

Interagierende Proteinkinasen
in *Leishmania mexicana*, die an der
Regulation der Flagellenlänge
beteiligt sind

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Departments Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Anne Scholz

Hamburg, März 2008

Gutachter:

Priv.-Doz. Dr. Martin Wiese

Prof. Dr. Ulrich Hahn

Tag der mündlichen Prüfung:

30. Mai 2008

Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.

Galileo Galilei, 1564-1642, italienischer Physiker und Astronom

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Leishmanien und die von ihnen verursachte Krankheit	1
1.1.1 Taxonomie	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Krankheitsbilder	2
1.1.4 Therapieansätze	3
1.1.5 Lebenszyklus	4
1.1.6 Genetik der Leishmanien mit deren Besonderheiten	7
1.1.7 Das Flagellum	9
1.2 Signaltransduktion in höheren Eukaryoten und in Leishmanien	10
1.2.1 Proteinphosphorylierung und Proteinkinasen	11
1.2.2 Die MAP Kinase Kaskade	13
1.2.3 Signaltransduktion in Trypanosomatidae	14
1.3 Bisheriges Wissen über LmxMKK und Aufgabenstellung	17
1.3.1 LmxMKK - Kenntnisstand	17
1.3.2 Aufgabenstellung	18
2. MATERIALIEN	19
2.2 Geräte	23
2.3 Verbrauchsmaterialien	23
2.4 <i>E. coli</i> Bakterienstämme	23
2.5 Leishmanien	24
2.6 Versuchstiere	24
2.8 Oligonukleotide	24
2.8 Plasmide	25
2.9 Phagenbank	26
2.10 Antikörper	26
2.11 Enzyme	26
2.12 Molekularbiologische Kits	26
2.13 DNA- und Proteingrößenstandards	27
2.14 Kulturmedien	27
2.14.1 Medien für Bakterienkulturen	27
2.14.2 Medien für Leishmanienkulturen	27
2.15 Puffer	28
3. METHODEN	31
3.1 Zellbiologische Methoden	31
3.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	31
3.1.2 Kultivierung von <i>Leishmania mexicana</i>	31
3.2 Molekularbiologische Methoden	32
3.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien	32
3.2.2 Transformation von <i>E. coli</i>	33
3.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	33
3.2.4 Transfektion von Leishmanien	34
3.2.5 Isolierung genomischer DNA aus Leishmanien (Medina-Acosta and Cross, 1993)	34
3.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung	35
3.2.7 Reaktionen mit DNA-modifizierenden Enzymen	35
3.2.8 Phenol-Chloroform-Extraktion	36
3.2.9 Ethanol-Fällung	36
3.2.10 Agarosegelelektrophorese von DNA	36
3.2.11 Gelextraktion	36
3.2.12 Oligonukleotid-Mutagenese	37
3.2.13 In vitro-Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch PCR	37
3.2.14 Klonierung eines PCR-Produktes mithilfe des TOPO TA Cloning® Kits	38
3.2.15 Sequenzierung von Plasmid-DNA	38
3.2.16 DNA-Markierung mit Digoxigenin (DIG)-dUTP	38
3.2.17 Southern Blot	38
3.2.18 Durchsuchen einer λ DASH II-Phagenbank	39
3.3 Rekombinante Proteinexpression und -aufreinigung	42
3.3.1 Proteinexpression	42
3.3.2 Proteinaufreinigung	42

3.3.3 Thrombin-Spaltung.....	43
3.4 Proteinchemische Methoden.....	43
3.4.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	43
3.4.2 Färben von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen.....	43
3.4.3 Trocknen der Gele.....	43
3.4.4 Immunoblot.....	44
3.4.5 Aufreinigung von Phosphoproteinen aus Leishmanien-Lysaten.....	45
3.4.6 Proteinbestimmung nach Bradford.....	45
3.4.7 Bestimmung von Phosphorylierungsstellen durch MS/MS.....	45
3.5 Aktivitätstests mit rekombinant exprimierten Proteinen.....	45
3.5.1 Kinase Aktivitätstest.....	45
3.5.2 In vitro Aktivierung von rekombinanten Kinasen.....	46
3.5.3 Kinase-Aktivitätstests von Leishmanien-Lysaten mit rekombinanter Kinase.....	46
3.6 Infektionsexperimente.....	46
3.6.1 Infektion von murinen Peritonealmakrophagen.....	46
3.6.2 Fußsohleninfektion von Balb/c Mäusen.....	47
3.6.3 Isolierung von Amastigoten aus Läsionen und anschließende Differenzierung zu Promastigoten.....	47
3.7 Mikroskopische Techniken.....	48
3.7.1 Immunfluoreszenz.....	48
3.7.2 Transmissionselektronenmikroskopie.....	48
3.8 In silico-Substratsuche mithilfe des Programmes PREDIKIN.....	49
4. ERGEBNISSE.....	50
4.1 LmxMKK.....	50
4.1.1 Differenzierungsstudien.....	50
4.1.2 Suche nach Interaktionspartnern von LmxMKK.....	51
4.1.3 Untersuchung der Feedback-Phosphorylierung von LmxMKK durch LmxMPK3.....	53
4.1.4 Untersuchung der Phosphorylierung von LmxMKK.....	57
4.2 TbMEKg.....	61
4.2.1 Untersuchung des Einflusses von TbMEKg in der LmxMKK-Deletionsmutante.....	61
4.2.2 Analyse des rekombinanten Proteins TbMEKg.....	64
4.2.3 Mutation von Alanin214 zu Aspartat.....	66
4.3 Identifikation weiterer Interaktionspartner.....	70
4.4 LmxMPK9.....	71
4.4.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung von GST-LmxMPK9 mit anschließendem Kinase-Aktivitätstest.....	71
4.4.2 Kombinierte Kinase Tests mit MAP Kinase Kinase Homologen.....	72
4.4.3 Coexpression mit Hilfe des pJC-duet Plasmids.....	73
4.4.4 Kinase Tests in Kombination mit LmxCRK3.....	74
4.5 Neue Proteinkinasen.....	75
4.6 LmxMPK13.....	75
4.6.1 Durchsuchen einer genomischen DNA-Bank nach LmxMPK13.....	75
4.6.2 Deletion von LmxMPK13 in <i>L. mexicana</i>	77
4.6.3 Charakterisierung der Δ LmxMPK13-Deletionsmutanten.....	80
4.6.4 Reintegration von LmxMPK13 in die Nullmutanten.....	84
4.6.5 Rekombinante Expression von LmxMPK13.....	89
4.6.6 Herstellung einer inaktiven Mutante von LmxMPK13.....	90
4.6.7 Kombinierte Kinase Tests mit MAP Kinase Kinasen.....	91
4.6.8 Coexpression von LmxMPK13 zusammen mit LmxPK4.....	92
4.6.9 Untersuchung der Phosphorylierung verschiedener LmxMPK13-Mutanten mit dem 4G10-Antikörper.....	94
4.6.10 Mutation des TEY-Motiv von LmxMPK13.....	94
4.6.11 Identifikation der Phosphorylierungsstellen.....	98
4.6.12 Identifikation von Substraten von LmxMPK13.....	99
4.6.13 Charakterisierung von LmxNOP und LmxHP.....	103
4.6.14 Rekombinante Expression und Kinase Aktivitätstest von LmxNOP und LmxHP.....	104
4.7 LmxMPK14.....	109
4.7.1 Durchsuchen einer λ DASH II Phagen-Bank nach dem ORF von LmxMPK14.....	109
4.7.2 Deletion von LmxMPK14 in <i>L. mexicana</i>	110
4.7.3 Klonierung von LmxMPK14 in verschiedene Expressionsplasmide und anschließende Kinase Aktivitätstests.....	114

4.7.4 Kinase Aktivitätstests von LmxMPK14 zusammen mit LmxPK4	117
4.7.5 Coexpression von His-LmxMPK14 zusammen mit LmxPK4	118
4.7.6 Kinase Tests von His-LmxMPK14 und His-LmxMPK14-KM zusammen mit LmxCRK3....	119
5. DISKUSSION.....	120
5.1 LmxMKK	120
5.1.1 Analyse des LmxMKK-Expressionsniveaus durch Differenzierungsanalysen	120
5.1.2 Identifikation von Interaktionspartnern von LmxMKK.....	120
5.1.3 „Feedback“-Phosphorylierung	124
5.1.4 Vergleich von LmxMKK mit TbMEK _g	126
5.2 Beziehung zwischen LmxPK4 und LmxMPK9	129
5.3 Substratsuche für LmxPK4.....	130
5.3.1 Deletion von LmxMPK13 und LmxMPK14	130
5.3.2 Kinase Aktivitätstests von LmxMPK13 und LmxMPK14 mit LmxPK4.....	131
5.4 Identifikation der Phosphorylierungsstellen in LmxMPK13	133
5.5 Substratsuche für LmxMPK13.....	137
5.6 LmxMPK9 und LmxMPK14	140
5.7 Einfluss der verschiedenen Signalwege auf die Regulation der Flagellenlänge.....	141
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	143
7. SUMMARY.....	144
8. LITERATURVERZEICHNIS	145
9. ANHANG	154
9.1 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	154
9.1.1 Vergleich der LmxMKK-Sequenz mit der von TbMEK _g	154
9.1.2 LmxMPK13.....	154
9.1.3 LmxNOP	158
9.1.4 LmxHP.....	158
9.1.5 LmxMPK14.....	159
9.2 MS- und MS/MS-Spektren.....	163
9.2.1 LmxMPK13-Wt.....	163
9.2.2 LmxMPK13-KM	167
9.2.3 LmxMPK13-Wt mit LmxPK4 coexprimiert.....	167
9.2.4 LmxMPK13-KM mit LmxPK4 coexprimiert.....	169
9.3 Plasmidkarten.....	171

Abkürzungsverzeichnis

-/-	Doppelalleldeletionsmutante
+/-	Einzelalleldeletionsmutante
°C	Grad Celsius
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BNI	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serum Albumin
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD-Domäne	„common-docking“-Domäne
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CL	Kutane Leishmaniose
CSPD	Dinatrium-3-[4-methoxy Spiro(1,2-dioxethan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1]decan)-4-yl]-Phenylphosphat
D	Aspartat
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindoldilacetat
DCL	Diffuse kutane Leishmaniose
ddH ₂ O	doppeldestilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleositriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
ERK	extrazellulär regulierte Kinase (<i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
EtOH	Ethanol

FCS	Fötales Kälberserum
G	Glycin
g	Gramm
(x) g	(Vielfaches der) Erdbeschleunigung
gDNA	genomische DNA
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde(n)
HAc	Essigsäure
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
His	Histidin
HRP	Meerrettichperoxydase
<i>Hyg</i>	Gen für Hygromycin B-Phosphotransferase
IAA	Isoamylalkohol
iFCS	hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum
IFN	Interferon
IFT	intraflagellarer Transport
IgG	Immunglobulin G
iFCS	hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- α -D-thiogalactopyranosid
K	Lysin
kD	Kilodalton
kDNA	Kinetoplasten-DNA
KM-Mutante	inaktive Kinase Mutante, bei der ein konserviertes Lysin zu Methionin mutiert wurde
l	Liter
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LB	Luria Bertani
LPG	Lipophosphoglykan
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight</i> Massenspektrometrie
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MAPK	MAP Kinase
MAPKK	MAP Kinase Kinase
MAPKKK	MAP Kinase Kinase Kinase
MBP	Myelin Basic Protein
MCL	Mukokutane Leishmaniose
MEK	ERK Kinase
MeOH	Methanol
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute(n)
MKK	MAP Kinase Kinase
MOPS	2-Morpholinopropansulfonsäure

mRNA	<i>messenger</i> -RNA
NaAc	Natriumacetat
NEB	New England Biolabs
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	offenes Leseraster
PAC	Gen für Puromycin-N-Acetyltransferase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pfu	Plaque forming unit(s)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSG	<i>promastigote secretory gel plug</i>
PVDF	Poly(vinyliden)difluorid
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunden
SH2/SH3	Src-Homologie-Regionen 2 und 3
SL	<i>spliced leader</i>
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitratpuffer (<i>standard saline citrate</i>)
<i>T.</i>	<i>Trypanosoma</i>
Tab	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLCK	N α -p-Tosyl-L-Lysin-Chlormethylketon-Hydrochlorid
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Triton X-100	Tertiärbutylphenylpolyoxyethylen
Tween-20	Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaureat
U	Unit; 1 U ist die Enzymmenge, die 1 μ g λ -Phagen-DNA in 1 h vollständig verdaut
ÜN	über Nacht
VL	Viszerale Leishmaniose
v/v	Volumen pro Volumen
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid

1. Einleitung

1.1 Leishmanien und die von ihnen verursachte Krankheit

1.1.1 Taxonomie

Die nach dem britischen Zoologen Sir William Leishman (1865 - 1920) benannte Gattung *Leishmania* gehört zu der Ordnung der Kinetoplastida. Diese sind parasitische Protozoen. Namensgebend für diese Ordnung ist der Kinetoplast. Bei diesem handelt es sich um die dichtgepackte DNA des einzigen Mitochondriums der Zelle, welches sich am vorderen Ende der Zelle befindet. Dort ist ebenfalls die Basis des Flagellums, mit dem sich der Parasit bewegt, lokalisiert.

Die Kinetoplastida lassen sich in zwei Unterordnungen aufteilen: in die meist freilebenden Bodonina, die über zwei Geißeln verfügen, und in die meist parasitär lebenden Trypanosomatina, welche nur eine Geißel besitzen. Aus dieser Unterordnung geht die Familie der Trypanosomatidae hervor, die wiederum neun Gattungen umfasst. Diese parasitieren verschiedene Organismen. *Phytomonas* befällt Pflanzen. *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas* und *Leptomonas* parasitieren Insekten. In Reptilien sind *Sauroleishmania* anzutreffen und Säugetiere werden von *Endotrypanum*, *Leishmania* und *Trypanosoma* befallen.

1.1.2 Epidemiologie

Das Verbreitungsgebiet der Leishmanien wird durch deren Überträger, die Sandmücke, bestimmt (Abb. 1.1). In der Alten Welt handelt es sich dabei um die Gattung *Phlebotomus* und in der Neuen Welt um *Lutzomyia*. Diese gehören zur Familie der Schmetterlingsmücken.

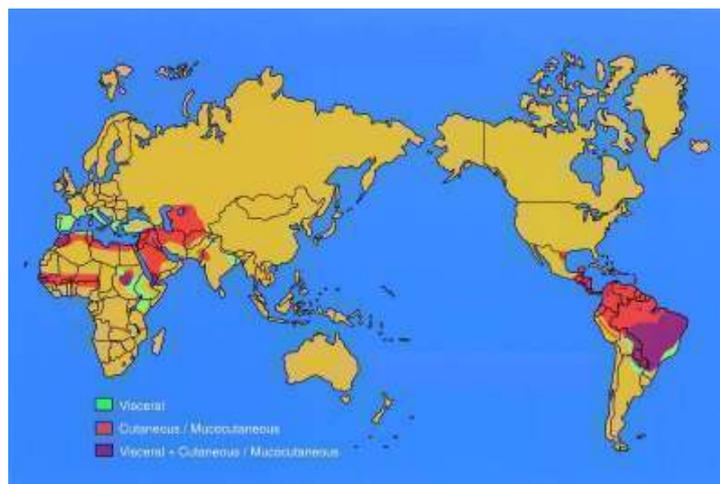


Abb. 1. 1: Verbreitungsgebiet der Leishmaniose, verändert nach (Handman, 2001).

Rot markierte Regionen: CL und MCL; grün:VL und lila: alle Formen der Leishmaniose.

