort auf eine Leishmanieninfektion wurde ausgiebig im murinen Modell untersucht (Bogdan and Rollinghoff 1998; Alexander, Satoskar et al. 1999; Awasthi, Mathur et al. 2004). In wie weit die Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind, ist Gegenstand aktueller Forschung. Aber auch im Mausmodell zeigen sich sehr unterschiedliche Reaktionen auf die verschiedenen Leishmanienspezies. Schon vor 40-80 Millionen Jahren haben sich die Leishmanienspezies der neuen Welt von denen der alten Welt in der Evolution getrennt. In dieser

Zeit haben die Leishmanien unterschiedliche Faktoren und Mechanismen entwickelt, um im Wirt und Vektor zu überleben (McMahon-Pratt and Alexander 2004).

Bei allen bisher untersuchten Spezies wird die erworbene Resistenz gegen die Leishmaniose vor allem durch T-Zellen vermittelt. Unter den T-Zellen sind es besonders die CD4⁺-T-Helferzellen, die eine entscheidende Rolle in der Resistenzentwicklung und der Elimination der Parasiten spielen, während die CD8⁺-T-Zellen eine Gedächtnis-Funktion bei der Immunantwort haben. Eine protektive Immunantwort ist meist Th1-vermittelt und führt dazu, die Amastigoten innerhalb der Makrophagen zu eliminieren. Die Rolle einzelner Zytokine, Oberflächenmolekülen und der B- und T-Zellen variiert dabei zum Teil erheblich (Alexander, Satoskar et al. 1999; Campos-Neto 2005).

1.1.6 Krankheitsbilder

Die Leishmaniose kann sich in verschiedenen Krankheitsbildern manifestieren. Leishmanienspezies, genetische Faktoren des Wirtes und die Wirtsimmunität bestimmen das klinische Spektrum. Bei Immunkompetenten verursachen die verschiedenen Leishmanienspezies jedoch ganz bestimmte typische Krankheiten. Die meisten klinisch auffälligen Infektionen bleiben auf die Haut und die anliegenden Lymphknoten begrenzt.

Kutane Leishmaniose

Die auch als „Orientbeule“ bezeichnete kutane Leishmaniose ist ein sich langsam entwickelndes Hautgeschwür. Es beginnt meist mit einer Papel an der Stelle des Bisses, vergrößert sich zu einem Nodulus und beginnt über einen Zeitraum von 1-3 Monaten zu ulzerieren. Die Anzahl der Ulzerationen hängt von der Anzahl der Bisse ab. Die kutane Leishmaniose ist die häufigste Erscheinungsform der Leishmaniose.

Mukokutane Leishmaniose

Die mukokutane Leishmaniose ist gekennzeichnet durch eine lymphogene oder hämatogene Verschleppung der Erreger in den Nasen und Rachenraum. Dies geschieht in 1-10% der Infektionen mit Erregern der neuen Welt (*L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*) meist 1-5 Jahre nach Abheilen der kutanen Infektion, kann aber auch im Zusammenhang mit der akuten Infektion auftreten. Hierbei kommt es zunächst zu einem Erythem und Ödem der Schleimhäute mit anschließender Ulzeration bis hin zur Perforation des Nasenseptums und einer destrukturierenden Entzündungsreaktion, die auch den Larynx oder Pharynx betreffen kann.

Die mukokutane Leishmaniose tritt nur sehr selten außerhalb Lateinamerikas auf und betrifft dann meist Reisende aus diesen Gebieten.

Diffuse, kutane Leishmaniose

Bei der diffusen, kutanen Leishmaniose handelt es sich um eine knotige, großflächige Hautentzündung, die nur bei Patienten mit defizienter Immunantwort auftritt. Hierbei kommt es zu keiner Spontanheilung und der Behandlungserfolg ist minimal.

Viszerale Leishmaniose = Kala-Azar

Bei der viszeralen Leishmaniose sind Fieber, Schwäche, Nachtschweiß, Anorexie und Gewichtsverlust häufige Symptome, die über Monate zunehmen. In Kindern kann es auch zu Durchfällen und Wachstumsretardierung kommen. Fieber, Blässe, Hepatomegalie und sehr ausgeprägte Splenomegalie sind typische Befunde. Anämie, Leukopenie oder Thrombozytopenie und Hypergammaglobulinämie sind ebenfalls charakteristisch. Unbehandelt führt diese Form der Erkrankung zur ausgeprägten Kachexie, Multisystemerkrankung, Blutungen, Anfälligkeit für Sekundärinfektionen und zum Tode. Die Erreger sind *L. donovani*, *L. infantum* und *L. chagasi*.

Post-Kala-Azar-Hautleishmaniose = PKDL

Die Pathogenese der Post-Kala-Azar-Hautleishmaniose ist unbekannt. Die Erkrankung tritt als Folge einer viszeralen Leishmaniose in Ost-Afrika und auf dem indischen Subkontinent (*L. donovani*) auf, beginnt meist mit einer makulopapulösen-nodulären Läsion im Bereich des Mundes und generalisiert dann. Es wird unterschieden zwischen der tuberkuloiden depigmentierenden und der lepromatösen erythematösen Form.

Im Sudan entwickeln 50% der Patienten einer viszeralen Leishmaniose innerhalb von 0-6 Monaten nach Diagnosestellung eine PKDL, die meist innerhalb eines Jahres von selbst heilt und keiner zusätzlichen Therapie bedarf, während die PKDL in Indien meist Jahre später auftritt und eine erneute lange Therapie erfordert (Salotra and Singh 2006).

Leishmaniosis recidivans

Bei *L. tropica* Infektionen kann es zu einer Leishmaniosis recidivans kommen. Dabei entstehen nach Abheilung der Primärläsion, erneute Läsionen in der Peripherie.

Die Leishmanien-Infektion, besonders die der viszerotropen Arten kann asymptomatisch bleiben oder sich auch erstmalig nach jahrelanger latenter Infektion im Rahmen eines erworbenen Immundefektes manifestieren.

1.1.7 Diagnostik

Die Diagnose der kutanen Leishmaniose erfolgt meist mikroskopisch durch den Nachweis von Amastigoten im Biopsat oder Abstrich. Durch die zusätzliche kulturelle Anzucht kann die Leishmanienspezies identifiziert werden. Auch Anti-Leishmanien-Antikörper können durch sensitive und standardisierte Assays nachgewiesen werden. Die höchste Sensitivität für kutane und mukokutane Infektionen erreicht die PCR mit positivem Nachweis von Leishmanien-DNA in Läsionsmaterial, eine Methode die jedoch nur in wenigen betroffenen Ländern durchgeführt werden kann.

Auch bei der viszeralen Leishmaniose stellt der visuelle Nachweis von Amastigoten in der Gewebeprobe den Standard dar. In Regionen, in denen die technischen Voraussetzungen dafür nicht gegeben sind, dient der Nachweis eines hohen anti-Leishmanien-IgG-Titers im Serum oder der frühe Nachweis von anti-K39 mit Hilfe eines immunochromatographischen Streifentests als eine gute alternative Diagnosemöglichkeit.

1.1.8 Therapie

Die Behandlung der Leishmaniose ist aufgrund der verschiedenen Leishmanien-Spezies, die sich morphologisch sehr ähnlich sind, jedoch biochemische und molekulare Unterschiede aufweisen, nicht einfach.

Die viszerale Leishmaniose verläuft unbehandelt in 90% der Fälle tödlich und auch die kutane Leishmaniose, die durch Reepithelialisierung und Vernarbung heilt, bedarf vor allem in der neuen Welt häufig einer systemischen medikamentösen Therapie. Behandelt wird die kutane Leishmaniose, um die Heilungsdauer zu verkürzen und um eine Narbenbildung, eine Disseminierung (mukokutane Form) oder eine Reaktivierung zu verhindern.

Alle Medikamente, die gegen die Leishmaniose bisher auf dem Markt sind, haben schwere Nebenwirkungen und erfordern häufig eine lange parenterale Therapie.

Die Medikamente der ersten Wahl sind die fünfwertigen Antimone (zum Beispiel Pentostam[®] und Glucantime[®]). Sie werden seit über 60 Jahren sowohl bei der viszeralen wie auch bei der kutanen Leishmaniose eingesetzt und die Resistenz gegen diese Verbindungen ist besonders auf dem indischen Subkontinent hoch und weit verbreitet (Croft, Sundar et al. 2006). Die häufig auftretenden Nebenwirkungen reichen von der asymptomatischen Pankreatitis, Athralgien und Myalgien bis zur Kardiotoxizität.

Das Medikament der zweiten Wahl, Pentamidin, wird bei der viszeralen Leishmaniose bei Versagen der Antimontherapie eingesetzt. Auch dieser Einsatz ist durch Resistenzentwicklung und Toxizität begrenzt.

Amphotericin B, ein antimykotisches Medikament, ist sehr effektiv, hat aber auch viele schwere Nebenwirkungen. Das neuere liposomale Amphotericin B (AmBisome®) hat bei weniger Nebenwirkungen gleiche Effektivität, aber die hohen Kosten verhindern den Einsatz in den meisten betroffenen Ländern.

Das erste oral verfügbare Medikament ist Miltefosin. Miltefosin ist ein Alkylphosphocholin-Analogon, das ursprünglich in der Onkologie entwickelt wurde und inzwischen für die Behandlung der viszeralen Leishmaniose zugelassen ist. Es ist aufgrund seiner guten Verträglichkeit, seiner guten Wirksamkeit und vor allem aufgrund seiner oralen Bioverfügbarkeit ein sehr vielversprechendes Medikament. In einer Studie in Indien konnten in Phase 2 und 3 bei Kindern mit viszeraler Leishmaniose Heilungsraten von 97% und 94% erreicht werden (Prasad, Kumar et al. 2004). Aber auch dieses Medikament kann aufgrund seiner Kosten, der Teratogenität und Resistenzentwicklung nur eingeschränkt angewendet werden.

Paramomycin, ein Aminoglykosid, das die Phase 3 in Indien schon abgeschlossen hat, wird zur Zeit in Ost-Afrika getestet. Dieses über 21 Tage zu injizierende Medikament könnte bei minimaler Toxizität, niedrigen Kosten und voraussichtlich hoher Wirksamkeit weltweit eine Alternative zur Antimon-Therapie darstellen (Murray, Berman et al. 2005).

Bei der kutanen Leishmaniose kann auch eine lokale Therapie erfolgreich sein. Hier hat sich in der neuen Welt eine Paromomycin und Methylbenzethoniumchlorid enthaltene Salbe als sehr wirksam erwiesen (Schwartz, Hatz et al. 2006). Andernorts werden Antimone mit unterschiedlicher Effektivität intraläsional verabreicht.

Zu den weiteren Therapieoptionen, deren Wirksamkeit zum Teil noch Gegenstand aktueller Studien ist, gehören unter anderem Immunmodulatoren (Alvar, Croft et al. 2006).

1.1.9 Prävention und Bekämpfung

Die Kontrolle der Leishmaniose bleibt ein ernsthaftes Problem. Da es sich um eine Zoonose handelt, ist die Übertragung schwer zu unterbrechen. Chemischer Mückenschutz und feinmaschige, mit Pyrethroid imprägnierte Moskitonetze sind sehr wichtig für die Prävention.

Eine Impfung gibt es zur Zeit nicht, weder für die kutane noch für die viszerale Leishmaniose. Solange diese nicht vorhanden ist, bleibt die Therapie der wichtigste Punkt für die Kontrolle über die Erkrankung.

1.2 Drug targets

Die heute gegen die Leishmaniose eingesetzten Medikamente sind durch eine empirische Suche gefunden worden, und über ihre Wirkungsweise ist meist wenig bekannt. In den letzten Jahren wurden im Bereich der Entwicklung neuer Medikamente gegen die Leishmaniose jedoch Fortschritte erzielt.

Phylogenetisch sind die Trypanosomatiden sich relativ früh abzweigende eukaryontische Zellen, so dass der Zellorganismus sich zum Teil erheblich von den Säugetierzellen unterscheidet. Signalwege, die in Leishmanien, aber nicht in Säugetieren vorkommen, könnten daher geeignete Zielstrukturen für Medikamente sein. Besonders die Analyse des vollständig entschlüsselten Genoms von *L. major* hat die Identifikation entsprechender Zielstrukturen erleichtert (El-Sayed, Myler et al. 2005; Ivens, Peacock et al. 2005).

Eine mögliche Zielstruktur stellen die Proteinkinasen dar. Proteinkinasen sind wichtige Regulatoren vieler verschiedener Zellprozesse, wie der Kontrolle der Transkription, des Zellzyklusses und der Differenzierung. Heute weiß man, dass defekte, beziehungsweise überaktive, Proteinkinasen bei der Entstehung vieler Erkrankungen des Menschen, wie zum Beispiel Alzheimer, Krebs und kardiovaskulären Erkrankungen, eine bedeutende Rolle spielen. Daher haben Pharmafirmen in den letzten Jahren viel in die Entwicklung neuer Verbindungen zur spezifischen Hemmung der humanen Proteinkinasen investiert, und inzwischen gibt es eine Vielzahl an Proteinkinase-Inhibitoren, die die klinische Phase erreicht haben.

An den Proteinkinasen in Leishmanien zu forschen ist aus vielerlei Gründen vielversprechend: Zum einen, weil das bereits vorhandene Verständnis über Funktion und Struktur der Kinasen im Menschen auch viel Aufschluss über die Funktion entsprechender Kinasen im Parasiten geben kann. Unterschiede in der Funktion können dabei als mögliche Zielstrukturen für Medikamente untersucht werden. Hierzu können die vielen Inhibitoren, die bereits gegen menschliche Proteinkinasen gefunden wurden, verwendet werden. Zum anderen konnten bereits einige klinisch relevante Proteinkinasen in Leishmanien identifiziert werden (Barrett, Mottram et al. 1999; Naula, Parsons et al. 2005). Eine Gruppe an Proteinkinasen, die in Leishmanien stark vertreten ist, sind die MAP-Kinasen.

1.3 MAP-Kinasen

MAP (Mitogen-aktiviertes Protein)-Kinasen sind Proteinkinasen, die durch die Phosphorylierung anderer Proteine Signale weiterleiten. Sie sind wichtige Regulatoren der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums, der Apoptose, der Embryogenese sowie der Stress- und Immunantwort. Die

MAP-Kinase-Signaltransduktionskaskaden gehören zu einem weit verzweigten Netz aus Proteinkinase-Kaskaden und zusätzlichen Signalweiterleitungen in der eukaryontischen Zelle. Die Aktivierung erfolgt durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli wie Hormone, Wachstumsfaktoren oder Zytokine und wird über diverse Rezeptortypen (Rezeptor-Tyrosinkinasen, Zytokin-Rezeptoren, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen) vermittelt. Die Aktivierung der Phosphorylierungskaskade kann auch durch Umwelteinflüsse wie die Veränderung der Osmolarität, durch Hitzeschock oder UV-Strahlung erfolgen.

Die klassische MAP-Kinase-Kaskade ist eine Kaskade, die von der Hefezelle bis zur menschlichen Zelle konserviert ist und aus drei hintereinandergeschalteten Proteinkinasen besteht. Zunächst kommt es zur Aktivierung einer MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK). Daran sind neben weiteren Proteinkinasen auch Mitglieder der Ras- und Rho-Familien der kleinen GTPasen beteiligt. Die MAPKKK phosphoryliert eine oder mehrere MAP-Kinase-Kinasen (MKK) an zwei konservierten Resten, entweder an Serin- oder an Threoninresten. Die aktivierte MKK erkennt und phosphoryliert ein konserviertes T-X-Y-(Threonin-X-Tyrosin)-Motiv in der Aktivierungsschleife (Phosphorylierungslippe) der zugehörigen MAP-Kinase. Durch die Phosphorylierung beider Reste (duale Phosphorylierung) kann eine >1000-fach gesteigerte spezifische Kinase-Aktivität erreicht werden.

Die Substratspezifität der MKKs ist sehr hoch, so dass sie nur eine oder wenige verschiedene MAPKs phosphorylieren (Widmann, Gibson et al. 1999).

Aktivierte MAPKs phosphorylieren Proteine im Zytoplasma, an der Zellmembran oder im Nukleus. Substrate der MAP-Kinasen sind verschiedene Enzyme, Transkriptionsfaktoren, Proteine des Zytoskelets und weitere Proteinkinasen wie die MAPK-aktivierten Proteinkinasen. Allen Substraten gemeinsam ist ein Serin/Threonin-Motiv, welches phosphoryliert wird. Eine Inaktivierung der MAPKs erfolgt durch spezifische MAPK-Phosphatasen (Pearson, Robinson et al. 2001).

In der menschlichen Zelle finden sich mindestens vier parallel vorkommende MAPK-Signalkaskaden, die unterschiedlich auf verschiedene extrazelluläre Reize reagieren. Die bisher beschriebenen vier Hauptgruppen der MAPK-Familie im Menschen sind die „extracellular signal-regulated kinases“ ERK1/2, p38-Kinasen, Jun N-terminale-Kinasen (JNKs) und die erst kürzlich identifizierte „big mitogen activated protein kinase“ (BMK1)/ERK5 (Hayashi, Fearn et al. 2005). Während die JNK und p38-MAPK eher durch Stress und inflammatorische Zytokine aktiviert werden, wird die ERK-Kaskade vor allem durch polypeptidische Wachstumsfaktoren aktiviert. Eine wichtige Rolle spielen die verschiedenen MAP-Kinase-Signalkaskaden nicht nur in

physiologischen, sondern auch in pathologischen Prozessen. Dazu gehören durch das Immunsystem vermittelte Erkrankungen, Diabetes mellitus, kardiovaskuläre Erkrankungen und die Karzinogenese. Daher besteht ein großes Interesse an der Erforschung der MAP-Kinasen-Signaltransduktion in der menschlichen Zelle, und für manche MAP-Kinasen konnten bereits spezifische Inhibitoren entwickelt werden (Chang and Karin 2001; Kyriakis and Avruch 2001; Johnson and Lapadat 2002).

1.4 Signaltransduktion in Trypanosomatidae

Viele wichtige Signalmoleküle, wie Transkriptionsfaktoren, heterodimere G-Proteine und die meisten Klassen von katalytischen Rezeptoren, fehlen in Trypanosomatiden. Stark vertreten dagegen sind Proteinkinasen und Phosphatasen. So finden sich im Genom von *L. major* 199 Proteinkinasen, die sehr wahrscheinlich auch katalytisch aktiv sind. Während einige Klassen an Proteinkinasen, die in der menschlichen Zelle vorkommen, in Trypanosomatiden nicht nachzuweisen sind, machen Proteinkinasen, die mit Stress und dem Zellzyklus in Verbindung stehen, einen großen Teil aus. Zu dieser Gruppe an Kinasen gehören auch die MAP-Kinasen (Parsons, Worthey et al. 2005).

Das erste Homolog zu einer MAPK wurde in *T. brucei* gefunden (Hua und Wang 1994), was das Vorkommen von MAP-Kinase-Signalkaskaden in Trypanosomatiden wahrscheinlich machte. Inzwischen konnte für eineige MAPK eine Rolle bei der Regulation der Flagellenlänge, der Differenzierung und des Zellzyklus nachgewiesen werden (Muller, Domenicali-Pfister et al. 2002; Wiese, Kuhn et al. 2003).

In *Leishmania mexicana* wurden 15 MAP-Kinase-Homologe identifiziert (Wiese, unveröffentlicht). Durch Klonierungen konnten bereits mehreren dieser MAPKs bestimmte Aufgaben im Parasiten zugeordnet werden, auch wenn die molekularen Zusammenhänge größtenteils noch unklar sind. In Bezug auf die Eignung als Zielstruktur für ein potentiell Medikament konnte bisher ein MAP-Kinase-Homolog ausgemacht werden. Durch eine Deletionsanalyse wurde gezeigt, dass diese Kinase essentiell für die Proliferation von amastigoten Parasiten im Phagozytosome des infizierten Makrophagen und somit für das Überleben des Parasiten im Säugetierwirt ist (Wiese 1998). Anderen Kinasen konnte eine Rolle bei der Regulation der Flagellenlänge (Bengs, Scholz et al. 2005; Erdmann, Scholz et al. 2006) und der Differenzierung (Kuhn and Wiese 2005) zugeschrieben werden.

Auch wenn sich diese Kinasen nicht als Zielstruktur für Medikamente zur Behandlung der Leishmaniose eignen sollten, können durch entsprechende Analysen wichtige Erkenntnisse über die Signaltransduktion und Funktion in Leishmanien gewonnen werden.

2 Material

2.1 Geräte

Brutschrank

Begasungsbrutschrank mit Kühlung
BBK 6220 (Heraeus)
Schüttelinkubator Innova 4230

Kendro Laboratory Products, Hanau
New Brunswick Scientific, USA

Elektrophorese

Biometra Minigel
Gene Power Supply GPS 200/400
Consort E734

Biometra GmbH, Göttingen
Amersham Biosciences, Freiburg
Consort, Belgien

Elektroporationsgeräte

Electro Cell Manipulator 600
Gene Pulser
Pulse Controller
Capacitance Extender

BTX, USA
BIO RAD Laboratories GmbH, München
BIO RAD Laboratories GmbH, München
BIO RAD Laboratories GmbH, München

Heizblock

Thermomixer 5436

Eppendorf AG, Hamburg

PCR-Maschine

Gene Amp PCR Systeme 9700

PE Applied Biosystems, Weiterstadt

pH-Meter

Digital-pH-Meter CG 820

Schott Geräte GmbH, Hofheim

Sicherheitswerkbank

Sicherheitswerkbank
HERAsafe HS15 (Heraeus)

Kendro Laboratory Products, Hanau

Sonifikator

Branson Sonifier® 250

Branson, Danbury USA

UV-Linker

UV Stratalinker 1800

Stratagene, La Jolla, USA

Vortex

Vortex VF2

Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen

Photometer

Spektralphotometer Ultrospec III
Biophotometer 6131

Amersham Biosciences, Freiburg
Eppendorf AG, Hamburg

Zentrifugen

Centrifuge 5415C
GS-6KR Zentrifuge, GH3.8 Rotor
HERMLE Z 400K
Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed
Centrifuge, SS-34 Rotor, GSA-Rotor
ProFuge® 10 K

Eppendorf AG, Hamburg
Beckman Instruments GmbH, München
Hermle Laborthechnik GmbH, Wehingen
Kendro Laboratory Products, Hanau

Stratagene, La Jolla, USA

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

2.2 Verbrauchsmaterialien

Sterile Plastikwaren für die Zellkultur stammten von den Firmen Sarstedt (Nürnbrecht), Nunc (Wiesbaden), Greiner Bio-One (Frickenhausen), VWR International (Darmstadt) und Eppendorf AG (Hamburg). X-Ray Retina Röntgenfilme kamen von den Fotochemischen Werken, Berlin. Zusätzlich verwendete Verbrauchsmittel sind an den betreffenden Stellen im Methodenteil angegeben.

2.3 Chemikalien

Acrylamid 30 % (w/v)/0,8 % (w/v) Bisacrylamid Stammlösung	Carl Roth, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche Diagnostics, Mannheim
Anhydrotetracyclin (AHT)	IBA GmbH, Göttingen
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Ampicillin	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Bacto-Agar	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Bacto-Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Bleocin™ (Phleomycin)	Merck Biosciences, Schwalbach
Blockierungsreagenz	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	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Carbenicillin (26,7 mg/ml in 70 % EtOH)	Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg
CSPD®	Roche Diagnostics, Mannheim
D-Desthiobiotin	IBA GmbH, Göttingen
N,N-Dimethylformamid	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogensulfat	Merck KGaA, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Biomol, Hamburg
dNTP-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Electrophoresis grade agarose	Amersham Biosciences, Freiburg
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Fischsperm-DNA	Roche Diagnostics, Mannheim
Formaldehyd 37 % (Formalin)	Carl Roth, Karlsruhe
Formamid	Merck KGaA, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Gelatine	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt

Glutardialdehyd	Merck KGaA, Darmstadt
Gluthation, reduziert	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Glutathione-Uniflow Resin	BD Bioscience, Heidelberg
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Hämin (bovines Häminchlorid)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Hefe-Extrakt	Carl-Roth, Karlsruhe
N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure] (HEPES)	Merck KGaA, Darmstadt
Hygromycin B	Merck Biosciences, Schwalbach
Imidazol	Merck KGaA, Darmstadt
Isoamylalkohol	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	Gerbu Biochemicals, Gaiberg
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin	Gerbu Biochemicals, Gaiberg
Leupeptin	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
L-Glutamin (200 mM, für Zellkultur)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Lithiumchlorid	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Maleinsäure	Serva, Heidelberg
Maltose	Merck KGaA, Darmstadt
Manganchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Morpholinoethansulfonsäure	Serva, Heidelberg
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Gerbu Biochemicals, Gaiberg
Mowiol 4-88	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck KGaA, Darmstadt
N-Lauroylsarkosin	Carl Roth, Karlsruhe
o-Phenanthrolin	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Penstrep (1000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	PAN Biotech, Aidenbach
Phenol, TE-äquilibriert, pH 7,5-8,0	Carl Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Poly-L-Lysin Hydrobromid	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Puromycin	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Schneider's Medium	PAN Biotech, Aidenbach
SDM-Medium	PAN Biotech, Aidenbach

Silbernitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Strep-Tactin-Sepharose 50 % suspension	IBA GmbH, Göttingen
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
N ^α -p-Tosyl-L-Lysin-Chloromethylketon-Hydrochlorid (TLCK)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt
Xylencyanol	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim

2.4 Antibiotika und Kulturmedien

2.4.1 Medien für Bakterienkulturen

Die Medien wurden mit ddH₂O angesetzt und 25 min bei 120 °C und 1 bar autoklaviert. Antibiotika wurden nach Abkühlung auf ungefähr 50 °C gegebenenfalls zugegeben. Für die Herstellung von Mediumplatten wurden vor dem Autoklavieren 15 g Bacto-Agar pro Liter Medium zugegeben.

LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 10 g/l NaCl
NZY-Medium	5 g/l Hefe-Extrakt 10 g/l Casein-Hydrolysat (NZ-Amin) 5 g/l NaCl 2 g/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O, pH 7,5
SOB-Medium	20 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 0,5 g/l NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ ; pH 7,0

2.4.2 Medien für Phagen

TB-Medium	5 g/l NaCl 10 g/l Bacto-Tryptone
-----------	-------------------------------------

2.4.3 Medien für Leishmanienkulturen

SDM-Medium komplett	500 ml SDM-Medium 5 % - 10 % (v/v) iFCS 1,2 ml Hemin 1 % (v/v) Pen/Strep (10 mg/ml Streptomycin, 10000 U/ml Penicillin)
---------------------	---

Schneiders Medium komplett	20 mM MES 1 % (v/v) Pen/Strep 20 % (v/v) iFCS in Schneider's Medium, pH 5,5
Einfriermedium für Leishmanien	10 % (v/v) DMSO in iFCS

2.4.4 Antibiotika-Stammlösungen

Ampicillin (50 mg/ml in ddH₂O, steril)
Carbenicillin (26,7 mg/ml in 70 % EtOH)
Kanamycin (50 mg/ml in ddH₂O, steril)
Hygromycin B (20 mg/ml in PBS, steril)
Bleocin (Phleomycin) (2,5 mg/ml in PBS, steril)
Puromycin (22 mg/ml in PBS, steril)

2.5 *E. coli* Bakterienstämme

XI-1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac1^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)</i>] (Stratagene, La Jolla, USA)
TOP10F'	F' [<i>lac1^q, Tn10 (Tet^R)</i>] <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i> (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
BL-21	<i>B F dcm ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) gal</i> (Stratagene, La Jolla, USA)

2.6 Leishmanien und Versuchstiere

Leishmania mexicana mexicana MNYC/BZ/62/M379, Klon 2
Balb/c-Mäuse

2.7 Plasmide

Allgemeine und bereits vorliegende Plasmide:

pBluescript II SK(+)	Stratagene, La Jolla, USA
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pGEX-KG	Guan und Dixon, 1991
pASK-IBA 7	IBA GmbH, Göttingen
pX63polPAC	Wiese

Eine Übersicht der sonstigen verwendeten Plasmide befindet sich im Anhang.

2.8 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden bei Invitrogen GmbH (Karlsruhe) hergestellt.

M13/pUC-F 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'
M13/pUC-R 5'-AGCGGATAACAATTTACACACAGG-3'
M13-rev 5'-GGAAACAGCTATGACCATGAT-3'

MPK11

LmaMPK11_1.for 5'-AACATTCTGGTAAACACGAA-3'
LmaMPK11_1.rev 5'-ATCTCTGCGCAGCAGACGACGAT-3'
LmxMPK11_2.rev 5'-TCATGTACTCGCCTTGAT-3'
LmxMPK11_3.for 5'-AGTTTCGAAGGTGCGAGAAT-3'
LmxMPK11_3.rev 5'-TTGTGTTGCGCGTCACTCT-3'
LmxMPK11_4.for 5'-GCGCAGCAGACGATTGAGAA-3'
LmxMPK11_4.rev 5'-TCCAGCAGGTAGCGGTCAT-3'
LmxMPK11_5.for 5'-GTTCTCCTCCGCTTCTTT-3'
LmxMPK11_5.rev 5'-GAGGATGTTGCGCAGGCCAAT-3'
LmxMPK11_6.for 5'-ACTTTTTCAATATACACAC-3'
LmxMPK11_6.rev 5'-CCATCAGTGTGAGAAACA-3'
LmxMPK11_7.for 5'-TTCTCGCCGGTATTGTGTT-3'
LmxMPK11_7.rev 5'-TCCAGCAGGTAGCGGTCAT-3'
LmxMPK11_8.for 5'-CGACCACCACACCCCTAA-3'
LmxMPK11_8.rev 5'-CAAATGTGGGTGTGCGTAT-3'
LmxMPK11_9.rev 5'-ATAGGAGGAGACAGAACTT-3'

LmaMPK11N.for 5'-CCGCGGCGCCATGGCGGCCACCAAGTCACTAGCG-3'
SacII *KasI* *NcoI*

LmxMPK11C.rev 5'-TCATGAAGCTTGACCTGATCACGGTCAAATTG-3'
BspHI *HindIII*

LmxMPK11_KM.for
5'-CGCCTCGTGGCCATGATGCGCGTGAACAAGGAAATC-3'

LmxMPK11_KM.rev
5'-CACGCGCATCATGGCCACGAGGCGGTTGTCGCTCTT-3'

MPK11del1.for 5'-TCTAGATATCTCCCTTGCGGGTGTTAC-3'
XbaI *EcoRV*

MPK11del1.rev 5'-TCTAGACCATGGCTGTGTTGCGCACTAAGCTG-3'
XbaI *NcoI*

MPK11del2.for 5'-TCTAGAGCTAGCTAAACGTCCACGTGTAAAGAAG-3'
XbaI *NheI*

MPK11del2.rev 5'-GATATCACCACTACAAACACCCAC-3'
EcoRV

MPK12

LmxMPK12N.for	5'- <u>CCGCGG</u> CG <u>TCATGA</u> TACTCACGAAGGTGGAG-3' <i>SacII</i> <i>BspHI</i>
LmxMPK12C.rev	5'- <u>CCATGGGATATC</u> CCGTTGCGCCGGGTTGACGCAA-3' <i>NcoI</i> <i>EcoRV</i>
LmaMPK12N.for	5'-CCGCGGCGTCATGATACTCACCAAGGTAGAG-3'
LmaMPK12C.rev	5'-CCATGGGATATCCCGCTGCTCCGGGTAGACGCAA-3'
LmaMPK12_1.for	5'-CTGTGCGCACTGCAATACAT-3'
LmaMPK12_1.rev	5'-TCACGTGCCAGGTCTGGTAT-3'
LmxMPK12_2.for	5'-CCCTGGCAAGGACTACAT-3'
LmxMPK12_2.rev	5'-CAGCAGGTTTCCCGGCTT-3'
LmxMPK12_3.for	5'-TCTATGCGCGCACGCCGAT-3'
LmxMPK12_3.rev	5'-AATATATGCCATCCCACAT-3'
LmxMPK12_4.for	5'-ACGCTGAGCGGAGAGGCAA-3'
LmxMPK12_4.rev	5'-AGGCAACACGTGAGAAGAA-3'
LmxMPK12_6.for	5'-GTTTGTGTGGCGACTTCAT-3'
LmxMPK12_6.rev	5'-GCAGTAGAACGCCAGGAAT-3'
LmxMPK12_7.for	5'-CGTCGCCGTGGCTGTTGAT-3'
LmxMPK12_7.rev	5'-ACGAAAGCCATCACGGATA-3'
LmxMPK12KM.for	5'-GAGCCAGTCGCGATAATGAAGGTGACGCACCTCTTCG-3'
LmxMPK12KM.rev	5'-TCACCTTCATTATCGCGACTGGCTCATTCGTCACCGT-3'
LmxMPK12del1.rev	5'- <u>TCTAGACCATGG</u> CCGCCCACTGTCCCCGATCC-3' <i>XbaI</i> <i>NcoI</i>
LmxMPK12del2.for	5'- <u>TCTAGAGCTAGC</u> TCGAGGCTTTCGATGCGCGCA-3' <i>XbaI</i> <i>NheI</i>
LmxMPK12del1.for	5'- <u>TCTAGATATC</u> TTCCATCTATGCGCATGC-3' <i>XbaI</i> <i>EcoRV</i>
LmxMPK12del2.rev	5'- <u>GATATC</u> GCTTGAGAGAAAACGGCA-3' <i>EcoRV</i>

Unterstrichen: durch Primer hinzugefügte Basen für Schnittstellen

2.9 Phagenbank

λ ZAP II cDNA-Bank *L. mexicana*

2.10 Antikörper

Ziege-anti-Kaninchen, HRP-gekoppelt (1:1000)	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen, Peroxidase-gekoppelt Anti-Digoxigenin Fab-Fragmente aus Schaf, AP gekoppelt (1:10.000)	Jackson Immuno Research Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-LmxMPK11 (1:10.000)	Charles River Laboratories GmbH, Deutschland

2.11 Enzyme

Expand High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
Klenow Enzym	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt
RNase A (bovine pancreas)	Roche Diagnostics, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
Shrimp Alkaline Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim

2.12 Molekularbiologische Kits

ECL Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences, Freiburg
PCR DIG Probe Synthesis Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAGEN [®] Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAGEN [®] Lamda Kit	Qiagen GmbH, Hilden
TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.13 DNA-und Protein-Größenstandards

Prestained protein Marker, Broad Range	New England Biolabs, Frankfurt
2-Log DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt
Tridye 1 kb DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt
1 kb Marker	Carl Roth, Karlsruhe
λ -HindIII Marker	Stratgene, La Jolla, USA

2.14 Puffer und weitere Lösungen

Agarose-Gel Auftragspuffer (10x)	0,1 % (w/v) Bromphenolblau 0,1 % (w/v) Xylenblau 0,1 M EDTA pH 8.0 0,5x TBE 50 % (v/v) Glycerin
AHT	2 mg/ml in Dimethylformamid (DMF)
Blockierungslösung (Immunoblot)	5 % (w/v) Magermilchpulver 0,2 % (v/v) Tween 20 20 mM Tris-HCl pH 7,5 in 1x PBS

Bradford-Reagenz	0,01 % (w/v) Serva Brilliant Blue G 250 5 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) H ₃ PO ₄ filtriert, Lagerung bei 4 °C
Coomassie-Entfärber	30 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
DIG-Puffer 1	0,15 M NaCl 0,1 M Maleinsäure, pH 7,5
DIG-Puffer 2	DIG-Puffer 1 1 % (v/v) Blockierungsreagenz
DIG-Puffer 3	50 mM MgCl ₂ 0,1 M NaCl 0,1 M Tris-HCl pH 9,5
DIG-Waschpuffer	DIG- Puffer 1 0,3 % (v/v) Tween 20
Elektroporationspuffer	21 mM HEPES pH 7.5 137 mM NaCl 5 mM KCl 0,7 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 6 mM Glucose, pH 7,5 steril filtriert
Fixierlösung für Leishmanien	90 % (v/v) 1x PBS 10 % (v/v) Formaldehyd
Geltrocknungspuffer	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/ml in 50 mM NaOH, autoklaviert
Hybridisierungslösung (Southern Blot)	50 % (v/v) Formamid 5x SSC 0,1 % (w/v) N-Lauroylsarkosin 0,02 % (w/v) SDS 2 % (v/v) Blockierungsreagenz
iFCS	FCS 45 min bei 56 °C inaktivieren; Lagerung - 20 °C
IPTG	0,1 M IPTG in ddH ₂ O
MAP-Kinase Reaktionspuffer (10x)	20 mM MnCl ₂ 100 mM MgCl ₂ 1 M NaCl 500 mM MOPS, pH 7,2 bzw. 7,0
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 1x PBS
Prähybridisierungslösung (Southern Blot)	Hybridisierungslösung 100 µg/ml Fischsperm-DNA

Puffer W	100 mM Tris-HCl 150 mM NaCl
Puffer E	1 mM EDTA; pH 8,0 100 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA
Rnase A-Lösung	2,5 mM Desthiobiotin; pH 8,0 20 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH 7,5 15 mM NaCl 15 min bei 100 °C kochen Lagerung -20 °C
SDS-PAGE-Auftragspuffer (5x)	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 20 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS 0,001 % (w/v) Bromphenolblau 50 mM DTT (frisch zugeben)
SDS-PAGE- Elektrophorese-Puffer (10x)	0,25 M Tris-HCl 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS, pH 8,3
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris-HCl 0,4 % (w/v) SDS, pH 6,8
SSC (20x)	3 M NaCl
TBE (5x)	300 mM Na-Citrat, pH 7,0 0,45 M Tris-Base 0,45 M Borsäure
T ₁₀ E _{0,1}	10 mM EDTA pH 8,0 10 mM Tris-HCl pH 8,0 0,1 mM EDTA pH 8,0
TELT-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0 62,5 mM EDTA pH 9,0 2,5 M LiCl
TENS	4 % (v/v) Triton X-100 10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0 100 mM NaOH
X-Gal	0,5 % SDS 20 mg/ml in DMF; Lagerung -20 °C, dunkel

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*-Bakterien

a) Kultivierung in Flüssigmedium

Für die Anzucht von *E. coli* in flüssigem Medium wurde eine Einzelkolonie mit Hilfe einer Impföse in die entsprechende Menge Medium (3-100 ml) gegeben. Die Kultur wurde bei 37 °C über Nacht im Schüttelinkubator (200-250 rpm) inkubiert. Meist wurde LB-Medium verwendet, dem Ampicillin (100 µg/ml) oder Carbenicillin (100 µg/ml) zugesetzt wurde.

b) Kultivierung auf Festmedium

Die Anzucht auf Festmedium erfolgte auf LB-Agar-Platten, wobei dem Medium Ampicillin (100 µg/ml), Carbenicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) zugesetzt wurde, um die *E. coli* Bakterien entsprechend zu selektionieren. 50-200 µl Einzelkolonien, Bakteriensuspension oder Bakterien aus Glycerinkulturen wurden auf der Platte ausgestrichen und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis Einzelkolonien sichtbar wurden (meist über Nacht).

c) Lagerung in Glycerin

Für die Lagerung in Glycerin wurden 700 µl einer dicht gewachsenen Bakterienkultur mit 700 µl sterilem Glycerin in einem Kryoröhrchen (Nunc) kurz auf dem Vortexer gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und bei -70 °C eingefroren.

Glycerinkulturen von *E. coli* können ohne Vitalitätsverlust über viele Jahre gelagert werden. Für die erneute Anzucht werden geringe Mengen der Kultur auf Festmedium ausgestrichen.

3.1.2 Kultivierung von *L. mexicana*-Promastigoten

Promastigote Leishmanien wurden in 10 ml SDM-Medium (komplett) in 50 ml-Zellkulturflaschen bei 27 °C im Brutschrank kultiviert. Für größere Versuchsansätze wurden 50 ml SDM-Medium in 250 ml-Zellkulturflaschen verwendet. Bei Vorhandensein eines oder mehrerer Resistenzgene wurden die entsprechenden Antibiotika hinzugefügt (Hygromycin B: 20 µg/ml; Bleocin™ (Phleomycin): 5 µg/ml; Puromycin: 22 µg/ml (40 µmol/l)).

3.1.3 Leishmanien-Stabilate zur Langzeitlagerung

Zur Herstellung von Stabilaten wurden 10 ml einer Leishmanien-Kultur, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befand, für 10 min bei 3000 rpm (2050 x g) und 4 °C

zentrifugiert (Beckmann GS-6KR Centrifuge, GH3.8 Rotor). Der Zelleniederschlag wurde in 1,5 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und auf 3 Kryotubes (Nunc) zu je 500 µl verteilt. Diese wurden zunächst in der Gasphase des Stickstofftanks eingefroren und nach 24 h zur Lagerung in den flüssigen Stickstoff überführt. Zur erneuten Anzucht wurden die Stabilate bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und sofort in 10 ml SDM-Medium mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen (s. 3.1.2) gegeben.

3.1.4 *In-vitro*-Differenzierung von Promastigoten zu Amastigoten

Aus einer sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden Promastigoten-Kultur wurden Leishmanien entnommen und 20 s bei 5600 x g und RT zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden mit auf pH 5,5 angesäuertem Schneider's Medium (komplett) gewaschen, anschließend mit einer Zelldichte von 4×10^6 Zellen/ml in eine Kultur desselben Mediums überführt und bei 34 °C und 5 % CO₂ inkubiert (Bates et al., 1992).

3.1.5 Zählen von Leishmanien

Von der zu zählenden Kultur wurden 10 µl entnommen, entsprechend der Dichte der Kultur mit Fixierlösung verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Transformation von *E. coli* XL1-Blue und BL-21

Pro Transformationsansatz wurde ein 200 µl Aliquot kompetenter *E. coli*-Bakterien auf Eis aufgetaut, Plasmid-DNA (5 µl Ligationsansatz, 2 µl DNA aus Midipräp) hinzugefügt, gemischt und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 60 s (BL21) bzw. 90 s (XL1-blue) einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und sofort für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Hinzufügen von 800 µl LB-Medium wurde die Zellsuspension für 40 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 100-200 µl der Suspension wurden dann auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen (s. 3.1.1) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2.2 Blau-Weiß-Selektion

Für Klonierungsarbeiten mit pBSKII(+) und pCR2.1-TOPO wurden positive Klone durch die Blau-Weiß-Selektion selektioniert. Hierzu wurden auf die antibiotikumhaltigen LB-Mediumplatten vor dem Ausbringen der Transformationsansätze 40 µl einer X-Gal-Lösung (40

mg/ml) sowie 40 µl einer 0,1 M IPTG-Lösung ausplattiert. Nach Inkubation im Brutschrank bei 37 °C über Nacht wurden die Platten mindestens 2 h bis zur Entwicklung des blauen Farbstoffes bei 4 °C gelagert.

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

3.2.3.1 Plasmid-DNA Minipräp nach Zhou et al. (1990)

1,5 ml einer Übernachtskultur wurden für 30 s bei 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) und RT zentrifugiert, der Überstand bis auf 100 µl dekantiert und der Niederschlag im verbleibenden Überstand resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurden 300 µl TENS gegeben, der Ansatz sofort 4 s vorsichtig gevortext und das entstehende Lysat auf Eis gekühlt. Dann wurden 150 µl 3M Natriumacetat (pH 5,2) zum Lysat hinzugefügt, sofort 3 s vorsichtig gevortext und die Ansätze 10 min bei 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) und 4 °C zentrifugiert, der Überstand in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut 5 min bei 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) und 4 °C zentrifugiert. Ein zweites Mal wurde der DNA-enhaltende Überstand abgenommen und mit 900 µl 100 % Ethanol (-18 °C) gefällt, 15 min zentrifugiert, der dabei entstandene Niederschlag mit 1 ml 70 % Ethanol (-18 °C) gewaschen und für 10 min unter denselben Bedingungen wie vorher zentrifugiert. Die DNA wurde anschließend an der Luft getrocknet und mit 40 µl ddH₂O aufgenommen.

Diese Methode wurde für analytische Restriktionsspaltungen verwendet.

3.2.3.2 Plasmid-DNA Minipräparation anhand des QIAprep® Spin Miniprep Kits

Hierzu wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur für 30 s bei 14000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415C). Der gesamte Überstand wurde dekantiert. Das weitere Vorgehen erfolgte nach Herstellerangaben. Die DNA wurde mit 50 µl ddH₂O eluiert.

Die so aufgereinigte DNA wurde für die Sequenzierung eingesetzt.

3.2.3.3 Plasmid-DNA Midipräparation anhand des QIAgen Plasmid Midiprep Kits

Für eine Plasmidgewinnung in größerem Maßstab wurde eine 100 ml Übernachtskultur für 15 min bei 3000 rpm und 4 °C (HERMLE Z 400K) zentrifugiert und der Niederschlag mit Hilfe des QIAgen Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt. Nach der Elution wurde das Eluat auf sechs Eppendorf-Reaktionsgefäße zu je 833 µl verteilt, und es wurden 583 µl (0,7 Volumenanteile) Isopropanol hinzugefügt, um die DNA zu fällen. Nach kurzem Vortexen wurden die Ansätze für 30 min bei 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) und 4 °C zentrifugiert. Die Zelniederschläge wurden mit 700 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut 10 min unter sonst

gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Zelniederschläge wurden an der Luft getrocknet und in 30 μ l ddH₂O aufgenommen.

3.2.4 Phagen-DNA-Isolierung nach Qiagen

200 ml TB-Medium, das zusätzlich 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO₄ enthielt, wurde mit 4 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* P2 392 beimpft und bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt bis die OD₅₅₀ 0,6 ergab (entspricht 9×10^7 Zellen/ml). Zur DNA-Isolierung eines Phagenklons wurden 1×10^9 Zellen benötigt. Das die erforderliche Zellzahl enthaltende Kulturvolumen wurde 15 min bei 1050 g und 4 °C zentrifugiert. Der Zelniederschlag wurde in 200 μ l 10 mM MgSO₄ resuspendiert und die Phagen in einem Verhältnis von 1:200 (Phagen:Bakterien) der Zellsuspension zugegeben, der Ansatz gut durchmischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in 100 ml NZY-Medium (37 °C) überführt und bei 37 °C unter starkem Schütteln inkubiert, bis die zunächst ansteigende OD drastisch abnahm. Das weitere Vorgehen erfolgte gemäß Herstellerangaben unter Verwendung von Anionenaustauschsäulen (Qiagen tip-100).

Die isolierte Phagen-DNA wurde in 120 μ l T₁₀E_{0,1} aufgenommen.

3.2.5 Transfektion von Leishmanien

Durch Elektroporation kann Fremd-DNA in Leishmanien eingeschleust werden. Hierbei wird die Zellmembran durch elektrische Impulse für kurze Zeit permeabel, so dass DNA in die Zelle gelangen kann.

Zunächst wurden 4×10^7 promastigote Leishmanien, die sich in der spätlogarithmischen Wachstumsphase befanden ($4-6 \times 10^7$ Zellen/ml), in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 30 s bei 10000 rpm und RT zentrifugiert (ProFuge 10K). Der Niederschlag wurde mit 500 μ l kaltem Elektroporationspuffer gewaschen und erneut wie oben zentrifugiert. Anschließend wurde der Niederschlag in 400 μ l Elektroporationspuffer resuspendiert und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (4 mm; Bio-Rad Laboratories GmbH, München) überführt. Zu der Zellsuspension wurden 5 μ g der gewünschten linearen DNA oder 5-10 μ g Plasmid-DNA mit einem max. Volumen von 15 μ l zugegeben, der Ansatz gemischt und bei 1,5 kV, 200 Ω und 25 μ F 3 mal mit einem Strompuls von 0,9-1,1 ms Dauer elektroporiert (Electro Cell Manipulator) und anschließend für 10 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden in 10 ml SDM-Medium, welches das Antibiotikum der Ausgangskultur enthielt, überführt und die Kultur für 24 h bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur mit weiteren 30 ml SDM-Medium verdünnt und das Selektionsantibiotikum (entsprechend dem transfizierten Resistenzgen) zugefügt. Um auf Einzelklone zu selektionieren, wurde die gesamte 40 ml Kultur auf zwei 96-well Platten mit 200

μ l Vertiefung verteilt, mit Parafilm luftdicht verschlossen und bei 27 °C inkubiert bis sich Trübungen zeigten. Die unter dem Selektionsdruck gewachsenen Klone wurden dann zunächst in 2 ml SDM-Medium aufgenommen und später in eine 10 ml Kultur übernommen.

3.2.6 Isolierung genomischer DNA aus *L. mexicana*

Es wurden 1,5-3 ml einer dichtgewachsenen promastigoten Kultur für 30 s bei 10000 rpm und RT (ProFuge 10K) zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, auf Eis aufgetaut, mit 400 μ l TELT-Puffer resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 400 μ l Phenol hinzugefügt, der Ansatz für 5 min bei 4 °C „End-über-End“ rotiert und für 10 min bei 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 400 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (Volumenverhältnis 24:1) zur wässrigen Phase gegeben und der Ansatz wieder für 5 min „End-über-End“ rotiert. Es wurde wie zuvor beschrieben zentrifugiert, die wässrige obere Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 1 ml 100 % Ethanol (-18 °C) gefällt.

3.2.7 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Probe wurde 1:100 in ddH₂O oder T₁₀E_{0,1} verdünnt und die Konzentration in einer Kunststoffküvette mit dem BioPhotometer bestimmt. Die Konzentrationsberechnung erfolgte unter der Annahme, dass eine Lösung doppelsträngiger DNA mit der Konzentration 50 μ g/ml eine OD₂₆₀ von 1,0 aufweist.

Die DNA-Konzentration konnte auch im ethidiumbromidhaltigen Agarosegel durch Vergleich der Bandenintensitäten mit einem entsprechenden Marker, der bei jedem Lauf als Standard neben den DNA-Proben aufgetragen wurde, abgeschätzt werden.

3.2.8 Anwendung DNA-modifizierender Enzyme

3.2.8.1 Sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von DNA wurden ausschließlich Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet, welche doppelsträngige DNA innerhalb spezifischer palindromischer Sequenzen von 4 bis 8 Basenpaaren schneiden und dabei kohäsive oder glatte Enden erzeugen.

Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA

Analytische Restriktionsspaltungen wurden in einem 15 µl Ansatz mit 0,2-1,0 µg Plasmid-DNA und 5-10 U¹ des jeweiligen Restriktionsenzym (New England Biolabs) durchgeführt. Je nach Enzym wurde ein geeigneter Puffer und BSA zugefügt. Wenn keine RNase in der Aufreinigung verwendet wurde (Minipräp nach Zhou et al.), wurde 2 µg RNase A zugesetzt. Der Ansatz wurde 3 h bei dem Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms, in der Regel 37 °C, im Heizblock inkubiert.

Präparative Restriktionsspaltungen wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit 10-20 µg Plasmid-DNA durchgeführt. Die Menge an eingesetzter Endonuklease und die Volumina der übrigen Komponenten wurden entsprechend angepaßt.

Restriktionsspaltung genomischer DNA

Es wurden 3 µg genomische DNA mit 50 U Restriktionsenzym, 40 µg RNase A und 4 µg BSA in einem Gesamtvolumen von 400 µl unter ständigem Invertieren bei dem jeweiligen Temperaturoptimum des Restriktionsenzym über Nacht inkubiert. Anschließend wurde eine EtOH-Fällung durchgeführt. Dazu wurden 44 µl 3 M Natriumacetat, pH 5,2, (0,11 Volumenanteile) und 1100 µl 100 % EtOH (-18 °C, 2,5 Volumenanteile) zugesetzt und nach Durchmischung 30 min bei -70 °C inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch 20 min Zentrifugation bei 4 °C und 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) präzipitiert, mit 70 % EtOH (-18 °C) gewaschen, 10 min bei RT getrocknet und in 15 µl T₁₀E_{0,1} aufgenommen.

3.2.8.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligationen von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Es wurden 50-200 ng Vektor-DNA und die dreifache molare Menge an Insert-DNA in einem 15 µl Ansatz mit 1 µl (1 U) T4 DNA-Ligase und 1,5 µl 10 x Ligasepuffer eingesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 13 °C im Wasserbad.

3.2.8.3 Dephosphorylierung des 5' Endes von DNA-Fragmenten

Gespaltene Vektor-DNA mit glatten oder kompatiblen, überhängenden Enden wurde mit Shrimp Alkaliner Phosphatase (SAP) dephosphoryliert, um eine Ligation mit sich selbst zu verhindern. Die Reaktion erfolgte in einem 30 µl Ansatz, der die ethanolgefällte linearisierte Vektor-DNA, 7,5 U SAP und SAP Puffer enthielt, über 2 Stunden bei 37 °C im Heizblock. Die SAP wurde anschließend 20 min bei 65 °C hitzeinaktiviert.

¹ 1 U (Unit ist definiert als die Enzymmenge, die 1 µg λ-Phagen-DNA in 1 h vollständig schneidet)

3.2.8.4 Auffüllreaktion mit Klenow-Polymerase

Linearisierte DNA-Fragmente, die zur Erzeugung von überhängenden Enden mit Restriktionsenzymen geschnitten wurden, können mit der „Fill-in“-Reaktion des Klenow-Fragmentes mit den entsprechenden Nukleotiden aufgefüllt werden, so dass sie glatte Enden erhalten.

Dazu wurde die DNA, die zuvor durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung gereinigt wurde, in 17 µl H₂O aufgenommen. Zu dem Ansatz wurden 2 µl 10x Klenow-Puffer, 0,5 µl dNTP's (8 nmol/µl) und 0,5 µl Klenow-Polymerase (2 mU/µl) gegeben und der Ansatz 15 min bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurden 2 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) zugegeben.

3.2.9 Phenol-Chloroform-Extraktion einer wässrigen DNA-Lösung

Störende Proteinbestandteile wurden aus den wässrigen DNA-Lösungen mit Hilfe einer Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt. Angewandt wurde diese Extraktion nach einer einer Ligation vorangehenden Restriktionsspaltung, bei der eine Hitzeinaktivierung nicht möglich war.

Dafür wurden 100 µl einer wässrigen DNA-Lösung mit 100 µl TE äquilibriertem Phenol versetzt, für 30 s gevortext und dann für 5 min bei 14.000 rpm und RT (Centrifuge 5415C) zentrifugiert. Die wässrige obere Phase mit der gelösten DNA wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol (Volumenverhältnis 24:1) 30 s gevortext und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die wässrige obere Phase mit der gelösten DNA wurde erneut in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch eine Ethanol-fällung konzentriert.

3.2.10 Ethanol-fällung einer wässrigen DNA-Lösung

Die Ethanol-fällung wurde einerseits zum Konzentrieren von DNA in wässrigen Lösungen verwendet, andererseits zum sterilen Aufnehmen der DNA-Fragmente nach Gelextraktion für anschließende Elektroporationen.

Der DNA-Lösung wurden 0,11 Volumenanteile 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumenanteile eiskalter 100 % Ethanol zugesetzt, der Ansatz kurz gemischt und 30 min bei -70 °C gelagert. Anschließend wurde der Ansatz 15 min bei 14000 rpm und 4 °C (Centrifuge 5415C) zentrifugiert, der Niederschlag mit 400 µl 70 % Ethanol gewaschen und 10 min unter sonst gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Der Niederschlag wurde an der Luft getrocknet und im gewünschten Volumen ddH₂O aufgenommen.

3.2.11 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,7 – 0,9 % Agarosegelen, die Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,1 µg/ml enthielten. Zu dem DNA-Fragment-Gemisch wurden 0,1 Volumenanteil 10 x DNA-Auftragspuffer gegeben. Als Elektrophoresepuffer diente 0,5 x TBE. Der Gellauf fand bei RT statt. Nach der Trennung wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels eines Dokumentationssystems fotografiert. Anhand eines mitgelaufenen DNA-Längenstandards konnten die Größen und Mengen der DNA-Fragmente abgeschätzt werden.

3.2.12 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Die durch Restriktionsenzyme gespaltene DNA eines 100 µl Ansatzes wurde zusammen mit dem Auftragspuffer auf ein 0,9 % Agarosegel aufgetragen und bei 90 V aufgetrennt. Anschließend wurde die entsprechende Bande unter schwachem UV-Licht ($\lambda=365$ nm) ausgeschnitten. Die Isolierung wurde mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit gemäß Herstellerangaben durchgeführt und die DNA nach 1 min Inkubation mit 30 µl ddH₂O eluiert.

3.2.13 In-vitro-Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR

Für die PCR-Amplifikation wurde das Expand High Fidelity PCR System (Roche) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Gemisch aus einer thermostabilen Taq-DNA-Polymerase und der Tgo-DNA-Polymerase, einer thermostabile Polymerase mit Proofreading-Aktivität, die die Fehlerquote der Taq-DNA-Polymerase beim Einbau der Nukleotide um ein Drittel senkt.

Die Reaktionen wurden in 50 µl Ansätzen in 200 µl-PCR-Reaktionsgefäßen in einem GeneAmp® PCR System 9700 von PE Applied Biosystems (Weiterstadt) wie folgt durchgeführt:

Reaktionsansatz:

Plasmid-oder genomische DNA	10-200 ng
Primer (10 µM)	je 1,5 µl
10 x PCR-Puffer mit 15 mM MgCl ₂	5 µl
dNTP-Mix (20 mM)	0,5 µl
Expand High Fidelity PCR System-Mix	0,75 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Reaktionsbedingungen:

Start/Denaturierung	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	
Annealing	45-65 °C	30 s	25 x
Elongation	72 °C	30 sec- 1 min	
Elongation	72 °C	7 min	

3.2.14 Klonierung eines PCR-Produkts mit Hilfe des TOPO TA Cloning[®] Kit

Mittels des TOPO TA Cloning Kit[®] können PCR-Produkte, die 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.

3.2.15 Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden

Die Verwendung des PCR DIG Probe Synthesis Kit ermöglicht durch den Einbau von Digoxigenin-markiertem dUTP die Markierung eines DNA-Fragmentes für den Einsatz als Sonde in Southern Blot-Hybridisierungen. Die Durchführung der PCR erfolgte laut den Herstellerangaben. Die DIG-markierte DNA wurde nach 10 min Denaturierung bei 95 °C im Wasserbad und anschließender Inkubation auf Eis (5 min) in eine Hybridisierungslösung überführt und im Southern Blot eingesetzt. Sollte die Sonde wieder verwendet werden, so wurde die die Sonde enthaltende Hybridisierungslösung vor dem Einsatz 10 min bei 95 °C im Wasserbad denaturiert und auf Eis abgekühlt.

Temp.	Zeit	
94 °C	5 min	
94 °C	30 s	
50 °C	30 s	30 x
68 °C	1 min	
68 °C	7 min	
4 °C	∞	

3.2.16 DNA-Analyse durch 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 l T₁₀E_{0,1} aufgenommen. Nach Zugabe von 10 x DNA-Auftragspuffer erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente in einem 0,7 % Agarosegel mit 4,5 V/cm (90 V) bei RT über 3-4 h. 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 HCl (Denaturierung), dann 30 min in 0,5 M NaOH/ 1,5 M NaCl (Neutralisierung) leicht geschwenkt. Durch Kapillartransfer wurde die DNA mit 20 x SSC als Transferpuffer bei 4°C über Nacht auf eine Biotinylated A -Transfer -Membran übertragen. Der Aufbau ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt.

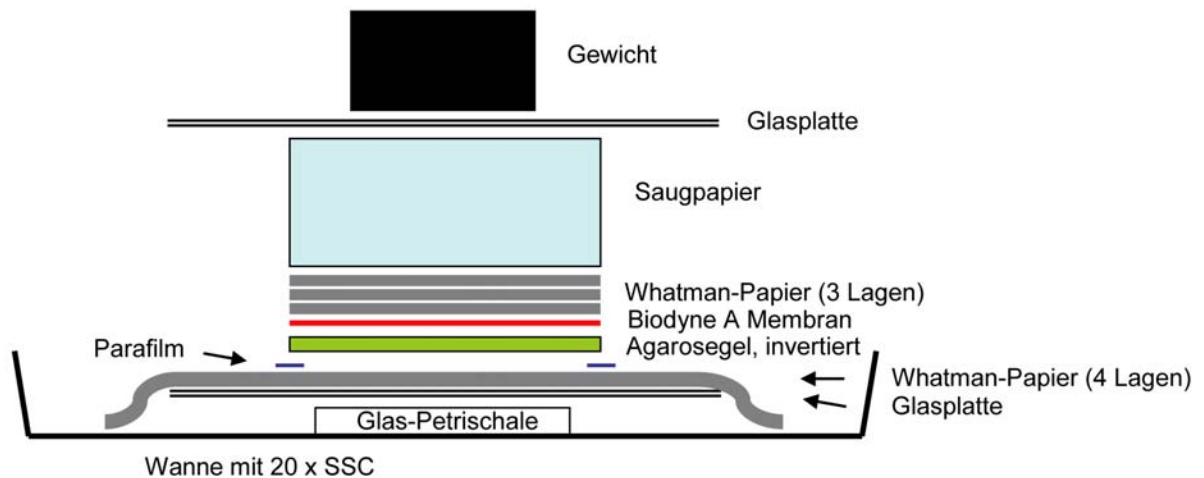


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Aufbaus zum Southern Blot.

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, USA) an dieser fixiert.

3.2.16.3 Hybridisierung mit einer DIG-markierten Sonde

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 diente der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Die DIG-markierte DNA wurde hitzedenaturiert (10 min, 95 °C), 5 min auf Eis abgekühlt und zu 30 ml auf 42 °C vorgewärmter Hybridisierungslösung gegeben. In dieser Hybridisierungslösung wurde die Membran über Nacht bei 42 °C im Wasserbad geschwenkt. Die Hybridisierungslösung wurde nach Gebrauch bei -20 °C gelagert und konnte nach erneuter Hitzedenaturierung erneut verwendet werden.

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

3.2.16.4 Nachweis der Digoxigenin-Markierung

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

Die Membran wurde 5 min bei RT 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 2 x 15 min bei RT 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 in Frischhaltefolie eingepackt. Nach 10 min Vorinkubation in einer Röntgenfilmkassette bei 37 °C wurde der Film 15-60 min 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 ddH₂O, anschließend 2 x 15min in 0,2 M NaOH und 0,1 % SDS bei 37 °C inkubiert und 5 min in 2 x SSC bei 37 °C gewaschen. Danach konnte die Membran bei 4 °C in DIG-Puffer 1 gelagert oder einer erneuten Prä- und Hybridisierung mit einer weiteren Sonde unterzogen werden.

3.3 Protein- und Immunochemische Methoden

3.3.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung denaturierter Proteine gemäß ihrer molekularen Massen erfolgte unter Verwendung des Minigel-Systems von Biometra (Göttingen) durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Gearbeitet wurde mit 12% Trenngelen und 4% Sammelgelen. Proteinproben wurden in 1 x SDS-Auftragsspuffer 10 min gekocht, 5 min auf Eis abgekühlt und ein Gesamtvolumen von 15-30 µl in die Geltaschen geladen. Die Auftrennung erfolgte bei RT pro Gel mit einer Stromstärke von 20 mA im Sammelgel und 30 mA im Trenngel. Dabei diente ein 0,1%-iger SDS-Elektrophoresepuffer als Laufpuffer.

Als Größenstandard wurde der Prestained Protein Marker *Broad Range* von New England Biolabs verwendet. Die darin enthaltenen Proteine und ihre Größen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Protein	Molekulargewicht [kD]
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 3.1: Prestained Protein Marker (Broad Range, New England Biolabs)

3.3.2 Färben von Protein in SDS-Polyacrylamidgelen

3.3.2.1 Coomassie Brilliant Blue R-250-Färbung

Zur Anfärbung von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue wurden die Trenngele 45 min bei RT in einer Coomassie-Färbelösung unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend solange in Entfärbelösung geschwenkt, bis die Proteinbanden deutlich zu sehen waren und die Färbung des Hintergrundes minimiert war.

3.3.2.2 Trocknen der Gele

Gefärbte Polyacrylamidgele wurden zur Aufbewahrung getrocknet. Die Gele wurden zunächst 30 min unter leichtem Schwenken in der Geltrocknungslösung inkubiert, bevor sie mittels eines Geltrocknungsrahmens (Roth, Karlsruhe) luftblasenfrei zwischen zwei in ddH₂O eingeweichten

Cellophan-Folienblättern eingespannt wurden. Nach 24 Stunden konnten die getrockneten Gele entnommen und zur Dokumentation eingescannt werden.

3.3.3 Immunoblot

3.3.3.1 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

Im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung 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 MeOH geschwenkt und anschließend 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Auch die sechs Whatmanpapiere, auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten, wurden in Transferpuffer getränkt. Der Proteintransfer erfolgte bei RT in einer Fastblot-Kammer (B44 Biometra, Göttingen) für 30 min mit 4 mA/cm^2 Membranfläche.

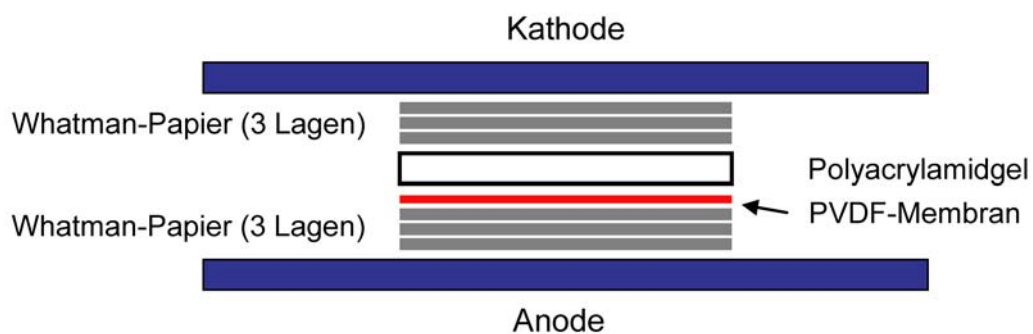


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Aufbaus zum Proteintransfer (Immunoblot)

3.3.3.2 Immunologische Detektion

Nach dem Abbau wurden die Markerbanden auf der Membran markiert und die Membran zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen anschließend 1 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in Blockierungslösung geschwenkt. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in spezifischer Verdünnung in 10 ml Blockierungslösung über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Nach viermaligem Waschen in 1 x PBST für jeweils 5 min bei RT erfolgte die Bindung des Sekundärantikörpers in 10 ml Blockierungslösung über 2 h bei RT.

Anschließend wurde die Membran bei RT unter leichtem Schwenken 3 x 5 min in 1 x PBST und 2 x 5 min in 1 x PBS gewaschen.

Zur Entwicklung wurde die Membran von beiden Seiten mit einer frisch angesetzten Entwicklerlösung bestehend aus gleichen Teilen der Lösungen des ECL (enhanced

chemiluminescence) Western Blotting Detection Reagent Kits (Amersham Pharmacia Biotech) getränkt, zwischen Folie in eine Filmkassette gelegt und ein Röntgenfilm 1 s - 15 min exponiert.

3.3.3.3 Abwaschen des gebundenen Antikörpers („stripping“)

Sollte der Blot mit einem weiteren Antikörper inkubiert werden, so wurde er zunächst 30 min bei 68 °C unter Schütteln in einer Lösung aus 100mM β -Mercaptoethanol, 2 % SDS und 62,5 mM TrisHCl, pH 6,7 inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2 x 10 min in 1 x PBST bei RT unter leichtem schwenken gewaschen. Danach konnte eine neue Blockierung erfolgen.

3.3.4 Herstellung von Leishmanienlysaten für SDS-PAGE

Zur Herstellung der Leishmanien-Lysate wurden für gewöhnlich Promastigote aus der logarithmischen Wachstumsphase ($4-6 \times 10^7$ Zellen/ml) verwendet, doch je nach Aufgabenstellung wurden auch Amastigote aus der Maus oder aus der in-vitro-Differenzierung verwendet. 1×10^8 Zellen wurden 20 s bei 5600 g und RT oder 10 min bei 2050 g und 4 °C sedimentiert, einmal in kaltem 1 x PBS gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Aufgenommen wurden die Zelniederschläge in einer Dichte von 1×10^9 Zellen/ ml in Leishmanien-Lysatpuffer, sofort 10 min auf 95 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 20 μ l Probe (2×10^7 Zellen) je Geltasche auf ein SDS-Gel geladen. Die der Hitze ausgesetzten Lysate konnten über längere Zeit bei -20 °C gelagert werden.