Der Lebensraum dieser Mücken befindet sich hauptsächlich in ländlichen Regionen der Tropen und Subtropen. Weltweit tritt die Leishmaniose in 88 Ländern auf, wobei es sich bei 72 von ihnen um Entwicklungsländer handelt. Die Neuinfektionen werden jährlich auf 2 Mio. beziffert, wobei 1,5 Mio. der Infizierten die kutane Leishmaniose zeigen und 500.000 die viszerale Form. Die WHO schätzt, dass momentan 12 Mio. Menschen mit Leishmanien infiziert sind. Auch europäische Länder weisen mittlerweile endemische Gebiete auf, so z.B. Frankreich, Spanien, Italien und Griechenland (Abb. 1.1).

1.1.3 Krankheitsbilder

Die Leishmaniose ist eine parasitische Krankheit, die durch den Biss der weiblichen Sandmücke übertragen wird. Es gibt drei Hauptformen der Leishmaniose. Welche Form auftritt, ist abhängig von der *Leishmania* Spezies und dem Immunsystem des infizierten Menschen.

Kutane Leishmaniose (CL)

Diese häufigste Form der Leishmaniose verursacht hauptsächlich im Gesicht, an den Armen und Beinen Hautläsionen (Abb. 1.2; 1. v.l.). Oft heilt die CL allein ab, hinterlässt dabei aber Narben. Wenn diese Läsionen abgeheilt sind, entsteht eine dauerhafte Immunität gegen die Spezies, welche die Krankheit hervorgerufen hat. Zu den Erregern der CL in der Alten Welt gehören hauptsächlich *L. major*, *L. tropica* und *L. aethiopica*.

In Mittel- und Südamerika treten überwiegend *L. panamensis*, *L. guyanensis* und Vertreter des *L. mexicana*-Komplexes auf. Mehr als 90 % aller Fälle von CL werden in Iran, Afghanistan, Syrien, Saudi Arabien, Brasilien und Peru dokumentiert.

Die Diffuse Kutane Leishmaniose (DCL) ist deutlich schwieriger zu behandeln als die einfache CL und heilt auch nicht allein ab. Häufig tritt die DCL bei einem geschwächten Immunsystem auf und bricht auch nach abgeschlossener Behandlung wieder aus. Im Gegensatz zur CL können bei dieser Krankheit die Läsionen über den gesamten Körper verteilt sein (Abb.1.2; 2. v.l.). Hervorgerufen wird sie durch *L. aethiopica*, aber auch durch Vertreter des *L. mexicana*-Komplexes.

Mukokutane Leishmaniose (MCL)

In Südamerika ist diese Krankheit auch als *Espundia* bekannt. Nach anfänglich einzeln auftretenden Läsionen im Gesichtsbereich verteilen sich die Parasiten auf den gesamten Mund-, Rachen- und Nasenbereich und führen dort zu einer weitgehenden Zerstörung von Haut, Muskeln und Knorpel (Abb. 1.2; 3. v.l.). Hervorgerufen wird die MCL durch Vertreter des *L. brasiliensis*- und des *L. mexicana*-Komplexes.

Viszerale Leishmaniose (VL)

Diese auch als *Kala Azar* bekannte Form der Leishmaniose ist durch unregelmäßige Fieberschübe, Gewichtsverlust, einem Anschwellen von Leber und Milz sowie einer Anämie gekennzeichnet (Abb. 1.2; 1. v.r.). Es ist die schlimmste Form der Leishmaniose und verläuft meist tödlich, wenn sie nicht behandelt wird. Die Inkubationszeit kann Monate bis Jahre dauern und im Gegensatz zu den unterschiedlichen Formen der Kutanen Leishmaniose befällt sie die inneren Organe. Ausgelöst wird die VL hauptsächlich durch die Parasiten des *L. donovani*- und des *L. infantum*-Komplexes. Diese Form der Leishmaniose tritt zu über 90 % in Bangladesch, Brasilien, Indien und im Sudan auf.

Als Folgeerscheinung einer therapierten VL besteht die Gefahr eines Post-Kala-Azardermalen-Leishmanoids (PKDL). Dabei handelt es sich um eine chronische CL, bei der zu Beginn einzelne Knoten oder Läsionen im Gesicht auftreten und sich anschließend über den gesamten Körper verteilen.



Abb. 1. 2: Fotografien von Patienten mit verschiedenen Leishmaniosen
Von Links: CL, DCL, MCL und VL (Quelle: WHO/TDR/Laufner/Crump)

1.1.4 Therapieansätze

Zur Behandlung von Leishmaniosen werden seit über 50 Jahren pentavalente Antimonverbindungen wie Pentostam™ (GlaxoSmithKline) oder Glucantime (Aventis) verwendet. Deren Wirkungsmechanismus ist aber noch nicht vollständig geklärt. Unpraktikabel ist die Darreichungsform und –dauer (intravenös oder intramuskulär für 20 - 28 Tage). Zusätzlich treten häufig Nebenwirkungen wie Übelkeit, Anorexie, Myalgie und Schädigungen an Herz und Leber auf (Lee and Hasbun, 2003). Antimonpräparate können gegen alle Typen der Leishmaniose eingesetzt werden. In einigen endemischen Regionen treten allerdings inzwischen vermehrt Resistenzen auf. So zeigt diese Behandlungsweise in Bihar/Indien inzwischen bei 30 – 60 % aller Patienten keine Wirkung (Sundar, 2003). Läsionen der CL können lokal mit Antimonpräparaten unterspritzt werden, wodurch sich die Nebenwirkungen deutlich verringern (Hepburn, 2003).

Als sogenannte „second line drug“ kommt mittlerweile das Polyen-Antibiotikum Amphotericin B (Bristol-Myers Squibb) zum Einsatz. Auch hier treten starke Nebenwirkungen

wie Fieber, Hypokalämie, Nephropathie und Myocarditis auf, was aber mit dem Mittel AmBisome® (Gilead Sciences) umgangen werden kann. Dabei handelt es sich um ein liposomales Amphotericin B, das eine bessere Verträglichkeit und Aufnahmeeffizienz besitzt. Für die Bevölkerung in den Endemiegebieten ist es allerdings nicht bezahlbar (Croft and Coombs, 2003; Sundar, 2003) und gegen CL zeigt es keinen deutlichen Effekt (Berman, 1997).

Seit 2002 ist Miltefosin in Indien zur Behandlung der VL zugelassen. Im Gegensatz zu den bisher aufgeführten Medikamenten kann dieses Alkylphospholipid oral eingesetzt werden. Die Heilungsrate liegt nach 28-tägiger Therapie bereits bei 95 % (Sundar, 2003). Auch hier treten Nebenwirkungen wie Übelkeit und Diarrhöe auf, wobei diese bei Weitem nicht so schlimm sind wie bei den anderen bereits erwähnten Medikamenten. Nachteile von Miltefosin sind seine fruchtschädigende Wirkung sowie die hohen Kosten. Außerdem konnten auch hier bereits Resistenzen beobachtet werden (Croft and Coombs, 2003; Sundar, 2003), weshalb zu einer Kombinationstherapie mit anderen Medikamenten geraten wird.

Neue Therapeutika wie Imidazole oder Triazole befinden sich in verschiedenen Phasen der Entwicklung. Diese hemmen die Sterolsynthese der Parasiten und sollen oral verabreicht werden. Aber auch Immunmodulatoren können für die Behandlung von Leishmaniosen eingesetzt werden.

Zusätzlich zur medikamentösen Therapie steht im Fall der CL auch die Möglichkeit des operativen Entfernens zur Verfügung. Außerdem können lokale Hitze- bzw. Kältetherapien mit Mikrowellen oder flüssigem Stickstoff zum Einsatz kommen. Aber auch diese Behandlungsformen sollten mit einer lokalen Antimontherapie unterstützt werden (Lee and Hasbun, 2003).

1.1.5 Lebenszyklus

Das parasitische Protozoon *Leishmania mexicana* hat einen zweigeteilten Lebenszyklus mit zwei sehr unterschiedlichen Stadien (Abb. 1.3). Zum einen die Promastigoten, die im Darm von Sandmücken leben und zum anderen die Amastigoten, die in Makrophagen von Säugetieren parasitieren. Die spindelförmigen Promastigoten sind ungefähr 10 bis 12 µm lang. Am vorderen Ende der Zelle entspringt das Flagellum der Flagellartasche. Diese ist der einzige Ort für Endo- und Exozytose (Overath et al., 1997). Es können verschiedene, morphologisch unterschiedliche Stadien bei den Promastigoten beobachtet werden (Gossage et al., 2003; Kamhawi, 2006). Innerhalb der ersten 48 h nach der Blutmahlzeit einer Sandmücke entwickelt sich aus einem Amastigot ein kurzer und ovaler prozyklischer Promastigot. Diese Umwandlung findet in der sogenannten peritrophen Vakuole statt, welche die Blutmahlzeit umschließt. Die entsprechende Membran wird vom Mitteldarmepithelium des Insektes sekretiert und besteht hauptsächlich aus Chitin, welches in eine Protein-

Kohlenhydrat-Matrix eingebettet ist (Killick-Kendrick, 1990). In den folgenden 24 h wandeln sich diese Zellen in teilungsunfähige Nectomonaden um. Diese sind deutlich länger und schlanker. Nach wenigen Tagen wird die peritrophe Membran durch eine von den Parasiten sekretierte Chitinase aufgelöst (Schlein et al., 1991) und die Parasiten wandern in den Mitteldarm. Mithilfe ihrer Flagellen heften sie sich dort an die Mikrovilli an. Dies verhindert eine vorzeitige Ausscheidung der Parasiten und wird über das Oberflächenglykolipid Lipophosphoglykan (LPG) vermittelt, welches den Hauptbestandteil der Promastigoten-Glykokalix darstellt. Nun entwickeln sich zunächst die teilungsinaktiven nectomonaden Promastigoten, die nicht mehr an das Darmepithel binden können und in die vorderen Darmabschnitte wandern. Dort findet eine Umwandlung in die Leptomonaden statt, die wiederum ein proliferationsfähiges Stadium der Entwicklung darstellen.

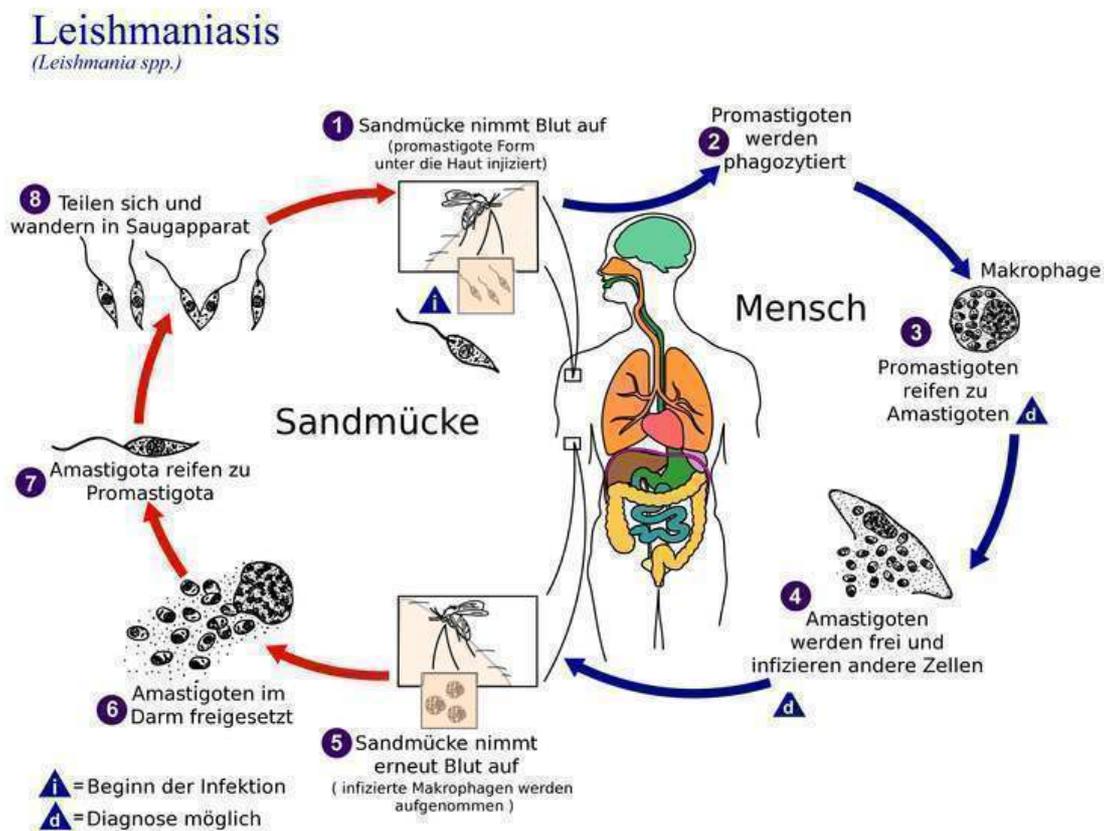


Abb. 1. 3: Lebenszyklus von *Leishmania*

(Quelle: http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Leishmania_lifecircle_german.png)

Unter Verlust der Teilungsfähigkeit entwickeln sich nun die metazyklischen Promastigoten, das infektiöse Stadium des Parasiten (Gossage et al., 2003). Während der Metazyklogenese bilden die Parasiten einen sogenannten PSG-Stopfen („promastigote secretory gel plug“), der hauptsächlich aus sekretiertem schleimartigem filamentösem Proteophosphoglykan (PPG) besteht und den Mitteldarm der Mücke verschließt (Rogers et al., 2002). Es kommt zu

einer Zerstörung der Valvula cardiaca, die normalerweise den Rückfluss der Nahrung vom Darm zum Pharynx verhindert (Schlein et al., 1992), was während der Nahrungsaufnahme der Sandmücke zur teilweisen Abgabe der aufgenommenen Blutmahlzeit in die Bisswunde führt. Dabei vermischt sich diese mit den infektiösen metazyklischen Promastigoten.

Im Säuger sind die Parasiten kurze Zeit den Bestandteilen des Komplementsystems ausgesetzt. Im Gegensatz zu den prozyklischen Promastigoten sind die metazyklischen Promastigoten relativ resistent gegenüber der komplementvermittelten Lyse, obwohl beide Formen signifikante Mengen des Komplementfaktors C3b an ihrer Oberfläche binden (Joiner, 1988). Die Oberflächenmetalloproteinase gp63 („Leishmanolysin“) spaltet auf den metazyklischen Promastigoten C3b, so dass dieses den Membranzerstörungskomplex nicht mehr binden kann (Brittingham and Mosser, 1996). Zusätzlich findet eine spontane Abstoßung des C5b-C9-Komplexes von der Oberfläche der Parasiten statt. Außerdem werden C3, C5 und C9 durch eine sekretierte Serin-/Threoninkinase (LPK-1) inaktiviert, was die komplementvermittelte Lyse verhindert (Hermoso et al., 1991; Puentes et al., 1990). Durch die Spaltung von C3b kommt es zusätzlich zur Generierung der chemotaktischen Peptide C3a und C5a. Dadurch werden Monocyten zur infizierten Stelle gelockt (Brittingham and Mosser, 1996). Diese sind nicht in der Lage, Antigene auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und sind daher ideale Wirtszellen für die Parasiten (Murray, 1994). Die Parasiten werden über rezeptorvermittelte Phagozytose von Makrophagen aufgenommen. Oberflächenmoleküle der Promastigoten wie gp63 sind daran beteiligt (Brittingham and Mosser, 1996). Die aufgenommenen Leishmanien sind anfangs in membrangebundenen Phagosomen lokalisiert. Diese fusionieren mit sekundären Lysosomen und bilden so das Phagolysosom, die parasitophore Vakuole (PV). Die PV besitzt einen sauren pH-Wert, ist reich an mikrobiziden Peptiden und hydrolytischen Enzymen. Die pH- und die Temperaturveränderung führen zur Differenzierung zu Amastigoten (Zilberstein and Shapira, 1994). Damit verbunden sind ein Einschmelzen des Flagellums, eine deutliche Größenreduktion und drastische Änderungen in der Genexpression. Die Amastigoten vermehren sich in der PV, was zur Zerstörung der Wirtszelle und Infektion benachbarter Zellen mit einer konzentrischen Ausbreitung der Läsion um die Bissstelle führt. Durch die Infektion mit *Leishmania*-Parasiten werden einige Prozesse der mikrobiziden Abwehr der Makrophagen verändert. LPG ist z.B. an der Verminderung der Superoxidproduktion beteiligt, indem es die Proteinkinase C hemmt. Aber auch gp63 spielt eine Rolle bei der Unterdrückung des sogenannten „oxidative burst“ in Monozyten und Neutrophilen (Sorensen et al., 1994). Die Stickoxidsynthase NOS2 (iNOS) wird hingegen sowohl durch LPG als auch durch Glykoinositolphospholipide gehemmt, die die Hauptoberflächenmoleküle der Amastigoten darstellen (Proudfoot et al., 1995). Diese Hemmung findet nur im Anfangsstadium der Infektion statt. Später kommt es zu einer erhöhten NO-Produktion

(Evans et al., 1996). Außer Makrophagen sind auch andere Zelltypen in der Lage Leishmanien zu phagozytieren. In der Frühphase der Infektion sind das dendritische Zellen (Caux et al., 1995) und polymorphkernige neutrophile Granulozyten. Diese können vermutlich auch eine Wirtsfunktion für die Parasiten übernehmen, bevor es zur Infektion der Makrophagen kommt. Retikuläre Fibroblasten sind wahrscheinlich für die beobachtete Persistenz der Parasiten verantwortlich (Bogdan et al., 2000).