3.3.5 Weitere proteinchemische Methoden

3.3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode. Zur Messung der Extinktion bei 595 nm wurde das Biophotometer 6131 von Eppendorf verwendet.

3.3.5.2 Ultrafiltration

Mittels Ultrafiltration konnte eine makromolekulare Proteinlösung aufkonzentriert und umgepuffert werden. Dies wurde mit Centricon® Säulchen von Millipore (Schwalbach) bei 4°C durchgeführt. Hierbei wurde die Proteinlösung mehrmals mit dem 10fachen Volumen an neuem Puffer 1 x PBS versetzt und erneut aufkonzentriert.

3.4 Proteinexpression und -isolierung

3.4.1 Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli*

Die Gene der zu exprimierenden Proteine wurden unter Beibehaltung des Leserasters in den pGEX-KG-Vektor kloniert und als Fusionsproteine mit der Gluthation S-Transferase (GST) in *E. coli* exprimiert. Die Proteinisolierung erfolgte über Bindung an Gluthation (Glutathione Uniflow Resin (BD Biosciences)) und anschließender Elution mit reduziertem Glutathion.

3.4.1.1 Expression des Fusionsproteins

E. coli BL-21 Zellen wurden mit dem entsprechenden Expressionsvektor transformiert. Mit den über Nacht bei 37 °C gewachsenen Kolonien wurden 3 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Ampicillin) beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Übernachtskultur wurde zu 100 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Ampicillin) gegeben und bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ = 0,9 geschüttelt. Zur Induktion der Proteinexpression wurde die Kultur mit IPTG mit einer Endkonzentration von 50-100 µM versetzt und über Nacht bei 18 °C inkubiert. Die durch 10 min Zentrifugation bei 3000 rpm (HERMLE Z 400K) und 4 °C sedimentierten Zellen wurden einmal mit 1 x PBS (4 °C) gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend weiterverarbeitet oder bei -20 °C max. 10 Tage gelagert.

Der Zelniederschlag wurde in 50 µl 1 x PBS (4 °C) pro ml Kultur resuspendiert, die Zellen anschließend durch Ultraschall-Lyse (branson Sonifier ®250, Branson, USA) aufgeschlossen und mit Triton X-100 (Endkonzentration 1 %) durch Invertieren 30 min bei 4 °C gemischt. Das Lysat wurde daraufhin auf drei 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und 20 min bei 14.000 rpm (Centrifuge 5415C) und 4 °C zentrifugiert.

3.4.1.2 Isolierung des Fusionsproteins

Pro Milliliter Lysat-Überstand wurden 50 µl Bettvolumen Sepharose (Glutathione-Uniflow Resin, BD Bioscience) benötigt. Diese lag in einer Verdünnung von 50 % vor. Der Lysat-Überstand wurde auf die zuvor 2 x mit 1 x PBS (4 °C) gewaschene Sepharose gegeben und 1 h unter ständigem Invertieren bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Lysat 2 min bei 500 rpm (HERMLE Z 400K) und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Sepharose Niederschlag wurde 3 x mit 4 x Bettvolumen 1x BPS gewaschen und dazwischen jeweils 5 min bei 4 °C invertiert und 2 min bei 500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Für die Elution wurde der Sepharose-Niederschlag in 0,8 x Bettvolumen GSH-Elutionspuffer resuspendiert und 10 min bei

4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 500 rpm und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und der Elutionsvorgang noch einmal wiederholt.

3.4.2 Expression des Strep-tag-Fusionsproteins

3.4.2.1 Expression des Fusionsproteins

E. coli XL-1 Blue Zellen wurden mit dem entsprechenden Expressionsvektor transformiert. Mit den über Nacht bei 37 °C im Brutschrank gewachsenen Kolonien wurden 6 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Übernachtskultur wurde zu 500 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) gegeben und bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer $OD_{550} = 0,5-0,6$ geschüttelt. Zur Induktion der Proteinexpression wurde die Kultur mit Anhydrotetrazyklin (AHT; Endkonzentration 0,25 µg/ml) versetzt und über Nacht bei 18 °C inkubiert. Die Kultur wurde 15 min bei 5000 rpm (HERMLE Z 400K) und 4 °C zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden einmal mit 40 µl 1 x PBS (4 °C) je ml Kultur gewaschen, erneut 10 min zentrifugiert und anschließend weiterverarbeitet oder bei -20 °C für max. 10 Tage gelagert.

Der Niederschlag wurde in 20 µl Puffer W (4 °C) pro ml Kultur resuspendiert und die Zellen durch Ultraschall-Lyse (branson Sonifier ®250, Branson, USA) aufgeschlossen. Das Lysat wurde auf 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und 15 min bei 11.000 rpm (Centrifuge 5415C) und 4 °C zentrifugiert.

3.4.2.2 Isolierung des Fusionsproteins

Pro Milliliter Lysat-Überstand wurden 20 µl Bettvolumen Strep-Tactin-Sepharose benötigt. Diese lag in einer Verdünnung von 50 % vor. Der Lysat-Überstand wurde auf die zuvor 2 x mit Puffer W (4 °C) gewaschene Sepharose gegeben und 1 h unter ständigem Invertieren bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Lysat 2 min bei 500 rpm (HERMLE Z 400K) und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Sepharose-Niederschlag wurde 5 x mit 5 x Bettvolumen Puffer W gewaschen und dazwischen jeweils 5 min bei 4 °C invertiert und 2 min bei 500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Für die Elution wurde der Sepharose Niederschlag in 1 x Bettvolumen Elutionspuffer (Puffer E) resuspendiert und 10 min bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 500 rpm und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und der Elutionsvorgang noch zweimal wiederholt.

3.5 Kinase-Aktivitätstests der rekombinant exprimierten Proteine

In Kinase-Aktivitätstests kann festgestellt werden, inwieweit Proteine zur Autophosphorylierung oder zur Übertragung einer Phosphatgruppe auf ein anderes Protein in der Lage sind. Im Reaktionsansatz liegt neben dem unmarkierten ATP auch radioaktiv markiertes ATP ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$) als Phosphatgruppendonator vor, so dass der Phosphorylierungsgrad des jeweiligen Substrates nach Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE sowohl qualitativ als auch quantitativ ausgewertet werden kann. Die verschiedenen Komponenten für einen Ansatz wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis zusammengegeben.

Reaktionsansatz:

- 5 μl 10 x Kinasepuffer
- 2 μl 1 mg/ml MBP
- 5 μl ATP-Mix (1 mM ATP und 5 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$)
- 2 μg Protein in Elutionspuffer
- ad 50 μg ddH₂O

Der Ansatz wurde für 1 h inkubiert und die Proben anschließend für die SDS-PAGE vorbereitet. Nach Zugabe von Auftragspuffer und DTT wurden die Proben 10 min bei 95 °C im Heizblock erhitzt, auf Eis abgekühlt und schließlich in einem SDS-Gel aufgetrennt. Nach der Färbung wurden die Gele für mindestens 24 h getrocknet und in eine Filmkassette gelegt. Die Exposition des Röntgenfilmes erfolgte bei -70 °C.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in *E. coli* exprimierten Kinasen hinsichtlich ihrer Aktivität bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen untersucht.

3.6 Infektion von BALB/c-Mäusen

Für die Infektionsversuche wurden 6-10 Wochen alte weibliche BALB/c-Mäuse verwendet. Jede Maus wurde mit 1×10^7 promastigoten Leishmanien infiziert, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase ($3\text{-}5 \times 10^7$ Zellen/ml) befanden. Das entsprechende Volumen an Zellsuspension wurde für 30 s bei 10000 rpm (ProFuge® 10 K) und RT zentrifugiert, die Zellen mit 1 x PBS (4 °C) gewaschen und anschließend in 500 μl 1 x PBS aufgenommen, so dass die Zelldichte $3,2 \times 10^7$ Zellen/100 μl betrug. Die Mäuse wurden mit 30 μl dieser Zellsuspension in den linken Hinterlauf infiziert.

3.7 Isolierung von Amastigoten aus Mausläsionen

Der Läsions-tragende Fuß einer zuvor getöteten Maus wurde mit 70 % Ethanol befeuchtet, die Läsion abgetragen und in 1 x PBS (4 °C) zusammen mit Proteaseinhibitoren (50 µM Leupeptin, 25 µM TLCK, 1 mM PMSF, 10 mM o-Phenanthroline) gegeben. Das Läsionsgewebe wurde durch ein Metallnetz zerrieben und die Lösung bei 150 g (Beckmann GS-6KR; 860 rpm) und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und erneut 10 min bei 1500 g (Beckman GS-6KR; 2700 rpm) und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Niederschlag mit 1 x PBS mit Proteaseinhibitoren (s. o.) resuspendiert.

4 Ergebnisse

4.1 Vorarbeiten

4.1.1 Ausgangsmaterial

Vor Beginn dieser Arbeit waren in dieser Arbeitsgruppe, unter anderem mit Hilfe des Genomprojektes, bei *Leishmania major* zwölf den MAP-Kinasen homologe Proteine entdeckt worden. Die Gene von neun dieser Kinasen wurden in der Arbeitsgruppe bereits kloniert und die zugehörigen Proteine teilweise charakterisiert. Die Gene von LmxMPK11 und LmxMPK12 lagen zu Beginn dieser Arbeit in isolierten Phagenklonen aus einer in dieser Arbeitsgruppe vorhandenen genomischen DNA-Bank von *L. mexicana* im Phagen Lambda vor.

Aus den Phagen wurde die Phagen-DNA isoliert. Im Falle des *LmxMPK11*-Gens wurden die nach Restriktionsspaltung mit *XbaI* entstandenen DNA-Fragmente in den pBluescript II SK(+)-Vektor kloniert und mittels PCR auf das Vorliegen eines vollständigen, die Kinasesequenz enthaltenden, offenen Leserasters (ORF) überprüft. Hierbei ergab sich für das Plasmid pB3LmxMPK11 ein circa 6 kb großes Insert, auf dem das vollständige Gen enthalten war.

Die Ergebnisse für die LmxMPK12 werden im hinteren Teil dieses Kapitels ab Abschnitt 4.9 beschrieben. Im Folgenden sind zunächst die Ergebnisse für die LmxMPK11 dargestellt.

4.1.2 Sequenzierung des *LmxMPK11*-Gens und Vergleich mit anderen Spezies

Das LmxMPK11-Gen in dem Plasmid pB3LmxMPK11 wurde mit seinen flankierenden Bereichen sequenziert. Die Analyse der Sequenz ergab ein 1229 bp großes Gen (Accession Number: AAY45992, Sequenz siehe Anhang 8.1). Der Aminosäure-Vergleich zeigte eine Übereinstimmung von 96 % mit der entsprechenden MAP Kinase in *L. major* und eine 70 % Übereinstimmung zu einer MAP-Kinase in *Trypanosoma cruzi* sowie *Trypanosoma brucei* (Alignment siehe Anhang 8.5).

4.2 Diverse Klonierungen mit *LmxMPK11*

4.2.1 Einfügung von Schnittstellen/Vektorklonierung

Um das in dem Plasmid pB3LmxMPK11 vorliegende Gen *LmxMPK11* für weitere Klonierungen zugänglich zu machen, wurde es mit den Primern LmaMPK11N.for und LmxMPK11C.rev amplifiziert und anschließend mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert. Endprodukt war das Plasmid pCR2LmxMPK11. Durch die Primer wurden zusätzlich

Schnittstellen für weitere Klonierungen eingefügt: stromaufwärts Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *SacII* und *NcoI*, nach dem Stopcodon Schnittstellen für *HindIII* und *BspHI*. Für die Expression als Glutathion S-Transferase (GST)-Fusionsprotein in *E. coli* wurde das *LmxMPK11*-Gen, unter Beibehaltung des Leserasters, über die Schnittstellen *NcoI* und *HindIII* aus dem pCR2LmxMPK11-Plasmid in den mit denselben Restriktionsenzymen geschnittenen pGEX-KG Vektor, einem pGEX-2T-Derivat, kloniert. Dies ergab das Plasmid pGEX1MPK11.

4.2.2 Herstellung der inaktiven Mutante von LmxMPK11

Eine Möglichkeit, eine MAP-Kinase zu inaktivieren, besteht in dem Ersatz des Lysin-Restes in der Subdomäne II durch Methionin. Dieser Aminosäure-Austausch wurde durch zielgerichtete Mutagenese in einer PCR-Reaktion erreicht. Mit den einander komplementären Primern *LmxMPK11KM.for* und *LmxMPK11KM.rev*, die in ihrer Mitte die entsprechende Punktmutation tragen, wurde an Position 152 des ORF des MPK11-Gens die Punktmutation (AAG Lys51 zu ATG Met51) eingeführt. Gleichzeitig wurde mit Hilfe dieser Primer durch eine weitere Punktmutation an Position 144 (GTC Val zu GTG Val) des ORF eine *MseI* Schnittstelle eingefügt, um eine spätere Differenzierung zum WT zu erleichtern.

Mit je einem die Punktmutationen enthaltenden Primer und einem der äußeren Primer (*LmaMPK11N.for* bzw. *LmxMPK11C.rev*) wurden die beiden Fragmente durch zwei unabhängige PCR-Reaktionen amplifiziert, über eine Gelextraktion gereinigt und zusammen mit den beiden äußeren Primern in einer neuen PCR-Reaktion als Template eingesetzt. Eine schematische Darstellung des Vorgangs befindet sich in Abbildung 4.1.

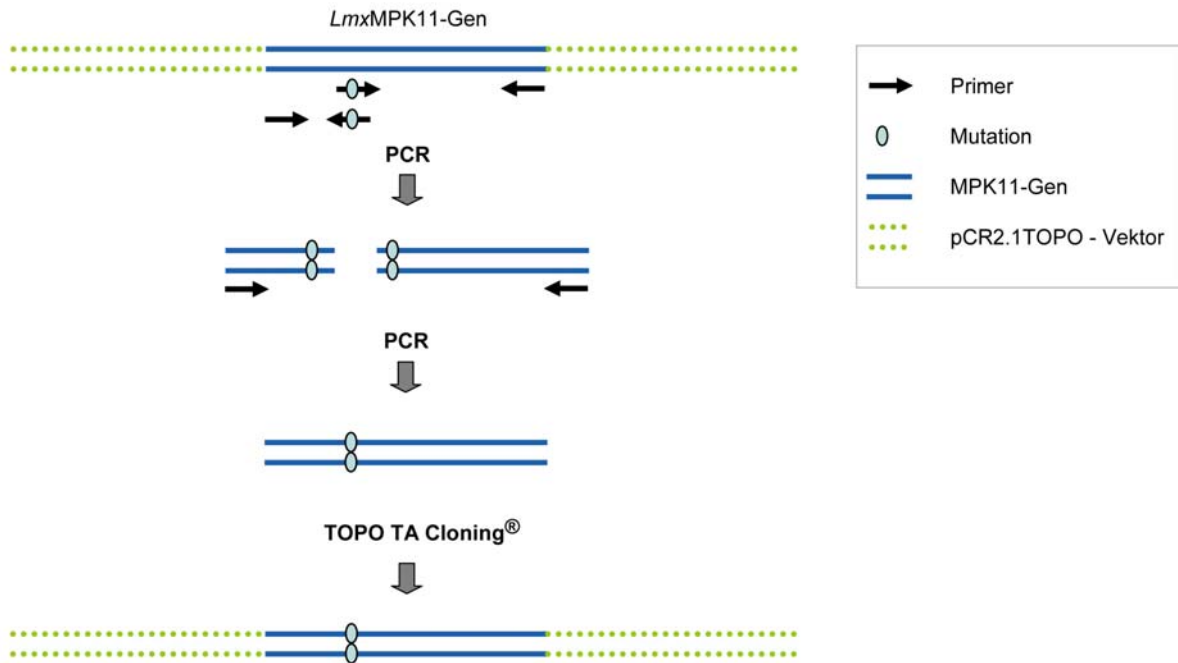


Abb. 4.1: Herstellung einer KM Mutante
Beschreibung der einzelnen Schritte, siehe Text

Das Amplifikat wurde anschließend mit dem TOPO TA Cloning® Kit in den pCR2.1-TOPO-Vektor kloniert und das entstandene Plasmid pCR10KMLmxMPK11 mittels Sequenzierung überprüft.

Für die Expression in *E. coli* wurde ein *NcoI/HindIII*-Fragment des Gens in den mit denselben Enzymen geschnittenen pGEX-Vektor kloniert. Diese Klonierung ergab das Plasmid pGEX2LmxMPK11KM.

4.2.3 Rekombinante Expression der GST-Fusionsproteine

Die Herstellung der für die rekombinante Expression benötigten pGEX-KG-Vektoren wurde in Kapitel 4.2.1 und 4.2.2 beschrieben. Die Expression der GST-LmxMPK11-Fusionsproteine wurde im 100 ml-Maßstab durchgeführt, die Induktion erfolgte mit 100 µM IPTG und Inkubation bei 18 °C über Nacht.

Nach der Elution wurden 20 µl (1/10) der Eluate auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das Ergebnis der Gel-Trennung ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass die Isolierung und Konzentrierung der beiden Fusionsproteine in der erwarteten Größe von 74 kDa (MPK11=46,7 kD, GST=27,4 kD) gelungen ist. Im Eluat konnten Protein-Konzentrationen von 4 - 8 mg/ml erzielt werden. Aus 100 ml dichtgewachsener *E. coli* Kultur erfolgte somit eine Aufreinigung von bis zu 5 mg Protein. Für weitere Tests wurden die Kinasen bei 4 °C gelagert (max. 3 Wochen).

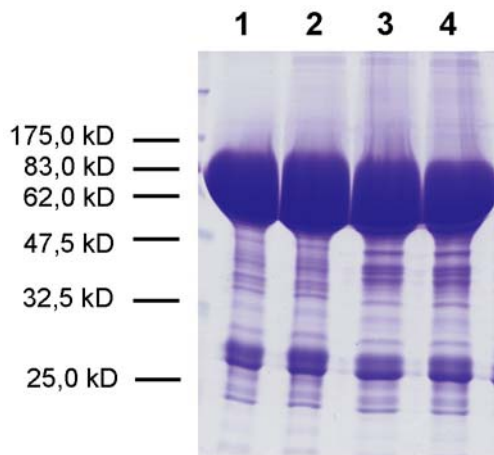


Abb. 4.2: SDS-PAGE mit Aliquots aus der Aufreinigung der GST-LmxMPK11-Fusionsproteine
 20µl (1/10) der Eluate aus der GST-LmxMPK11 Proteinisolierung wurden auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.
 1: Eluat 1 WT; 2: Eluat 2 WT; 3: Eluat 1 KM-Mutante; 4: Eluat 2 KM-Mutante

4.2.4 Antikörper - Herstellung

Für die Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen die LmxMPK11 wurden 1,3 mg des LmxMPK11-Fusionsproteins durch Filtration im Centricon 30 konzentriert und in PBS aufgenommen. Abbildung 4.3 zeigt eine SDS-PAGE vor und nach der Konzentrierung. Die Herstellung des polyklonalen Antikörpers im Kaninchen erfolgte durch Charles River Laboratories.

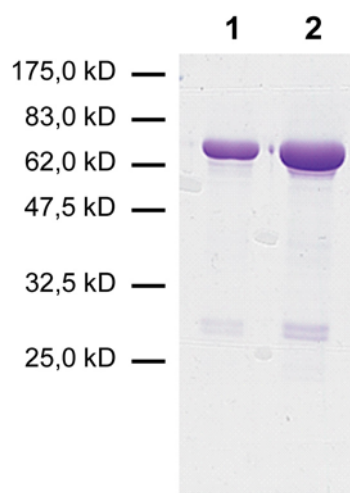


Abb. 4.3: SDS-PAGE des LmxMPK11 GST-Fusionsprotein für die Antikörper-Herstellung
 Auftrennung in einem 12 % SDS-Gel mit anschließender Commassie Brilliant Blue-Färbung
 1: 0,5 µl Proteineluat im Elutionspuffer nach Aufreinigung
 2: 0,5 µl Proteineluat in 1 x PBS nach Konzentrierung durch Centricon

4.3 In-vitro-Aktivitätstest (Kinase-Assay) mit der GST-LmxMPK11

Kinasen sind nur in Anwesenheit von divalenten Metallionen (meistens Mg^{2+} oder Mn^{2+}) aktiv. Die Kationen bilden einen Komplex mit dem zu spaltenden ATP und ermöglichen so die Übertragung der endständigen Phosphatgruppe des ATPs auf ein Substrat. Um die Phosphorylierungsaktivität (Autophosphorylierung und Substratphosphorylierung) der exprimierten und aufgereinigten GST-LmxMPK11 am WT und der inaktiven Mutante zu untersuchen, wurden in-vitro-Aktivitätstests unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Als Testsubstrat diente in allen Versuchsansätzen Myelin Basic Protein (MBP).

4.3.1 Temperaturoptimum und optimale Ionenkonzentration

Zunächst wurde das Temperaturoptimum der Kinaseaktivität ermittelt, indem ein Reaktionsansatz mit einer Ionenkonzentration von 2 mM $MnCl_2$ und 10 mM $MgCl_2$ und einem pH von 7,2 bei 27 °C und 34 °C für 1 h inkubiert wurde. Wie aus Abbildung 4.4 ersichtlich, zeigte die Kinase des WT bei 34 °C eine gesteigerte Aktivität der Autophosphorylierung und der MBP Phosphorylierung. MBP hat eine Größe von 18,5 kD. Die Kinase der Mutante zeigte unter den gewählten Bedingungen keine Aktivität.

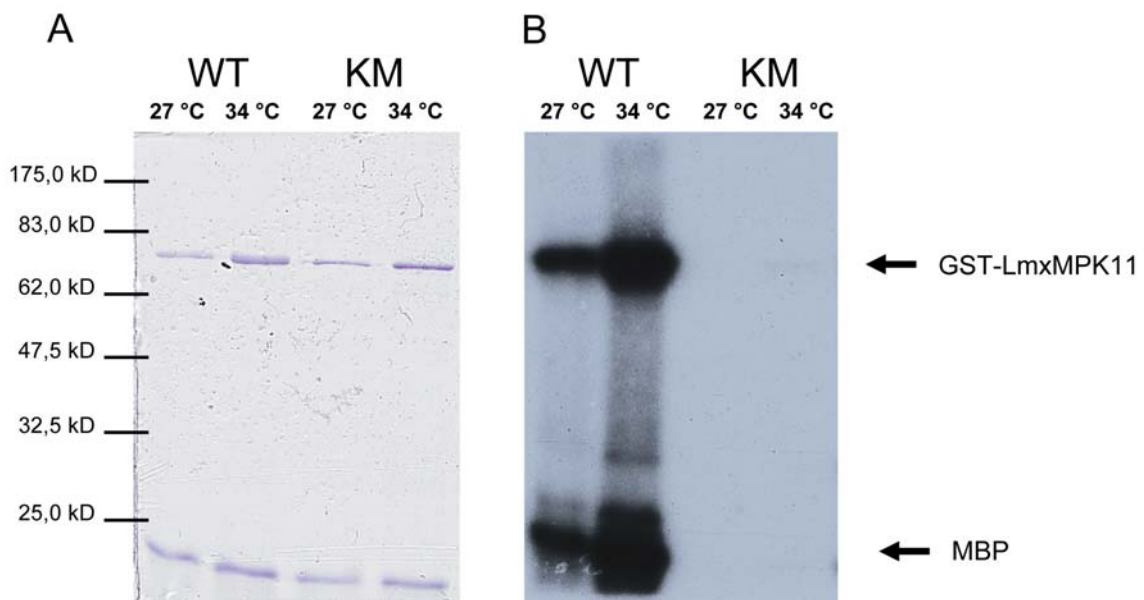


Abb. 4.4: Test auf Phosphorylierungsaktivität von GST-LmxMPK11WT und KM bei 27 °C und 34 °C
A: Coomassie-gefärbtes 12 % SDS-Polyacrylamid-Gel
B: zugehöriges Autoradiogramm nach 24 h Exposition

Zur Ermittlung der optimalen Ionenkonzentration wurde der Reaktionsansatz bei pH 7,0 unterschiedlichen Ionenkonzentrationen an Mg^{2+} und Mn^{2+} ausgesetzt und 1 h bei 34 °C inkubiert. Die Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen ist in Tabelle 4.1 aufgeführt. Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt Abbildung 4.5. Die stärkste Aktivität erreicht die Kinase des WT bei der höchsten getesteten $MnCl_2$ Konzentration von 10 mM (Puffer 5).

Salz	Puffer 1	Puffer 2	Puffer 3	Puffer 4	Puffer 5	Puffer 6	Puffer 7	Standard
$MnCl_2$ [mM]	-	-	-	-	10	2	1	2
$MgCl_2$ [mM]	50	10	5	-	-	-	-	10
NaCl [mM]	100	100	100	100	100	100	100	100
MOPS [mM]	500	500	500	500	500	500	500	500

Tabelle 4.1: Ionenzusammensetzung der verwendeten MAP- Kinase Puffer

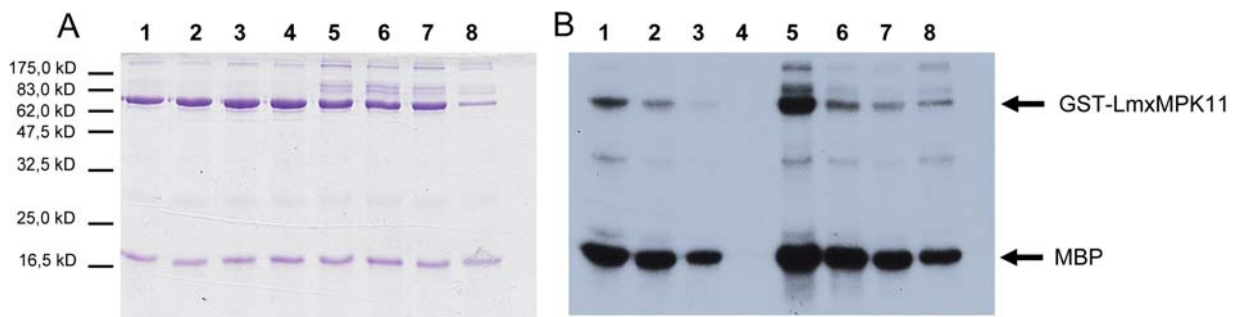


Abb. 4.5: Einfluß von Mn^{2+} - und Mg^{2+} - Ionen auf die Phosphorylierungsaktivität von GST-LmxMPK11

A: 12 % SDS-Gel mit Comassie Brilliant Blue gefärbt

B: zugehöriges Autoradiogramm nach 4 h Exposition

A/B: 1: Puffer 1; 2: Puffer 2; 3: Puffer 3; 4: Puffer 4; 5: Puffer 5; 6: Puffer 6; 7: Puffer 7; 8: Standard Puffer

4.4 Herstellung von *LmxMPK11*-Deletionsmutanten

In Trypanosomatiden kann ein Gen, sofern es im haploiden Genom in einfacher Kopienzahl vorliegt, durch homologe Rekombination gezielt entfernt und durch ein Resistenzgen ersetzt werden, so dass eine nachfolgende Selektion ermöglicht wird. Zum Ersatz beider Allele eines Gens werden zwei voneinander unabhängige Resistenzgene benötigt. Als Resistenzgene wurden die Gene für die Neomycin Phosphotransferase (NEO), die Hygromycin B Phosphotransferase (HYG), sowie für das Phleomycin bindende Protein (BLE) eingesetzt.

4.4.1 Nachweis des *LmxMPK11*-Gens als single copy Gen

Der Nachweis, dass es sich beim *LmxMPK11*-Gen um ein single copy Gen handelt, erfolgte durch einen Southern Blot. Hierzu wurde die genomische DNA mit verschiedenen

Restriktionsenzymen gespalten und das entstandene Schnittmuster analysiert (Nachweis nicht dargestellt).

4.4.2 Klonierungsarbeiten zur Herstellung eines linearen DNA-Konstruktes zur Transfektion von *L. mexicana*

Für die Herstellung von Deletionsmutanten wurde das offene Leseraster der MPK11 durch ein Resistenzgen ersetzt. Hierzu wurde ein lineares DNA-Konstrukt erzeugt, das neben dem Resistenzgen auch die für eine homologe Rekombination hinreichend langen DNA-Abschnitte der flankierenden Regionen der MPK11 enthielt.

In Abbildung 4.6 sind die Klonierungsschritte zusammenfassend dargestellt. Das in 4.1.1 erwähnte Plasmid pB3LmxMPK11, welches das *LmxMPK11*-tragende Phageninsert enthält, diente als Ausgangsplasmid.

Zunächst wurde die 3'-flankierende Region (Stromabwärts-Region) d2 mit dem Primern MPK11del2.for und MPK11del2.rev in einer PCR-Reaktion amplifiziert, mit *EcoRV* und *XbaI* geschnitten und in den ebenfalls mit *EcoRV* und *XbaI* geschnittenen pBlueskript II (+) Vektor kloniert und so das Plasmid pB11d2MPK11 erzeugt. Anschließend wurde die 5'-flankierende Region (Stromaufwärts-Region) mit den Primern MPK11del1.for und MPKdel1.rev in einer weiteren PCR-Reaktion amplifiziert, mit *XbaI* geschnitten und in den nun mit *XbaI* linearisierten pB11d2MPK11- Vektor kloniert. Es entstand das Plasmid pB2delMPK11. Aus diesem wurde ein *NheI/NcoI* Fragment herausgeschnitten und durch Resistenzgene gegen Hygromycin B (hyg-Gen, erhalten aus pCR2.1hyg), Bleocin (phleo-Gen, erhalten aus pCR2.1phleo) bzw. Neomycin (neo-Gen, erhalten aus pCR2.1neo) ersetzt. Entsprechende Schnittstellen waren durch die Primer MPK11del2.for und MPK11del1.rev generiert worden. Die resultierenden Plasmide sind pBdelMPKphleo2, pBdelMPK11hyg3 und pBdelMPK11neo2.

Über *EcoRV* wurde das lineare DNA- Konstrukt aus dem Vektor geschnitten und für die Transfektion eingesetzt. Die so erhaltenenen DNA- Fragmente werden im folgenden als Phleo-, Hyg- und Neo- Fragment bezeichnet.

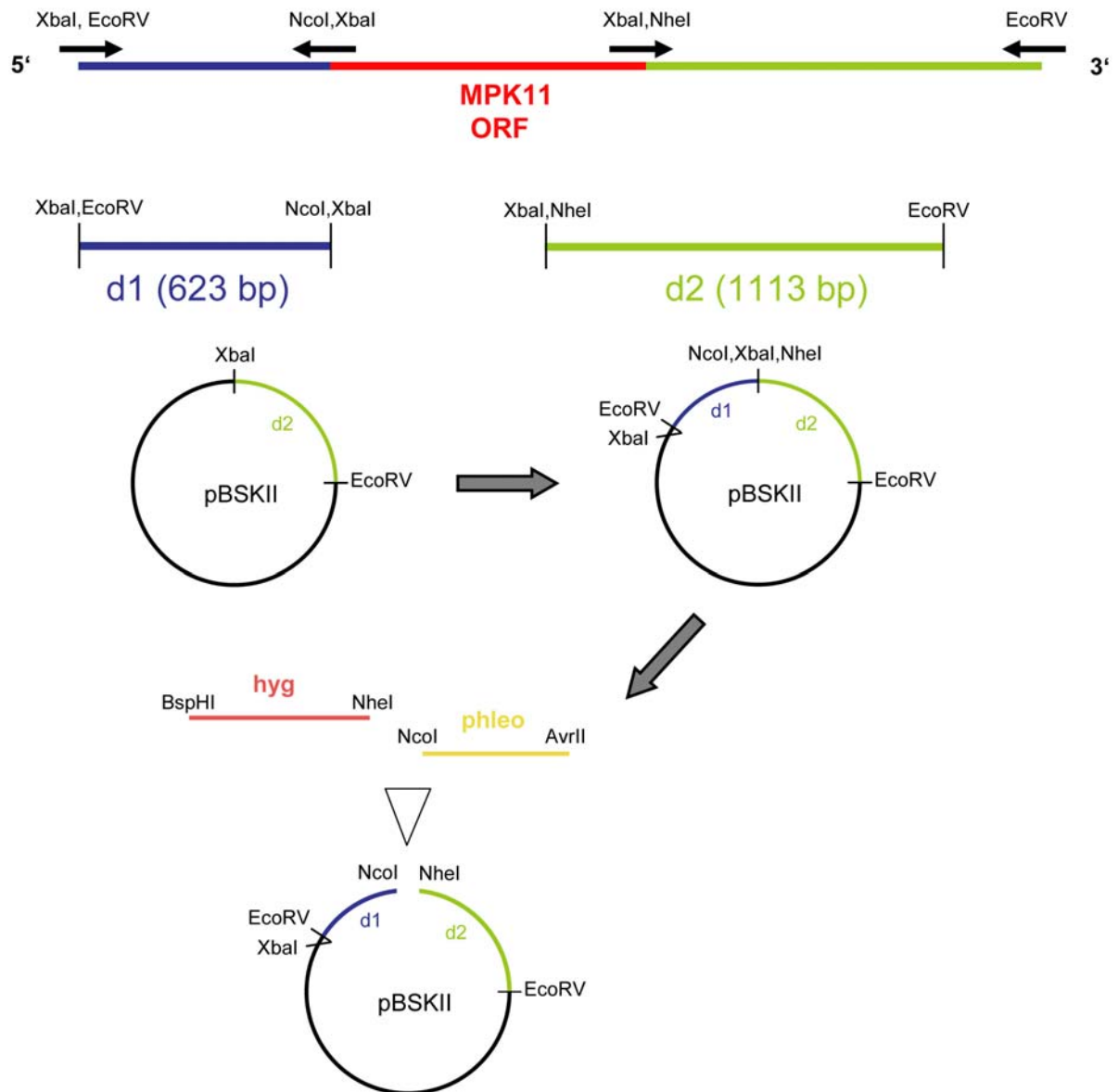


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung der Herstellung eines linearen DNA-Konstruktes zur Transfektion in *L. mexicana* am Beispiel der Resistenzgene für HYG und PHLEO

ORF: open reading frame

d1: PCR-Amplifikat der upstream flankierenden Region des MPK11-Gens

d2: PCR-Amplifikat der downstream flankierenden Region des MPK11-Gens

pBSKII: pBbluascript-Vektor

Hyg: HYG-Resistenzgen

Phleo: PHLEO-Resistenzgen

4.4.3 Deletion beider *LmxMPK11*-Allele

Aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit einer gleichzeitigen zweifachen homologen Rekombination in einem Organismus wurden die beiden allelischen Kopien von *LmxMPK11* nacheinander ersetzt. Im ersten Schritt wurden unabhängig voneinander eine genomische Kopie

des Gens durch das HYG-, NEO- oder BLE-Gen ausgetauscht und das zweite Allel durch eines der beiden anderen Resistenzgene ersetzt.

In der ersten Runde der Elektroporation von *L. mexicana* WT-Promastigoten mit den in 4.4.2 beschriebenen linearen DNA-Konstrukten resultierte im Falle des HYG- und des PHLEO-tragenden Fragmentes Einzelklone, von denen jeweils vier Klone im Southern Blot analysiert wurden. Durch die Southern Blot Analyse der genomischen DNA konnte der Austausch eines *LmxMPK11*-Allels durch das betreffende Resistenzgen in 2 der PHLEO-Klone und in allen 4 HYG-Klonen nachgewiesen werden. Bei der Transfektion mit dem NEO-tragenden Fragment gab es keine lebensfähigen Zellen.

Von den Klonen $\Delta LmxMPK11 (+/-)$ PHLEO1, $\Delta LmxMPK11 (+/-)$ PHLEO2, $\Delta LmxMPK11 (+/-)$ HYG Klon 1-4 wurden Stablate zur Langzeitlagerung angelegt.

Für die Herstellung der *LmxMPK11*-Doppelalleldeletionsmutanten von *L. mexicana* wurde eine Elektroporation der Einzeldelentionsmutanten $\Delta LmxMPK11 (+/-)$ PHLEO1 und $\Delta LmxMPK11 (+/-)$ PHLEO2 mit dem HYG- tragenden Deletionskonstrukt durchgeführt. Von den unter Selektionsdruck gewachsenen Einzelklonen der beiden Transfektionsansätze wurde von jeweils 4 Klonen die genomische DNA isoliert und mittels eines Southern Blots analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass in allen Klonen das zweite *LmxMPK11*-Allel durch ein Resistenzgen ersetzt und somit vollständig aus dem Genom entfernt wurde.

Für die nachfolgende Experimente wurden die Klone $\Delta LmxMPK11 (-/-)$ P1H4 (1. Allel-Austausch: PHLEO1, 2. Allel-Austausch HYG), $\Delta LmxMPK11 (-/-)$ P1H5, $\Delta LmxMPK11 (-/-)$ P2H1 und $\Delta LmxMPK11 (-/-)$ P2H3 weiterhin kultiviert. Von den restlichen Klonen wurden Stablate angelegt.

4.5 Analyse der LmxMPK11 Deletionsmutanten

Der Nachweis, dass die beiden Allele des *LmxMPK11*-Gens in zwei aufeinanderfolgenden Schritten durch Resistenzgene ersetzt worden waren, wurde mittels Southern Blot Analyse erbracht und konnte auch im Immunoblot gezeigt werden.

4.5.1 Southern Blot Analyse

Die genomische DNA vom *L. mexicana* Wildtyp, den beiden Einzeldelentionsmutanten $\Delta LmxMPK11 (+/-)$ PHLEO1 und PHLEO2 sowie den Doppeldeletionsmutanten $(-/-)$ P1H4, P1H5, P2H1 und P2H3 wurden mit *NruI* gespalten und einer Southern Blot Analyse unterzogen. *NruI* besitzt Schnittstellen in den flankierenden Regionen von *LmxMPK11*, von denen eine auch

außerhalb des Deletionskonstruktes liegt. Durch Verwendung einer DIG-markierten Sonde D11 (PCR mit den Primern LmxMPK11_6.for und MPK11del1.rev auf 617 bp-*Xba*I-Fragment (d1) aus pCR5d1MPK11 = 466bp), die in der 5'-flankierenden Region des *LmxMPK11*-Gens hybridisiert, können korrekt ins Genom integrierte Elektroporationsfragmente aufgrund der unterschiedlichen Fragmentgrößen nachgewiesen werden. Abbildung 4.7 zeigt die zu erwartenden Fragmentgrößen.

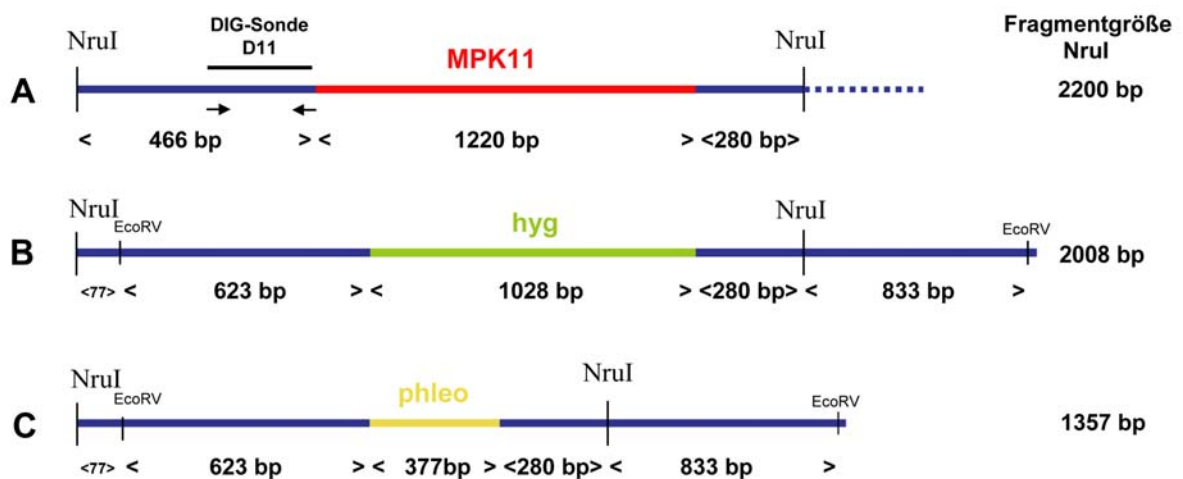


Abb. 4.7: Schematische Darstellung des *LmxMPK11*-, *hyg*- bzw. *phleo*-Gens im Genom von *L. mexicana* mit Bindungsregion der Sonde D11 und der zu erwartenden Fragmentgrößen nach Verdau mit *Nru*I

A: *LmxMPK11*-Gen im Genom von *L. mexicana*; B: *hyg*-Gen im Genom von *L. mexicana*;

C: *phleo*-Gen im Genom von *L. mexicana*

Abbildung 4.8 zeigt die durch *Nru*I-Spaltung entstandenen Banden im Southern Blot mit den für die jeweiligen Klone erwarteten Größen. Die Bande für das *MPK11*-Genfragment liegt bei 2,2 kb und erscheint im Wildtyp als einzige Bande. In den Einzeldelationen erscheint zusätzlich eine 1,3 kb Bande, die der Größe des *Phleo*-Gen-tragenden Fragmentes entspricht. In den Doppeldelationen taucht anstelle des *MPK11*-Genfragmentes eine etwas kleinere Bande von 2,0 kb auf, entsprechend der Größe des *Hyg*-Gen tragenden Fragmentes.

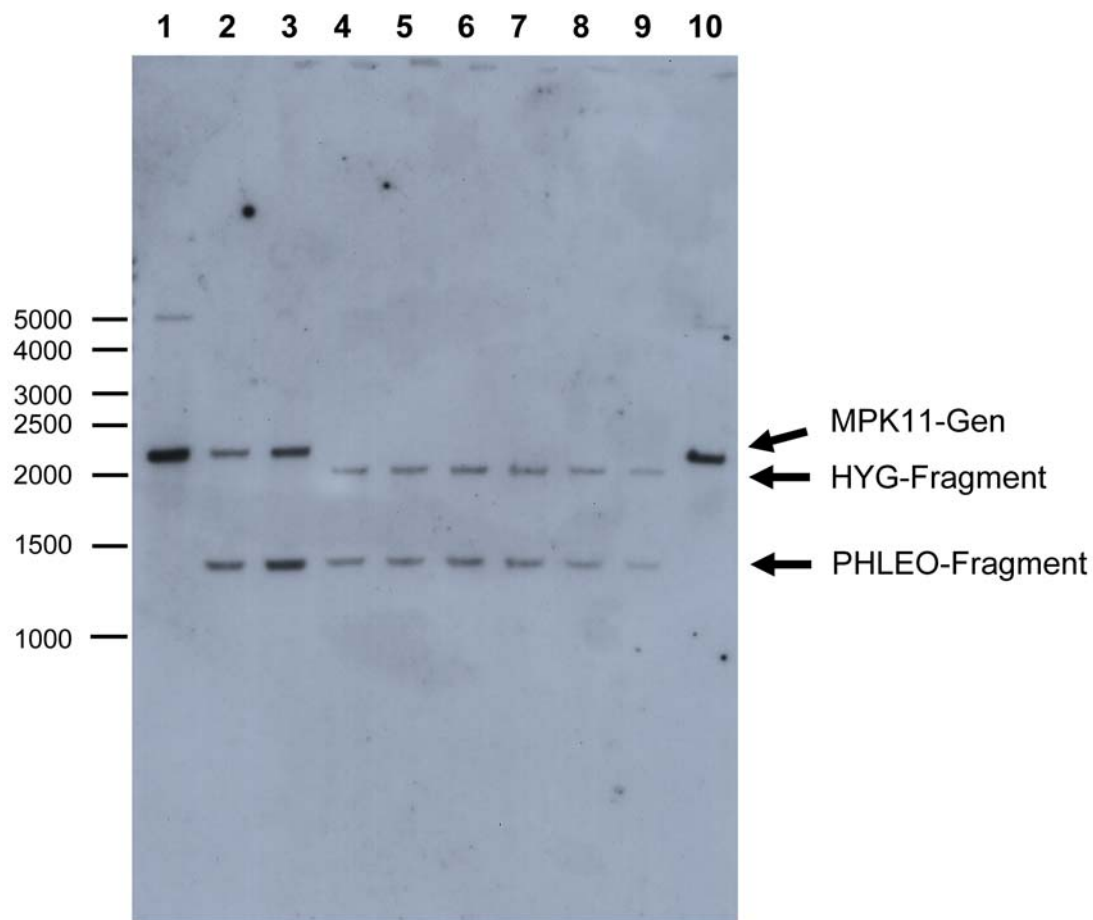


Abb. 4.8: Southern Blot genomischer DNA der *L. mexicana* Δ LmxMPK11- Klone

Mit *Nru*I geschnittene genomische DNA diverser Δ LmxMPK11-Klone im Southern Blot mit der DIG-markierten Sonde D11 hybridisiert.

1: *L. mexicana* WT 03/05; 2: Δ LmxMPK11(+/-)PHLEO1; 3: Δ LmxMPK11(+/-)PHLEO2;

4: Δ LmxMPK11(-/-)P2H1; 5: Δ LmxMPK11(-/-)P2H2; 6: Δ LmxMPK11(-/-)P2H3;

7: Δ LmxMPK11(-/-)P1H4; 8: Δ LmxMPK11(-/-)P1H5; 9: Δ LmxMPK11(-/-)P1H6; 10: *L. mexicana* WT 03/05

4.5.2 Immunoblot Analyse

Die Gesamtzelllysate der bereits im Southern Blot getesteten Deletionsmutanten wurden hinsichtlich ihrer LmxMPK11-Expression mittels eines Immunoblots untersucht. Zur Detektion wurde der unter 4.2.4 erwähnte polyklonale Antikörper verwendet. Abbildung 4.9 zeigt die Abnahme der Proteinmenge von LmxMPK11 vom Wildtyp zu den Einzeldeletionsmutanten, in den homozygoten Deletionsmutanten findet keine Expression mehr statt.

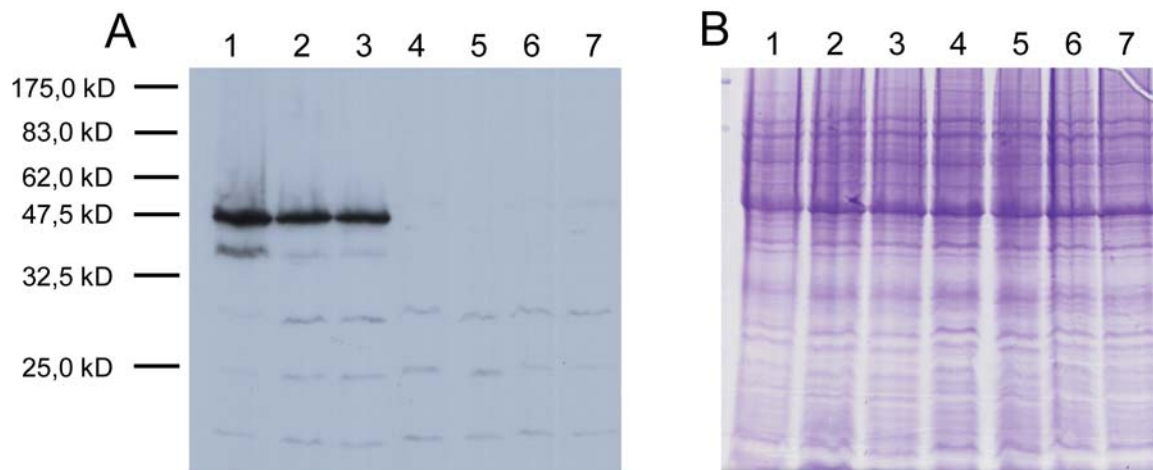


Abb.4.9: Immunoblot von Zelllysaten der *L. mexicana* Δ LmxMPK11-Klone

Leishmanienlysate von je 2×10^7 Zellen wurden auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (B) und auf eine PVDF-Membran geblottet. Detektion erfolgte mit Antiserum gegen LmxMPK11(A)

1: WT 03/05; 2: Δ LmxMPK11(+/-)PHLEO1; 3: Δ LmxMPK11(+/-)PHLEO2; 4: Δ LmxMPK11(-/-)P2H1; 5: Δ LmxMPK11(-/-) P2H3; 6: Δ LmxMPK11(-/-)P1H4; 7: Δ LmxMPK11(-/-)P1H5.

4.6 Episomale Expression von *LmxMPK11*

Durch die episodale Expression von *LmxMPK11* kann untersucht werden, welche Auswirkungen eine Überexpression auf den Phänotyp von *L. mexicana* hat. Dafür wird der *L. mexicana* Wildtyp mit einem das *LmxMPK11*-Gen enthaltenden Expressionsvektor transfiziert.

Wird der das *LmxMPK11*-Gen enthaltene Expressionsvektor in eine Doppeldeletionsmutante eingebracht, so dient die episodale Expression als Add-Back-Mutante. Können dadurch die im Phänotyp der Deletionsmutanten auftretende Unterschiede zu den Wildtyp-Parasiten wieder rückgängig gemacht werden, so könnte dies als Nachweis für eine direkte Beteiligung der *LmxMPK11* dienen.

4.6.1 Herstellung des *LmxMPK11*-tragenden Plasmids

pX63polPAC3LmxMPK11

Als Ausgangsvektor für die Herstellung eines *LmxMPK11*-tragenden Plasmids diente pX63polPAC, der das Gen für die Puromycin-N-Acetyltransferase (PAC) enthält. Dieses Gen vermittelt eine Resistenz gegenüber Puromycin und ermöglicht somit eine Selektion auf Plasmid enthaltende *LmxMPK11*-Promastigote.

Zur Herstellung wurde das *LmxMPK11*-Gen über die Schnittstellen *Sac*II und *Hind*III aus dem pCR2LmxMPK11-Vektor ausgeschnitten, die Schnittstellen mit der Klenow-Polymerase aufgefüllt und das Fragment über eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit Ethanol fällung

aufgereinigt. Anschließend wurde das Fragment in den mit *EcoRV* linearisierten, dephosphorylierten pX63polPAC-Vektor kloniert. Das Produkt pX63polPAC3LmxMPK11 wurde in größeren Mengen aufgereinigt und für die Transfektion steril in ddH₂O aufgenommen.

4.6.2 Episomale Expression im WT

Für die episomale Expression in *L. mexicana* Wildtyp-Promastigoten wurden diese mit dem pX63polPAC3LmxMPK11-Plasmid elektroporiert. Von den entstandenen Einzelklonen wurden vier Klone im Southern Blot analysiert. Dafür wurde die genomische DNA isoliert und mit *NruI* gespalten. *NruI* besitzt eine Schnittstelle in den flankierenden Regionen des MPK11-Gens (s. Abb. 4.8), nicht aber in dem Plasmid, welches eine Größe von 7032 bp hat. Für die Detektion des Gens wurde eine DIG-Sonde verwendet, welche mit den Primern *LmaMPK11_1.for* und *LmaMPK11_1.rev* hergestellt wurde und mit einer Teilsequenz des MPK11-Gens hybridisiert. Im Southern Blot in Abbildung 4.10 ist eine Bande mit der Größe von 2,2 kb zu sehen, die dem *LmxMPK11*-Gen im Genom entspricht. Die Bande mit der Größe von 7 kb entspricht der Größe des MPK11 tragenden Plasmids.

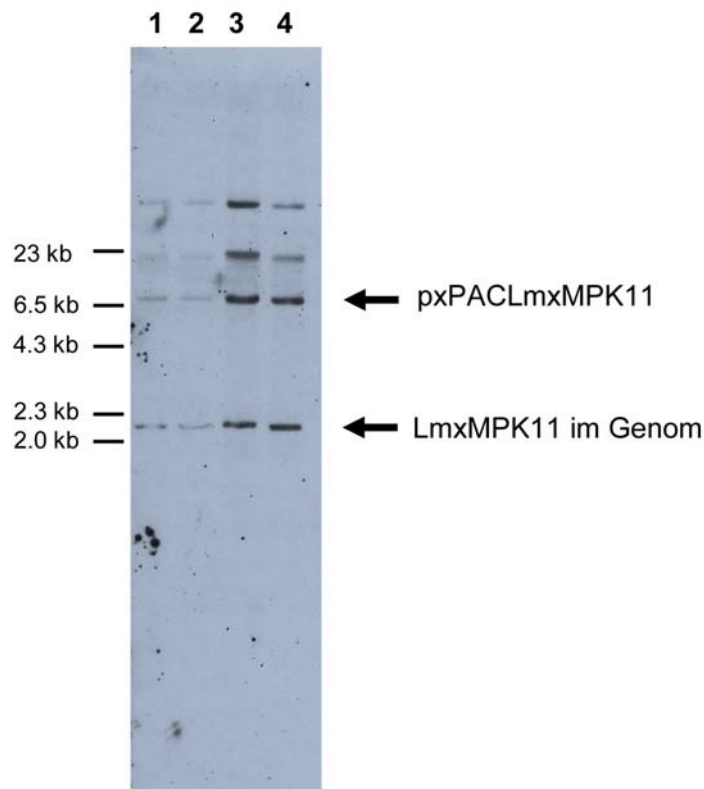


Abb.4.10: Southern Blot genomischer DNA von *L. mexicana* Klonen mit episomalen Expression der MPK11

Genomische DNA geschnitten mit *NruI* und im Southern Blot hybridisiert mit der DIG-markierten MPK11-Sonde. WT 03/05 + pX3PACLmxMPK11 Klon 1-4

1: Klon 1; 2: Klon 2; 3: Klon 3; 4: Klon 4

4.6.3 Episomale Komplementation

Für die Herstellung der „Add-back“-Mutanten wurde das Plasmid pX63polPAC3LmxMPK11 in die $\Delta LmxMPK11(-/-)$ Klone P2H3 und P1H5 transfiziert und die DNA von jeweils 4 der erhaltenen Puromycin-resistenten Klone im Immunoblot untersucht. Die Klone $\Delta LmxMPK11(-/-)$ P2H3 + pX3PACLmxMPK11 und $\Delta LmxMPK11(-/-)$ P1H5 + pX2PACLmxMPK11 wurden weiter kultiviert und für die Infektion in der Maus eingesetzt (s. 4.8.2).

Die Abbildung 4.11 zeigt einen zusammenfassenden Immunoblot diverser *LmxMPK11*-Mutanten. Wie bereits in 4.5.2 beschrieben, nimmt die Proteinmenge vom Wildtyp zu den Einzeldelentionsmutanten hin ab, bei den Doppeldeletionen ist keine Expression mehr nachweisbar. Hingegen ist die Expression in den beiden „Add-back“-Mutanten wieder nachweisbar und nimmt zur episomalen Expressionsmutante im WT noch weiter zu.

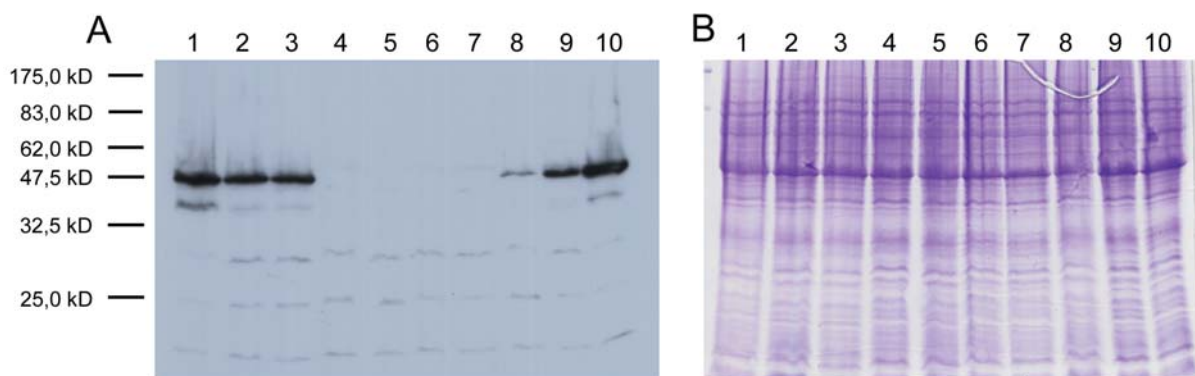


Abb. 4.11: Immunoblot von Zelllysaten diverse *LmxMPK11*-Mutanten

Leishmanienlysate von je 2×10^7 Zellen wurden auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (B) und auf eine PVDF-Membran geblottet. Detektion erfolgte mit Antiserum gegen *LmxMPK11*(A)

1: WT 03/05; 2: $\Delta LmxMPK11(+/-)$ PHLEO1; 3: $\Delta LmxMPK11(+/-)$ PHLEO2; 4: $\Delta LmxMPK11(-/-)$ P2H1; 5: $\Delta LmxMPK11(-/-)$ P2H3; 6: $\Delta LmxMPK11(-/-)$ P1H4; 7: $\Delta LmxMPK11(-/-)$ P1H5; 8: $\Delta LmxMPK11(-/-)$ P1H5 + pX2; 9: $\Delta LmxMPK11(-/-)$ P2H3 + pX3; 10: WT 03/05 + pX3PACLmxMPK11

4.7 Phänotypische Analyse von *LmxMPK11(-/-)*

Doppeldeletionsmutanten

4.7.1 Morphologische Betrachtung

Es wurde untersucht, inwieweit sich die Deletion von *LmxMPK11* aus dem *L. mexicana*-Genom auf die Morphologie der Promastigoten auswirkt. Hierfür wurden die Oberflächen logarithmisch wachsender Wildtyp und $\Delta LmxMPK11$ -Parasiten im Rasterelektronen- und im Phasenkontrastmikroskop betrachtet. Es konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

4.7.2 Wachstum der Promastigoten in vitro

Da Enzyme der MAP Kinase-Kaskade häufig an der Regulation des Zellzyklus und des Zellwachstums beteiligt sind, wurde ein möglicher Einfluß anhand von Wachstumskurven untersucht. Hierfür wurde das Wachstum der Wildtyp-Promastigoten mit jeweils zwei *LmxMPK11*-Doppeldelentionsmutanten verglichen.

Von einer Ausgangskultur mit 1×10^5 Zellen /ml aus der spät-logarithmischen Wachstumsphase wurden über den Zeitraum von 6 Tagen in regelmäßigen Abständen Proben entnommen, um die Zelldichte zu bestimmen. Die Grafik in Abbildung 4.12 zeigt, dass die Deletionsmutanten zunächst langsamer wachsen und bei einer geringeren Zelldichte ihre Sättigung erreichen als die Promastigoten des Wildtyps.

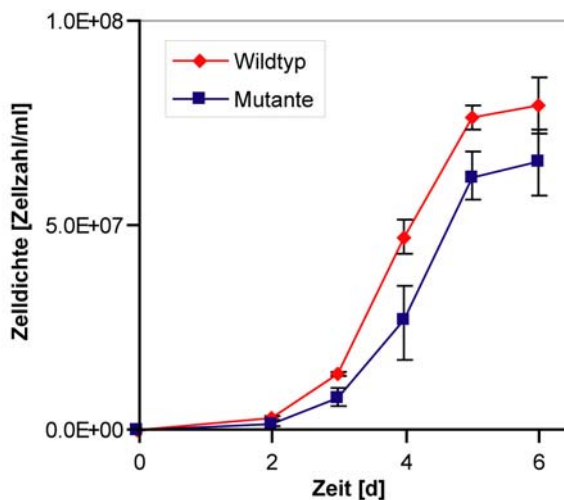


Abb. 4.12: Wachstumskurven der promastigoten WT und Doppeldelentionsmutanten $\Delta LmxMPK11$
Mittelwert aus zwei Versuchen (4 Mutanten) mit Darstellung der maximalen und minimalen Messwerte
Rot: WT 03/05
Blau: Mittelwert der Klone $\Delta LmxMPK11$ (-/-) P2H1, P2H3, P1H4 und P1H5.

4.7.3 In-vitro-Differenzierung zu Amastigoten

Die in-vitro-Differenzierung, bei der die Promastigoten Leishmanien zu Amastigoten differenzieren, kann durch eine Ansäuerung des Mediums und Erhöhung der Inkubationstemperatur von 27 °C auf 34 °C erreicht werden. 1×10^8 Promastigote aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden in 50 ml Schneider's Medium gegeben und über 6 Tage im Brutschrank inkubiert. Während der Differenzierung und dem anschließendem Wachstum wurden in regelmäßigen Abständen Zellen entnommen und die daraus hergestellten Lysate im Immunoblot auf das Vorhandensein von *LmxMPK11* untersucht. In den 6 Tagen, die der Versuch andauerte, konnte, wie in Abbildung 4.13 dargestellt, keine signifikante Veränderung

der Proteinmenge festgestellt werden. Die Doppeldeletionsmutanten der MPK11 dienten als Kontrolle und sind in Spur 7-9 aufgetragen.

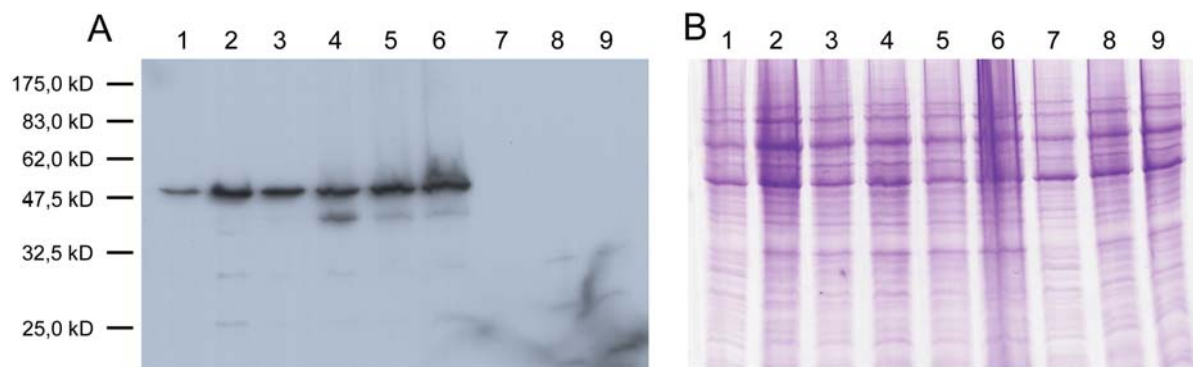


Abb 4.13: In-vitro-Differenzierung von *L. mexicana* WT Promastigoten zu Amastigoten

Gesamtzelllysate von je 2×10^7 Zellen auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel (B) und auf eine PVDF-Membran gebロットet. Als Primärantikörper diente ein Antiserum gegen MPK11(A). In Spur 1-6 sind die zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommenen WT-Proben aufgetragen, in Spur 6-9 dienten $\Delta LmxMPK11(-/-)$ Mutanten als Kontrolle.

- 1: WT-Promastigote vor der Differenzierung; 2: 1.Tag der Differenzierung; 3: 2.Tag, 4: 3.Tag, 5: 4.Tag 6: 5.Tag;
- 7: $\Delta MPK11(-/-)$ - Promastigote, 8: $\Delta MPK11(-/-)$ P2H1 am 3. Tag der Differenzierung;
- 9: $\Delta MPK11(-/-)$ P2H3 am 3. Tag der Differenzierung

In einer weiteren Versuchsreihe wurde das Wachstum der Doppeldeletionsmutanten $(-/-)$ P2H1 und $(-/-)$ P1H5 mit dem des Wildtyps während der Differenzierung verglichen. Hierzu wurden *L. mexicana* Kulturen mit einer Zelldichte von 2×10^6 Promastigoten/ml angeimpft und bei 34 °C in Schneider's Medium inkubiert. Über 96 h wurden in regelmäßigen Abständen Proben zur Bestimmung der Zelldichte entnommen. Bei der Betrachtung der in Abbildung 4.14 dargestellten Wachstumskurven fällt auf, dass die Zellen der Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp schon während der ersten 24 h langsamer wachsen und nach 74 h keine Teilung der Amastigoten mehr stattfindet, während die WT-Amastigoten sich bis zum Ende des Versuches nach 96 h weiter teilten.

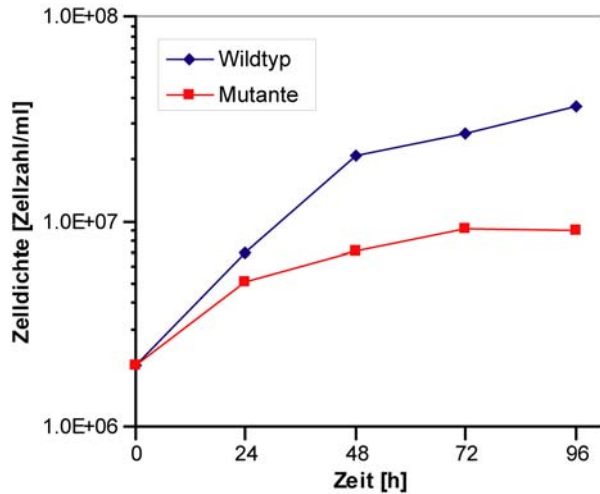


Abb. 4.14: Wachstum von *L. mexicana* WT- und Δ LmxMPK11-Amastigoten in vitro
 Blau: *Lmex* WT 03/05
 Rot: Δ *Lmex*MPK11(-/-) P2H1 und P1H5

4.7.4 In-vitro-Differenzierung mit WT-Amastigoten aus der Mausläsion

Die aus der Maus gewonnen Amastigoten wurden bei 27 °C inkubiert und nach 24 h und anschließend nach allen 48 h Proben entnommen. Nach 9 Tagen wurde ein Immunoblot durchgeführt. Aus der Abbildung 4.15 wird ersichtlich, dass die Kinase während der gesamten Differenzierung exprimiert wird.

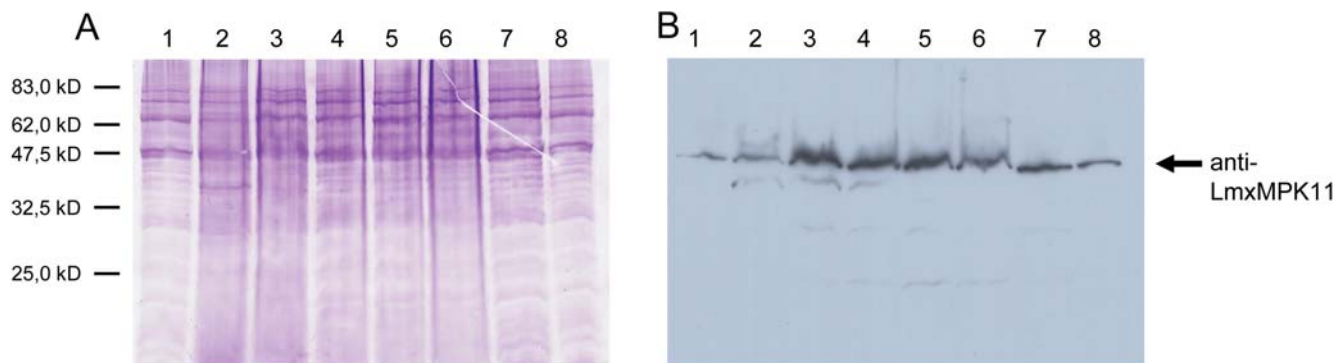


Abb 4.15: In-vitro-Differenzierung von *L. mexicana* WT Amastigoten aus der Mausläsion zu Promastigoten

Gesamtzelllysate von je 2×10^7 Zellen auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel (A) und auf eine PVDF-Membran geblottet. Als Primärantikörper diente ein Antiserum gegen MPK11(B).