1.1.6 Genetik der Leishmanien mit deren Besonderheiten

Das haploide Genom von Leishmanien umfasst $3,2 - 5 \times 10^7$ Basenpaare (bp). Je nach Spezies verteilen sich diese auf 34 (*L. mexicana*), 35 (*L. braziliensis*) oder 36 Chromosomen (*L. major*). Obwohl sie repetitive telomere Sequenzen aufweisen, kondensieren sie zu keinem Zeitpunkt der Mitose. Im Gegensatz zu vielen anderen Organismen ist das *Leishmania*-Genom sehr GC-reich (60 %). Bei Säugern liegt deren Anteil bei nur 40 - 45 %. Die Sequenzierung des *L. major*-Genoms wurde 2003 abgeschlossen. Es umfasst $3,28 \times 10^7$ bp, die sich auf Chromosomen mit einer Größe von $0,3 - 2,8 \times 10^6$ bp verteilen (Ivens et al., 2005). Bisher konnten 8370 Gene identifiziert werden. Die Sequenzierungen der Genome von *L. infantum* und *L. braziliensis* sind ebenfalls abgeschlossen (Peacock et al., 2007), wobei immer noch an den Auswertungen gearbeitet wird. Bisher konnten bei *L. infantum* 8184 Gene identifiziert werden und bei *L. braziliensis* 8312 Gene.

Leishmanien sind diploide Organismen, bei denen die Möglichkeit zur genetischen Rekombination besteht (Taylor et al., 1994). Bisher gibt es keine Anzeichen für einen sexuellen Genaustausch, wie dies bei *T. brucei* nachgewiesen werden konnte (Gibson and Bailey, 1994). Die Chromosomen von Leishmanien besitzen keine für Eukaryoten typischen Zentromersequenzen und zeigen eine genomische Plastizität, die sich in einer ständig variierenden Chromosomengröße und -anzahl bemerkbar macht (Stiles et al., 1999). Ein Beispiel dafür sind die sogenannten multicopy-Minichromosomen, die sich unter Antibiotikaselektion oder nutritivem Stress bilden können (Beverley, 1991). Diese können 5 - 10 % der Gesamt-DNA der Zelle ausmachen.

Zusätzlich zur genomischen DNA im Zellkern besitzen Leishmanien eine ungewöhnliche mitochondriale DNA, die Kinetoplasten-DNA. Diese macht 10 - 15 % der Gesamt-DNA der Zelle aus. Sie ist in einem Netzwerk von sogenannten Mini- und Maxicircles organisiert. Die Minicircles sind 0,5 - 2,8 kb groß und es gibt ungefähr 5.000 – 10.000 pro Zelle. Bisher ist bei ihnen keine proteinkodierende Funktion bekannt. Man weiß nur, dass sie für guide-RNAs kodieren. Die Maxicircles sind 20 – 39 kb groß und es liegen in einer Zelle zwischen 20 und 50 Moleküle vor. Sie kodieren für die mitochondrialen Proteine sowie für die guide-RNAs.

Bei Trypanosomatiden konnten bisher keine Introns sowie die dazugehörigen cis-Spleißvorgänge nachgewiesen werden (Stiles et al., 1999). Die einzige Ausnahme bildet das Gen für die Poly-A-Polymerase in *T. brucei* und *T. cruzi* (Mair et al., 2000). Sehr viele Gene liegen

in mehreren Kopien im Genom vor. Man spricht von sogenannten multicopy-Genen, die häufig tandemartig hintereinander angeordnet sind. Zusätzlich treten auch Gen-Cluster mit verwandten aber auch unterschiedlichen Genen auf. Die tandemartige Wiederholung von Genen kann zu einer Erhöhung der Transkriptmenge führen.

Die meisten Gene werden von der RNA-Polymerase II cotranskribiert. Bei der Transkription entsteht eine polycistronische mRNA. Durch eine Trans-Spleißreaktion am 5'-Ende wird die RNA mit einer ca. 40 Nukleotid-langen RNA, dem sogenannten Spliced-Leader (SL), versehen. Damit verbunden ist das Anfügen eines 7-Methylguanosin-Restes, der Cap-Struktur. Zusätzlich findet am 3'-Ende eine Polyadenylierung statt (Matthews et al., 1994; Ullu et al., 1993). Durch diese beiden Prozesse entsteht erst eine stabile translatierbare RNA (Clayton, 2002). Als Trans-Spleiß-Signale dienen meist U-reiche Polypyrimidin-Abschnitte gefolgt von AG-Akzeptorsequenzen. Die Polyadenylierung findet 100 - 400 Nukleotide stromaufwärts des nächsten Spleiß-Signals statt (Clayton, 2002). Bisher wurde ein Promotor für die RNA-Polymerase II identifiziert. Dieser scheint aber nur die Expression der SL-Sequenzen zu kontrollieren. Bei diesem Prozess spielt auch der bisher einzige in Leishmanien identifizierte Transkriptionsfaktor eine Rolle. Dieser besteht aus drei Untereinheiten, von denen eine homolog zu einer Untereinheit des humanen snRNA Transkriptionsfaktors SNAPc ist (Das and Bellofatto, 2003). Für die RNA-Polymerasen I und III wurden ebenfalls Promotoren gefunden. Diese scheinen aber keine weitere Rolle zu spielen (Gilinger and Bellofatto, 2001; Laufer and Gunzl, 2001; Nakaar et al., 1997).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Regulation der Genexpression auf Transkriptionsebene nur eine untergeordnete Rolle spielt. Hauptsächlich findet diese posttranskriptional über RNA-Prozessierung, über die Stabilität und Abbau der Vorläufer- und der vollständigen mRNA sowie auf Translationsebene statt. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die 3'-untranslatierten Regionen (UTR) einen großen Einfluss auf die Stabilität und die Translationseffizienz ausüben (Clayton, 1999).

Eine weitere Besonderheit bei den Leishmanien ist das sogenannte RNA-Editing der mitochondrialen mRNA, wobei die guide-RNA als Vorlage dient. Anhand derer werden Uridin-Basen eingefügt oder deletiert. Dieser Prozess läuft in 3' - 5'-Richtung ab und führt zu funktionellen offenen Leserastern.

Zur genetischen Manipulation stehen bei Leishmanien zwei Möglichkeiten zur Verfügung (Clayton, 1999). Zum einen kann durch ein schrittweises Ersetzen beider Allele eines Gens durch Antibiotika-Resistenzgene eine Deletionsmutante erzeugt werden. Diese Methode basiert auf der homologen Rekombination. Außerdem können episomal neue Gene in die Parasiten integriert werden. Der bei *T. brucei* standardmäßig angewandte Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) funktioniert bei den meisten *Leishmania* ssp. nicht, da essentielle Komponenten fehlen (Robinson and Beverley, 2003). Nur bei *L. braziliensis* wurden alle

notwendigen Komponenten gefunden, so dass davon ausgegangen werden, dass hier RNAi funktioniert (Peacock et al., 2007).

1.1.7 Das Flagellum

Flagellen sind lange, von der Zelloberfläche abstehende Fortbewegungsorganellen. Im Gegensatz zu Cilien werden sie nur in geringer Anzahl ausgebildet. Sie kommen sowohl bei Prokaryoten als auch bei Eukaryoten vor, wobei sich der Feinbau allerdings stark unterscheidet.

Die Flagellen von Eukaryoten sind von der Zellmembran umgeben und mit Zytoplasma gefüllt. In ihrem Inneren liegt eine hoch konservierte Mikrotubuli-Struktur vor. Dabei bilden im Flagellenquerschnitt neun äußere Mikrotubuli-Doublets einen Kreis um zwei innen liegende einzelne Mikrotubuli, das sogenannte 9 + 2 Mikrotubulimuster (Abb. 1.4). Das Plus-Ende, also das schneller wachsende, befindet sich an der Flagellenspitze. Jedes Doublet besteht aus einem vollständigen A-Strang und einem unvollständigen B-Strang. Von den äußeren Mikrotubuli ragen sogenannte Radialspeichen zu dem inneren Mikrotubulipaar. Durch innere und äußere Dyneinarme sind die äußeren Mikrotubuli-Doublets miteinander verbunden. Diese komplexe Struktur aus Mikrotubuli, Radialspeichen und Dyneinarmen wird als Axonem bezeichnet. In Trypanosomatiden gibt es eine zusätzliche Struktur, die parallel zum Axonem verläuft, der Paraxialstab (PFR; Abb. 1.4). Im Querschnitt sind hierbei drei Domänen erkennbar (Farina, 1986). Eine schmale Domäne liegt nah am Axonem, eine Zweite liegt intermediär und die Dritte liegt distal vom Axonem. Die nah und die entfernt gelegenen Domänen haben eine ähnliche Struktur mit mehreren übereinander gelagerten Schichten. Die mittlere Domäne hingegen besteht aus Filamenten, welche die beiden anderen Domänen miteinander verbinden. Bei Trypanosomen ist das Flagellum nicht frei beweglich, sondern verläuft entlang des Zellkörpers, an den es durch die sogenannte „flagellar attachment zone“ (FAZ) gebunden ist. Wenn Leishmanien ein Flagellum ausbilden, müssen sie gleichzeitig zwei Zytoskelettstrukturen aufbauen: das Axonem und das PFR (Bastin et al., 1999; Sherwin and Gull, 1989).

Studien an der Grünalge *Chlamydomonas*, die zwei Flagellen trägt, zeigten, dass die Flagellenbestandteile durch den Intraflagellaren Transport (IFT) zur Flagellenspitze transportiert werden (Abb.1.4 B; Rosenbaum and Witman, 2002). Dieser Vorgang wird auch als anterograde Transport bezeichnet. Die Proteinkomplexe, auch als IFT Partikel bekannt, werden durch Kinesin II entlang der äußeren Mikrotubuli an die Flagellenspitze befördert. Doch Flagellen sind auch dynamische Organellen, deren Bestandteile ständig ausgetauscht werden (Marshall and Rosenbaum, 2001; Song and Dentler, 2001). Mithilfe des zytoplasmatischen Dynein 1b kehren die IFT-Partikel entlang der Mikrotubuli-Doublets zum Zellkörper zurück, was als retrograde Transport bezeichnet wird (Cole et al., 1998; Kozminski et al., 1995; Pazour et al., 1999; Piperno and Mead, 1997). Ein Fehlen der IFT-

Motor Proteine oder der IFT-Partikel Proteine führt zu schwerwiegenden Störungen des Flagellenaufbaus in allen untersuchten Organismen (Rosenbaum and Witman, 2002; Scholey, 2003; Signor et al., 1999). So liegen Störungen im IFT auch verschiedenen humanen Krankheiten zugrunde, wie z.B. zystische Nierenerkrankungen, degenerative Netzhauterkrankungen und eine abnorme Ausbildung der Rechts-Links-Asymmetrie während der Entwicklung (Rosenbaum and Witman, 2002).

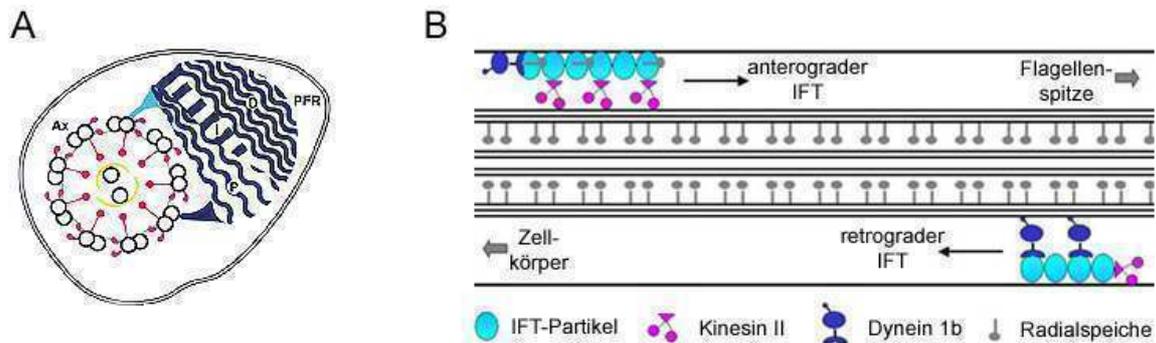


Abb. 1. 4: Schematische Darstellung von A: Querschnitt eines Flagellums von Leishmanien; verändert nach (Bastin et al., 2000) und B: dem IFT im Längsschnitt eines Flagellums; verändert nach (Rosenbaum and Witman, 2002).

Ax: Axonem, PFR: Paraxialstab

Wie der IFT und damit die Flagellenlänge reguliert werden, ist bisher noch nicht bekannt, aber es deutet alles darauf hin, dass Signaltransduktionswege daran beteiligt sind. So konnte nachgewiesen werden, dass eine Aurorakinase und eine GSK3 β an der Regulation der Flagellenlänge bei *Chlamydomonas* beteiligt sind (Pan et al., 2004; Wilson and Lefebvre, 2004), sowie das MAPK Homolog LF4 (Berman et al., 2003). Eine Beteiligung der Regulation der Flagellenlänge konnte ebenso für das MAPKK Homolog LmxMCK in *L. mexicana* gezeigt werden (Wiese et al., 2003a).

1.2 Signaltransduktion in höheren Eukaryoten und in Leishmanien

Als Signaltransduktion werden Prozesse bezeichnet, mittels derer Zellen auf äußere Reize reagieren, diese umwandeln und in das Zellinnere weiterleiten. An diesen Prozessen sind eine Vielzahl von Enzymen und sekundären Botenstoffen (Second Messenger) in einer oder mehreren nachgeschalteten Ebenen beteiligt. Dabei wird das ursprüngliche Signal in der Regel amplifiziert.

Signaltransduktionsvorgänge sind für einzellige Organismen von essentieller Bedeutung, um auf Veränderungen ihrer Umwelt beispielsweise durch Regulation des Stoffwechsels und der Genexpression zu reagieren. In mehrzelligen Organismen ist die zelluläre Signaltransduktion zusätzlich ein wichtiger Bestandteil der Verarbeitung innerer (z. B. Blutdruck, Hormone und Neurotransmitter) und äußerer Reize (z. B. Sehen, Riechen). Wichtige biologische Prozesse,

die durch Signaltransduktion reguliert werden, sind u. a. Immunreaktion, Zellproliferation und Gentranskription.