1: WT-Promastigote; 2-7: Amastigote aus der Maus 2: Zeitpunkt 0; 3: 1.Tag, 4: 3.Tag, 5: 5.Tag 6: 7.Tag; 7: 9.Tag; 8: WT-Promastigote

4.8 Infektion von BALB/c-Mäusen

Um den Einfluß der Deletion des *LmxMPK11*-Gens aus dem *L. mexicana* Genom auf das Infektionsverhalten in vivo zu untersuchen, wurden BALB/c-Mäuse mit promastigoten Zellen von diversen *LmxMPK11*-Deletionsmutanten infiziert. Weibliche BALB/c Mäuse im Alter von 6-10 Wochen wurden in Gruppen zu je 5 Mäusen zusammengefaßt und jeweils 1×10^7 sich in der spät-logarithmischen Phase befindliche Parasiten in die Fußsohle des linken Hinterlaufs injiziert. Alle 4 Wochen wurde die Fußdickendifferenz zum nichtinfizierten Fuß gemessen und so der Infektionsverlauf verfolgt. Als Kontrolle galten mit Wildtyp-Leishmanien infizierte Mäuse.

4.8.1 Auswirkung der Deletion und episomalen Komplementation von *LmxMPK11* auf den Infektionsverlauf

Je 5 Mäuse wurden mit den beiden $\Delta LmxMPK11$ -Einzeldelentionsmutanten (+/-)PHLEO1 und PHLEO2, den Doppeldelentionsmutanten (-/-) P1H4, P1H5, P2H1 und P2H3, sowie mit den Komplementationsmutanten (-/-) P1H5 + pX3 und P2H3 + pX2*LmxMPK11* infiziert und mit einer Gruppe von 5 mit dem Wildtyp infizierten Mäusen verglichen. Die Zelldichten der Promastigoten zum Zeitpunkt der Infektion waren $4,5 \times 10^7$ /ml (PHLEO1), $3,3 \times 3,6 \times 10^7$ /ml (P1H4), $4,2 \times 10^7$ /ml (P1H5), $3,6 \times 10^7$ /ml (P1H5+px2) und $4,8 \times 10^7$ /ml (P2H3+px3). In Abbildung 4.16 sind die Ergebnisse nach einem Beobachtungszeitraum von 28 Wochen dargestellt. Das Läsionsverhalten jeder Maus einer Gruppe wurde aufgrund eines zum Teil sehr unterschiedlichen Infektionsverhaltens innerhalb einer Gruppe einzeln aufgetragen. Die Ergebnisse der Fußsohleninfektion mit dem *L. mexicana*-Wildtyp sind hier nicht dargestellt, entsprechen aber denen der Einzeldelention P2.

Bei der Betrachtung der Kurvenverläufe der Fußsohleninfektionen mit der Einzeldelentionsmutante P1 und den Doppeldelentionsmutanten P1H4 und P1H5 zeigt sich, dass sich bei drei von fünf mit der Einzeldelentions-Mutante infizierten Mäusen eine Fußdickendifferenz von bis zu 5 mm entwickelte, während nur eine von zehn mit den Doppeldelentionsmutanten infizierten Mäusen eine langsame Fußdickenzunahme zeigte, die nach 28 Wochen noch bei 1 mm lag.

Alle mit der „Add-back“-Mutante P1H5 +pX3*LmxMPK11* infizierten Mäuse entwickelten nach der 20. Wochen eine Läsion, eine Maus verstarb in der 19. Woche.

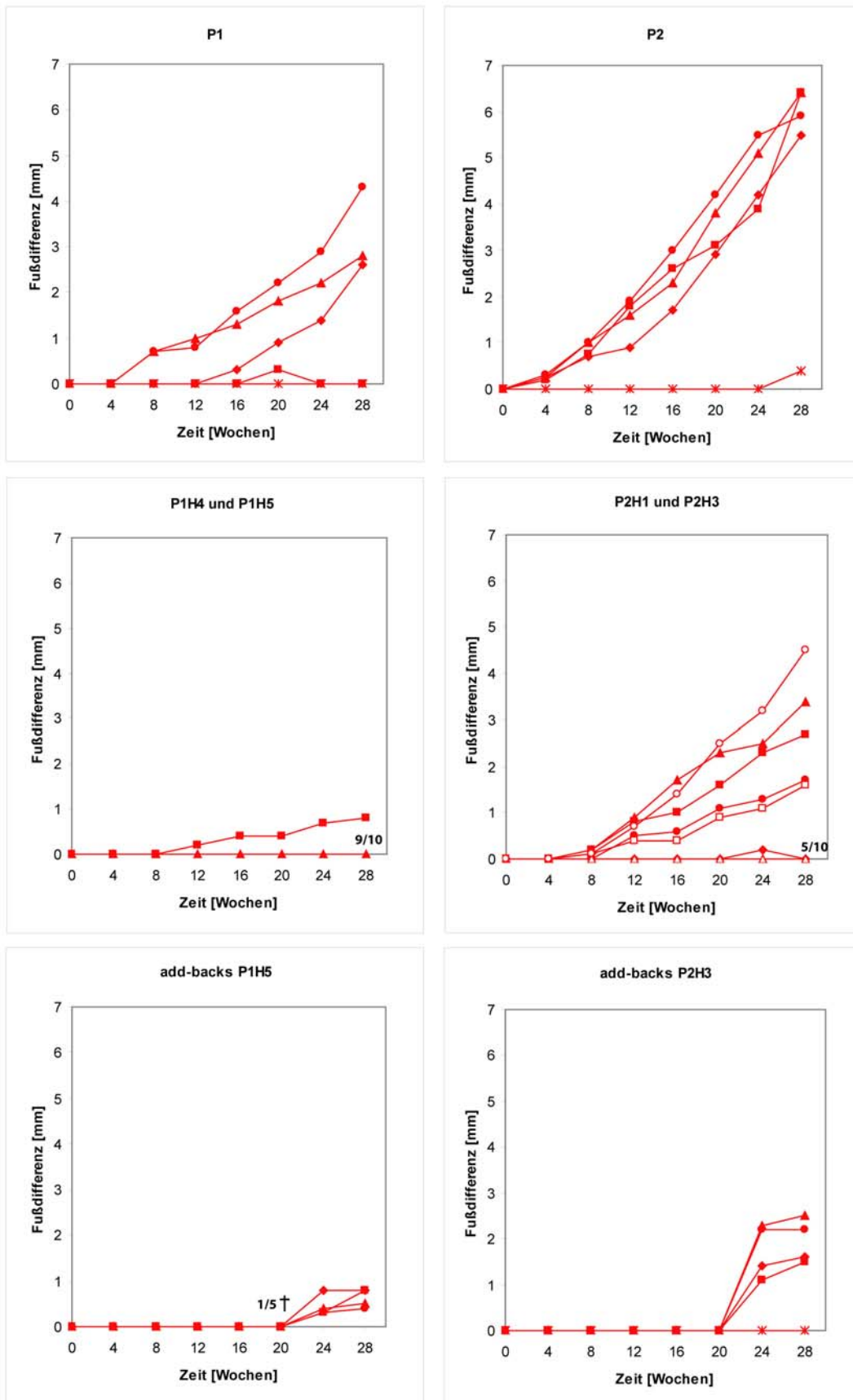


Abbildung 4.16: Verlauf der Läsionsbildung in mit verschiedenen $\Delta LmxMPK11$ Mutanten infizierten BALB/c-Mäusen

Ein ähnliches Verhalten zeigen auch die Kurvenverläufe der mit der Einzeldelation P2 und den Doppeldelationen P2H1 und P2H3 infizierten Mäuse. Die Läsionsbildung war in dieser Versuchsreihe bei allen Klonen etwas ausgeprägter. Auch hier zeigten vier der zehn mit der Doppeldelation infizierten Mäuse im Beobachtungszeitraum keine Läsionsbildung. Die übrigen sechs Mäuse zeigten eine Zunahme der Fußdickendifferenz zwischen 1,5 und 4,5 mm, während vier von fünf der mit der Einzeldelationsmutante P2 infizierten Mäuse nach 28 Wochen Fußdickendifferenzen von mehr als 5,5 mm aufwiesen.

Von den mit der „Add-back“-Mutante P2H3 +pX2LmxMPK11 infizierten Mäuse entwickelte sich auch hier nach der 20. Woche eine Fußdickenzunahme, nur eine Maus zeigte nach 28 Wochen noch keine Läsion.

4.9 Diverse Klonierungen mit LmxMPK12

4.9.1 Klonierungen mit *LmxMPK12*

Nach Isolierung der Phagen-DNA wurde diese mit *Xba*I, *Eco*RI und *Not*I gespalten. Klone, die nach der Restriktionsspaltung ausschließlich große Phagenfragmente ergaben, wurden in die mit den entsprechenden Enzymen geschnittenen pBbluescript Vektoren kloniert. In einer PCR-Reaktion mit den Primern LmaMPK12N.for und LmaMPK12C.rev wurden die Klone mit Phageninsert identifiziert, die das *LmxMPK12*-Gen enthielten.

Das nun in dem pB5LmxMPK12 vorliegende Gen MPK12 wurde vollständig sequenziert. Die Analyse der Sequenzierung ergab ein 1233 bp großes Gen (Accession Number AAY45991, Sequenz siehe Anhang 8.2, Alignment siehe Anhang 8.5). Für weitere Klonierungen wurde das Gen mit den Primern LmxMPK12N.for und LmxMPK12C.rev amplifiziert und über das TOPO TA Cloning[®] Kit in den pCR2.1-TOPO-Vektor kloniert. Für weitere Klonierungen wurden durch die Primer Schnittstellen für *Sac*II und *Bsp*HI stromaufwärts des *LmxMPK12*-Gens und Schnittstellen für *Nco*I und *Eco*RV nach dem Stopcodon eingefügt. Es entstand das Produkt pCR1LmxMPK12, das durch eine Sequenzierung überprüft wurde.

Für die nähere Charakterisierung der LmxMPK12 wurde diese zunächst als Glutathion S-Transferase (GST)-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte durch Glutathion Sepharose über den GST-tag.

4.9.2 Herstellung von pGEX-KG4LmxMPK12 für die Expression in *E. coli*

Für eine Expression in *E. coli* als GST-Fusionsprotein wurde das Gen über die Schnittstellen *Bsp*HI und *Eco*RV aus dem pCR1LmxMPK12-Vektor unter Beibehaltung des Leserasters in den pGEX-KG Vektor kloniert. Dafür wurde dieser mit *Hind*III linearisiert, die Schnittstellen mit Klenow-Polymerase gefüllt und anschließend mit *Nco*I geschnitten. Die Klonierung ergab das Plasmid pGEX4MPK12.

4.9.3 Herstellung der inaktiven Mutante von LmxMPK12

Durch den Ersatz des Lysin-Restes in der Subdomäne II durch Methionin (Punktmutation) kann eine MAP-Kinase inaktiviert werden. Dieser Aminosäure-Austausch wurde durch zielgerichtete Mutagenese in einer PCR Reaktion erreicht, wobei gleichzeitig eine *Nru*I Schnittstelle für eine spätere Unterscheidung zum Wildtyp eingefügt wurde.

Mit den Primern LmxMPK12KM.for und LmxMPK12KM.rev, zwei einander komplementären Primern, die in ihrer Mitte drei Punktmutationen tragen, wurde zur Inaktivierung der Kinase an Position 182 des ORF des MPK12-Gens eine Punktmutation (AAG Lys61 zu ATG Met61) eingeführt. Die dadurch entstandene Schnittstelle *Bsp*HI wurde durch eine zweite Punktmutation an Position 180 (ATC Ile zu ATA Ile) entfernt und die *Nru*I Schnittstelle durch eine Punktmutation an Position 174 (GTG Val zu GTC Val) des ORF eingefügt.

Mit je einem die Punktmutationen enthaltenen Primer und einem der äußeren Primer LmxMPK12N.for bzw. LmxMPK12C.rev wurden die beiden Fragmente durch zwei unabhängige PCR-Reaktionen amplifiziert, über eine Gelextraktion gereinigt und als Template in einer neuen PCR-Reaktion zusammen mit den beiden äußeren Primern eingesetzt. Da sich mit dem Primer LmxMPK12C.rev kein Amplifikat erzeugen ließ, wurde dieser durch den Sequenzierungs-Primer LmxMPK12_2.rev ersetzt. Das nun verkürzte Genfragment wurde nach der Amplifikation über das TOPO-TA Cloning® Kit in den pC2.1-TOPO-Vektor kloniert. Anschließend wurde das Fragment über die am N-Terminus gelegene *Sac*II Schnittstelle und die stromabwärts der Mutationen gelegene Schnittstelle *Eco*NI ausgeschnitten und das entsprechendem WT-Fragment dadurch ersetzt.

In Abbildung 4.17 ist die Herstellung der inaktiven Mutante schematisch dargestellt.

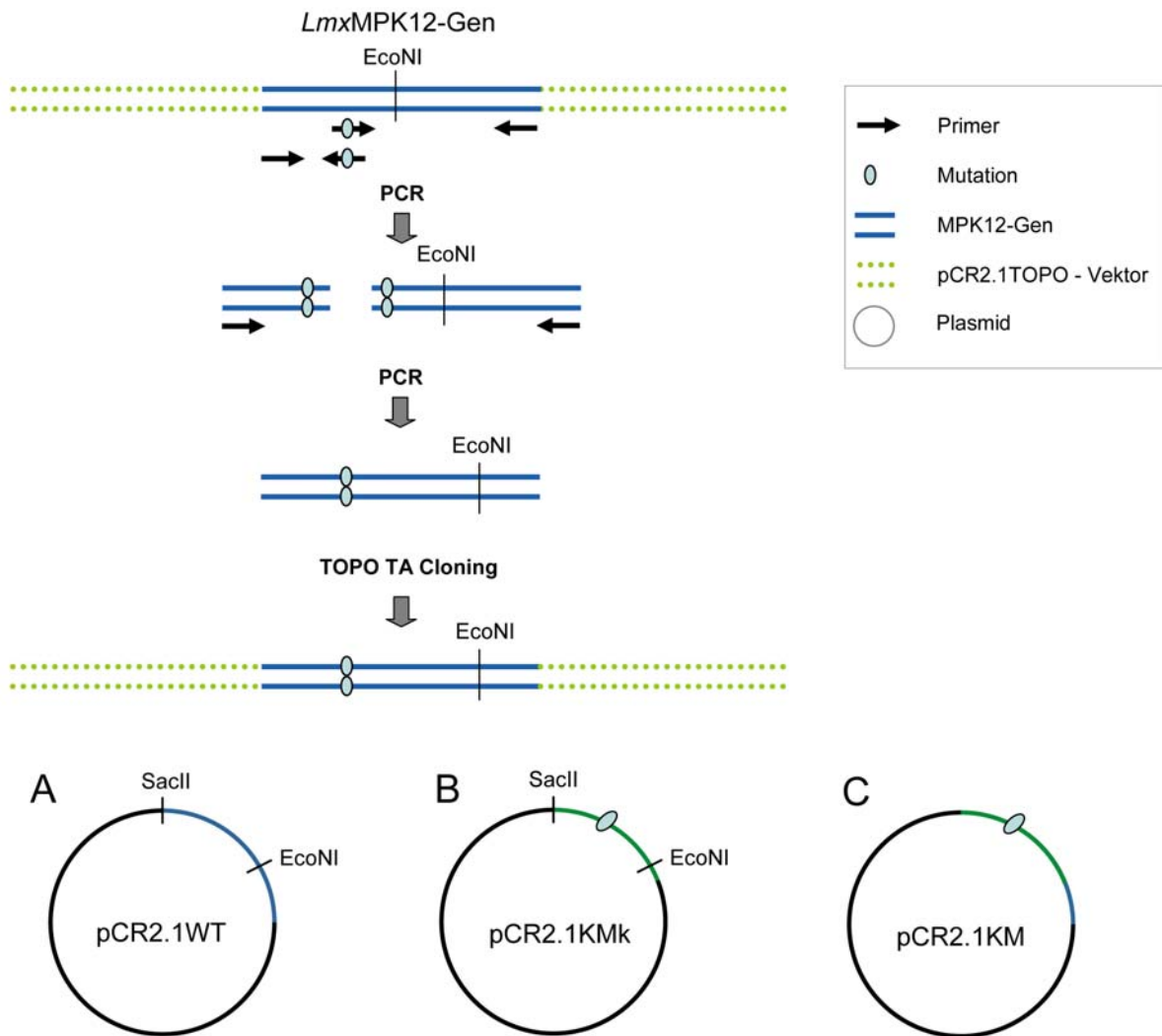


Abb. 4.17: Schematische Darstellung der Herstellung der inaktiven Mutante

A-C: Aus dem pCR2.1WT-Vektor (A) wurde das *SacII*/*EcoNI*-Fragment herausgeschnitten und mit dem entsprechenden, die Mutationen tragenden Fragment aus dem pCR2.1KMk Plasmid (B) ersetzt (C).

Das entstandene Plasmid pCR2KMLmxMPK12 wurde mittels Sequenzierung überprüft und für die Expression über die Schnittstellen *Bsp*HI und *Eco*RV in den pGEX Vektor kloniert. Es entstand das Plasmid pGEX7KMLmxMPK12.

4.9.4 Expression und Aufreinigung mit dem GST-tag

Die Expression des GST-LmxMPK12-Fusionsproteins wurde nach einer Testexpression, bei der die Induktion bei unterschiedlichen Temperaturen und IPTG-Konzentrationen verglichen wurde, im 100 ml Maßstab durchgeführt. Die Induktion erfolgte mit 100 μ M IPTG bei 18 °C über Nacht. Nach der Elution wurden 20 μ l (1/10) des Eluates auf ein SDS-Gel aufgetragen und aufgetrennt (Abb. 4.18). Das LmxMPK12-GST-Fusionsprotein hat eine berechnete Größe von 74 kD (MPK12 = 46,4; GST = 27,4).

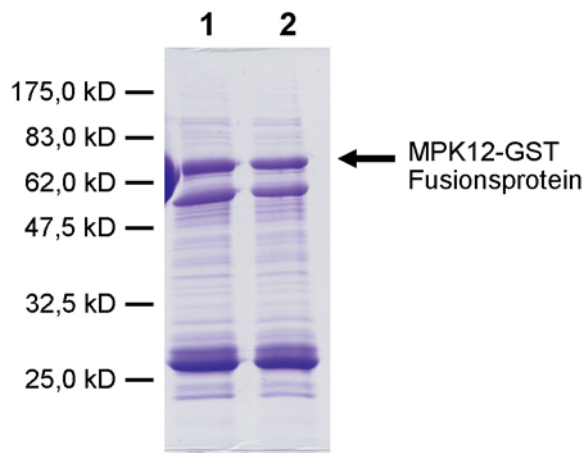


Abb. 4.18: SDS-PAGE mit Aliquots aus der Aufreinigung des GST-LmxMPK12-Fusionsproteins
 20µl (1/10) der Eluate aus der GST-LmxMPK12 Proteinisolierung wurden auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.
 1: Eluat 1 WT; 2: Eluat 2 WT

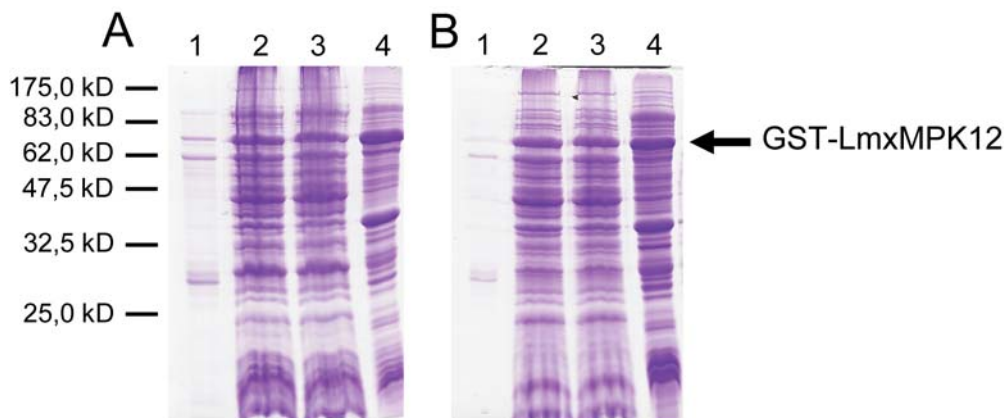


Abb. 4.19: SDS-PAGE des Verlaufs der Isolierung der GST-Fusionsproteine
 A: Wildtyp, B KM-Mutante
 1: Eluat; 2: Lysat nach Bindung; 3: Lysat-Überstand vor Bindung; 4: Zelniederschlag

Die Abbildung 4.19 zeigt neben den Eluaten der aufgereinigten und isolierten Wildtyp- und KM-Fusionsproteinen auch die jeweiligen Lysate vor und nach Bindung an die Sepharose sowie der Zelniederschlag nach Aufschluß durch Ultraschall und Triton X-100. Aus Spur 2 und 3 wird ersichtlich, dass das Fusionsprotein schlecht an die Sepharose bindet. Spur 4 zeigt, dass nach Aufschluß des Zelniederschlages noch Fusionsprotein im Niederschlag enthalten ist.

In den Eluaten konnten nur geringe Proteinkonzentrationen von maximal 0,9 mg/ml erreicht werden.

4.9.5 Expression und Aufreinigung mit dem Strep-tag

Um die Expression in einem weiteren Expressionssystem auf eine höhere Ausbeute hin zu testen, wurden das MPK12 WT- und KM-Gen in den IBA-KG Vektor kloniert. Als Ausgangsplasmid diente pCR1MPK12 bzw. pCR2MPK12KM.

Aus diesen Plasmiden wurden die Gene mit *NcoI* und *SacII* herausgeschnitten und in den ebenfalls mit *NcoI* und *SacII* geschnittenen pASK-IBA7-Vektor kloniert. Dies ergab die Plasmide pASK-IBA1LmxMPK12 und IBA2LmxMPK12KM.

Die anschließende Aufreinigung wurde in einem 500 ml Ansatz durchgeführt. Die Induktion erfolgte bei 18 °C über Nacht mit 0,2 µg/ml AHT. Die Abbildung 4.20 zeigt die Gelaufentrennung. Der Strep-tag ist mit 8 Aminosäuren sehr klein. Eine Bande in der erwarteten Größe von 48 kD (MPK12 mit Strep-tag) erscheint in den Eluaten beider Fusionsproteine. Im Lysat-Überstand nach Bindung an die Sepharose sowie in den Waschflüssigkeiten nach Elution ist diese Bande kaum nachweisbar.

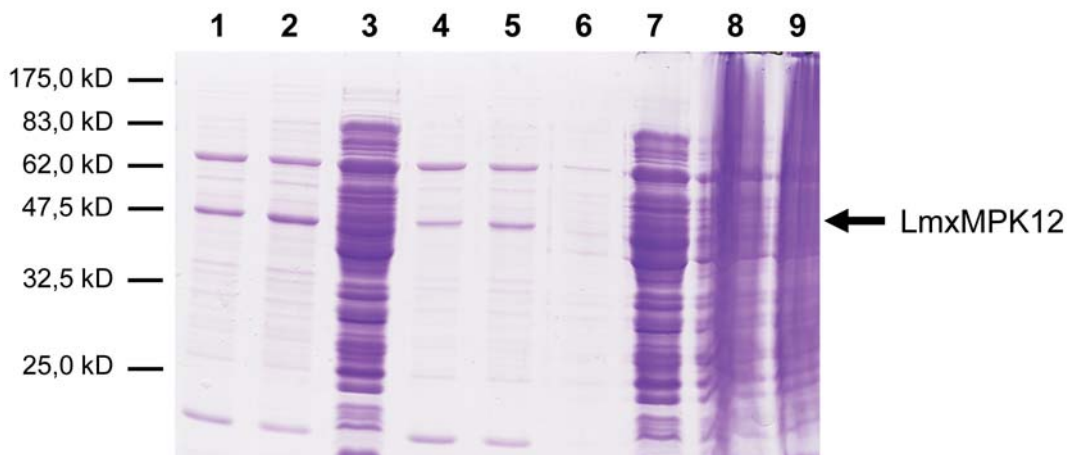


Abb.4.20: SDS-PAGE der LmxMPK12-Strep-tag Fusionsproteine

1: 1.Elust Wildtyp; 2: 2.Elumat Wildtyp; 3: Überstand nach Bindung an Strep-Tactin-Resin;

4: 1.Elust KM-Mutante; 5: 2.Elumat KM-Mutante; 6: 3.Elumat KM-Mutante;

7: Überstand nach Bindung an Strep-Tactin-Resin; 8: Waschflüssigkeit 1 (1:25); 9: Waschflüssigkeit 2 (1:25)

Es ließen sich unter den oben angegebenen Bedingungen nur sehr geringe Mengen Protein aufreinigen (0,3 mg/ml).

4.10 In-vitro-Aktivitätstest (Kinase-Assay) mit der GST-LmxMPK12

Um die Phosphorylierungsaktivität (Autophosphorylierung und Substratphosphorylierung) der exprimierten und aufgereinigten GST-LmxMPK12-Wildtyp-Kinase zu untersuchen, wurden in-vitro-Aktivitätstests unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Als Testsubstrat diente Myelin Basic Protein (MBP).

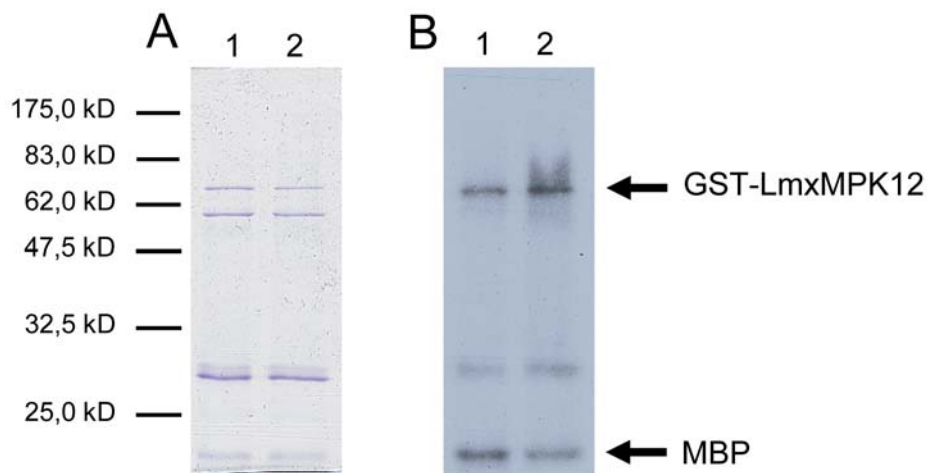


Abb. 4.21: Test auf Phosphorylierungsaktivität von GST-LmxMPK12WT bei 27 °C und 34 °C
A: Coomassie-gefärbtes 12 % SDS-Polyacrylamid-Gel
B: zugehöriges Autoradiogramm nach 24 h Exposition
1: 27 °C, 2: 34 °C

In Abbildung 4.21 ist die Phosphorylierungsaktivität der GST-LmxMPK12-Wildtyp-Kinase bei 27 °C und 34 °C gezeigt. Die Aktivität der Kinase ist unter den gegebenen Bedingungen sehr gering. So findet nur eine geringe Autophosphorylierung (74 kD) bzw. Substratphosphorylierung (18,5 kD) statt. Während das MBP, das eine Größe von 18,5 kD hat, bei 27 °C etwas stärker phosphoryliert wird als bei 34 °C, ist es bei der Autophosphorylierung genau umgekehrt. Dieser Test wurde mit dem Standardpuffer bei einem pH von 7,2 durchgeführt. Aufgrund der geringen Ausbeute bei der Proteinaufreinigung und Isolierung der Fusionsproteine sowie der sehr niedrigen Aktivität der Kinase in vitro wurden im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Kinase-Tests durchgeführt.

4.11 Erzeugung einer (-/-) LmxMPK12-Doppeldeletionsmutante

In Trypanosomatiden kann ein Gen, sofern es im haploiden Genom in einfacher Kopienzahl vorliegt, durch homologe Rekombination gezielt entfernt und durch ein Resistenzgen ersetzt werden, so dass eine nachfolgende Selektion ermöglicht wird (Cruz et al., 1991). Zum Ersatz beider Allele eines Gens werden zwei voneinander unabhängige Resistenzgene benötigt. Als Resistenzgene wurden die Gene für die Neomycin- oder Hygromycin B-Phosphotransferase (NEO bzw. HYG) sowie für das Phleomycin bindende Protein (BLE) eingesetzt.

4.11.1 Nachweis des *LmxMPK12*-Gens als single-copy-Gen

Der Nachweis erfolgte durch einen Southern Blot. Hierzu wurde die genomische DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten und das entstandene Schnittmuster analysiert.

Es wurde eine DIG-markierte *LmxMPK12*-Sonde verwendet, die mit einer Teilsequenz des offenen Leserasters der *LmxMPK12* hybridisiert und mit den Primern *LmaMPK12_1.for* und *LmaMPK12_1.rev* hergestellt wurde. Bei Restriktionsenzymen, die nicht im Bereich der Sonde schneiden, sollte bei einem single copy Gen nur eine Bande zu sehen sein, bei mehreren Genkopien mindestens eine. Restriktionsenzyme, die eine Schnittstelle innerhalb der Sonde aufweisen, sollten zwei Fragmente ergeben. Abbildung 4.22 zeigt eine schematische Darstellung der Lokalisation der relevanten Schnittstellen innerhalb des sequenzierten Bereiches.

Wie aus Abbildung 4.23 ersichtlich, hybridisierten die Enzyme mit einer Schnittstelle im Bereich der Sonde (*Acc65I*, *PstI*, *PciI*) mit maximal zwei Fragmenten. Enzyme mit Schnittstellen innerhalb des sequenzierten Bereiches, jedoch außerhalb der Sonde, hybridisierten mit einem Fragment entsprechender Mindestgröße (*PvuI*). Enzyme mit einer Schnittstelle vor und einer nach dem Sonden-bindenden Bereich (*XhoI*, *PvuII*) hybridisierten mit einem Fragment der zu erwartenden Größe. Enzyme, die in dem sequenzierten Bereich keine Schnittstelle aufweisen, ergeben hier auch kein Fragment (*NheI*, *AvrII*). Aufgrund dieser Ergebnisse wird ersichtlich, dass es sich bei der *LmxMPK12* um ein single-copy-Gen handelt.

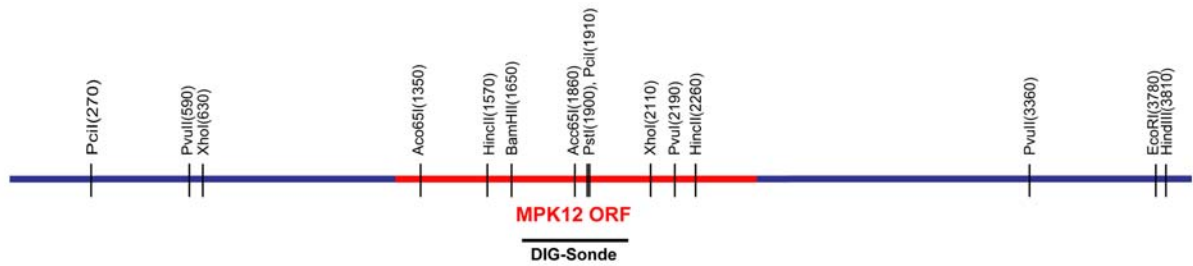


Abb. 4.22: schematische Darstellung der Lokalisation relevanter Schnittstellen im Bereich des *LmxMPK12* Gens und der sequenzierten flankierenden Regionen

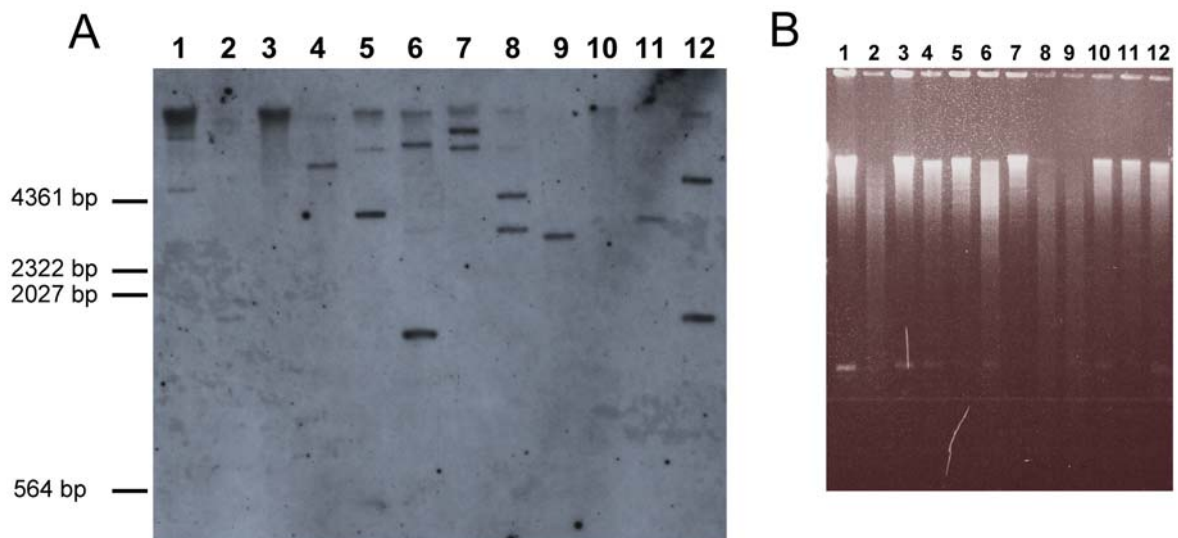


Abb. 4.23: Southern Blot genomsicher *L. mexicana* WT-DNA

1: *EcoRI*; 2: *Hinc II*; 3: *AvrII*; 4: *HindIII*; 5: *Acc65I*, 6: *XhoI*; 7: *BamHI*; 8: *PstI*; 9: *PvuII*; 10: *NheI*; 11: *PvuI*; 12: *Pci I*

4.11.2 Klonierungsarbeiten zur Herstellung eines linearen DNA-Konstruktes zur Transfektion von *L. mexicana*

Bei der Herstellung der Deletionsmutanten wurde das offene Leseraster der *LmxMPK12* durch ein Resistenzgen ersetzt. Hierzu wurde ein lineares DNA-Konstrukt erzeugt, das neben dem Resistenzgen auch die für eine homologe Rekombination hinreichend langen DNA Abschnitte der flankierenden Regionen der *LmxMPK12* enthielt.