Mit Hilfe von Rezeptoren in der Zellmembran werden die extrazellulären Signale aufgenommen und im Zellinneren verarbeitet. Diese Rezeptoren lassen sich entsprechend ihrer Lokalisation, ihres Aufbaus und ihrer Funktion unterscheiden. Die Weiterleitung (Transduktion) der von einem Rezeptor aufgenommenen äußeren Signale zu Effektorproteinen innerhalb der Zelle ist die eigentliche Aufgabe der Signaltransduktion. Dies erfolgt durch koordinierte Protein-Protein-Interaktionen und einer Aktivierung von zwischengeschalteten Effektoren, welche wiederum weitere Effektoren aktivieren können. Dadurch entsteht eine starke Vernetzung der unterschiedlichen Proteine. Während der Signaltransduktion wird oft auch gleichzeitig das Signal amplifiziert, indem ein aktiviertes Proteinmolekül seinerseits mehrere Effektormoleküle aktiviert.

1.2.1 Proteinphosphorylierung und Proteinkinasen

Die Weiterleitung solcher Signale erfolgt meist durch Phosphorylierung der Effektor-Proteine. Bei der Phosphorylierung handelt es sich um die häufigste posttranslationale Modifikation. Sie ist bei ungefähr einem Drittel aller Säuger-Proteine anzutreffen. Eine Phosphorylierung kann sowohl zur Steigerung als auch zur Hemmung der Aktivität eines Proteins führen. Außerdem können Bindungsstellen blockiert oder zugänglich gemacht werden. Desweiteren können Phosphorylierungen zur Änderung der subzellulären Lokalisation und der Stabilität von Proteinen beitragen.

2 % aller humanen Gene kodieren für Proteinkinasen, die somit eine der größten Proteinfamilien bilden. Mutationen und Fehlfunktionen bergen somit ein hohes Risiko für verschiedene Krankheiten.

Die katalytische Domäne von Proteinkinasen ist mit 250 – 300 Aminosäuren relativ klein. Es gibt 12 konservierte Subdomänen, die von Bereichen geringerer Homologie getrennt werden. Kinasen lassen sich anhand des von ihnen phosphorylierten Aminosäurerestes in drei Gruppen unterteilen: die Serin-/ Threoninkinasen, die Tyrosinkinasen und die dualspezifischen Kinasen, die sowohl Serin- und Threoninreste als auch Tyrosinreste phosphorylieren können. Zu dieser letzten Gruppe gehören außer den LAMMER-Kinasen nur die MAP Kinase Kinasen (Hanks et al., 1988; Lee et al., 1996). In ihrer räumlichen Struktur sind bei den Kinasen zwei Untereinheiten erkennbar. Die kleinere N-terminale Untereinheit besteht aus einem antiparallelen β -Faltblatt aus 5 Strängen ($\beta 1 - \beta 5$) und einer α -Helix (αC). Sie spielt bei der Orientierung von ATP bzw. GTP eine Rolle. Die größere C-terminale Untereinheit ist hauptsächlich α -helikal. Zwischen den beiden Untereinheiten liegt eine tiefe Furche, in der sich das aktive Zentrum mit den Nukleotid- und Substratbindenden Taschen befindet. ATP wird durch Wechselwirkungen mit konservierten Aminosäuren in

beiden Domänen in die für den Phosphatgruppentransfer erforderliche Orientierung gebracht. Dazu gehören eine glycinreiche Schleife zwischen den β 1- und β 2-Strang, zwei Asparagin- und Aspartatreste in den Subdomänen VIb und VII, die für die Bindung der divalenten Kationen benötigt werden, und ein Lysinrest in Subdomäne II. Dieser wird durch eine Salzbrücke mit einem Glutamatrest in Subdomäne III stabilisiert und ausgerichtet. Dieses Lysin koordiniert die α - und β -Phosphatgruppen des ATP und ist essentiell für die Phosphatgruppenübertragung (Matte et al., 1998). Das Substrat bindet nahe des γ -Phosphats vom ATP. Dies ist aber nur möglich, wenn die Kinase in ihrem aktiven Zustand vorliegt. Erst durch die Phosphorylierung an der Aktivierungsschleife kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch eine aktive offene Form der Kinase entsteht. Ein am Rande der Phosphorylierungsschleife gelegenes, invariantes DFG-Motiv mit dem bereits erwähnten Aspartatrest, ist an der Phosphorylierung beteiligt. Die hochkonservierte katalytische Schleife weist neben dem zuvor erwähnten Asparagin- einen weiteren wichtigen Aspartatrest in Subdomäne VIb auf, der als katalytische Base mit dem Proton der zu phosphorylierenden Hydroxylgruppe des Substrats wechselwirkt (Huse and Kuriyan, 2002; Krupa et al., 2004).

1.2.2 Die MAP Kinase Kaskade

Die MAP Kinase Kaskade (mitogen-activated protein) bezeichnet eine Reihe mehrstufiger Signaltransduktionswege, die unter anderem an der Regulation der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und der Apoptose beteiligt sind (Pearson et al., 2001). Die Kaskade wird durch verschiedene Rezeptortypen aktiviert, die wiederum auf viele verschiedenen Stimuli wie Hormone, Wachstumsfaktoren oder Zytokine reagieren. Die

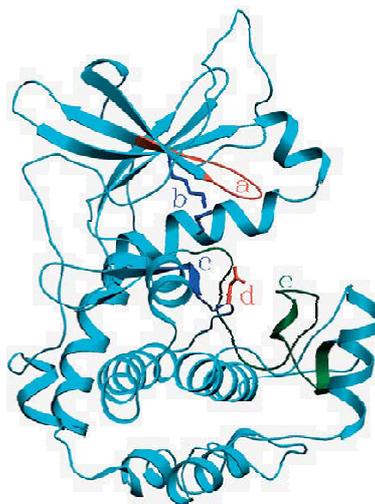


Abb. 1. 5: Struktureller Aufbau der katalytischen Domäne von Proteinkinase (Krupa et al., 2004)
a: Phosphat-Anker mit GXGXXG-Sequenz; b: Lysin-Glutamat-Salzbrücke; c: katalytische Schleife;
d: katalytische Base (Aspartat Subdomäne VIb); e: Aktivierungsschleife

Auslösung der Phosphorylierungskaskade kann auch durch Umwelteinflüsse wie osmotischer und Hitzeschock oder UV Strahlung erfolgen (Kyriakis and Avruch, 2001).

Die Signalwege umfassen mindestens drei "in Serie" geschaltene Kinasen: Eine MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK), eine MAP Kinase Kinase (MAPKK, MKK oder MEK) und eine MAP Kinase (MAPK oder MPK), welche in dieser Reihenfolge phosphoryliert und somit aktiviert werden. Die Aktivierung der MAPKKK erfolgt durch andere Proteinkinasen, wie die Ste20-ähnliche Proteinkinase oder Mitglieder der Ras- und Rho-Familien. Die MAPKKK phosphoryliert eine oder mehrere MAPKKs an zwei konservierten Serin- und/oder Threoninresten. Die aktivierte MAPKK phosphoryliert wiederum das konservierte TXY-Motiv (Threonin-X-Tyrosin) in der Aktivierungsschleife der zugehörigen MAPK. Dadurch wird diese aktiviert und ist nun in der Lage in den Zellkern zu translozieren und verschiedene Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren, wodurch sie direkten Einfluss auf die Regulation der Genexpression nimmt. Es können aber auch verschiedene zytoplasmatische Proteine wie z.B. die RNA Polymerase II, Proteine des Zytoskeletts oder weitere Proteinkinasen (MAPKAPs) von MAPKs beeinflusst werden. Bei höheren Eukaryoten unterscheidet man die MAPKs in vier Gruppen (Tanoue and Nishida, 2002). Die Aktivität der „extracellular signal regulated kinase“ (ERK)-1/2-Gruppe wird hauptsächlich durch Mitogene stimuliert. Kinasen der p38- und der JNK/ SAPK („c-Jun N-terminal kinases/ stress activated protein kinases“-Gruppe werden hauptsächlich über Stressreize oder inflammatorische Zytokine aktiviert und Kinasen der ERK5-Gruppe durch den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), den neuronalen Wachstumsfaktor (NGF) sowie durch osmotischen und oxidativen Stress. Durch spezifische Phosphatasen wird die Aktivierung einer MAPK wieder aufgehoben.

MAPK phosphorylieren ihre Substrate meist an einem Serin- oder Threoninrest, der von einem Prolinrest gefolgt wird (Pearson et al., 2001). Dies liegt vor allem an sterischen Gründen, da MAPKs im Gegensatz zu anderen Proteinkinasen nur eine kleine Einbuchtung im aktiven Zentrum aufweisen. Die normalerweise vorhandene Tasche wird durch das phosphorylierte Tyrosin des TXY-Motivs nahezu ausgefüllt.

MAPKs interagieren mit ihren Substraten über sogenannte Docking-Domänen. Die erste identifizierte Docking-Domäne stammt aus c-Jun und heißt δ -Domäne (Kallunki et al., 1994). Sie ermöglicht die Interaktion mit JNK/ SAPKs. In vielen MAPKs liegen ähnliche D-Domänen vor. Sie bestehen aus mehreren basischen Aminosäureresten, denen eine [LI]X[LI]-Sequenz folgt. Bei ERK1/2 Kinasen existiert zusätzlich das FXFP-Motiv (Yang et al., 1998), das bei der Interaktion mit den Substraten eine Rolle spielt. Außerdem können MAPKs eine „Common Docking“- (CD)-Domäne besitzen. Diese besteht aus der Sequenz DXX[DE]. Sie ist mitverantwortlich für die Aktivierung und Bindung von ERK an MEK (Tanoue et al., 2000; Tanoue and Nishida, 2003). Unabhängig davon sind MAPKs und ihre Aktivatoren oft an

Gerüstproteine gekoppelt, wodurch zusätzlich die Spezifität der Kaskade gewährleistet wird (Marcus et al., 1994).

1.2.3 Signaltransduktion in Trypanosomatidae

Leishmanien mit ihrem digenetischen Lebenszyklus sind besonders darauf angewiesen äußere Signale ihrer Umwelt wahrzunehmen, die Signale weiterzuleiten und darauf zu reagieren, z.B. mit einer Regulation der Genexpression. In ihrem Lebenszyklus durchlaufen die Parasiten starke morphologische Veränderungen, die zum Teil auch über Phosphorylierungen reguliert werden (Dell and Engel, 1994). Im Gegensatz zu höheren Eukaryoten und bestimmten Modellorganismen ist über die Signaltransduktion bei Leishmanien und Trypanosomen noch relativ wenig bekannt. Viele bekannte Komponenten konnten durch Homologievergleiche auch in diesen Organismen identifiziert werden, andere wichtige Schlüsselkomponenten aber bisher noch nicht (Abb. 1.6; Parsons and Ruben, 2000). Die einzigen bisher in Trypanosomatiden nachgewiesenen Rezeptoren sind die Adenylatzyklase-Rezeptoren (Sanchez et al., 1995). Diese besitzen je nach Rezeptor variable extrazelluläre Domänen und eine intrazelluläre Domäne mit der Adenylatzyklase-Aktivität (Naula and Seebeck, 2000). Durch diese Rezeptoren wird die Bildung von cAMP reguliert, das nachweislich bei der Differenzierung von Trypanosomen eine wichtige Rolle spielt (De Castro and Luz, 1993; Rolin et al., 1993). Homologe der Proteinkinase A (Huang et al., 2002) und von Phosphodiesterasen (Rascon et al., 2000), die ebenfalls Teil der Adenylatzyklase-Kaskade sind, konnten ebenfalls identifiziert werden, Substrate der Proteinkinase A-homologen Proteine bisher allerdings noch nicht. Auch die Signalweiterleitung über Ca^{2+} als „second messenger“ konnte nachgewiesen werden. Das Acidocalcisom dient dabei als intrazellulärer Calciumspeicher (Parsons and Ruben, 2000). Inositolphosphate scheinen ebenfalls vorhanden zu sein, denn die an diesem Signalweg beteiligte Phospholipase C konnte in *T. cruzi* bereits identifiziert werden (Nozaki et al., 1999). Weitere Komponenten dieser Kaskade wurden auch in *T. brucei* kloniert (Bringaud et al., 1998).

Wichtige Rezeptoren höherer Eukaryoten, wie G-Protein gekoppelten Rezeptoren oder Rezeptor-Tyrosinkinasen, wurden allerdings noch nicht gefunden. Außerdem sind bisher noch keine Tyrosinphosphatasen oder -kinasen bekannt, obwohl Beweise ihrer Aktivität bereits vorliegen (Parsons et al., 1994; Zhong et al., 1998). Signalkaskaden enden oft mit der Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren. Auch diese konnten bisher in Leishmanien noch nicht identifiziert werden.

Dennoch sind schon zahlreiche Proteinkinasen und -phosphatasen bekannt. In einer Kinomanalyse konnten in *L. major* 179 Kinasen bestätigt werden, in *T. brucei* 156 und in *T. cruzi* 171 (Parsons et al., 2005). Dies ist nur ein Drittel der Kinasegene, die im Menschen vorkommen. Bei *L. major* entspricht es ungefähr 2 % des gesamten Genoms. Kinasen der NEK- (NIMA („never in mitosis gene A“) - ähnliche Kinasen), der STE- (Homologe aus Hefe von STE7, STE11 und STE20 Kinase) und der CMGC-Gruppe (Zyklusabhängige Kinasen CDKs, MAPKs, Glycogen-Synthase Kinase 3, Zellzyklus-abhängige Kinasen (cdc)-ähnliche Kinasen) machen 56 % des Kinoms von *L. major* aus.

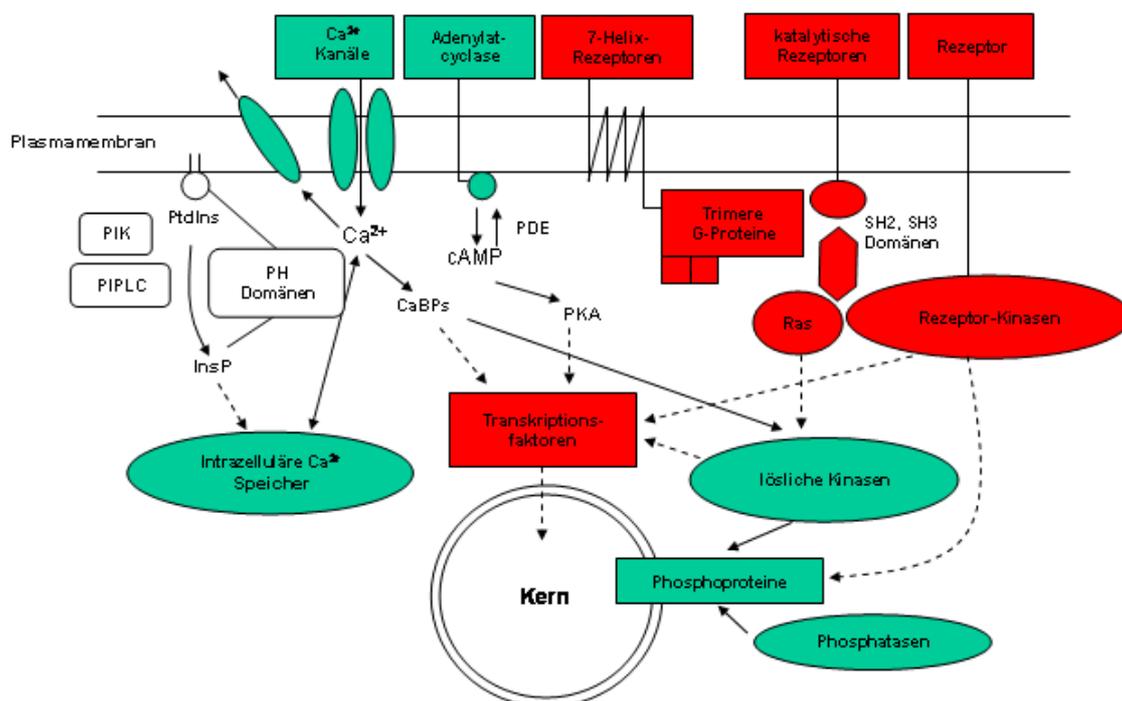


Abb. 1. 6: Signaltransduktionswege in Trypanosomatiden und höheren Eukaryoten verändert nach (Parsons and Ruben, 2000)

Den CDKs kommt eine große Rolle bei der Regulierung des Zellzyklus zu. Die bisher am besten charakterisierte CDK ist *cdc2*, die eine Schlüsselstellung in der Kontrolle der Mitose einnimmt. In Trypanosomatiden gibt es zusätzlich eine Familie von *cdc2*-verwandten Kinasen (CRKs), die in sechs Klassen unterteilt werden können (CRK1 - 6) (Mottram, 1994). CRK1 und 3 aus *L. mexicana* sind essentiell für den Parasiten (Hassan et al., 2001; Mottram et al., 1993; Mottram et al., 1996).

Ebenfalls an der Regulation des Zellzyklus ist eine Polokinase in *T. brucei* beteiligt (Hammarton et al., 2007). Diese wird für die Duplikation der Basalkörper, für die Segregation der kDNA und für die Zytokinese benötigt.

Schon 1993 konnten von Gale und Parsons zwei Gene von NIMA-ähnlichen Proteinkinasen aus *T. brucei* kloniert werden, *nrkA* und *nrkB* (Gale and Parsons, 1993). Mit *TbNRKC* wurde das erste NEK-Homolog in *T. brucei* funktionell charakterisiert (Pradel et al., 2006). Dabei

konnte eine Beteiligung an der Basalkörper-Duplikation bei der Zellteilung nachgewiesen werden.

Das erste Homolog einer MAPK, Kfr1, wurde 1994 von Hua und Wang in *T. brucei* entdeckt (Hua and Wang, 1994). In *L. mexicana* wurden die ersten neun MAPKs (LmxMPK1 - LmxMPK9) mithilfe degenerierter Oligonukleotide identifiziert (Wiese et al., 2003b). Kurze Zeit später wurde das Genom von *L. major* bei GeneDB veröffentlicht (Ivens et al., 2005). Dort wurden insgesamt 15 MAPK Homologe beschrieben, also sechs mehr als bisher angenommen. Die zusätzlichen Gene wurden mittlerweile in *L. mexicana* identifiziert und kloniert (Wiese, 2007), was teilweise Gegenstand dieser Arbeit war. In den Genomen von *L. infantum* und *L. braziliensis* konnten diese 15 Proteinkinasen ebenfalls ausgemacht werden. In *T. brucei* und *T. cruzi* hingegen wurden MPK7 und MPK8 bisher noch nicht gefunden (Wiese, 2007). Zusätzlich wurden in der GeneDB-Datenbank zwei atypische MAPKs identifiziert (Parsons et al., 2005).

LmxMPK1, das homologe Protein zum bereits erwähnten Kfr1 aus *T. brucei*, zeigte sich in Deletionsexperimenten essentiell für das amastigote Lebensstadium (Wiese, 1998), genauso wie LmxMPK5 (Wanders, 2004). Dessen Homolog in *T. brucei*, TbMAPK2, steuert die Differenzierung der Trypanosomen von der Blutstromform zur prozyklischen Form (Muller et al., 2002), genauso wie TbMAPK5 (Domenicali Pfister et al., 2006). Bisher noch nicht veröffentlicht ist, dass LmxMPK2 ebenfalls für eine Infektion von Balb/c-Mäusen notwendig ist. Zusätzlich zeigte die entsprechende Nullmutante schwerwiegende morphologische Veränderungen (Wiese, bisher unveröffentlichte Daten). LmxMPK4 ist sogar für beide Lebensstadien des Parasiten essentiell (Wang et al., 2005). Für die C-terminale Domäne von TbECK1, dem Homolog von LmxMPK6 in *T. brucei*, konnte eine regulatorische Funktion nachgewiesen werden (Ellis et al., 2004).

Im *L. major* Genom konnten 7 potentielle MAPKK-Gene identifiziert werden (Parsons et al., 2005). Zu Beginn dieser Arbeit waren in *L. mexicana* bereits 4 MAPKK-Homologe bekannt. Von LmxMCK wusste man bereits, dass sie an der Flagellenlängenregulation beteiligt ist (Wiese et al., 2003a), ebenso wie LmxPK4 (Kuhn, 2004). Von LmxPK2 und LmxPK3 sowie LmxPK5 bis LmxPK7 sind bisher noch keine Funktionen bekannt (Wiese, unveröffentlichte Daten; Melzer, 2007).

Agron et al. fanden 2005 mit MRK1 die erste MAPKKK in *L. major* (Agron et al., 2005). Diese stellte sich als essentiell heraus. Im *L. major* Genom wurden insgesamt 23 putative MAPKKK vorhergesagt (Parsons et al., 2005).

1.3 Bisheriges Wissen über LmxMKK und Aufgabenstellung

1.3.1 LmxMKK - Kenntnisstand

LmxMKK ist wie bereits erwähnt ein MAP Kinase Kinase Homolog. Das entsprechende Gen umfasst 1116 bp und kodiert somit für ein Protein mit 372 Aminosäuren. Dies entspricht einem Molekulargewicht von 41,5 kD. Die mRNA-Menge ist in Amastigoten deutlich herunterreguliert (Duncan et al., 2001), ebenso wie die Proteinmenge (Wiese et al., 2003a). In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass rekombinant exprimierte GST-LmxMKK keine nennenswerte Aktivität besitzt (Wiese et al., 2003a). Wurden in der Aktivierungsschleife mehrere Aminosäuren zu Aspartaten umgewandelt, entstand eine konstitutiv aktive Mutante, die als LmxMKK-D bezeichnet wird. Dies wurde den Versuchen an einer murinen MKK nachempfunden, bei der diese Mutationen zu einer Aktivierung führten (Mansour et al., 1996). Die Aktivität von LmxMKK ging durch die Mutation von Lysin91 in Subdomäne II zu Methionin wieder verloren. Dieser Lysinrest ist an der Orientierung des ATP vor der Phosphatgruppenübertragung beteiligt und somit essentiell für die Aktivität jeder Kinase (siehe 1.2.1). In meiner Diplomarbeit (Scholz, 2003) konnte ich bereits feststellen, dass die optimalen Bedingungen für die konstitutiv aktive LmxMKK-D im Kinase Aktivitätstest 27°C, ein pH-Wert von 7,0 und 10 mM Mn²⁺ sind. Außerdem konnte ich nachweisen, dass der NH₂-Terminus der Kinase eine Rolle für die Aktivität der Kinase spielt, da eine um 48 Aminosäuren verkürzte Mutante einen deutlichen Aktivitätsverlust zeigte.

Aus Deletionsstudien war bekannt, dass LmxMKK einen Einfluss auf die Flagellenlängenregulation hat, da die Nullmutanten ein auf mindestens 1/5 verkürztes Flagellum aufwiesen (Wiese et al., 2003a). Die Flagellenlänge variierte zwischen 0 und 5 µm, wobei der Durchschnitt bei 1,76 µm lag. In den meisten untersuchten Zellen der Nullmutanten konnte kein Paraxialstab in der transmissionselektronischen Analyse ausgemacht werden. Zusätzlich fehlte bei 11 % aller untersuchten Zellen das zentrale Mikrotubulipaar im Flagellum. Dadurch ergab sich anstelle des typischen 9 + 2 Mikrotubulimusters ein 9 + 0 Muster. In Infektionsexperimenten fingen die Deletionsmutanten deutlich verzögert an Läsionen zu bilden (Wiese et al., 2003a). So war erst nach ca. 30 Wochen eine Läsionsbildung zu beobachten. Bei LmxWt sind im Gegensatz schon nach 5 – 6 Wochen Läsionen messbar.

1.3.2 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von Interaktionspartnern von LmxMKK. Auf diese Weise sollte die Signaltransduktionskaskade aufgeklärt werden, an der LmxMKK beteiligt ist. Damit verbunden war nicht nur die Hoffnung die Regulation der Flagellenlänge in Leishmanien besser zu verstehen, sondern vor allem auch ein besseres Verständnis der MAP Kinase Kaskaden in *L. mexicana* im Allgemeinen. Von denen ist bisher weder bekannt, wodurch sie aktiviert werden noch welchem Zweck sie genau dienen, da die Substrate von

MAP Kinasen bisher auch noch nicht bekannt sind. Mögliche Aktivatoren von LmxMKK könnten MAPKKs sein. Als Substrate sind vor allem MAPKs interessant. Falls es gelingen sollte Interaktionspartner von LmxMKK zu identifizieren, sollten diese im Anschluss charakterisiert werden. Dazu könnten die entsprechenden Gene in den Leishmanien deletiert werden, um zu untersuchen welche Bedeutung diesen Proteinen zukommt. Außerdem könnten die Proteine rekombinant exprimiert und anschließend auf ihre Aktivität hin untersucht werden.

Darüber hinaus sollte nach weiteren Kinasen gesucht werden, die einen Einfluss auf die Flagellenmorphogenese, im Speziellen auf die Regulation der Flagellenlängen, ausüben. Dazu besteht zum einen die Möglichkeit in anderen Organismen nach Proteinen zu suchen, die einen Einfluss auf die Länge von Flagellen haben, um anschließend das homologe Protein in *L. mexicana* genauer zu untersuchen. Zum anderen könnten Proteine genauer untersucht werden, von denen bereits in Leishmanien bekannt ist, dass sie die Flagellenlänge regulieren. So zeigen z.B. die Nullmutanten von LmxPK4 und LmxMPK9 leicht verlängerte Flagellen. Für solche Proteine sollte ebenfalls nach Interaktionspartnern gesucht werden.

Schließlich sollte der Phosphorylierungsmechanismus von LmxMKK genauer analysiert werden. So sollte das Phosphorylierungsmuster von LmxMKK mit phosphospezifischen Antikörpern untersucht und wichtige Phosphorylierungsstellen durch MS-Analyse identifiziert werden.

2. Materialien

2.1 Chemikalien

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

Acrylamid 30% (w/v)/ 0,8% (w/v) Bisacrylamid Stammlösung	T	R:45-46-20/21-25-36/38- 43-48/23/24/25-62 S: 53-36/37-45	Carl Roth, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)			Roche Diagnostics, Mannheim
Agar-Agar			Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	O;Xn	R:8-22-36/37-38-42/43 S: 22-26-36/37	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Ampicillin	Xn	R: 36/37/38-42/43 S: 22-26-36/37	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Bacto-Trypton			Becton Dickinson, Heidelberg
Blockierungsreagenz	Xn	R: 22-36/37/38 S: 26-28-37	Roche Diagnostics, Mannheim
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β - Dgalactosid (X-Gal)			Roche Diagnostics, Mannheim
Bovines Serumalbumin (BSA)			Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Bromphenolblau		S: 22-24/25	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Calciumchlorid	Xi	R: 36 S: 22-24	Merck, Darmstadt
Chloroform	Xn	R: 22-38-40-48/20/22 S: 36/37	Carl Roth, Karlsruhe
Cobaltchlorid	T; Xn	R: 49-22-42/43-50/53 S: 53-22-45-60-61	Carl Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R-250			Serva, Heidelberg
CSPD®	Xn	R: 22-38-41-48/22 S: 26-36/37/39-46 S: 22.24/25	Roche Diagnostics, Mannheim
4', 6-Diamino-2- phenylindoldilactat (DAPI)			Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
N,N-Dimethylformamid (DMF)	T	R: 61-20/21-36	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Xi	R: 36/38 S: 26	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat			Merck, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Xn	R: 22-36/37/38 S: 26-36	Biomol, Hamburg
dNTP-Mix			Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Electrophoresis Grade</i> Agarose			Amersham Biosciences, Freiburg

Ethanol	F	R: 11 S: 2-7-16	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	T+	R: 22-26-36/37/38-68 S: 26-28-36/37-45	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Xn	R:22	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure (EGTA)			Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Fischsperm-DNA			Roche Diagnostics, Mannheim
Formaldehyd 37% (Formalin)	T	R: 23/24/25-34-40-43 S: 26-36/37/39-45-51	Carl Roth, Karlsruhe
Formamid	T	R: 61 S: 53-45	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)			Gibco BRL, Eggenstein/ PAN Biotech, Aidenbach
Gelatine			Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Glukose			Merck Darmstadt
L-Glutamin (0,2 M für Zellkultur)			PAN Biotech, Aidenbach
Glutardialdehyd	T; N	R: 22-23-34-42/43-50 S: 26-36/37/39-45-61	Merck, Darmstadt
Glutathion, reduziert			Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Glycerin			Carl Roth, Karlsruhe
Glycin			Carl Roth, Karlsruhe
Hämin (bovines Häminchlorid)		S: 22-24/25	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Hefe-Extrakt			Carl Roth, Karlsruhe
N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure] (HEPES)			Merck, Darmstadt
Hygromycin B	T+	R: 26/27/28-41-42/43 S: 22-26-28-36/37/39-45	Merck Biosciences, Schwalbach
Igepal CA-630 (Nonidet P-40)	Xn	R: 22-41 S: 26-36/39	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Imidazol	C	R: 22-34 S: 22-26-36/37/39-45	Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol	Xn	R: 10-20 S: 24/25	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	F; Xi	R: 11-36-67 S: 7-16-24/25-26	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)		S: 22-24/25	Gerbu Biochemicals, Gailberg
Kaliumacetat			Merck, Darmstadt

Kaliumchlorid			Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat			Merck, Darmstadt
Kanamycinsulfat	T	R: 61 S: 26-36/37/39-45	Gerbu Biochemicals, Gailberg
N-Lauroylsarcosin	Xi	R: 36/37/38 S: 26-36	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Leupeptin			Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Lithiumchlorid	Xn	R: 22-36/37/38 S: 26-36/37/39	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Magermilchpulver			Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid			Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat			Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Xn	R: 22-36-37/38 S: 26-28-37	Serva, Heidelberg
Maltose			Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Xn	R: 22	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	T; N	R: 22-24-34-51/53 S: 26-36/37/39-45-60	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Methanol	F; T	R: 11-23/24/25-39/23/24- 25 S: 7-16-36/37-45	Carl Roth, Karlsruhe
2-[N-Morpholino]- ethansulfonsäure (MES)	Xi	R: 36/37/38 S: 36/37/39	Serva, Heidelberg
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)			Gerbu Biochemicals, Gailberg
Mowiol 4-88			Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Xi	R: 36 S: 22-26	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid			Merck, Darmstadt
Natriumcitrat			Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat			Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Xi	R: 22-36/38 S: 22-24/25	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	T	R: 25-32-36/38 S: 22-24/25	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	C	R: 35 S: 2-26-37/39-45	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	T	R: 25-36/37/38 S: 37-45	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumthiosulfat			Merck, Darmstadt
ortho-Phenanthrolin	T; N	R: 25-50/53	Sigma Aldrich Chemie,