In Abbildung 4.24 sind die Klonierungsschritte zusammenfassend dargestellt. Das in 4.9.1 näher beschriebene Plasmid pB5LmxMPK12, welches das *LmxMPK12*-tragende Phageninsert enthält, diente als Ausgangsplasmid.

Zunächst wurde die 3'-flankierende Region (Stromabwärts-Region) d2 mit dem Primern MPK12del2.for und MPK12del2.rev in einer PCR-Reaktion amplifiziert, mit *EcoRV* und *XbaI* geschnitten und in den ebenfalls mit *EcoRV* und *XbaI* geschnittenen pBBlueskript II (+) Vektor

kloniert. Dies ergab das Plasmid pB6d2LmxMPK12. Anschließend wurde die 5'-flankierende Region (Stromaufwärts-Region) mit den Primern MPK12del1.for und MPK12del1.rev in einer weiteren PCR Reaktion amplifiziert, mit *XbaI* geschnitten und in den nun mit *XbaI* linearisierten pB6d2MPK11-Vektor kloniert. Es entstand das Plasmid pB5delMPK12.

Ein *NheI/NcoI*-Fragment wurde herausgeschnitten und durch Resistenzgene gegen Hygromycin B (hyg-Gen), Bleocin (phleo-Gen) und Neomycin (erhalten aus pCR2.1hyg, pCR2.1phleo und pCR2.1neo) ersetzt. Entsprechende Schnittstellen waren durch die Primer MPK12del2.for und MPK12del1.rev generiert worden. Die resultierenden Plasmide sind pBdelMPK12phleo5, pBdelMPK12hyg4 und pBdelMPK12neo2.

Über *EcoRV* wurde das lineare DNA- Konstrukt aus dem Vektor geschnitten und für die Transfektion eingesetzt (Abbildung 4.25). Die so erhaltenen DNA- Fragmente werden im folgenden als PHLEO- und HYG-Fragment bezeichnet.

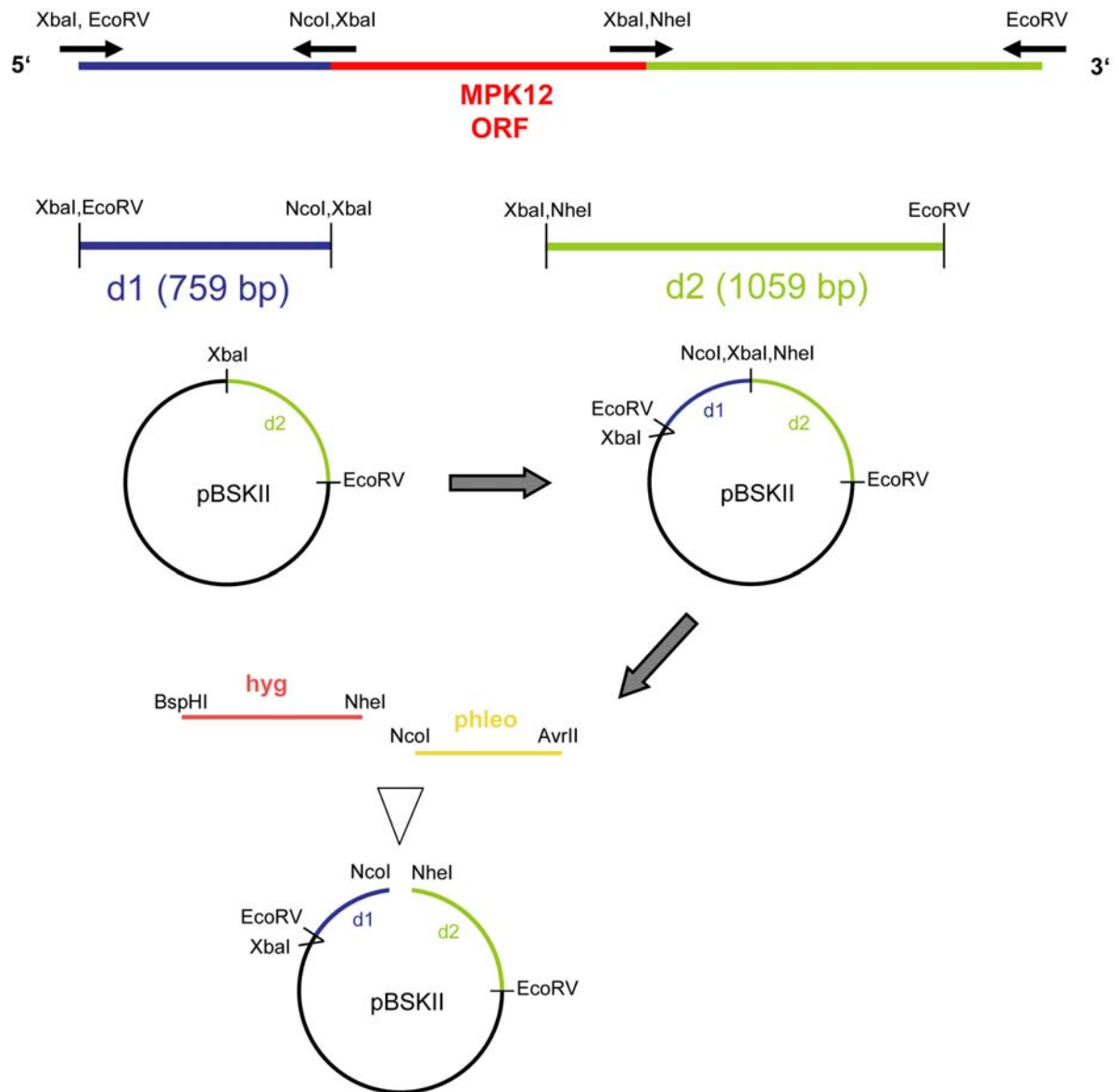


Abb. 4.24: Schematische Darstellung der Herstellung eines linearen DNA-Konstruktes zur Transfektion in *L. mexicana*

ORF: open reading frame

d1: PCR-Amplifikat der upstream-flankierenden Region des MPK11-Gens

d2: PCR-Amplifikat der downstream-flankierenden Region des MPK11-Gens

pBSKII: pBluescript-Vektor

Hyg: HYG-Resistenzgen

Phleo: PHLEO-Resistenzgen

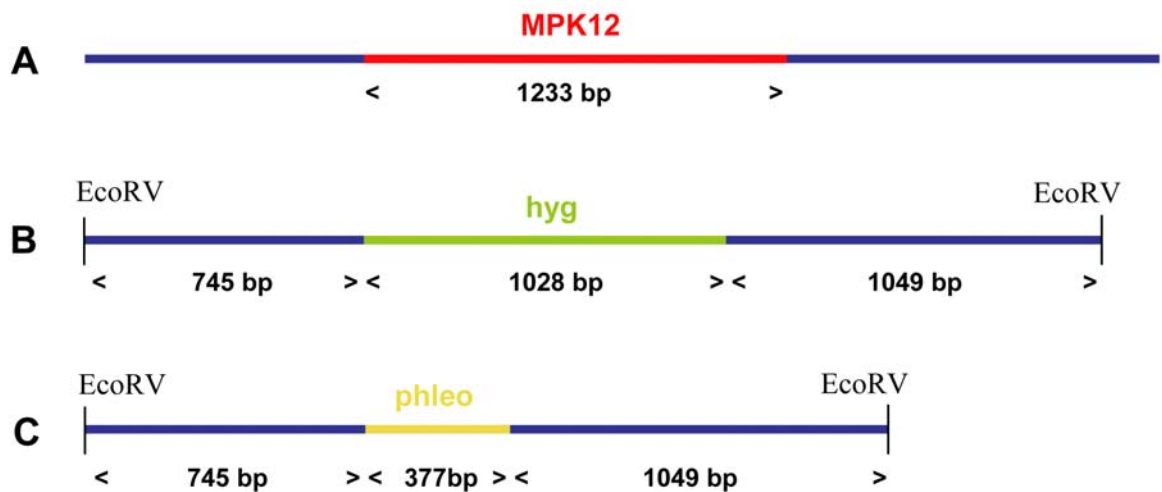


Abb. 4.25: Elektroporationskonstrukte zur Erzeugung von (-/-)- *LmxMPK12*-Doppeldeletionsmutanten von *L. mexicana*

A: *LmxMPK12*-Gen im Genom von *L. mexicana*, B: Elektroporationskonstrukt mit hyg-Gen; C: Elektroporationskonstrukt mit phleo-Gen

4.11.3 Deletion beider *LmxMPK12*-Allele

Aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit einer gleichzeitigen zweifachen homologen Rekombination in einem Organismus wurden die beiden allelischen Kopien von *LmxMPK12* nacheinander ersetzt. Im ersten Schritt wurden unabhängig voneinander eine genomische Kopie des Gens durch HYG-, NEO- oder BLE-Gen ausgetauscht, anschließend wurde das zweite Allel durch eines der beiden anderen Resistenzgene ersetzt. Auf diese Weise erhält man unabhängig voneinander hergestellte Doppelalleldeletionsmutanten, deren Eigenschaften in weiteren Experimenten untersucht werden können.

In der ersten Runde der Elektroporation von *L. mexicana*-WT-Promastigoten mit den in 4.9.2 beschriebenen linearen DNA-Konstrukten resultierten im Falle des HYG- und des PHLEO-tragenden Fragmentes Einzelklone, von denen vier PHLEO- und zwei HYG-Klone im Southern Blot analysiert wurden. Durch die Southern Blot-Analyse der genomischen DNA konnte der Austausch eines *LmxMPK12*-Allels durch das betreffende Resistenzgen in den 6 untersuchten Klonen nachgewiesen werden. Bei der Transfektion mit dem NEO-tragenden Fragment gab es keine lebensfähigen Zellen.

Von den Klonen $\Delta LmxMPK12$ (+/-) PHLEO Klon 1-4 und $\Delta LmxMPK12$ +/- HYG Klon 1+2 wurden Stabilate zur Langzeitlagerung angelegt.

Für die Herstellung der *LmxMPK12*-Doppelalleldeletionsmutanten von *L. mexicana*

wurde eine Elektroporation der Einzeldelentionsmutanten $\Delta LmxMPK12$ (+/-) PHLEO3 und $\Delta LmxMPK12$ (+/-) HYG1 mit dem HYG- bzw. dem PHLEO-tragenden Deletionskonstrukt durchgeführt. Von den unter Selektionsdruck gewachsenen Einzelklonen des Transfektionsansatzes PHLEO3 mit dem HYG-Fragment wurde von 4 Klonen die genomische DNA isoliert und mittels eines Southern Blots analysiert. Aus dem Transfektionsansatz HYG1 mit dem PHLEO-Fragment ergab sich nur ein Klon, dessen genomische DNA ebenfalls isoliert und mittels Southern Blot analysiert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass in allen getesteten Klonen das zweite $LmxMPK12$ -Allel durch ein Resistenzgen ersetzt und somit vollständig aus dem Genom entfernt wurde.

Für die nachfolgende Experimente wurden die Klone $\Delta LmxMPK12(-/-)$ P3H2 (1. Allel-Austausch: PHLEO, 2. Allel-Austausch HYG) und $\Delta LmxMPK12(-/-)$ H1P4 weiterhin kultiviert. Von den restlichen Klonen wurden Stabilate angelegt.

4.12 Analyse der $LmxMPK12$ Deletionsmutanten

Der Nachweis, dass die beiden Allele des $LmxMPK12$ -Gens in zwei aufeinanderfolgenden Schritten durch Resistenzgene ersetzt worden waren, wurde mittels Southern Blot Analyse erbracht.

4.12.1 Southern Blot Analyse

Die genomische DNA vom *L. mexicana*-Wildtyp, den beiden Einzeldelentionsmutanten $\Delta LmxMPK12$ (+/-) PHLEO3 und HYG1 sowie den Doppeldelentionsmutanten (-/-) P3H1, P3H2, P3H3 und H1P4 wurden mit AatII und XbaI gespalten und einer Southern Blot-Analyse unterzogen. AatII besitzt eine Schnittstelle in der stromaufwärts gelegenen flankierenden Region von $LmxMPK12$ sowie in den Resistenzgenen. Eine XbaI-Schnittstelle liegt in der stromabwärts gelegenen flankierenden Region von $LmxMPK12$ außerhalb des Deletionskonstruktes. Durch Verwendung einer DIG-markierten Sonde D12 (PCR mit den Primern LmxMPK12_6.for und MPK12del2.rev auf das 1059 bp-Fragment d2 aus pCR2d2MPK12 = 430 bp-Sonde), die in der 3'-flankierenden Region des $LmxMPK12$ -Gens hybridisiert, können aufgrund der unterschiedlichen Fragmentgrößen korrekt ins Genom integrierte Elektroporationsfragmente nachgewiesen werden. Abbildung 4.26 zeigt die zu erwartenden Fragmentgrößen.

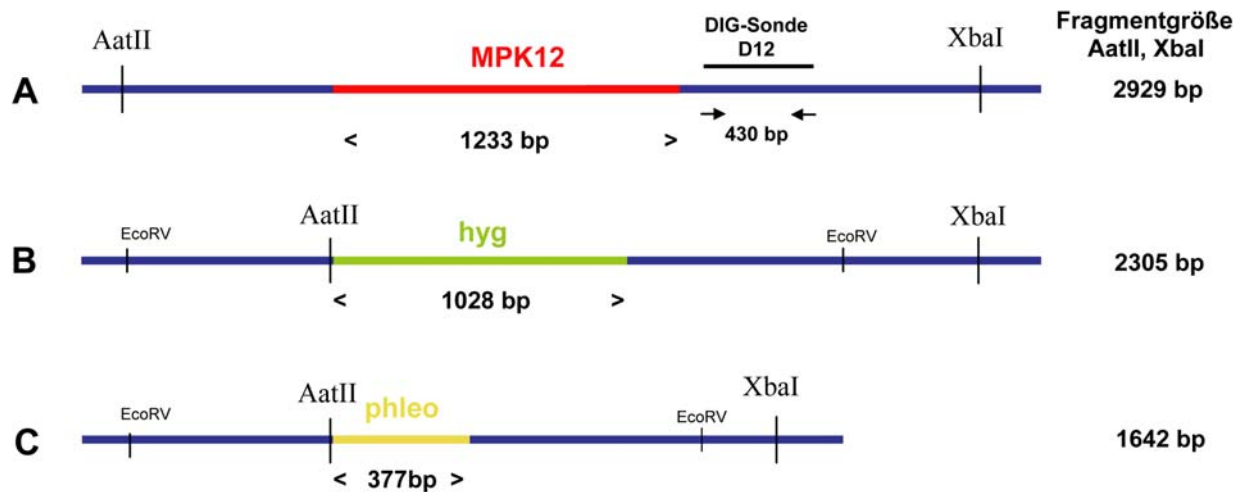


Abb. 4.26: Nachweis des *LmxMPK12*-,*hyg* bzw. *phleo*-Gens im Genom von *L. mexicana* mit der Sonde D12
 A: *LmxMPK12*-Gen im Genom von *L. mexicana*; B: *HYG*-Gen im Genom von *L. mexicana*; C: *PHLEO*-Gen im Genom von *L. mexicana*

Abbildung 4.27 zeigt die durch *AatII* und *XbaI*-Spaltung der genomischen DNA entstandenen Banden im Southern Blot in den für die jeweiligen Klone erwarteten Größen. Die Bande für das *MPK12*-Genfragment liegt bei 2,9 kb und erscheint im Wildtyp als einzige Bande. In der Einzeldelation mit *Phleo* erscheint zusätzlich eine 1,6 kb Bande, die der Größe des *Phleo*-Gen-tragenden Fragmentes entspricht. In der Einzeldelation mit *Hyg* erscheint die entsprechende 2,3 kb Bande. In den Doppeldeletionen taucht anstelle des *MPK12*-Genfragmentes eine Bande in der Größe des *Hyg*-Fragmentes, sowie eine Bande der Größe des *Phleo*-Fragmentes auf.

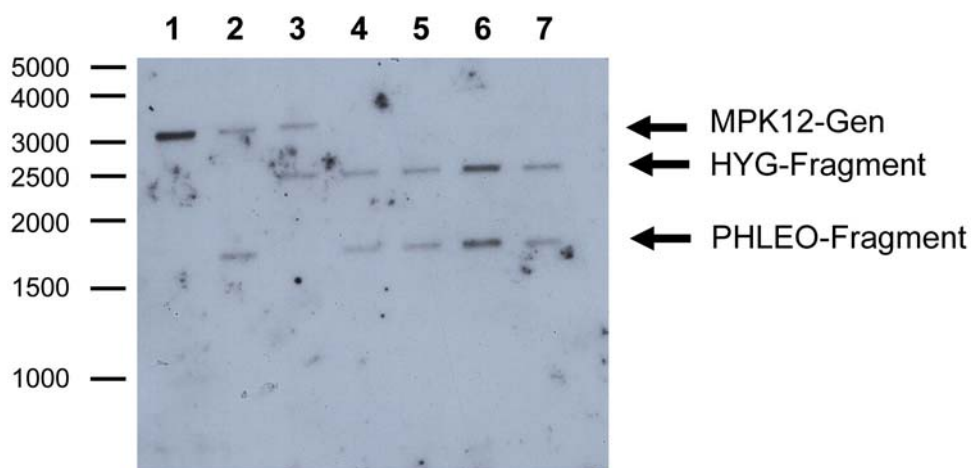


Abb. 4.27: Southern Blot genomischer DNA der *L. mexicana* Δ *LmxMPK12*- Klone
 Mit *AatII* und *XbaI* geschnittene genomische DNA diverser Δ *LmxMPK12*-Klone im Southern Blot mit der DIG-markierten Sonde D12 hybridisiert.
 1: *Lmx* WT 03/05; 2: Δ *LmxMPK12*(+/-)*PHLEO*3; 3: Δ *LmxMPK12*(+/-)*HYG*1; 4: Δ *LmxMPK12*(-/-)*P3H1*; 5: Δ *LmxMPK12*(-/-)*P3H2*; 6: Δ *LmxMPK12*(-/-)*P3H3*; 7: Δ *LmxMPK12*(-/-)*H1P4*

4.13 Episomale Expression von LmxMPK12

Wird ein Expressionsvektor, der das *LmxMPK12*-Gen enthält, in eine Deletionsmutante eingebracht, so dient die anschließende episodale Expression als „Add-Back“-Mutante. Können dadurch auftretende Unterschiede im Phänotyp der Deletionsmutanten im Vergleich zu den Wildtypparasiten wieder rückgängig gemacht werden, so könnte dies als Nachweis für eine direkte Beteiligung von *LmxMPK12* dienen.

4.13.1 Herstellung des *LmxMPK12*-tragenden Plasmids

pX63polPAC3*LmxMPK12*

Als Ausgangsvektor für die Herstellung eines *LmxMPK12*-tragenden Plasmids diente pX63polPAC, der das Gen für die Puromycin-N-Acetyltransferase (PAC) enthält, das eine Resistenz gegenüber Puromycin vermittelt und somit eine Selektion auf Plasmid enthaltende homozygote *LmxMPK12*-Promastigote ermöglicht.

Zunächst wurde das *LmxMPK12*-Gen über die Schnittstellen *Bsp*HI und *Eco*RV aus dem pCR1*LmxMPK12*-Vektor ausgeschnitten, die Schnittstellen mit der Klenow-Polymerase aufgefüllt, und das Fragment über eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit Ethanol-fällung aufgereinigt. Anschließend wurde das Fragment in den mit *Eco*RV linearisierten, dephosphorylierten pX63polPAC-Vektor kloniert. Das Produkt pX63polPAC3*LmxMPK12* wurde in größeren Mengen aufgereinigt und steril in ddH₂O für die Transfektion aufgenommen.

4.13.2 Episomale Komplementation

Für die Herstellung der „Add-back“-Mutanten wurde das Plasmid pX63polPAC3*LmxMPK12* in die Δ *LmxMPK12*(-/-)-Klone P3H2 und H1P4 transfiziert und die DNA von jeweils 2 der erhaltenen Puromycin-resistenten Klone nach TELT-Aufreinigung in einer PCR-Reaktion untersucht. Diese wurde mit den Primern *LmxMPK12*C.rev und *LmxMPK12*_2.for durchgeführt, der WT und eine Doppeldeletionsmutante dienten als Kontrolle. Hierbei zeigte sich nach der Auftrennung im Agarosegel ein Amplifikat im WT und den vier Add-back Mutanten, nicht jedoch in der Deletionsmutante.

Von den Klonen Δ *LmxMPK12*(-/-)P3H2 + pX1PACL*LmxMPK12* Δ *LmxMPK12*(-/-)P3H2 + pX2PACL*LmxMPK12* und Δ *LmxMPK12*(-/-)H1P4 + pX3PACL*LmxMPK12*, +pX4 wurden Stabilate angelegt. Mit jeweils einem Add-back-Klon wurden Mäuse infiziert.

4.14 Phänotypische Analyse von LmxMPK12(-/-)

Doppeldeletionsmutanten

4.14.1 Morphologische Betrachtung

Es wurde untersucht, inwieweit sich die Deletion von LmxMPK12 aus dem *L. mexicana*-Genom auf die Morphologie der Promastigoten auswirkt. Hierfür wurden die Oberflächen logarithmisch wachsender Wildtyp und $\Delta LmxMPK12$ -Kulturen im Lichtmikroskop betrachtet. Es konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

4.14.2 Wachstum der Promastigoten in vitro

Da Enzyme der MAP-Kinase-Kaskade häufig an der Regulation des Zellzyklus und des Zellwachstums beteiligt sind, sollte anhand von Wachstumskurven diesbezüglich ein möglicher Einfluß aufgezeigt werden. Hierfür wurden der WT mit 2 Doppeldeletionsmutanten verglichen. Es zeigte sich kein verändertes Wachstum.

4.14.3 In-vitro-Differenzierung zu Amastigoten

Die in-vitro-Differenzierung, bei der die promastigoten Leishmanien zu Amastigoten differenzieren, kann durch eine Ansäuerung des Mediums und Erhöhung der Inkubationstemperatur von 27 °C auf 34 °C erreicht werden.

Während der Differenzierung wurde das Wachstum der Doppeldeletionsmutanten (-/-)P2H1 und (-/-)P1H5 mit dem des Wildtyps verglichen. Hierzu wurden *L. mexicana* Kulturen mit einer Zelldichte von 2×10^6 Promastigoten/ml angeimpft und bei 34 °C in Schneiders Medium inkubiert. Über 96 h wurden in regelmäßigen Abständen Proben zur Bestimmung der Zelldichte entnommen. Bei der Betrachtung der in Abbildung 4.28 dargestellten Wachstumskurven fällt auf, dass sich die Zellen der Deletionsmutanten bereits in den ersten 48 Stunden der Differenzierung langsamer teilen als die Zellen vom Wildtyp. Im weiteren Verlauf teilen sich die Amastigoten der Deletionsmutanten nicht mehr, während das Wachstum der WT-Amastigoten weiter zunimmt.

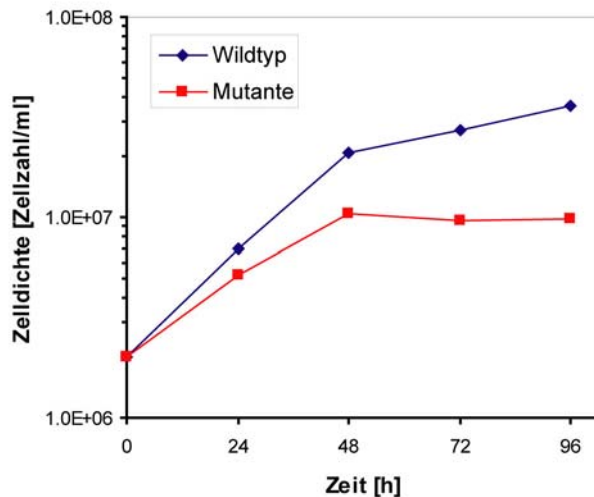


Abb. 4.28: Wachstum von *L. mexicana* WT- und $\Delta LmxMPK12$ -Amastigoten in vitro

Blau: *Lmex* WT 03/05

Rot: $\Delta LmxMPK12(-/-)$ P3H2 und H1P4

4.15 Infektion von *BALB/c*- Mäusen

Um den Einfluß der Deletion von *LmxMPK12* aus dem *L. mexicana* Genom auf das Infektionsverhalten in vivo zu untersuchen, wurden BALB/c-Mäuse mit promastigoten Zellen von diversen *LmxMPK12*-Deletionsmutanten infiziert. Hierfür wurden weibliche BALB/c-Mäuse im Alter von 6-10 Wochen in Gruppen zu je 5 Mäusen zusammengefasst und jeweils 1×10^7 Parasiten der spät-logarithmischen Phase in die Fußsohle des linken Hinterlaufs injiziert. Alle 4 Wochen wurde die Fußdicke gemessen und dadurch der Infektionsverlauf verfolgt. Als Kontrolle galten mit WT infizierte Mäuse.

Je 5 Mäuse wurden mit den beiden $\Delta LmxMPK12$ -Einzeldelentionsmutanten (+/-)PHLEO3 und HYG1, sowie mit den Doppeldelentionsmutanten (-/-) P3H2 und H1P4 infiziert. Die Zelldichten der Promastigoten zum Zeitpunkt der Infektion waren $3,5 \times 10^7$ /ml (PHLEO3), $3,9 \times 10^7$ /ml (HYG1, P3H2) und $3,2 \times 10^7$ /ml (H1P4). In Abbildung 4.29 sind die Ergebnisse nach einem Beobachtungszeitraum von 34 Wochen dargestellt. Aufgrund eines zum Teil sehr unterschiedlichen Infektionsverhaltens innerhalb einer Gruppe wurde das Läsionsverhalten jeder Maus einer Gruppe einzeln aufgetragen.

Bei der Betrachtung der in Abbildung 4.29 dargestellten Kurvenverläufe der Fußsohleninfektionen zeigt sich, dass drei der fünf mit der Einzeldelention H1 infizierten Mäuse und vier der fünf mit der Doppeldelention P3H2 infizierten Mäuse bereits nach 4 Wochen eine Läsion entwickeln, während die Läsionsbildung bei den mit der Einzeldelention P3 infizierten Mäusen erst nach 12 Wochen einsetzt. Noch später entwickeln sich die Läsionen bei den mit der

Doppeldeletion H1P4 infizierten Mäusen. Hier zeigen drei der fünf Mäuse nach 34 Wochen noch keine Fußdickendifferenz.

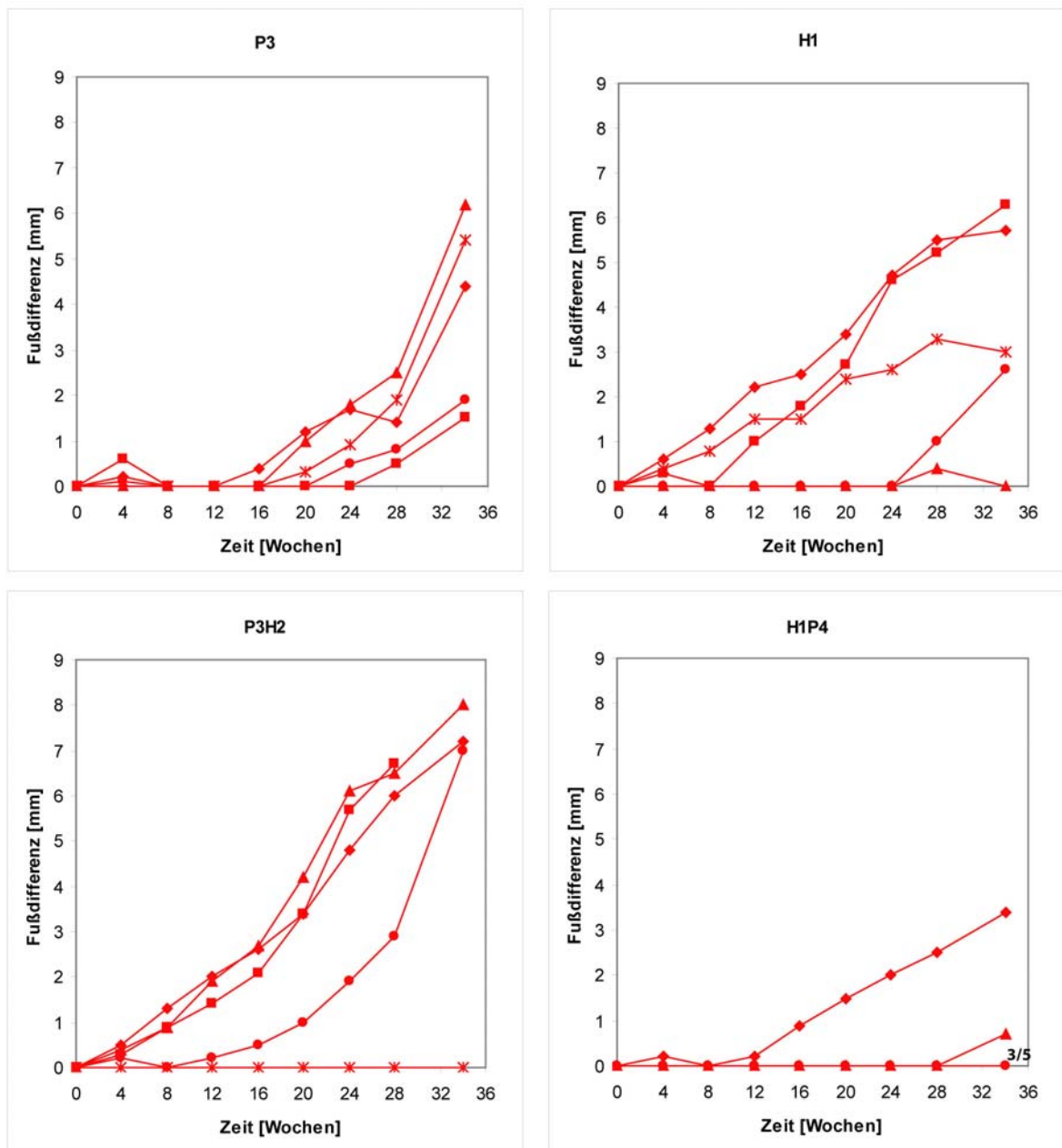


Abbildung 4.29: Verlauf der Läsionsbildung in mit verschiedenen Δ LmxMPK12 Mutanten infizierten BALB/c-Mäusen

5 Diskussion

5.1 Aktivitätstests der rekombinant exprimierten Proteine

5.1.1 Expression und Aufreinigung des GST-LmxMPK11-Fusionsproteins

Für die enzymatische Charakterisierung der LmxMPK11 wurde diese als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und in Kinase-Aktivitätstests eingesetzt. Auch die inaktive KM-Mutante konnte erfolgreich rekombinant exprimiert werden. Bei einer hohen Ausbeute von bis zu 5 mg aus einer 100 ml Kultur konnte auf eine weitere Optimierung der Expressionsbedingungen verzichtet werden, da für die Durchführung von Aktivitätstests nur 2 µg Kinase je Ansatz benötigt werden. Aufgrund der hohen Ausbeute und der relativ reinen Aufreinigung des LmxMPK11-GST-Fusionsproteins konnte dieses auch für die Herstellung eines polyklonalen Antikörpers im Kaninchen eingesetzt werden.

5.1.2 Expression und Aufreinigung der LmxMPK12-Fusionsproteine

Die LmxMPK12 ließ sich im bakteriellen Expressionssystem nur schwer exprimieren. Bei der Aufreinigung des GST-LmxMPK12-Fusionsproteins zeigte die LmxMPK12 eine schlechte Bindung an die GST-Sepharose, denn auch nach Bindung an die Sepharose war im Überstand eine deutliche Bande auf Höhe des GST-Fusionsproteins im SDS-Gel auszumachen. Die anschließende Aufreinigung über den Strep-Tag, ein Expressionssystem das sich auch für schwer exprimierbare und schlecht bindende Proteine bewährt hat, zeigte ebenfalls nur eine geringe Ausbeute. Hier zeigten sich jedoch im Überstand nach der Bindung an die Sepharose sowie in den Waschfraktionen keine deutlichen Proteinbanden mehr auf Höhe der Kinase, so dass die geringe Ausbeute an einer niedrigen Expression und nicht an dem Bindungsvermögen an die Sepharose zu liegen scheint. Durch eine Testexpression bei unterschiedlichen Bedingungen könnte die Menge an exprimiertem Protein sicherlich gesteigert werden.

5.1.3 In-vitro-Aktivitätstests mit dem GST-LmxMPK11 und LmxMPK12-Fusionsproteinen

In Kinasetests sollten die rekombinant exprimierten GST-LmxMPK11 und GST-LmxMPK12 hinsichtlich ihrer Phosphorylierungsaktivität untersucht werden. Als Testsubstrat wurde das Myelin basische Protein (MBP) eingesetzt, dessen Eignung als Substrat für viele Kinasen wie Proteinkinase A, Proteinkinase C oder MAP Kinasen dokumentiert ist.

Für die LmxMPK11 konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein in aktiver Form aus *E. coli* isoliert wurde und sowohl zur Auto- als auch zur MBP-Phosphorylierung in der Lage ist. Als

Kontrolle diene die inaktive KM-Mutante, die weder eine Auto- noch eine Substratphosphorylierung zeigte. Der Lysin-Rest in der Subdomäne II, der bei der inaktiven Mutante durch Methionin oder Arginin ersetzt wird, ist essentiell für die Übertragung von Phosphatgruppen auf das Substrat. Durch die Inaktivierung eignet sich die KM-Mutante als Kontrolle im Kinase-Test. Verunreinigungen z.B. durch bakterielle Kinasen können so ausgeschlossen werden.

Die gesteigerte Aktivität der LmxMPK11 bei einer höheren Temperatur könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Kinase in Amastigoten oder bei der Differenzierung zu Amastigoten aktiver ist als in den Promastigoten, denn im Vergleich zu Mensch und Säugetier liegt im Insektenvektor eine eher niedrigere Temperatur von 27 °C vor. Bei der Differenzierung zu Amastigoten kommt es im Lebenszyklus der Leishmanien zu einem Temperatursprung von 27 °C auf 34-37 °C. Auch dies spricht für eine Beteiligung der LmxMPK11 an diesem Prozess.