Paraformaldehyd	C	R: 20/22-34-40-43 S: 26-36/37/39	Steinheim Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Penstrep (1000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)			PAN Biotech, Aidenbach
Phenol, TE-äquilibriert pH 7,5-8,0	T	R: 24/25-34 S: 2-28-45	Carl Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	T	R: 25-34 S: 26-36/37/39	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Phleomycin	Xn	R: 20/21/22-36/37/38-40- 42/43-68 S: 22-26-36/37/39-45	Merck Biosciences, Schwalbach
Poly-L-Lysin Hydrobromid			Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Puromycin	Xn	R: 22 S: 22-24/25	Carl Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid			Merck, Darmstadt
Salzsäure	C	R: 34-37 S: 26-45	Carl Roth, Karlsruhe
Schneiders Drosophila Medium			PAN Biotech, Aidenbach
SDM-Medium			PAN Biotech, Aidenbach
Silbernitrat	C; N	R: 34-50/53 S: 26-45-60-61	Merck, Darmstadt
Tetracyclin	Xi	R: 36/37/38	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED)	F; C	R: 11-20/22-34 S: 16-26-36/37/39-45	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
N α -p-Tosyl-L-Lysin- Chloromethylketon-Hydrochlorid	Xi	R: 36/37/38 S: 26-36	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Tris Base	Xi	R: 36/38	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Xn	R: 22-41 S: 26-36/39	Sigma Aldrich, Steinheim
Tween 20			Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Xi	R: 36/37/38 S: 26-36	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim

2.2 Geräte

Centrifuge 5415C, 5415R und 5415D	Eppendorf, Hamburg
GS-6KR Centrifuge; GH3.8 Rotor	Beckman Coulter, Krefeld
Hermle Z 400K	Hermle Labortechnik, Wehningen
OptimaTM TL Ultracentrifuge; TLA 55-Rotor	Beckman Coulter, Krefeld

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

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

2.3 Verbrauchsmaterialien

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

2.4 E. coli Bakterienstämme

BL21	<i>hsdS gal</i> (λ clts857 <i>ind</i> 1 <i>Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene</i> 1)
M15	[pREP4] <i>lac ara gal mtl recA+ uvr+</i> [pREP4, <i>lacI</i> , <i>kanar</i>] (Qiagen, Hilden)
P2392	LE392 (P2 lysogen) (Stratagene, La Jolla, USA)
BL21 (DE3) [pAP/ <i>lac</i> ^Q]	<i>hsdS gal</i> (λ clts857 <i>ind</i> 1 <i>Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene</i> 1) [pAP/ <i>lac</i> ^Q]
TOP10 F'	F' [<i>lacIq Tn</i> 10 (TetR)] <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMSmcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)
XL1 Blue	<i>recA endA gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacqZ</i> Δ M15 <i>Tn</i> 10 (Tetr)] (Stratagene, La Jolla, USA)

2.5 Leishmanien

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

2.6 Versuchstiere

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

2.8 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden durch Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert.

LmxMKK-SA	5' CCGCGGCGATGCTCCGTATGTGA 3'
LmxMKK-TA	5' ACGCGTCGGACGTAGGAAGCGTCGGTGCACTTCCGTTGGC 3'
LmxMKK-SD	5' CCGCGGCGATGATCCGTATGTGATG 3'
IdMKK-n-term	5' GATTACATGAAGAATCGACCCGCTC 3'
IdMKK-c-term	5' TCTAGAGCACCATCTTATCAAGCTG 3'
LmaLF4_1.for	5' ACCGGCTTCGTGAGATTCA 3'
LmaLF4_1.rev	5' AGTCCATCTTGTAGTTGTA 3'
MPK13_BgIII_for	5' AGATCTCAGAAGTACCAAATCT 3'
MPK13_BgIII_rev	5' AGATCTGCTAGCCTATATCAGCTTTGGC 3'
MPK13US_Dral	5' TTAAAGGCGCTATGGCGAG 3'
MPK13DS_Dral	5' TTAAAGGCGACAGGATGC 3'
MPK13expr_for	5' GAATTCCATGGGATCCATGCAGAAGTACCAAATCTTA 3'
MPK13expr.rev	5' GATATCAAGCTTCTATATCAGCTTTGGCAG 3'
MPK13-KM.for	5' ATCCAATCGCGATTATGTGCATGAAGAAG 3'
MPK13-KM.rev	5' AATCCATCGCGACAAACTGCTGCG 3'
MPK13_TEF	5' GGTACCAACGCGTGGAGATGAACTCTGTGAGCGG 3'
MPK13_AEY	5' GGTACCAACGCGTGGAGATGTAAGTCTGCGAGCGGCAACTT 3'
MPK13_AEF	5' GGTACCAACGCGTGGAGATGAACTCTGTGAGCGGCAACTT 3'
MPK13_seq8	5' CATCGACAAGAGGTTGGG 3'
MPK13_seq11	5' TCCTCGCCCCTTCCTCAA 3'
NOP_for	5' GAATTCCATGGGATCCATGCACCTTCGAGTGT 3'
NOP_rev	5' GATATCAAGCTTCTACAGCGGCTGCAGGC 3'
NOP_BgIII_for	5' AGATCTCACCTTCGAGTGTACA 3'
NOP_BgIII_rev	5' AGATCTCTACAGCGGCTGCAGG 3'
HP_for	5' GAATTCAGGATCCGTCATGAAGAAGAGCATTTCCTCA 3'
HP_rev	5' GATATCAAGCTTACTCCATCTCGTAC 3'
LmxMPK14_1.for	5' TACATCCACAAGCGCGGCTA 3'
LmxMPK14_1.rev	5' AGGAAAGGTGTAGCGGATT 3'
MPK14_8	5' CATATTGCGTGTGTGCGT 3'
MPK14_sonde1	5' ACTACAGTAGAACTGTCG 3'
MPK14expr_for	5' GAATTCGGATCCATGGACAAATATGAAATT 3'
MPK14expr_rev	5' GATATCTCGAGCCGGCTCGGCTACG 3'
MPK14-KM.for	5' AACTAGTAGCCATCATGAAGATGAAGCAG 3'
MPK14-KM.rev	5' AGACTAGTTGGCCGTTTTTC 3'
MPK14_TDF	5' GGTACCACCGCGTGGACACGAAGTCGGTGAACGG 3'
MPK14_ADY	5' GGTACCACCGCGTGGACACGTAGTCGGCGAACGGGGGGCG 3'

MPK14_ADF	5' GGTACCACCGCGTGGACACGAAGTCGGCGAACGGGGGGCG 3'
Scal-Primer.for	5' CTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAG 3'
Scal-Primer.rev	5' ATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTC 3'
pXPHLEO2	5' AAACCGCTCGCGGTGTGTT 3'
pQE.rev	5' CTGAGGTCATTACTGGAT 3'

2.8 Plasmide

Allgemeine und bereits vorliegende Plasmide

pBluescript II SK(+)	Stratagene, La Jolla, USA
pCR®2.1-TOPO®	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
pGEX-KG	(Guan and Dixon, 1991)
pJCduet	Joachim Clos, BNI
pQE30	Qiagen, Hilden
pX63polPAC	Wiese, unveröffentlicht
pGEX-KGImmkk Klon6	(Wiese et al., 2003)
pGEX-KGImmkk Mut2 Klon29	(Wiese et al., 2003)
pGEX-KG1MCIImmkk K91-M	(Wiese et al., 2003)
pGEX-KG14XCImmkk K91M Mut2	(Wiese et al., 2003)
pX63-phleoTbMEKg-3'	E. Vassella, M. Wiese; unveröffentlicht
pGEX-KG5aBHLmxMPK3	(Erdmann et al., 2006)
PGEX-KG7LmxMPK3KM	(Erdmann et al., 2006)
pGEX-LmxPK4-1	(Kuhn and Wiese, 2005)
pGEX-LmxPK4mut1	(Kuhn and Wiese, 2005)
pJC4MPK11PK4	Wiese et al., unveröffentlicht
pGEX-KGHN3MPK9	(Bengs et al., 2005)
pGEX-KG1MPK9KM	(Bengs et al., 2005)
pJC-duet MPK9 Klon5	Wiese et al., unveröffentlicht
pJC-duet MPK9 KM Klon3	Wiese et al., unveröffentlicht

Weitere Plasmide

Eine Übersicht, der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmide, befindet sich im Anhang.

2.9 Phagenbank

λ DASH II-gDNA-Phagenbank *L. mexicana* (2. Amplifikat) (Wiese, 1991)

2.10 Antikörper

Zusätzlich zur Bezeichnung der jeweiligen Antikörper wird die verwendete Konzentration im Immunoblot/ in der Immunfluoreszenz angegeben.

Primärantikörper:

anti-LmxMCK-C-term	1:500	(Wiese et al., 2003)
anti-GST-LmxMCK	1:200	(Wiese et al., 2003)

anti-LmxMPK3-C-term	1:500	(Erdmann et al., 2006)
anti-LmxPK4-C-term	1:500	(Kuhn and Wiese, 2005)
anti-LmxMPK9-C-term	1:500	(Bengts et al., 2005)
anti-PFR2 L8C4, Hybridomzellüberstand	1:50/1:2	Keith Gull, Oxford, UK
anti-TY BB2, Hybridomzellüberstand	1:500/1:10	Keith Gull, Oxford, UK
anti-Phospho-Tyrosin 4G10, Hybridomzellüberstand	1:2	B. Fleischer BNI
anti-Digoxigenin Fab-Fragment aus Schaf, AP-gekoppelt	1:10000	Roche Diagnostics, Mannheim

Sekundärantikörper:

anti-Kaninchen IgG (H+L) aus Ziege, Meerrettichperoxidase (HRP)- gekoppelt	1:5000	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG aus Kaninchen, HRP-gekoppelt	1:2000	DAKO, Hamburg
anti-Maus IgG aus Ziege, Alexa Fluor 488-gekoppelt	1:500	Invitrogen, Karlsruhe

2.11 Enzyme

Alkalische Phosphatase, Shrimp	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Expand High Fidelity PCR System</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
Klenow Enzym	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
RNase A (bovine pancreas)	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
Thrombin	Amersham Biosciences, Freiburg

2.12 Molekularbiologische Kits

<i>PCR DIG Probe Synthesis Kit</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>TOPO TA Cloning® Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>SuperSignal West Pico Chemiluminescent</i>	Pierce/ Perbio Science, Bonn
<i>M&N Nucleospin Plasmid Kit</i>	Macherey & Nagel, Düren
<i>M&N NucleoBond Midi Kit</i>	Macherey & Nagel, Düren
<i>Lambda Midi Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>PhosphoProtein Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden

2.13 DNA- und Proteingrößenstandards

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

2.14 Kulturmedien

2.14.1 Medien für Bakterienkulturen

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

LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl
NZY-Medium	5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Casein-Hydrolysat (NZ-Amin) 5 g/l NaCl 2 g/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O; pH 7,5
NZY-Top-Agarose	0,7 % (w/v) Agarose in NZY-Medium

2.14.2 Medien für Leishmanienkulturen

Fötales Kälberserum wurde vor Gebrauch 45 min bei 56°C hitzeinaktiviert. Das inaktivierte Serum wird als iFCS bezeichnet.

SDM-Medium komplett (Brun und Schönenberger, 1979)	7,5 µg/ml Hämin 5% (v/v) iFCS 1% (v/v) Penstrep in SDM-Medium
Differenzierungsmedium	20% (v/v) iFCS 1% (v/v) Penstrep 1% (v/v) L-Glutamin 1,95 g MES/ 500 ml in Schneiders Drosophila Medium; pH 5,5
Einfriermedium für Leishmanien	10% (v/v) DMSO in iFCS

2.15 Puffer

Äquilibriumspuffer für Gelfiltration	40 mM Tris HCl pH 7 0,1% β-Mercaptoethanol 0,1mM EGTA 0,1% Triton X-100
Blockierungslösung für Immunoblot 1	5% (w/v) Magermilchpulver 20 mM Tris HCl pH 7,5 in PBST
Blockierungslösung für Immunoblot 2	5% (w/v) BSA in TBST
Bradford-Reagenz	5% (v/v) Ethanol 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 10% (v/v) Phosphorsäure filtriert und bei 4°C gelagert
Cobalt-Bindepuffer/ Waschpuffer 2	50 mM Tris HCl pH 8 1 M NaCl 10% Glycerol 20 mM Imidazol

Cobalt-Waschpuffer 1	50 mM Tris HCl pH 8 1 M NaCl 10% Glycerol 10 mM Imidazol
Cobalt-Elutionspuffer	50 mM Tris HCl pH 8 300 mM NaCl 10% Glycerol 500 mM Imidazol 1 mM PMSF
Coomassie-Entfärber	30% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
DAPI-Stammlösung	160 µg DAPI/ml in Methanol
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
DIG-Puffer 1	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl; pH 7,5
DIG-Puffer 2	1% (w/v) Blockierungsreagenz in DIG-Puffer 1
DIG-Puffer 3	50 mM MgCl ₂ 0,1 M NaCl 0,1 M Tris HCl pH 9,5
DIG-Waschpuffer	0,3% (v/v) Tween 20 in DIG-Puffer 1
DNA-Auftragungspuffer	0,5 x TBE 0,1 M EDTA pH 8 0,1% Bromphenolblau 0,1% Xylenblau 50% (v/v) Glycerol
Elektroporationspuffer	21 mM HEPES pH 7,5 137 mM NaCl 5 mM KCl 0,7 mM Na ₂ HPO ₄ 6 mM Glucose
Elutionspuffer für GST-Proteinaufreinigung	10 mM reduziertes Glutathion 50 mM Tris HCl pH 8,0
Fixierlösung für Leishmanien	3,7% Formaldehyd in 1 x PBS
Fixierlösung für Makrophagen	2% Formaldehyd in 1 x PBS
Geltrocknungslösung	20% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Glycerol
GSH-Elutionspuffer	10 mM Glutathion (reduziert) 50 mM Tris HCl pH 8
Hämin-Stammlösung	2,5 mg Hämin/ml in 50 mM NaOH
Hybridisierungslösung	50% (v/v) Formamid 5 x SSC 0,1% N-Laurylsarcosin 0,02% SDS 2% (w/v) Blockierungsreagenz
Standard-Kinase-Puffer (10 x)	0,5 M MOPS pH 7,2 100 mM MgCl ₂ 20 mM MnCl ₂ 1 M NaCl

Leishmanien-Lysepuffer für Immunoblot	50 µM Leupeptin 25 µM TLCK 1 mM PMSF 10 µM o-Phenanthrolin 1 x PBS 0,1% SDS 50 mM DTT 1 x SDS-Auftragspuffer
Mowiol/DABCO	2,4g Mowiol 6 g Glycerol 12 ml 0,2 M Tris HCl pH 8,5 6 ml ddH ₂ O 2,5% (w/v) DABCO
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M Tris HCl pH 7,1 1 mM EDTA pH 8
PBS (10 x)	1,37 M NaCl 0,5 M KCl 101 mM Na ₂ HPO ₄ 18 mM KH ₂ PO ₄
PBST	0,2% (v/v) Tween 20 in 1 x PBS
Prähybridierungslösung	100 µg/ml Fischsperm-DNA in Hybridisierungslösung
RF1	0,1 M RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ 15% (v/v) Glycerol; pH 5,8
RF2	10 mM RbCl 10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 15% (v/v) Glycerol; pH 6,8
SDS-PAGE Elektrophoresepuffer (10 x)	0,25 M Tris HCl 1,92 M Glycin 1% (w/v) SDS; pH 8,3
SDS-PAGE Auftragspuffer (5 x)	62,5 mM Tris HCl 6,8 20% (v/v) Glycerol 2% (w/v) SDS 0,001% (w/v) Bromphenolblau 200 mM DTT
SDS-PAGE Sammelgelpuffer (4 x)	0,5 M Tris HCl 0,4% (w/v) SDS; pH 6,8
SDS-PAGE Trenngelpuffer (4 x)	1,5 M Tris HCl 0,4% (w/v) SDS; pH 8,8
Silberfärbungs-Entwicklerlösung (Lsg.5)	2,5% (w/v) Na ₂ CO ₃ 0,01% (v/v) Formaldehyd
Silberfärbungs-Färbelösung (Lsg. 4)	0,1% (w/v) AgNO ₃ 0,02% (v/v) Formaldehyd
Silberfärbungs-Fixierlösung (Lsg. 1)	30% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure
Silberfärbungslösung 2	30% (v/v) Ethanol 0,5 M Natriumacetat 0,5 % (v/v) Glutaraldehyd 0,2% (w/v) Natriumthiosulfat
SM-Puffer	100 mM NaCl 8 mM MgSO ₄ 50 mM Tris HCl pH 7,5 0,01% (w/v) Gelatine

SSC (20 x)	3 M NaCl
	0,3 M Natriumcitrat; pH 7
T ₁₀ E _{0,1}	10 mM Tris HCl pH 8
	0,1 mM EDTA pH 8
TBE (5 x)	0,45 M Tris
	0,45 M Borsäure
	10 mM EDTA pH 8
TBS (10 x)	200 mM Tris HCl pH 7,5
	137 mM NaCl
TBST	0,2% Tween 20 in 1 x TBS
TELT	50 mM Tris-HCl pH 8,0
	62,5 mM EDTA pH 8,0
	2,5 M LiCl
	4 % (v/v) Triton X-100
TENS	10 mM Tris HCl pH 8
	1 mM EDTA pH 8
	10 mM NaOH
	0,5% (w/v) SDS
Transferpuffer	25 mM Tris
	150 mM Glycin
	10% (v/v) Methanol

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Kultur auf Mediumplatten

Zur Kultivierung von *E. coli* auf Mediumplatten wurden bis zu 250 µl Bakteriensuspension auf entsprechenden Mediumplatten verteilt und in inverser Orientierung bei 37°C inkubiert bis einzelne Bakterienkolonien sichtbar waren. Meist wurden LB-Platten mit einem Antibiotikum zur Selektion resistenter Bakterienkolonien benutzt (100 µg/ml Ampicillin oder bzw. und 50 µg/ml Kanamycin).