Bei der Suche nach der optimalen Ionenkonzentration von Mg^{2+} und Mn^{2+} im Kinasepuffer wurde sowohl für die Autophosphorylierung, wie auch für die Substratphosphorylierung, ein Maximum an Aktivität der LmxMPK11 bei der höchsten getesteten Mn^{2+} -Konzentration beobachtet. Die hier gezeigte Präferenz für Mn^{2+} gegenüber Mg^{2+} läßt aber kaum eine Aussage über das Verhalten unter physiologischen Bedingungen zu, da in der Zelle ganz andere Ionenzusammensetzungen und Konzentrationen vorliegen.

Auch die LmxMPK12 läßt sich in aktiver Form aus *E. coli* isolieren, wenn auch mit einer nur sehr schwachen Aktivität. Hier sollte zunächst die Expression optimiert werden, um eine höhere Ausbeute an Protein zu bekommen. Anschließend kann der Kinase-Aktivitätstest für die LmxMPK12 durch die Veränderung der Ionenkonzentration, des pH-Wertes und der Temperatur optimiert werden. Hierbei bietet es sich auch an, die Aktivität bei Temperaturen unterhalb von 27 °C und oberhalb von 34 °C zu testen, um einen Einfluß der Temperatur auf die Aktivität nachweisen zu können.

5.2 Deletion des LmxMPK11 und LmxMPK12-Gens aus dem L. mexicana Genom

5.2.1 Herstellung der Deletionsmutanten sowie episomale Komplementation

Eine wichtige Methode zur Untersuchung der Funktion eines Proteins ist die Deletion des Gens. Insbesondere der Einfluß auf die Pathogenität und Infektiosität des Erregers kann so untersucht werden. Handelt es sich bei dem zu deletierenden Gen um ein single copy Gen, so kann das Gen durch homologe Rekombination durch Resistenzgene ersetzt werden und eine Nullmutante

erzeugt werden. Für beide Kinasen ließen sich Einzel- und Doppeldeletionsmutanten unkompliziert erzeugen.

Über die episomale Komplementation konnte eine Reexpression der LmxMPK11 erreicht werden. Der Southern Blot zum Nachweis der episomalen Reintegration des Gens im *Leishmanium* zeigt neben der Bande in der Größe des Plasmids auch Banden, die ein Vielfaches davon sind. Da die Plasmid-DNA nicht geschnitten wurde, könnten dies Plasmide sein, die durch „supercoiling“ miteinander verbunden sind. Dass das Gen auch transkribiert und das Protein exprimiert wird, zeigte der Immunoblot.

Der Nachweis für die Reexpression der LmxMPK12 konnte nicht erbracht werden, da kein spezifischer Antikörper gegen die LmxMPK12 vorlag. Wohl aber zeigte eine PCR das Vorhandensein des Gens in den das Plasmid tragenden Leishmanien.

5.2.2 Phänotyp der Deletionsmutanten

Die Herstellung lebensfähiger Δ LmxMPK11 und Δ LmxMPK12-Parasiten zeigt, dass das Gen für das Promastigoten-Stadium von *L. mexicana* zumindest in der Zellkultur nicht essentiell ist. Durch die Analyse der genomischen DNA im Southern Blot war bekannt, dass es sich bei den beiden Genen um ein single copy Gen handelt. Für die LmxMPK11 ließ sich dies im Immunoblot unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen die MPK11 auch bestätigen. In der Southern Blot Analyse, die zeigt, dass es sich bei der LmxMPK12 auch um ein single copy Gen handelt, erscheint in den Spuren der mit *Xho*I und *Bam*HI geschnittenen genomischen DNA eine zusätzliche Bande, die weit größer als 4000 bp ist. Hierbei handelt es sich sehr wahrscheinlich um unvollständig gespaltene DNA. Entsprechendes gilt auch für die noch darüber liegenden Banden, die in fast allen Spuren auszumachen sind.

Während sich die Promastigoten im Lichtmikroskop und in der Elektronenmikroskopie nicht vom Wildtyp unterscheiden, wurde bei den LmxMPK11-Nullmutanten ein verringertes Wachstum der Promastigoten in der Zellkultur festgestellt, was für eine Beteiligung der LmxMPK11 am Teilungsprozess spricht. Auch bei der in-vitro-Differenzierung zeigten die Nullmutanten der LmxMPK11 wie auch der LmxMPK12 eine im Vergleich zum Wildtyp verzögerte und langsamer ablaufende Differenzierung. Beide Kinasen haben somit einen Einfluß auf die Differenzierung und auch auf die Teilung der Amastigoten in vitro. In einem Immunoblot, bei dem während der in-vitro-Differenzierung von Promastigoten zu Amastigoten regelmäßig Proben genommen wurden, konnte gezeigt werden, dass die LmxMPK11 in allen Stadien vorhanden ist. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die LmxMPK11 an Prozessen in diesen Stadien und während der Differenzierung beteiligt ist. Auch bei den aus der Mausläsion isolierten Amastigoten ließ sich die Kinase nachweisen, so dass die Ergebnisse auf in-vivo-Verhältnisse übertragbar zu sein scheinen.

Für die LmxMPK12 wurde erst zum Ende dieser Arbeit ein Antikörper generiert, der im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr eingesetzt werden konnte.

5.3 Infektion von BALB/c Mäusen

Um zu untersuchen, ob die LmxMPK11 und die LmxMPK12 auch einen Einfluß auf die Infektiosität von *L. mexicana* ausüben, wurden BALB/c Mäuse mit den unterschiedlichen Deletionsmutanten der beiden Kinasen infiziert. BALB/c Mäuse entwickeln eine TH2-Immunantwort, die sie empfänglich für eine Leishmanieninfektion mit ulzerierender Läsionenbildung macht. Mäuse-Klone, die auf eine Infektion mit einer TH1- Immunantwort reagieren, sind meist resistent.

5.3.1 Deletion von *LmxMPK11*

Ca. 70% der mit den Doppeldelationen infizierten Mäuse blieben über 28 Wochen gesund, während der Wildtyp und die Einzeldelation in diesem Zeitraum zum Teil sehr ausgeprägte Läsionen entwickelten. Bei den mit der Nullmutante infizierten Mäusen, bei denen sich eine Läsion entwickelte, trat diese verlangsamt und verzögert auf. Somit nimmt die LmxMPK11 einen deutlichen Einfluß auf das Infektionsverhalten in Mäusen. Das Fehlen dieser Kinase führt zu einer verminderten Infektiosität. Die Ausprägung dieses Merkmals fiel jedoch in den verschiedenen Klonen unterschiedlich aus, und auch innerhalb der Klone zeigte sich nicht immer ein eindeutiges Bild.

Die Deletionsmutanten, die von der Einzeldelation P2 abstammten, zeigten allgemein eine ausgeprägtere Infektion. Hier wurden in den ersten 28 Wochen nach Infektion 60 % der Mäuse krank. Ursache dafür könnte eine Kompensation sein, bei der die Funktion der LmxMPK11 durch andere Mechanismen ersetzt wird. Aber auch eine Schwäche des Immunsystems der Mäuse durch eine andere Infektion könnte eine mögliche Ursache sein.

Die Mäuse, die mit den Doppeldelationsmutanten P1H4 und P1H5 infiziert wurden, zeigten bis auf eine Maus in den ersten 28 Wochen keine Infektion. Die Beobachtung, dass eine Maus in diesem Zeitraum eine kleine Läsion entwickelte, spricht dafür, dass die Infektiosität auch in diesen Klonen nicht aufgehoben, sondern nur vermindert ist. Auch hier könnte ein Kompensationsmechanismus die Ursache für die spät einsetzende Läsionsbildung sein. In diesem Fall wäre zu erwarten, dass auch die anderen Mäuse zu einem späteren Zeitpunkt eine Läsion entwickeln. Vor allem auch der sehr unterschiedliche Verlauf der Läsionsbildung bei mit demselben Klon infizierten Mäusen spricht für einen Kompensationsmechanismus, den die Leishmanien mit der Zeit in unterschiedlicher Ausprägung entwickeln. Ein ähnliches

Läsionsverhalten wurde auch bei den LmxPK4-Deletionsmutanten beobachtet (Kuhn and Wiese 2005). Hier konnte durch Reinfektionsexperimente gezeigt werden, dass das Fehlen der LmxPK4 durch einen bisher nicht bekannten Mechanismus kompensiert wird.

Ob Kompensationsmechanismus oder Immunschwäche für das verzögerte, inhomogene Infektionsverhalten verantwortlich sind, ist in diesem Rahmen nicht festzustellen. Sicher scheint jedoch, dass die *LmxMPK11*-deletierten Leishmanien in die Makrophagen eindringen und dort persistieren können.

In den mit den Add-back Mutanten infizierten Mäusen zeigte sich nach 24 Wochen einheitlich eine Läsionsbildung, die zwar verzögert einsetzte, aber ein schnelles Wachstum aufwies. Das abweichende Verhalten dieser Mutanten von den Doppeldeletionen spricht für eine, wie auch im Immunoblot gezeigte Expression der LmxMPK11 über die episomale Komplementation. Dass das Verhalten der Add-back Mutanten von denen des Wildtyps und den Einzeldelationen abweicht mag daran liegen, dass sich auf dem Plasmid nur das ORF der *LmxMPK11* befindet und nicht auch die flankierenden Regionen. Letztere könnten bei der Regulation der Expression eine Rolle spielen.

5.3.2 Deletion von *LmxMPK12*

Von den mit der *LmxMPK12*-Deletionsmutanten infizierten Mäusen zeigten Mäuse aller Klone Läsionen, die jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten entstanden und auch ein unterschiedlich schnelles Wachstum aufwiesen. Ein Unterschied zwischen den Doppel- und den Einzeldelationsmutanten war nicht auszumachen.

Einen Zusammenhang scheint es hier aber zwischen dem Stadium, in dem sich die Promastigoten zum Zeitpunkt der Infektion befanden, und dem Infektionsverlauf zu geben.

Es sind vor allem die metazyklischen Promastigoten, die hochinfektiös sind. Durch biochemische und morphologische Veränderungen werden aus nicht infektiösen, sich teilenden Promastigoten infektiöse, sogenannte metazyklische Promastigote.

Der Anteil an metazyklischen Promastigoten hängt stark von dem Wachstumsstadium der Promastigoten ab. Metazyklische Promastigote sind nur zu einem geringen Anteil in den sich teilenden und in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden Promastigoten vertreten. Ihr Anteil nimmt zur stationären Wachstumsphase hin erheblich zu. (*L. mexicana*: 2% in der Wachstumsphase versus 25% in der stationären Phase). Sowohl für *L. major* als auch für *L. mexicana* konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die mit Promastigoten mit einem höheren Anteil an metazyklischen Leishmanien infiziert wurden, schneller Läsionen bildeten als Mäuse, die mit Promastigoten mit einem geringeren Anteil an metazyklischen Leishmanien infiziert wurden (Zakai, Chance et al. 1998).

Aber auch für verschiedenste andere Leishmanien-Spezies konnte gezeigt werden, dass der Anteil an metazyklischen Promastigoten eine Auswirkung auf die Infektiosität nicht nur *in vitro* hat (Sartori, Oliveira et al. 1997).

Auch wenn dieser Einfluß in den bisherigen Infektionsstudien mit Deletionsmutanten von MAP-Kinasen in *L. mexicana* keine Relevanz hatte, so scheint die Zelldichte der Promastigoten zum Zeitpunkt der Infektion bei den *LmxMPK12*-Deletionsmutanten doch den Infektionsverlauf zu bestimmen. Schon eine geringfügig erhöhte Zelldichte der Leishmanien bei der Infektion der Mäuse verursachte eine deutlich raschere Entwicklung und Größenzunahme der Läsionen.

5.4 Ausblick

5.4.1 Ausblick LmxMPK11

Aufgrund der guten Exprimierbarkeit und der starken *in-vitro*-Aktivität von LmxMPK11 bietet sich diese zum Einsatz in weiteren Kinetests an. Dabei könnte nach der aktivierenden MKK gesucht werden und somit weitere Erkenntnisse über die Signalkaskade in Leishmanien gewonnen werden.

Im Bezug auf die Suche nach geeigneten Zielstrukturen für Hemmstoffe, die als potentielle Therapeutika gegen die Leishmaniose eingesetzt werden könnten, ist dies sicherlich nicht das vielversprechendste Ergebnis. Aber eine verminderte Infektiosität, die es eventuell dem Wirt und Mensch erleichtert, mit dem eigenen Immunsystem gegen die Erreger vorzugehen, schließt die LmxMPK11 als Zielstruktur nicht aus. Weitere Tests sind nötig, um die Funktion der LmxMPK11 genauer zu identifizieren. So können die aus der Mausläsion gewonnen Amastigoten daraufhin untersucht werden, ob sie zur Rückdifferenzierung in der Lage sind. Sollte dies nicht der Fall sein, könnte so der Infektionskreislauf unterbrochen werden.

In einem Makrophagen-Infektionsversuch könnte das Infektionsverhalten auf Zellebene untersucht werden. Jedoch sprechen die Ergebnisse aus der Mausinfektion dafür, dass eine Infektion stattfindet und die Leishmanien auch ihren Weg in die Makrophagen finden, wenn vielleicht auch verlangsamt und in einer verminderten Zahl. Selbst wenn es Kompensationsmechanismen sind, die zu einer Läsionsbildung führen, so werden die Leishmanien dennoch in die Makrophagen eindringen und dort persistieren können.

Es ist unwahrscheinlich, dass die Ursache für die erst spät einsetzende Läsion durch einen Makrophagen-Infektionsversuch zu klären ist.

5.4.2 Ausblick LmxMPK12

Aufgrund der nur geringen Exprimierbarkeit und der schwachen in-vitro-Aktivität der LmxMPK12 muß zunächst die Expression und Aufreinigung verbessert werden, damit die Kinase in Kinasetests effektiver eingesetzt werden kann.

Als Zielstruktur für Therapeutika eignet sich diese Kinase nicht, da zwischen den Einzel- und den Doppeldeletionsmutanten keine Unterschiede im Infektionsverhalten festgestellt werden konnten. Jedoch führt eine Deletion der LmxMPK12 zumindest bei der Differenzierung in vitro dazu, dass sich die Amastigoten nicht mehr teilen, so dass eine Expression während dieses Stadiums zu erwarten ist. Mit Hilfe des inzwischen hergestellten Peptid-Antikörpers gegen die LmxMPK12 sollte untersucht werden, in welchen Stadien die Kinase exprimiert wird, um darüber eventuell weitere Informationen über ihre Funktion gewinnen zu können.

Um sicher sein zu können, dass die Mäuse mit hochinfektiösen Leishmanien infiziert werden und somit am ehesten den in-vivo-Verhältnissen entsprechende Bedingungen vorherrschen, sollte der Anteil an metazyklischen Promastigoten möglichst hoch liegen.

In wie weit die Infektiosität von diesem metazyklischen Promastigoten-Anteil abhängig ist, könnte auch durch die Infektion von Makrophagen untersucht werden. Hier würde sich ein Vergleich mit Deletionsmutanten andere MAP-Kinasen und dem Wildtyp anbieten, um herauszubekommen, ob und welche Rolle die Deletion der LmxMPK12 bei diesem Prozess spielt.

6 Zusammenfassung

Die LmxMPK11 und die LmxMPK12 sind MAP-Kinasen-homologe Proteine in *Leishmania mexicana*. Die Gene beider Kinasen konnten vollständig sequenziert werden und im bakteriellen Expressionssystem exprimiert werden. Ferner konnten Deletionsmutanten erzeugt, und mit diesen eine in-vitro-Differenzierung durchgeführt werden.

Die LmxMPK11 ließ sich im GST-Expressionssystem mit einer hohen Ausbeute aufreinigen und zeigte im in-vitro-Aktivitätstest eine starke Auto- und MBP (Myelin Basic Protein) Phosphorylierungsaktivität bei einer leichten Präferenz für Mn^{2+} -Ionen. Durch Austausch einer Aminosäure in dem aktiven Zentrum konnte eine inaktive Mutante hergestellt werden, die im Kinase-Aktivitätstest keine Aktivität zeigte.

Beide Allele des *single copy*-Gens *LmxMPK11* konnten über gezielte homologe Rekombination durch Resistenzgene ersetzt werden. Somit ist die LmxMPK11 für das Wachstum der Promastigoten in vitro nicht essentiell. Die Deletion des *LmxMPK11*-Gens führt jedoch zu einer Wachstumsverlangsamung der Promastigoten im Vergleich zum Wildtyp und hat auch einen deutlichen Einfluß auf die Differenzierung zu Amastigoten, deren Teilungsvermögen bei den Deletionsmutanten stark eingeschränkt war. Bei der mikroskopischen Betrachtung waren morphologisch keine Unterschiede auszumachen.

Mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen die LmxMPK11 konnte sowohl bei der in-vitro-Differenzierung von Promastigoten zu Amastigoten, als auch bei der Differenzierung von Amastigoten aus der Mausläsion zu Promastigoten gezeigt werden, dass die LmxMPK11 in allen Stadien exprimiert wird.

Bei der Infektion von BALB/c-Mäusen mit den Deletionsmutanten zeigten 2/3 der Mäuse keine Läsionsbildung, die übrigen eine stark verzögerte und verlangsamte Entwicklung. Daraus lässt sich schließen, dass die LmxMPK11 auch einen deutlichen Einfluss auf die Differenzierung von Amastigoten in vivo hat. Die episomale Komplementation führte zu einer Reexpression der LmxMPK11.

Die LmxMPK12 ließ sich nur schwer exprimieren und zeigte nur eine sehr schwache Aktivität im in-vitro-Kinasetest. Auch die LmxMPK12 erwies sich als nicht essentiell für das Wachstum von Promastigoten in vitro und morphologisch waren bei den Deletionsmutanten keine Unterschiede zum Wildtyp zu erkennen.

Doch bei der in-vitro-Differenzierung zeigte sich, dass auch die LmxMPK12 einen starken Einfluss auf das Teilungsvermögen von Amastigoten hat, die nach der Differenzierung nicht weiter wuchsen.

7 Literaturverzeichnis

- Alexander, J., A. R. Satoskar, et al. (1999). "Leishmania species: models of intracellular parasitism." J Cell Sci **112 Pt 18**: 2993-3002.
- Alvar, J., S. Croft, et al. (2006). "Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis." Adv Parasitol **61**: 223-74.
- Awasthi, A., R. K. Mathur, et al. (2004). "Immune response to Leishmania infection." Indian J Med Res **119(6)**: 238-58.
- Barrett, M. P., J. C. Mottram, et al. (1999). "Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmanias." Trends Microbiol **7(2)**: 82-8.
- Bengs, F., A. Scholz, et al. (2005). "LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in *Leishmania mexicana*." Mol Microbiol **55(5)**: 1606-15.
- Bogdan, C. und M. Rollinghoff (1998). "The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion." Int J Parasitol **28(1)**: 121-34.
- Campos-Neto, A. (2005). "What about Th1/Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine discovery?" Braz J Med Biol Res **38(7)**: 979-84.
- Chang, L. und M. Karin (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." Nature **410(6824)**: 37-40.
- Croft, S. L., S. Sundar, et al. (2006). "Drug resistance in leishmaniasis." Clin Microbiol Rev **19(1)**: 111-26.
- Croft, S. L. und V. Yardley (2002). "Chemotherapy of leishmaniasis." Curr Pharm Des **8(4)**: 319-42.
- El-Sayed, N. M., P. J. Myler, et al. (2005). "Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa." Science **309(5733)**: 404-9.
- Erdmann, M., A. Scholz, et al. (2006). "Interacting protein kinases involved in the regulation of flagellar length." Mol Biol Cell **17(4)**: 2035-45.
- Hayashi, M., C. Fearn, et al. (2005). "Big mitogen-activated protein kinase 1/extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway is essential for tumor-associated angiogenesis." Cancer Res **65(17)**: 7699-706.
- Ivens, A. C., C. S. Peacock, et al. (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*." Science **309(5733)**: 436-42.
- Johnson, G. L. und R. Lapadat (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." Science **298(5600)**: 1911-2.
- Kuhn, D. und M. Wiese (2005). "LmxPK4, a mitogen-activated protein kinase kinase homologue of *Leishmania mexicana* with a potential role in parasite differentiation." Mol Microbiol **56(5)**: 1169-82.

- Kyriakis, J. M. und J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." Physiol Rev **81**(2): 807-69.
- McMahon-Pratt, D. und J. Alexander (2004). "Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease?" Immunol Rev **201**: 206-24.
- Muller, I. B., D. Domenicali-Pfister, et al. (2002). "Stage-specific requirement of a mitogen-activated protein kinase by Trypanosoma brucei." Mol Biol Cell **13**(11): 3787-99.
- Murray, H. W., J. D. Berman, et al. (2005). "Advances in leishmaniasis." Lancet **366**(9496): 1561-77.
- Naula, C., M. Parsons, et al. (2005). "Protein kinases as drug targets in trypanosomes and Leishmania." Biochim Biophys Acta **1754**(1-2): 151-9.
- Parsons, M., E. A. Worthey, et al. (2005). "Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: Leishmania major, Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi." BMC Genomics **6**: 127.
- Pearson, G., F. Robinson, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-83.
- Prasad, R., R. Kumar, et al. (2004). "Miltefosine: an oral drug for visceral leishmaniasis." Indian J Pediatr **71**(2): 143-4.
- Salotra, P. und R. Singh (2006). "Challenges in the diagnosis of post kala-azar dermal leishmaniasis." Indian J Med Res **123**(3): 295-310.
- Sartori, A., M. A. Oliveira, et al. (1997). "Metacyclogenesis modulates the ability of Leishmania promastigotes to induce IL-12 production in human mononuclear cells." J Immunol **159**(6): 2849-57.
- Schwartz, E., C. Hatz, et al. (2006). "New world cutaneous leishmaniasis in travellers." Lancet Infect Dis **6**(6): 342-9.
- Widmann, C., S. Gibson, et al. (1999). "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." Physiol Rev **79**(1): 143-80.
- Wiese, M. (1998). "A mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue of Leishmania mexicana is essential for parasite survival in the infected host." Embo J **17**(9): 2619-28.
- Wiese, M., D. Kuhn, et al. (2003). "Protein kinase involved in flagellar-length control." Eukaryot Cell **2**(4): 769-77.
- Zakai, H. A., M. L. Chance, et al. (1998). "In vitro stimulation of metacyclogenesis in Leishmania braziliensis, L. donovani, L. major and L. mexicana." Parasitology **116** (Pt 4): 305-9.

8 Anhang

8.1 Nukleotid- und Aminosäuresequenz von LmxMPK11 und den flankierenden Regionen

1	AGCCTTCTCGCACTCCTTCCTCATACAAACCGCTGGAAGGGACGGTGTACCATTGAAAC	60
61	ATCCACAGCATCCTTTTTTGCTTCAGCATCACGGGATTGTTCCCCATCCCCATCTCCCTC	120
121	CCCTTCTCCCTTTCTCGTGCTTTTCGTTGGGTGATTCCGGTGCCTCCCTCTCGCGATCTACC	180
181	ACGCGGTGTGCTGTGTTTCTTTTCCTTTTGTTTTCCGTTTTTCGGGGGCAGTGTGTGCTC	240
241	TGCTTCTATCTCCCTTGCGGTGTTACGCACACTTACGCGCACGCTGGCAATCCTACGTG	300
301	ACCCACCCCTCCCACCCCGCCAAACACCCAAGGAATCCTCAAGGTTGCCTTCTTTCTTT	360
361	CCTTCGTTCTTGCCCCCCCCGACTCCCCACTCACCTTTACTTTTTCAATATAACACACAC	420
421	GCAGAGGCTCACACTGGCACACTGCATCCATCGCCCTCCCTCTTCCATAAACCTGCACA	480
481	CCCCAAACAGACATACGCACACCCACATTTGTAGACTTGTTCACCCATCCGCGCTACC	540
541	TCGGCCTCCCACCAACGACCCCCCTCCACCACCCCTTCCATCTATTCCCTTGATCGAT	600
601	TCGACGACCTGTTGGTTCTTCTTTGCTCTTCCCGACACCAACACACGCACACGCACA	660
661	CACTTTTTTTCCCTCCCACCATCGCAGCCGTGGTGCGAATTGGCCGACTGGCTTGTGTTT	720
721	TGTGTGTGGGTGTGGGTGCACGCATCGTCGACTCTTATCTGTCTCCCTGCACCCCTTC	780
781	CCCGTCCCTTCGGGCGTAGCTGAGTTTCGAAGTTCGCAGAATCGGTCACTGCAGCTTAG	840
841	TGCGCAACACAGAGATGCGCGCCACCAAGTCACTAGCGGAGCTGCAGGCAGAGGTCTGCC	900
	M P A T K S L A E L Q A E V C R	
901	GCCTGGATGACCGCTACCTGCTGGAGCGCGTCACTCGGCGCCGGTTCCTATGGTGTGTGA	960
	L D D R Y L L E R V I G A G S Y G V V I	
961	TTGCGCGCGGTGACACCAAGAGCGACAACCGCCTCGTCGCCATGAAGCGCGtGAACAAGG	1020
	R A R D T K S D N R L V A M K R V N K E	
1021	AAATCTTTGAGGAGGTTATTCTGGCGAAGCGCATTCTGCGCGAGATCAAGCTGCTGTGCGC	1080
	I F E E V I L A K R I L R E I K L L S H	
1081	ACTTCAATGACGACAACATCATTGGCCTGCGCAACATCCTCACCCCGGAGGACCCAGAGA	1140
	F N D D N I I G L R N I L T P E D P E N	
1141	ACTTTGACCACTTCTACATCGTAATGGATATTATGGAACCGACCTGAAGCAGGTGCTGC	1200
	F D H F Y I V M D I M E T D L K Q V L R	
1201	GCAGtGGCAGGAGCTGACGGAGGCGCACATTCACTTTCATCTACCAGGCACtGCGTG	1260
	S G Q E L T E A H I Q F F I Y Q A L R A	
1261	CGTGTCACATTATTACAGCGCCGGCGTCACTCCACCGCGATATTACGCCGGCGAACATT	1320
	L H I I H S A G V I H R D I T P A N I L	
1321	TGGTGAACACGAACTGCGACTTGAAGATTTGTGACTTTCGGCCTGGCGAAGGAGGAAAACG	1380
	V N T N C D L K I C D F G L A K E E N D	
1381	ATCAAGGCGAGTACATGACGGACTACGTGACAATGCGCTGGTACCGTGCGCCGGAGTTGG	1440
	Q G E Y M T D Y V T M R W Y R A P E L V	
1441	TGATGGAGGACAAGGATTACTCGGCGCAGATTGATGTGTGGGGCATCGGCTGCATCCTCG	1500
	M E D K D Y S A Q I D V W G I G C I L G	
1501	GCGAGCTACTCGGCTCTCGGCCGCTCTTCCAGGGGAAAGACCGGGTGAACCAGTTGGACA	1560
	E L L G S R P L F Q G K D R V N Q L D K	
1561	AGATAGTCGATGTGATCGGTACGCCGTCTGAGGAGGACATCAACTCCGTAGGATCGTCTG	1620
	I V D V I G T P S E E D I N S V G S S A	

1621 CTGCGCAGAAGTACCTCAAGAAGAAGAGTCACCGACCGCAAGCTGACTGGCGGCAGCGCT 1680
A Q K Y L K K K S H R P Q A D W R Q R Y
1681 ACCCAAAGGCGTCTTCGGAGGCGCTCGACCTGCTGCGCCGCATGCTGGTCTTCAACCCGA 1740
P K A S S E A L D L L R R M L V F N P K
1741 AGCGGCGAATCACGGTGCTGCAGGCGATGCGTCACCCGTTCCCTGGTGCAGCTGCACGACG 1800
R R I T V L Q A M R H P F L V Q L H D D
1801 ACGCAGATGATAACATCAGCTACACTCTCTTCCGCTTTGACGAGAACGAGCAAAAGACGA 1860
A D D N I S Y T L F R F D E N E Q K T I
1861 TAGTGATGTGAAGCGCGCCATCTACCAAGAGAGTGTCAAGTTTCACAATGAGCATCCAT 1920
V D V K R A I Y Q E S V K F H N E H P S
1921 CCTCGATGCGGGCAACGACCATGTACAGCGCCTTCAACACCCCGAGCGTGGCCGACCGA 1980
S M R A T T M Y S A F N T P S V A A P S
1981 GCGTGGAACAGAGGGGCGAGGGCCGCTCGGGCAGCAGACGATTGAGAAGAACATCCCAG 2040
V A T E G E G R S A Q Q T I E K N I P E
2041 AGAACGCGGGAGACGGCAATTTTGACCGTGATCAGGTCTGAAACGACTAACGTCCACGTG 2100
N A G D G N F D R D Q V *
2101 TAAAGAAGGGAGAGTGACGCGCAACACAAAGAGGGGCGAGAGGGAGCAAGTGGAGACGCA 2160
2161 CCGGATGTCCAGGAGCAGAGGTGAGGGCGCCGAGCAAGAGAGAGAGGGGGGAATAAAG 2220
2221 CAAGCTACCCATCTTGCATGATAAATGCTGTTACTGCTTTTTTGGTCTCTCTGGCGTCCCTC 2280
2281 TTTTGCAGTTTGTCTTCTCTACCACCCTTTTGTCTTGTCTCAGCTCCACTTCTTGACAC 2340
2341 GCTCTCACAAACATTCGCGACCAGGAGAGAAGGAGCGAGGAGAAGGGAGGCATGGACGGGA 2400
2401 GACGCGGAATGCTCTGTAAGATGAGAAAAGAAGAGCGTAGCGCGCATAACACACACGCAC 2460
2461 ATCCACAGAGAGAGCGAAGACACTCGAAGCCATCACCTGCCCTGTCTCATGAGGGCCGCTA 2520
2521 TGCATATATATATATATATGCCGTTTGTCTTTATGTTTTGATACCGTTCCCTGTTTTTATTTGG 2580
2581 GAGTGACGTCGTCTCCCTCCCTCCACCCACCCGCTGTCTCTCCCTCGTGTCTCTCGT 2640
2641 CCCCCGCATCATGATGGAGTGACTTTGTATTGTCGTTCCCTCTATAGTTTTTTTTTTTTCA 2700
2701 GAATTATCAGTTCCTCCTCCGCTTCTTTGCTTTCCAAAAAAAATGATGAGAGGTTGTA 2760
2761 AAGGCGTCTCACCGTATCTTTCTTTGTTCTCGACACTGATGGAAGTGTGCTCTCCCCC 2820
2821 CCTCTCACCCACTCACCCACACACACACAGCCTATGAGAACGCGGAGCGTAAAGGAAG 2880
2881 GTTGTGTGTAGCCGTCGCGTGTTTTATCAGATTTGCCTCTGCCCTTTGTCCGCACCCCA 2940
2941 CCCCCTCCTCTTCTTCTCCTATCTGCCCCCCCCGCTCCTCCCTCCCTCCCCCATATGG 3000
3001 GCATCACTGGCCTTACCTCTTTCTTTTCTCACGGTCTCTCTCTTCGGTGGTGTGGTG 3060
3061 TGGTGCTCCTTACAGATGCGTTACTTTTCAAGTTCGCTTTGTAGGTCACTAGTGAGGCAC 3120
3121 CTTTGTATATATATATATATATATGTTTGGGTGTATGCACATGTGTGTGGGTGTTTGTAGTG 3180
3181 GTGATAGTGTCTGTGCTTGTCCCTTGGAGCGGCTTGTTTGTGTCTCCTCTGAAACGCTGT 3240
3241 CTCTTCTCTCGGTTCACTCGCTCCCTTTTCTTGAATCATATTTTTTCTCTCTCCGCC 3300
3301 TCCCTTTCATCTCCCTCCTCTACTCTTCTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTATGCGTGT 3360
3361 CGTTTTCTCGCCGGTATTGTGTTGGCGCAACCTTCACTGTGGTGTATGTAATCTTTTCGTT 3420
3421 CCACACCGCCTCTCTCTATGTGATCGAGCACTGCCTCAACAAGTTCTGTCTCCTCCTATG 3480
3481 CATTAAATATAGATGTGTGTGTGTGTGTG 3508

Untersrichen: nur DNA-Einzelstrang sequenziert

8.2 Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *LmxMPK12* und den flankierenden Regionen