Flüssigkultur

Zur Inokulation einer Flüssigkultur wurde eine Bakterienkolonie mit einer sterilen Impföse in die jeweils geeignete Menge Flüssigmedium überführt und ÜN unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Überwiegend wurde LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin benutzt.

Glycerolkulturen zur Langzeitlagerung

500 µl einer dicht gewachsenen ÜN Kultur wurden mit 500 µl Glycerol in einem sterilen Kryoröhrchen vorsichtig gemischt und nach kurzer Inkubation auf Eis bei -70°C eingefroren.

3.1.2 Kultivierung von *Leishmania mexicana*

Kultivierung von *L. mexicana*-Promastigoten

Promastigote Leishmanien wurden in SDM-Medium bei 27°C ohne CO₂-Begasung kultiviert. Bei Vorhandensein eines Resistenzgens wurde das entsprechende Antibiotikum in folgenden Konzentrationen zugegeben: Hygromycin B: 20 µg/ml; Phleomycin: 5 µg/ml und Puromycin: 40 µM. Die Kulturen wurden jeweils nach Erreichen einer Dichte von 5 - 7 x 10⁷ Zellen/ml in einem Verhältnis von 1:500 bis 1:1000 mit einer sterilen Einwegpipette verdünnt.

In vitro-Differenzierung zu axenischen Amastigoten und deren Kultivierung

Um Promastigote zu Amastigoten zu differenzieren, wurden in der logarithmischen Wachstumsphase befindliche Leishmanien 5 min bei 2050 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden mit Differenzierungsmedium gewaschen, anschließend in einer Dichte von 4 x 10⁶ Zellen/ml in Medium aufgenommen und bei 34°C und 5% CO₂ inkubiert (Bates et al., 1992).

Leishmanien-Stabilate zur Langzeitlagerung

10 ml einer in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Leishmanien-Kultur wurden 10 min bei 2050 x g und 4°C zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden anschließend in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert und auf drei sterile Kryoröhrchen

aufgeteilt. Diese wurden 24 h in der Gasphase über flüssigem Stickstoff eingefroren und danach in der Flüssigphase versenkt. Um die gefrorenen Zellen wieder zu kultivieren, wurde das Stabilat bei 37°C aufgetaut und in 10 ml vorgewärmtes SDM-Medium überführt.

Bestimmung der Zellzahl von Leishmanien

Von der zu zählenden Leishmanien-Kultur wurden 10 µl im gewünschten Verhältnis mit Fixierlösung verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer (0,100 mm; 0,0025 mm²) gezählt. Es wurde mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt. Alternativ konnte die Zellzahl auch mit dem CASY Cellcounter & Analyzer (Schärfe System, Reutlingen) bestimmt werden. Dazu wurden 10 µl der zu messenden Leishmanienkultur mit 10 ml Casyton gemischt. Das Gerät führte eine Doppelbestimmung durch.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Herstellung kompetenter Zellen nach (Hanahan, 1983)

Aus einer Glycerolkultur wurden Bakterien des *E. coli* Stammes XL1 blue auf einer LB-Agarplatte mit 20 µg/ml Tetracyclin ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag ein Vorkultur mit einer Einzelkolonie inokuliert. Mit 500 µl der dicht gewachsenen Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium (40 µg/ml Tetracyclin) angeimpft und bei 37°C geschüttelt, bis eine OD₅₅₀ ≈ 0,2 (4 - 7 x 10⁷ Zellen/ml) erreicht war. Die Kultur wurde 15 min auf Eis gekühlt und anschließend in zwei 50 ml-Röhrchen für 15 min bei 3500 x g und 4°C zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in je 16 ml RF1 durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert, vereinigt und 90 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation, wie oben beschrieben, wurde der Zellniederschlag in 8 ml RF2 resuspendiert, weitere 15 min auf Eis inkubiert und in 200 µl Aliquots aufgeteilt. Die kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -70°C gelagert.

Herstellung kompetenter *E. coli* BL21 (DE3) [pAPlac^Q]

Die Herstellung kompetenter pAPlac-Zellen erfolgte durch eine CaCl₂-Behandlung. 200 ml LB-Medium (mit 10 µg/ml Kanamycin) wurden mit *E. coli* BL21 (DE3) [pAPlac^Q] angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C geschüttelt bis eine Zelldichte von 2 x 10⁸ Zellen/ml erreicht war (≈OD₆₀₀ von 0,3). Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation (3000 x g, 15 min, 4°C) sedimentiert. Auf Eis wurden sie in 20 ml 50 mM CaCl₂ resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wurde das Zellsediment in 2 ml 50 mM CaCl₂, 50 % Glycerin, 7 % DMSO aufgenommen. In 200 µl Aliquots wurden die Zellen dann in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, in einem Trockeneis-Ethanol-Gemisch eingefroren und bei -70°C gelagert.

3.2.2 Transformation von *E. coli*

Ein 200 µl Aliquot gefrorene kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und die Plasmid-DNA in einem Volumen von 1 - 10 µl zu den Zellen gegeben. Nach kurzem Vortexen wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert, 90 sec bei 42°C einem Hitzeschock unterworfen und für 5 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium inkubierte der Ansatz 1 h bei 37°C unter Schütteln. Von der Zellsuspension wurden 50 und 200 µl auf LB-Agarplatten, die eventuell notwendige Antibiotika enthielten, ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert. War eine Blau-Weiß-Selektion der Bakterien möglich, wurde auf den Agarplatten vor dem Ausstreichen der Bakterien 40 µl X-Gal (40 µM) und 40 µl IPTG (100 mM) ausplattiert. Die Platten wurden in diesem Fall auf 37°C vorgewärmt.

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

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

Von einer ÜN-Kultur wurden 1,5 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 30 sec bei 15800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und der Zellniederschlag durch Vortexen im verbleibenden Volumen resuspendiert. Zu der Suspension wurden 300 µl TENS-Puffer gegeben und mehrfach vorsichtig invertiert. Anschließend wurden zu dem Ansatz 150 µl 3 M NaAcetat (pH 5,2) gegeben und nochmals vorsichtig invertiert. Danach wurde für 15 min bei 4°C und 15800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene DNA durch Zugabe von 900 µl eiskaltem 100 %-igem Ethanol gefällt. Die Lösung wurde 15 min bei 4°C und 15800 x g zentrifugiert. Der entstandene DNA-Niederschlag wurde mit 1 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und anschließend wie zuvor für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die sedimentierte DNA getrocknet und in 40 µl ddH₂O aufgenommen.

b) Plasmid-DNA-Minipräparation mittels Qiagen oder Macherey & Nagel

Mit dieser Methode können geringe DNA-Mengen sehr sauber aufgereinigt werden, so dass die DNA anschließend auch in eine Sequenzierreaktion eingesetzt werden kann. Durchgeführt wurde sie nach dem Protokoll von QIAGEN bzw. Macherey & Nagel, welches mit dem entsprechenden Kit mitgeliefert wurde.

c) Plasmid-DNA-Midipräparation

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA aus 100 ml Bakterienkultur wurden Anionenaustauscher-Säulen der Firmen Qiagen, Invitrogen bzw. Macherey & Nagel verwendet. Auch hier wurde nach dem mitgelieferten Protokoll gearbeitet.

3.2.4 Transfektion von Leishmanien

Leishmanien wurden durch Elektroporation transfiziert. Dazu wurden 4×10^7 in der spätlogarithmischen Wachstumsphase befindlichen Promastigote 20 sec bei $5600 \times g$ zentrifugiert und mit 500 μ l kaltem Elektroporationspuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 400 μ l Elektroporationspuffer aufgenommen und in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (4 mm; BIO-RAD Laboratories, München) überführt. Zu der Zellsuspension wurden 1 - 5 μ g linearisierte DNA oder 5 μ g Plasmid-DNA gegeben, vorsichtig gemischt und die Zellen bei 1,5 kV, 200 Ω und 25 μ F dreimal durch Strompulse von 0,9 bis 1,1 msec elektroporiert (BIO-RAD Gene-Pulser 1652077 mit BIO-RAD Pulse Controller, BIO-RAD Laboratories). Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde der komplette Elektroporationsansatz in 10 ml SDM-Medium mit den Antibiotika der Ausgangskultur überführt und ÜN bei 27°C inkubiert. Nach 24 h wurde die Kultur mit SDM-Medium (10 % iFCS) auf 40 ml aufgefüllt und das Antibiotikum zugegeben, dessen Resistenzgen sich auf dem elektroporierten DNA-Fragment bzw. Plasmid befand. Die so verdünnte Kultur wurde auf zwei 96-Well Mikrotiterplatten verteilt und ca. 14 Tage bei 27°C inkubiert. Zellen, die nach diesem Zeitraum angewachsen waren, wurden vollständig in 2 ml-Kulturen überführt und anschließend in einem Volumen von 10 ml unter Selektionsdruck weiter inkubiert. Alternativ konnte die Elektroporation mit dem Nucleofector II (Amaxa Biosystems, Köln) durchgeführt werden. Dazu wurden 3×10^7 Promastigote aus der spätlogarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet. Anschließend wurden sie in 100 μ l der T-Cell-Solution, die bereits mit dem Supplement versetzt war, resuspendiert. Nach Zugabe der DNA (gleiche Mengen wie oben) wurde die Zellsuspension in die Küvette überführt und im Nucleofector II mit dem Programm V 033 elektroporiert. Anschließend wurde die Küvette mit den Leishmanien 10 min auf Eis gelagert, bevor die Zellen in 10 ml frisches SDM-Medium überführt wurden. Die Vereinzelung der Zellen am darauffolgenden Tag wurde wie bereits beschrieben durchgeführt.

3.2.5 Isolierung genomischer DNA aus Leishmanien (Medina-Acosta and Cross, 1993)

Um genomische DNA aus Leishmanien zu isolieren, wurden 3 ml einer logarithmischen, promastigoten Leishmanienkultur 30 sec bei $5600 \times g$ und RT zentrifugiert und die Zellen in 400 μ l frischen TELT-Puffer resuspendiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurden 400 μ l TE-äquilibriertes Phenol zugegeben, 5 min bei 4°C rotiert und anschließend 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde abgenommen und mit 400 μ l Chloroform/IAA (24:1) versetzt. Nach einer weiteren 5-minütigen Inkubation über-Kopf-rotierend bei 4°C wurden die Phasen durch eine Zentrifugation wie oben beschrieben getrennt. Die obere wäßrige Phase wurde erneut abgenommen und in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde die DNA durch Zugabe von 1 ml

eiskaltem 100 %-igen Ethanol und 5-minütiger Inkubation bei 4°C gefällt. Anschließend wurde 10 min bei 15800 x g und 4°C zentrifugiert und der DNA-Niederschlag mit 1 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde bei RT getrocknet und danach in 200 µl T₁₀E_{0,1}-Puffer resuspendiert.

3.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Probe wurde 1:100 in ddH₂O verdünnt und die Konzentration in einer UV-ette (Eppendorf) mit dem Biophotometer 6131 (Eppendorf) bestimmt. Bei einer geringen DNA-Menge konnte deren Konzentration durch Vergleich der Bandenintensitäten in einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel abgeschätzt werden.

3.2.7 Reaktionen mit DNA-modifizierenden Enzymen

a) Spezifische Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

In analytischen Standardansätzen wurden in einem Gesamtvolumen von 15 µl 0,2 – 1,0 µg Plasmid-DNA in dem für die entsprechende Restriktionsendonuklease (Typ II) geeigneten Puffer mit 5 - 10 U des Enzyms gespalten. Je nach Bedarf wurden dem Ansatz noch 2 µg BSA und 4 µg RNaseA zugegeben. Letztere vor allem bei Restriktionsspaltungen von Plasmid-Minipräparationen nach Zhou. Die Ansätze wurden nach Durchmischung in der Regel 3 h bei Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms (meist 37°C) inkubiert.

In präparativen Ansätzen wurden die Menge an DNA, die Enzymmenge und die Volumina der übrigen Komponenten entsprechend erhöht. Es wurden normalerweise 10 – 20 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl gespalten.

b) Dephosphorylierung von DNA-Enden

Bei linearisierten Vektormolekülen mit glatten oder gleichen kohäsiven Enden wurde die 5'-Phosphatgruppe mit Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP) abgespalten. Hierzu wurde die linearisierte Vektor-DNA nach Ethanol-Fällung in einem Volumen von 25 µl ddH₂O aufgenommen. Dann wurden 3 µl des 10 x SAP-Puffers sowie 2 µl SAP (5 U/µl) zugegeben und der gesamte Ansatz für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach abschließender 20-minütiger Inaktivierung der SAP bei 65°C konnte die DNA für Ligationsexperimente verwendet werden.

c) Auffüllreaktion mit Klenow-Polymerase

Zum Ligieren linearisierter DNA-Fragmente mit unterschiedlichen Enden, müssen die überhängenden Enden mit den entsprechenden Nukleotiden aufgefüllt werden. Dies ist mit Hilfe der „Fill-in“-Reaktion des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase möglich. Dazu wurde die DNA, die zuvor durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung gereinigt wurde, in 20 µl Klenow-Puffer aufgenommen. Zu dem Ansatz wurden 0,5 µl dNTP's (8 nmol/µl) und

0,5 µl Klenow-Polymerase (2 mU/µl) gegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. Zum Beenden der Reaktion wurden 2 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0) zugegeben.

d) Ligation von DNA-Fragmenten

In einen Standardligationsansatz wurden 50 - 150 ng Vektor-DNA, die dreifache Menge an Insert-DNA, 1 µl 10 x Ligase-Puffer und 0,8 µl T4 DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 µl ÜN bei 13°C bzw. 1 h bei RT inkubiert. Die DNA-Mengen wurde visuell aus dem Agarosegel abgeschätzt.