1	<u>TCGATGTCGTGCGCCGAGTGTGTGTATGCGTGTGCGTGTGTGACAACCTGAAGAGAGCAG</u>	60
61	<u>CAACGACAGCGGCAGCAGCAGAGAAGGAGAGCTGTGGAAGCAAACGCGGGGTGGAGCACC</u>	120
121	<u>TGTGAGCCTGCGTGTGTGTGTGTGTGTATGTGTATGTGCCAGCGGGCTGGTTTCGATC</u>	180
181	<u>ATGCTGTCGTGCGCCGTGGCTGTTGATGTTCCGGCTTGCTCTTTTTTCCCTTTCCTTGATCG</u>	240
241	<u>ACTCGTTTCGCTCCCTCCCTTTGTGTGCGTGCACATGTGGGGGTGCGTGTGTGCCCGCTG</u>	300
301	<u>TAGCTACATTCCTTTGCTCTTTTTTTTTTGTCTCTCTCTCTCTCTTCATCTGTGCCCGTG</u>	360
361	<u>TCTCCATCAACTCGAAGTATAAAGAATTTATCCAGGGCTGAACCTGATTCAACGCCTCCA</u>	420
421	<u>ACTCTTCTCTTTTGC GGAGAAATGGAACACGCAGACACACACGCGCGCACGAAAAGCGAA</u>	480
481	<u>TACAGACGACCACAGACCCCGCCCCACCCCTCTCCGCCCTCTCGATCTTCCATCTATGCGC</u>	540
541	<u>ATGCAAGTGCACAGTGTGACGCGGCACTGGCTTACGGGCGAGTGCAGGCTCACTCAGCT</u>	600
601	<u>GGTTGTGAAAAATGTGCACCAGTGC CGCTGCTCGAGTACGTGCACGTGTGTGTGTGTTC</u>	660
661	<u>CATCGTGTCTTTGCCCAACGCCTGCCTGTCACTGCTTTTTCATCTGGCTGCTTTGTTGTGT</u>	720
721	<u>TCGAAGCGCCTCAATGAGCCCGTGCACCACCGTGTGGCAGTGCCCATAGCAGAGAGGGAC</u>	780
781	<u>GGGAGGGCACACTACGAGGGCCACGACTTCTCCTGTGGTCTCTTGCGCCATCACGAATGA</u>	840
841	<u>CGTCCCTTTCTCTTGTFTTCACCTCTCCGTACCCCTTTGCGCGCCCTCTCTCCTCCCC</u>	900
901	<u>ACGCACAGGTGCGCGTATCTGTGCAAGCAGGAAGGCACACACACACACACACACAGAC</u>	960
961	<u>ACCTGGGCGCATATAAAACGTGTGCGAGCTAACCTGAACGCTGAGCGGAGAGGCAACACA</u>	1020
1021	<u>TACGTACTCGCGATGCGCCAGCGGGAGGAGAGAAGAGACAAGTACACGTGTGGATT</u>	1080
1081	<u>CCGTGCGGCACGCGCCGCGCCCTCGCCCTCCCTCTCAGCCATTCCGCATTCTTCTCAC</u>	1140
1141	<u>GTGTTGCCTCTGTGCGCCATATATAGGGCGATAGTGTGAGGCTGCAAGTGCACACGACAAG</u>	1200
1201	<u>CGAGTCGAGAGCGCAGAGGAGGGATAGCTACAGCGATTACCCGGGATCGGGGACAGTGGG</u>	1260
1261	CGGCGATGATACTCACGAAGGTGGAGGGCCCTAATGCGGCTGGCAACAAGGTTTACGTCT	1320
	M I L T K V E G P N A A G N K V Y V F	
1321	TTGGTGTGAACGACTATCGCCTTGAGGTACCAGAGTGC TACAATGTTCAACACTTTGTTG	1380
	G V N D Y R L E V P E C Y N V Q H F V G	
1381	GGCGTGGCGCCTACGGCTTTGTGTGCAGCGCTGTGGACACGGTGACGAATGAGCCAGTGG	1440
	R G A Y G F V C S A V D T V T N E P V A	
1441	CGATCAAGAAGGTGACGCACCTCTTCGACGATGCCGTGATGCAAAGCGCGTCTGCGAG	1500
	I K K V T H L F D D A V D A K R V L R E	
1501	AGGTGAAGCTGTTAGCCTATCTCAATCACCCGAACATCCTCTCCCTCAAGGACCTCTTCA	1560
	V K L L A Y L N H P N I L S L K D L F K	
1561	AGTCACCGGACCCGGTTCGACACGTACAGCGAGCTCTACGTTGTGACCGACTTGATGGAGT	1620
	S P D P V D T Y S E L Y V V T D L M E S	
1621	CGGACATGGACGCCGTCTGCGTTCCCCACGGATCCGTCTCGCCGCCGGGCACGGACAGT	1680
	D M D A V L R S P R I R L A A G H G Q Y	
1681	ACTTCACCCTTCAGTTGCTGTGCGCACTGCAATATATTACAGTGCGCATGTGCTGCACC	1740
	F T L Q L L C A L Q Y I H S A H V L H R	
1741	GAGACCTGAAGCCGGGAAACCTGCTGACAGACTCGGAGTGCAACCCTTAAGCTGGGCGACT	1800
	D L K P G N L L T D S E C N L K L G D F	
1801	TTGGCCTCGCGCGCGGTATCGGGCATGACGACACCATGACACAGTACGTGTTACGCGGT	1860
	G L A R G I G H D D T M T Q Y V F T R W	
1861	GGTACCGGCCACCAGAGTTGCTGCTGGTGTGCAAGCACTGCAGCTACAGCGCTGACATGT	1020
	Y R P P E L L L V C K H C S Y S A D M W	
1921	GGGCTGTGGGATGCCTTGCGGCGGAGATGTTACCGGCAAGCCGCTCTTCCCTGGCAAGG	1980
	A V G C L A A E M F T G K P L F P G K D	

1981 **ACTACATCAACCAGATCAACCTCATAGTGGAGTTATTAGGCATACCGGACCTTGCACGTG** 2040
Y I N Q I N L I V E L L G I P D L A R D

2041 **ACCTACCGCCGAGCACGTCAAAGGAGGCGGTACACTACCTCTCCTCCCTGCCCCCTAGCA** 2100
L P P S T S K E A V H Y L S S L P P S K

2101 **AGGGGAAGAAGCTCGAGGAGTACGCACCGGAGCTGCGGCATCGCTTTGACGAGACCACCT** 2160
G K K L E E Y A P E L R H R F D E T T F

2161 **TTTACGACAGCTTCGACACGGAGTTAGAGGAGGCGATCGCTGCGGATGGCGCCACCATCG** 2220
Y D S F D T E L E E A I A A D G A T I A

2221 **CCCCCCTAAGCCACGCCCGCCGGAGGAGTACTACGCCGAGTTTCGTCGACTTCATCTTTG** 2280
R P K P R P P E E Y Y A E F V D F I F G

2281 **GACTGCTTCGTTACAACCCCGTGAAGCGGCGCACGGCGAAAGAGTCCATAGCGCATGCGT** 2340
L L R Y N P V K R R T A K E S I A H A W

2341 **GGCTGTGCGACGTGCGCGGTCCACAGGAGACCATTGGCGGCTGCGAGGCGGAGCGAATAT** 2400
L S D V R G P Q E T I G G C E A E R I Y

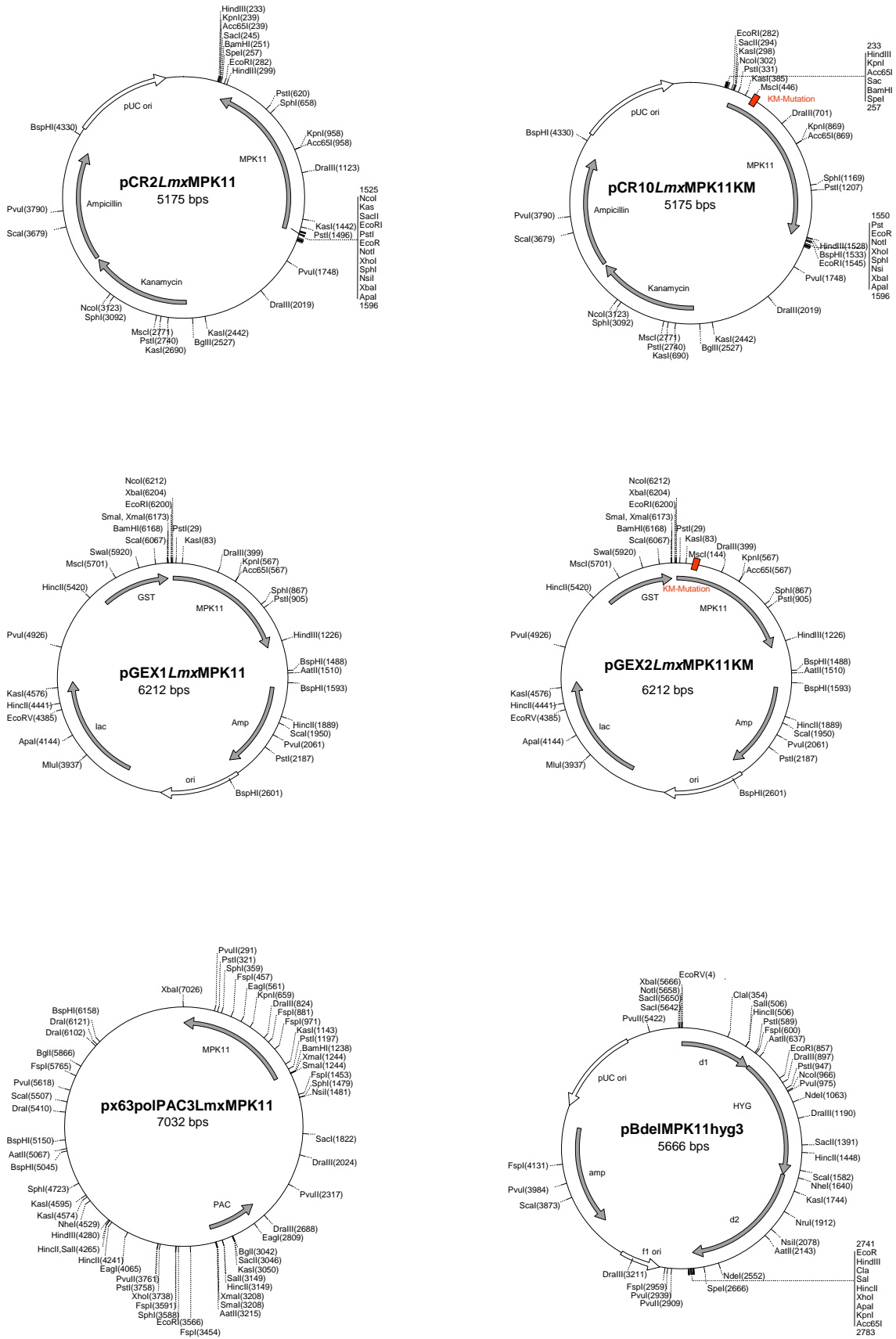
2401 **ACCGTTGGGATGCCGACGGCACCGCTTTCACCATCCCGCAACTTCGCCAACTGTTTCATAG** 2460
R W D A D G T A F T I P Q L R Q L F I D

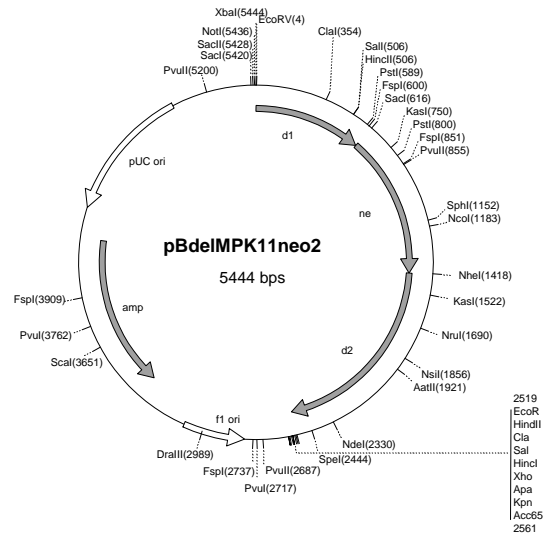
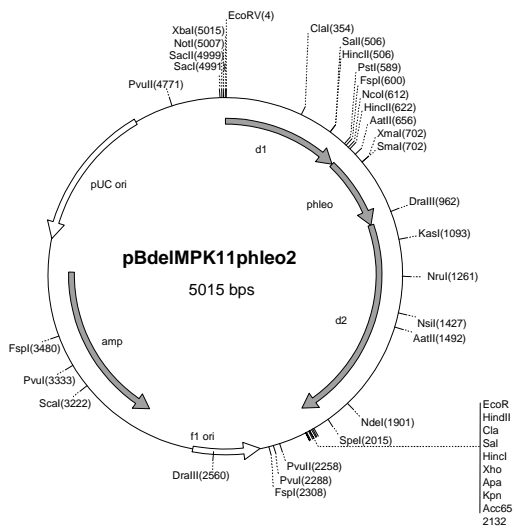
2461 **ATGAGATCGAAAAGTTTGCGTCAACCCGGCGCAACTGAGCGCCATCGAGGCTTTCGATGC** 2520
E I E K F A S T R R N *

2521 GCGCACGCCGATCCCGGTGACAGTCCGTTGGGACGGAGCGTTTGTATGGTGGAGGCGCTGGA 2580
2581 GCAAGCGCTTGTGCAGAGAGAGAGCGAAAGGGGTGATGTGGGATGGCATATATTTGCTG 2640
2641 GGGGGTGAAGCGAGGGGGGGGAGCTGGAGGGGTGAGGGTCATCAGCGCCTTCTCCACA 2700
2701 CCCCTCTCTCCATCTTTGTCTTTCTTTTTCTCGCTATGCTTCACTGCGGATGTCGGTCTG 2760
2761 TTGCTGCTATCCGTGATGGCTTTCGTCGTCGTCACCTCTGCGCACTTTTTCAAGTTGTC 2820
2821 ACTCCACGGCCGCTTTCCTGCGACATTAACCTCTCCCGATCGACAAGCAAGAGCGCAGGA 2880
2881 GGAGGCGAACCTTCATCATCGCTTCCCGTATCTCAGCCACTCGTTTCGTGTGCGCCTTGTG 2940
2941 CGTTTTCTTTGGTGTTTTCGGCGCAGACCGTTGTGCGTCTCTCTCTGTGCTGCCGTTG 3000
3001 TCGATGTTGCTGCAATTTCTTCCAGCCTCCCCATTTCGCTACACCCTTCCCCTTGCCTT 3060
3061 GCTCGCTCGCCCTTCTGCGGTTGACCCAAATTCCTGCATCCGTTTGTGTGGCGACTTCAT 3120
3121 GTGCGCTTTTATATTTGTGTGCCGCCGCCCTGTGTGTACCTCTCTCCCTCTCTTCCGTTG 3180
3181 TCCGGTTTGTATTCCTGGCGTTCTACTGCGATGCAACACACCCCAAGTGTGTCCCTATCC 3240
3241 GACGAGCACATATGTATTTTGCCGTTCCGCCACTTGTTCCTTCTGCGCCCTCTCCTCTCC 3300
3301 TCTCCTTTCCTCCGCTTTCCTCTCTGTCCTCTGTGCCCTCCCCTCGCGCAATGCACGCATGCT 3360
3361 TGCAGCTGTGCGCACGTGCGTCTCTTCGCGAGGGGAGTGGGGGGGCATAGGGATGGTC 3420
3421 GGCTGGGGCAGAGAGGGAGAGAGAAGGGGGCAGCTGAAGGAAGGGAGGACACGAAAAAAT 3480
3481 GTGCGCGCCCATGTACTCCACAGCAACAACAATTTTTGCACAGGCGCTTGCCGTTTTCTC 3540
3541 TCAAGCGATCCCTCCCCCTTAACCTGCCGTTGCCCGAACCTTCAGTGAGCGGCTCTGG 3600
3601 AGTGATGAGGAGGGACGGCAGATACTCACCGCCGTTCCATCTTTTCGCTCTCTGCATGCC 3660
3661 TCTCGCTTCTTCGCGGATGCACTCTTCTCAACTTCGCTTCTCCCTTCATGTCCTTACT 3720
3721 GATCCGAATTCGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTCGCGGGCCGCTCTAGAACTAGTGGAT 3780
3781 CCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGC 3840
3841 CCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTA 3900
3901 CAACGTCGTG 3910

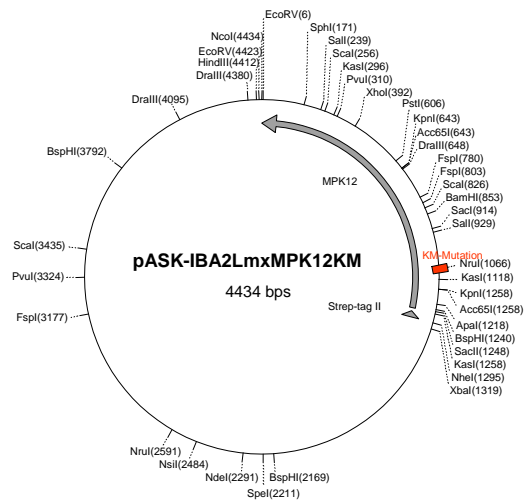
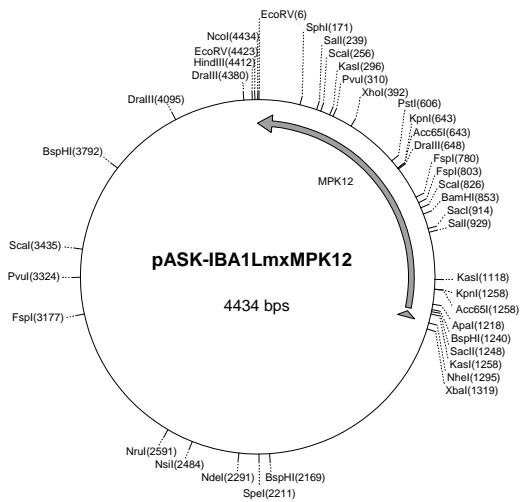
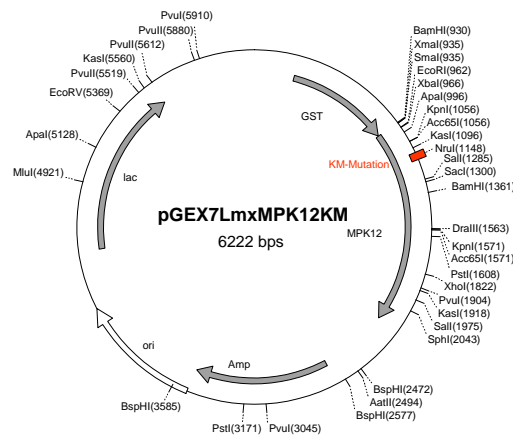
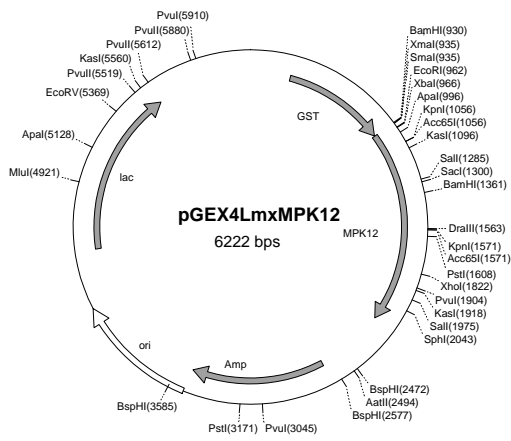
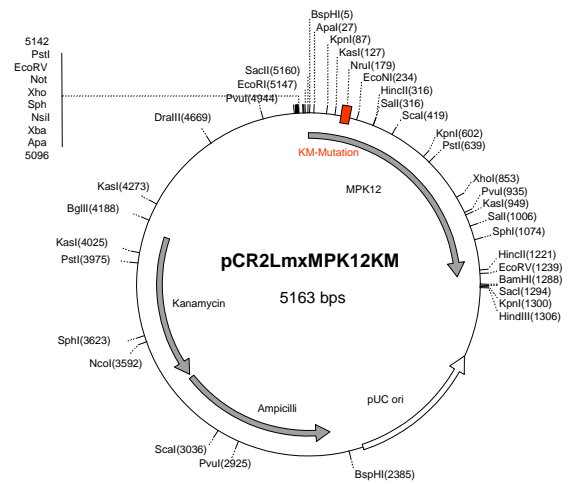
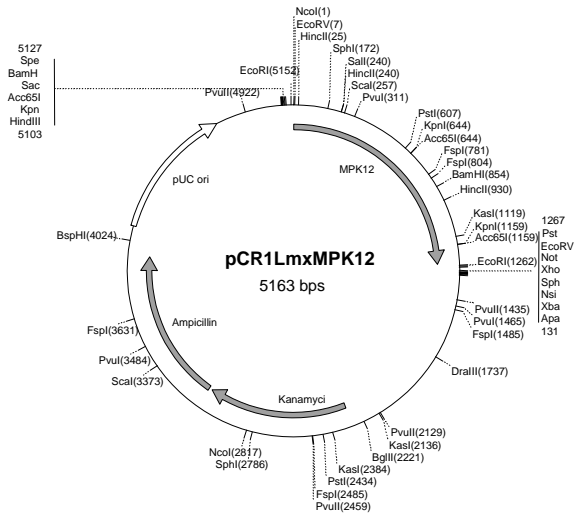
Untersuchen: nur DNA-Einzelstrang sequenziert

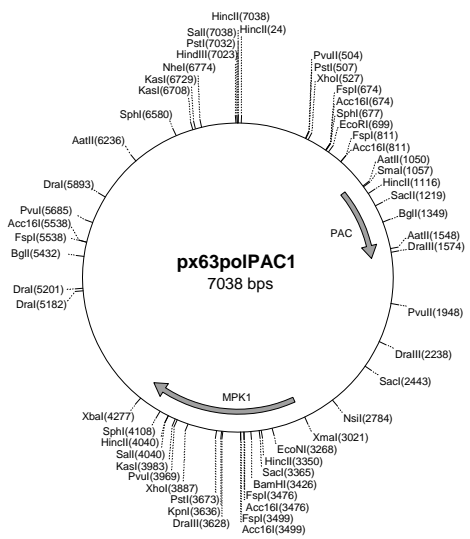
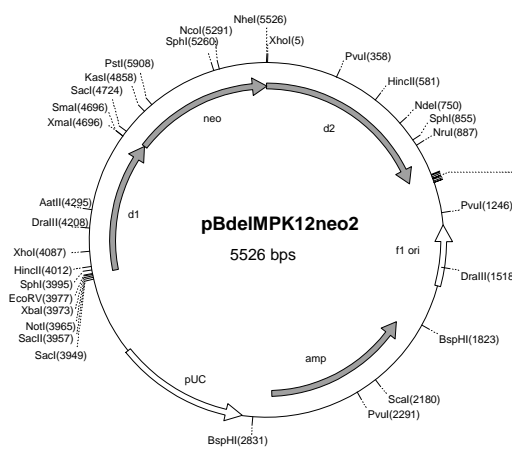
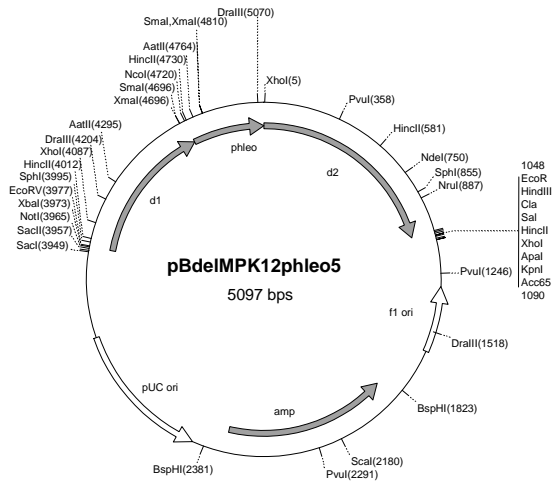
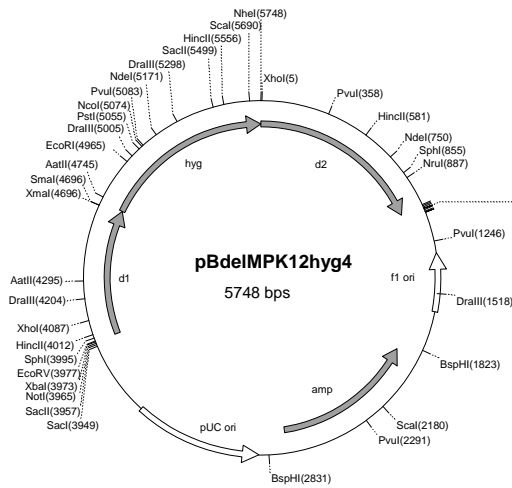
8.3 Plasmidkarten *LmxMPK11*





8.4 Plasmidkarten *LmxMPK12*





8.5 Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener MAP-Kinase-Homologen

8.5.1 LmxMPK11

LmxMPK11	M	PATKSLAELQ	AEVCRLDDRY	LLE-RVIGAG	SYGVVIRARD	TKSDNRLVAM	KRVNKEIFEE
LmjMPK11R.....I.....
TbMPK11	MN	RSSRN...M	D.INQ....	K..-KI....-TT.D...I
TcMPK11	MS	HQIR..S...E	.NS..S...V	..-KI....I.....	LN..E...L
CrMPK (28)	VTASGKLD	SY NREYNQFLVC	GSLFECPAK	..-PIKP..K	A...CS.KN	LDNQEK-..I	.KIANA-.DN
DdMPK (120)	PPPTS	SDTSNF N-DNISYFVY	GSQFTVPR..	-SIVKC..H	A...CS.K	NLTGK-..I	.KIS.A-.DN
AtMPK4 (12)	QSSSKGVATH	GGSYVQYNVY	GNLFEVSRK	VPPL.P..R	A..I.CA.TN	SETGEE-..I	.KIGNA-.DN
MmMPK (14)	PRGTAGVVPV	VPGEVE-VVK	GQPFVGP..	TQ-LQY..E	A..M.SS.Y	HVRKT-..I	.KIS-P-..H
				I		II	
	61						130
LmxMPK11	VILAKRILRE	IKLLSHFNDD	NIIGLRNILT	PEDPENFDHF	YIVMDIMETD	LKQVLRSGQE	LTEAHIQFFI
LmjMPK11A.....K.....
TbMPK11	I.....	...A..HH.LI.	A.RD.Y.Y.V....T..S	...G...Y..
TcMPK11	M.....V....	...F...E	...A.....	..L.S.D....E.....T....	...V....
CrMPK	..D...T...	...R.LQHE	..VQIKD.IP	.TNRDA.KDL	.V.YEL.D..	.H.II..P.A	.SND.S.Y.L
DdMPK	LKDT..T...	.H..R..KHE	.L.SIKD..K	.NSK.Q.EDV	..SEL.D..	.H.IIT.P.P	.SDD.C.Y.V
AtMPK4	I.D...T...	...K.MDHE	.V.AVKD.IK	.PQR...NDV	..YEL.D..	.H.II..N.P	..DD.CR..L
MmMPK	QTYCQ.T...	.QI.LR.RHE	.V..I.D..R	APTL.AMRDV	...Q.L....	.YKLLK.Q.-	.SND..CY.L
		III	IV	V		VIa	
	131						197
LmxMPK11	YQALRALHII	HSAGVIHRDI	TPANILVNTN	CDLKICDFGL	AK---EENDQ	GEYMTDYVTM	RWYRAPELVM
LmjMPK11
TbMPK11	..I.H..NF.	..S.....K.S.---	..S...H.....
TcMPK11	..I.H..KY.	..T.....Q.R	..N.....
CrMPK	..L..G.KV.	..NIL...L	K.S.L..A.RTSTS--	NE K.F.E..VTLL
DdMPK	..M..G.KH.	..N.L...L	K.S.L.I.ED	.L....L..	.RVEDA--TH	QGF..E..ATVIL
AtMPK4	..L..G.KYV	..N.L...L	K.S.L.L.A.	..LG....	R--TK--SE	TDF..E..VTLL
MmMPK	..I..G.KY.	..N.L...L	K.S.L.I..TRIADP.H.H	TGFL.E..ATIML
		VIb		VII		VIII	
	198						267
LmxMPK11	EDKDYSQAID	VWGIGCILGE	LLGSRPLFQG	KDRVNQLDKI	VDVIGTPSEE	DINSVGSAA	QKYLKKKSHR
LmjMPK11V....SVGSSAA
TbMPK11	..R.....	..V.S....	..A.....I.....SIGSTAAF.
TcMPK11	..N.....	..V.S....R.....	IE.....	..KSLGSLPA	..R..ET.
CrMPK	SCSG.TTA..	..SV...FA.	..RK...P.	..Y.H..SL	TK...S...	ELGFITSEKA	KR.IRSLPRS
DdMPK	SWNK.TKA.	I.SV...FA.	..RK...P.	..YIH.ITL	IET..S...	.CNIANEQA	RQFIRNMGNQ
AtMPK4	NCSE.TA..	I.SV...A.	TMTRE...P.	..Y.H..RL	TEL..S.DDS	SLGFLRSDNA	RR.VRQLPQY
MmMPK	NS.G.TKS..	I.SV...A.	M.SN..I.P.	.HYLD..NH.	LGIL.S..Q.	.L.CIINMKA	RN..QSLPSK
		IX		X			
	268						336
LmxMPK11	PQADWRQRYP	KASSEALDLL	RRMLVFNPKR	RITVLQAMRH	PFLVQLHDDA	DDNISYTLFR	FD-ENEQKTI
LmjMPK11P.....	..H.....E.....L.....
TbMPK11	..AP..ASV..	R..P.....H.DK	..AE.LK.	..RD.YEES	.VQV.IQHFN	..-TOH...
TcMPK11	..PL...AK..	..E.....	K...H.DK	..DE.L..	..AE.Y.EQ	YET.NIP..S	..-Q...V
CrMPK	ERV.FG.LW.	HVTKT...I	DK...D.TK	..E..LE.	.Y.AS...VS	.EPVCP.P.T	..FDS.HL.P
DdMPK	.KVNFA	NMF..NPD.I..	E...Y.D.SK	.L..EE.LA.	.YFQS...PS	.EP.CLHK.S	LNF.AWDLNR
AtMPK4	.RQNFAA.F.	NM.AG.V...	EK...D.S.	..DE.LC.	.Y.AP...IN	EEPVCVRP.N	..F.QPTL.E
MmMPK	TKVA.AKLF.	.SD.K.....	D...T..NK	..EE.LA.	.Y.E.YY.PT	.EPVAEEP.T	..M.LDDLPK
			XI				
	337						403
LmxMPK11	VDVKRAIQE	SVKFHNEHPS	S-----MRA	TTMYSAFNTP	SVAAPSVATE	GEGRSAQQTI	EKNIPENAGD (8)
LmjMPK11	M.....K.DVAE (8)
TbMPK11	QE..W.V.D.	..A..KN..R	TAPRPQQQOH	---SAQQPAA	AASL.T.DIA	..W.....	.RGE-.EC.A (11)
TcMPK11	H...K.V.E.	..M..EKY.K	TAPRHRQLQH	QQQQQQQQG	GS.L..MDVTR..	.RDNV.DVDN (10)
CrMPK	DV.REV.L.D	MAEL.T					
DdMPK	DLL.EL..N.	MLAY.P.D.Q	APYYTDLNPN	NFNL.RIQSS	.ELFNLLQQQ	KQQIHQ.VNQ	QSIKN
AtMPK4	..F.QPTL.E	ENI.EL..R.	T...NPQDSV				
MmMPK	ERL.EL.F..	TAR.QPGA.E	GP				

Punkt (.) : Übereinstimmung mit der LmxMPK11-Sequenz; Bindestriche (-): Lücken, um den bestmöglichen Sequenzvergleich zu erhalten; I-XI: typische Subdomänen der MAP-Kinasen


```

322
LmxMPK12 KPRPPEEYYA EFVDFIFGLL RYNPVKRRTA KESTIAHAWLS DVRGPQETIG -GCEAERIYR WDADGTAFTI
LmjMPK12 R.H..... C...A.....
TcMPK12 DG.NG..R.. L.K..L.R.. M...KE.M.. .AL..P..R E..ANCGGKE FET..GEQFF .EF.S.ELSA
TbMPK12 IA AAA .KE. . L.K..LLK. . . . .KE.M. . A.AVT.P..R .I.KKC.DE. LEIQPSNRFH .NF.SAE..E
PcMPK ----- .LLEKM. IFD.NR.I.V D.ALC.PY.A ALHDIN.EPV CPR--PFSFD FE--OPTC.E
CrMPK ----- .L.DKM. VFD.T..I.V EQALE.PY.A SLHDVSDEPV CPT--PFTFD F.--SEHL.P
CaMPK ----- .LLEK.. IF..A..I.V EDALK.PY.Q LYHD.NDEPI SDKIP.DFFD F.KMKDQL..
PcMPK ----- .LLEK.. AF..A..V.. E.ALQ.NY.E PYHD.DDEPT APPISPSFFD F.RIKDSL.K
DdERK ----- .LLERM. YFD.S..L.V E.AL..PYFQ SLHD.SDEPI CLH--KFSLN FE--AWDLNR

391 410
LmxMPK12 PQLRQLFIDE IEKFASTRRN
LmjMPK12 .....G.....SS
TcMPK12 V.....LMN. .I.YNE
TbMPK12 .V..AVMKA.. .AD.SA..R
PcMPK ENIKE.IWK. SV..NPDPIL
CrMPK DVV.EVILQD MAELHT
CaMPK ED.KK.LYE.. .M.PL
PcMPK ND.KI.IYK.. .MSMNN
DdERK DL.KE.IYN. MLAYHPEDPQ (47)

```

Punkt (.): Übereinstimmung mit der LmxMPK11-Sequenz; Bindestriche (-): Lücken, um den bestmöglichen Sequenzvergleich zu erhalten; I-XI: typische Subdomänen der MAP-Kinasen.

Lmj: Leishmania major, Tc: Trypanosoma cruzi, Tb: Trypanosoma brucei, Pc: Petrosilium crispum
Cr: Chlamydomonas reinhardtii, Ca: Candida albicans, Pc: Pneumocystis carinii, Dd: Dictyostelium discoideum

Homologe Kinase	Identities	E-value
L. major MPK12	392/408 (96 %)	0
T. cruzi MPK12	216/427 (50 %)	1e-110
T. brucei MPK12	200/417 (47 %)	2e-99
P. crispum MPK	128/274 (46 %)	9e-66
C. reinhardtii MPK	131/277 (47 %)	4e-63
C. albicans MPK	148/381 (38 %)	4e-60
P. carinii MPK	137/348 (39 %)	7e-60
D. discoideum ERK	130/343 (37 %)	1e-59

Tabelle 8.2: Homologien zur LmxMPK12

9 Danksagung

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Martin Wiese für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe am BNI und der zur Durchführung der Arbeit benötigten Mittel sowie für die hilfsbereite und engagierte Betreuung der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Fleischer möchte ich mich für die Übernahme der Betreuung sowie die Tätigkeit als Gutachter bedanken.

Allen Mitarbeitern aus Labor 3 danke ich für die nette Zusammenarbeit.

Bei Frau Anne McDonald und Frau Christel Schmetz bedanke ich mich für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Leishmanien.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Mareike Windelberg
Geburtsdatum	05.07.1978
Geburtsort	Hannover

Schulbildung

1985-1991	Freie Waldorfschule in Hannover
1991-1998	Kaiser-Wilhelm-Gymnasium Hannover

Studium

1998-2005	Medizinstudium an der Medizinischen Universität zu Lübeck
-----------	---

Dissertation

2005-2006	Molekulare Charakterisierung der MAP-Kinasen LmxMPK11 und LmxMPK12 aus <i>Leishmania mexicana</i> bei Prof. Fleischer am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg
-----------	---

Hamburg, Juli 2006

Mareike Windelberg

11 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Name und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, Juli 2006

Mareike Windelberg