3.2.8 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zu 100 µl einer Restriktionsspaltung wurden 100 µl TE-äquilibriertes Phenol gegeben und 30 sec gevortext. Um die Phasen voneinander zu trennen, wurde 5 min bei 15.800 x g und RT zentrifugiert. Die Phenolphase wurde verworfen und zu der wässrigen Phase 100 µl Chloroform/IAA (24:1) gegeben. Nach guter Durchmischung wurde auch diese Suspension unter den gleichen Bedingungen wie oben zentrifugiert und die organische Phase verworfen. In der wässrigen Phase befindet sich die aufgereinigte DNA.

3.2.9 Ethanol-Fällung

Zu 100 µl wässriger DNA-Lösung wurden 11 µl 3 M NaAcetat (pH 5,2) und 250 µl 100 %-iger eiskalter Ethanol gegeben. Dieses Gemisch wurde für 20 min auf Trockeneis oder bei -70°C inkubiert, um anschließend bei 15.800 x g und 4°C für 15 min zu zentrifugieren. Danach wurde mit 400 µl 70%-igen Ethanol gewaschen und wie oben zentrifugiert, allerdings nur für 10 min. Der Überstand wurde verworfen. Die gefällte DNA wurde getrocknet und anschließend in 30 – 50 µl ddH₂O aufgenommen.

3.2.10 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in ethidiumbromidhaltigen 0,7 - 1,2 %-igen Agarosegelen. Zu der DNA-haltigen Probe wurden 1/10 Volumenanteile 10 x DNA-Auftragspuffer gegeben und diese in die Geltaschen überführt. Die Auftrennung erfolgte bei 1,4 - 10 V/cm. Als Elektrophoresepuffer diente 0,5 x TBE. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Anhand eines Längenstandards konnten die Größen und Mengen der DNA-Fragmente abgeschätzt werden.

3.2.11 Gelextraktion

Um DNA-Fragmente aus Agarosegelen zu extrahieren, wurde die entsprechende Bande unter schwachem UV-Licht mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Zur DNA-Extraktion wurde das QIAquick Gelextraction Kit der Fa. QIAGEN verwendet. Die DNA wurde mit 30 - 50 µl ddH₂O von der Säule eluiert.

3.2.12 Oligonukleotid–Mutagenese

Zur Veränderung eines kurzen DNA-Abschnitts durch Mutagenese, wurden zwei phosphorylierte Oligonukleotide hergestellt, die mit der gewünschten DNA-Sequenz übereinstimmten und an beiden Enden der Sequenz gespaltener Restriktionsschnittstellen entsprachen. Es wurden je 0,5 µl der Oligonukleotide (beide 100 pmol/µl) in insgesamt 50 µl ddH₂O aufgenommen und für 10 min auf 95°C erhitzt. Der Ansatz wurde anschließend für 10 min bei 65°C und je 30 min bei 37°C und RT inkubiert, so dass die beiden Oligonukleotide sich aneinander anlagern konnten. Das so generierte DNA-Fragment konnte danach in ein Plasmid ligiert werden, welches mit den Restriktionsschnittstellen linearisiert worden war, deren Sequenz das DNA-Fragment an seinen Enden trägt. Mit 1 µl linearisiertem Vektor sowie 5 µl dieses Ansatzes wurde die Ligation durchgeführt.

3.2.13 *In vitro*-Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde mit dem *Expand High Fidelity PCR System* durchgeführt. Als DNA-Template wurden sowohl gereinigte Plasmid-DNA als auch genomische DNA von *L. mexicana* und *L. major* verwendet. Die Reaktionen wurden in 200 µl-PCR-Reaktionsgefäßen in einem GeneAmp®PCR System 9700 von PE Applied Biosystems (Weiterstadt) wie folgt durchgeführt:

Reaktionsansatz:

Template:	10 - 200 ng
Primer (10µM):	je 1,5 µl
10 x PCR-Puffer mit 15 mM MgCl ₂ :	5 µl
dNTP-Mix (20 mM):	0,5 µl
Polymerase:	0,75 µl
mit ddH ₂ O	ad 50 µl

Reaktionsbedingungen:

Start/Denaturierung:	94°C	5 min	} 25 - 30 x
Denaturierung:	94°C	30 sec	
Anlagerung:	50 - 65°C	30 sec	
Elongation:	72°C	30 sec – 5 min	
Elongation:	72°C	7 min	

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

3.2.14 Klonierung eines PCR-Produktes mithilfe des TOPO TA Cloning® Kits

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

3.2.15 Sequenzierung von Plasmid-DNA

DNA-Sequenzierungen wurden extern durch die Fa. AGOWA (Berlin) durchgeführt.

3.2.16 DNA-Markierung mit Digoxigenin (DIG)-dUTP

Die Verwendung des *PCR DIG Probe Synthesis Kit* ermöglicht die Markierung eines DNA-Fragments durch den Einbau von DIG-markierten dUTP. Die Durchführung der PCR erfolgte laut Herstellerangaben. Die DIG-markierte DNA konnte nach 10 min Denaturierung bei 95°C und anschließender Inkubation auf Eis benutzt werden.

3.2.17 Southern Blot

Restriktionsspaltung genomischer DNA und Agarosegelelektrophorese

Genomische DNA von *L. mexicana* wurde wie unter 3.2.7 beschrieben gespalten, gefällt und in 15 µl HPLC-H₂O aufgenommen. Nach Zugabe von 1,5 µl 10 x DNA-Auftragspuffer erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente in einem 0,7 %-igen Agarosegel mit 7 V/cm. Das Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese mit einem seitlich angelegten Lineal, zur Kontrolle der Laufstrecke, unter UV-Licht fotografiert.

Southern Blot

Das Gel wurde zunächst bei RT 20 min in 0,25 M HCl denaturiert und anschließend in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl neutralisiert. Durch Kapillartransfer ÜN bei 4°C mit 20 x SSC als Transferpuffer wurde die DNA auf eine Biodyne A Transfer Membran (PALL, New York, USA) übertragen. Der Aufbau des Southern Blots ist in Abb. 3.1 dargestellt.

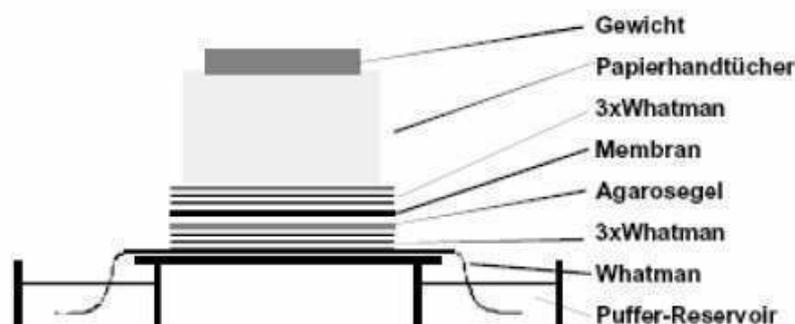


Abb. 3. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Southern Blots

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

Hybridisierung mit einer DIG-markierten Sonde und Stringenzwaschen

Die Membran wurde mit 50 ml Prähybridisierungslösung in Plastikfolie eingeschweißt und mindestens 3 h bei 42°C im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Die DIG-markierte DNA wurde nach Hitzedenaturierung (10 min, 95°C) 5 min auf Eis gekühlt und zu 50 ml vorgewärmter Hybridisierungslösung gegeben. Die Membran wurde darin ÜN bei 42°C im Wasserbad geschwenkt. Die Hybridisierungslösung wurde nach Gebrauch bei -20°C gelagert und konnte nach erneuter Hitzeinaktivierung mehrfach verwendet werden.

Die Membran wurde anschließend 2 x 7 min bei RT in je 200 ml 2 x SSC/0,1 % SDS und 2 x 10 min bei 68°C in 0,1 x SSC/0,1 % SDS unter leichtem Schwenken gewaschen.

Nachweis der DIG-Markierung

Die Detektion der DIG-markierten Sonde erfolgte über einen Alkalische-Phosphatase (AP)-gekoppelten DIG-Antikörper mit anschließender Chemolumineszenzdetektion. Die Membran wurde bei RT 5 min in DIG-Waschpuffer geschwenkt, dann mit 50 ml DIG-Puffer 2 in Plastikfolie eingeschweißt und 2 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für mindestens 45 min bei 37°C in 45 ml DIG-Puffer 2 mit anti-DIG-AP (Fab-Fragmente, 1:10.000). Danach wurde die Membran bei RT 2 x 15 min in je 200 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 und luftblasenfrei zwischen 2 Folien gelegt. Anschließend wurden mit der Membran Röntgenfilme (X-Ray, Retina, Fotochemische Werke, Berlin) in einer Röntgenfilmkassette für 30 – 120 min bei 37°C exponiert.

Abwaschen der gebundenen Sonde („stripping“)

Die Membran wurde unter ständigem Schwenken zunächst 10 min bei RT in ddH₂O, anschließend 2 x 15 min in 0,2 M NaOH/ 0,1 % SDS bei 37°C inkubiert und 5 min in 2 x SSC bei 37°C gewaschen.

3.2.18 Durchsuchen einer λ DASH II-Phagenbank

Vorbereitung der Wirtsbakterien

Als Wirt diente der Bakterienstamm *E. coli* P2932, welcher nur das Wachstum von rekombinanten Phagen zulässt. Die Bakterien wurden auf NZY-Agarplatten angezogen. Eine Einzelkolonie diente zum Beimpfen einer 3 ml ÜN-Kultur in NZY-Medium. Mit 1 ml dieser Kultur wurden 50 ml TB-Medium mit 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO₄ angeimpft und bis zu

einer OD_{600} von ca. 1 bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann durch 15-minütige Zentrifugation bei 1050 x g und 4°C sedimentiert, in 20 ml 10 mM $MgSO_4$ resuspendiert und auf eine OD_{600} von ca. 0,5 verdünnt. Aliquots von je 200 µl wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Phagenplattierung

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

Übertragung von Phagenplaques auf Nylonmembranen

Platten mit deutlich sichtbaren Phagenplaques wurden für mindestens 30 min bei 4°C gekühlt. Anschließend wurde ein Nylon-Rundfilter (Nytran® SuperCharge, Schleicher & Schuell, Dassel) für 5 min auf die Platte gelegt, dieser nummeriert und die exakte Lage durch 4 mit einer Kanüle gestochene Löcher markiert, damit die genaue Zuordnung der später erhaltenen Signale auf dem Röntgenfilm zu den einzelnen Plaques möglich war. Die Nylonmembran wurde abgezogen, 5 min mit der Plaquesseite nach oben auf ein mit Denaturierungslösung und im Anschluss 2 x 5 min auf ein mit Neutralisierungslösung getränktes Whatman-Papier gelegt. Abschließend wurde die Membran in ein Tauchbad mit 2 x SSC überführt. Nach kurzem Trocknen der Membranen auf Whatman-Papier wurde die DNA durch UV-Quervernetzung (Autocrosslinking-Funktion, UV-Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, CA, USA) fixiert und die Nylonfilter dann bis zur weiteren Verwendung in einem 2 x SSC-Bad aufbewahrt.

Prähybridisierung und Hybridisierung mit einer DIG-markierten Sonde sowie der DIG-Nachweis erfolgten wie unter 3.2.17 beschrieben.

Untersuchung der gentragenden Phagenklone

Ausgehend von den Signalen auf dem Film wurden mithilfe der Lochmarkierung auf den Nylonmembranen die positiven Plaques bestimmt. Der Agar an dieser Stelle wurde großzügig (Durchmesser ca. 3 - 5 mm) mithilfe einer Pipettenspitze ausgestochen und in je 80 µl SM-Puffer zur Elution der Phagen aus dem Agar überführt. Nach einer Inkubation ÜN

bei 4°C wurden die Phagen in verschiedenen Verdünnungen zur weiteren Untersuchung und Vereinzelung erneut ausplattiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt bis sich nur noch positive Plaques auf den Platten befanden.

Amplifikation der Phagenlösungen

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

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

4 ml einer ÜN-Kultur mit *E. coli* P2392 wurden zur Inokulation von 200 ml TB-Medium mit 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO₄ benutzt. Die Zellen wurden unter Schütteln bei 37°C inkubiert, bis sie eine OD₅₅₀ von 0,6 (entspricht 9 x 10⁷ Zellen) erreichten. Pro Phagenklon wurden je 1 x 10⁹ Zellen 15 min bei 1050 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Zelleniederschlag wurde in je 200 µl 10 mM MgSO₄/ 10⁹ Zellen resuspendiert und pro Ansatz 5 x 10⁶ Phagen in einem SM-Puffer-Volumen bis zu 10 µl zugegeben und gemischt. Zur Phagen-Präadsorption wurde 25 min bei 37°C inkubiert. Die Bakterien-Phagen-Suspension wurde anschließend in 50 ml vorgewärmtes NZY-Medium gegeben und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Wurde nach ca. 3 - 4 h ein Abfall der OD₆₀₀ beobachtet, war dies ein Indiz dafür, dass die Bakterien lysierten. Die Kultur wurde in ein 50 ml-Röhrchen überführt und je 3 % Chloroform zugegeben. Es wurde für 15 min bei RT unter Invertieren inkubiert, dann 15 min bei 4200 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in neue Röhrchen überführt. Nun wurde bis zur Präzipitation der DNA nach Herstellerangaben verfahren. Die sedimentierte Phagen-DNA wurde nach dem letzten Waschschrift nur sehr kurz bei RT getrocknet und anschließend je Klon in insgesamt 120 µl T₁₀E_{0,1} aufgenommen. Die Phagen-DNA wurde im Anschluss jeweils mit den Restriktionsendonukleasen *NotI*, *EcoRI* und *XbaI* gespalten. Die freigesetzten Fragmente wurden in den Vektor pBluescript II SK (+), der mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisiert worden war, ligiert.

3.3 Rekombinante Proteinexpression und –aufreinigung

3.3.1 Proteinexpression

Zur Expression rekombinanter Proteine wurden 100 - 500 ml LB-Medium mit einer 3 ml Übernachtskultur inokuliert und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,9 wurde mit 10 - 100 µM IPTG induziert. Die Kultur schüttelte ÜN bei 18°C weiter.

3.3.2 Proteinaufreinigung

Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die dicht gewachsene Kultur wurde 15 min bei 2050 x g und 4°C zentrifugiert. Der Zellschlag wurde mit kaltem 1 x PBS gewaschen und anschließend in 5 ml 1 x PBS resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann in 15 ml Probenröhrchen überführt. Durch Ultraschall wurden die Zellen aufgeschlossen. Dazu wurde dreimal mit Intensitäten von 2 - 4 jeweils für 20 sek mit einer 6 mm Spitze geschallt (Branson Sonifier 250, Branson, USA). Anschließend wurden zu der Suspension 600 µl 10 %-iges Triton X-100 gegeben und 30 min bei 4°C gerollert.

Zwischenzeitlich wurde die GST-Sepharose vorbereitet. Dazu wurde je 1 ml Lysat 50 µl Sepharose eingesetzt. Die 50 %-ige kommerziell erhältliche Lösung wurde zweimal mit 1 x PBS gewaschen, bevor das Zellysate zugegeben werden konnte. Dieses musste zuvor aber noch bei 15.800 x g, 4°C für 10 min zentrifugiert werden. Anschließend wurden Sepharose und Zellysate 1 h zusammen bei 4°C gerollert. Nach 2 minütiger Zentrifugation bei 4°C konnte das Lysat abgenommen und die Sepharose dreimal mit 1 x PBS gewaschen werden. Anschließend folgten zwei Elutionsschritte. Dabei wurde die Sepharose mit dem einfachen Sepharosevolumen Elutionspuffer 10 min bei 4°C gerollert.

Aufreinigung von 6 x His-Fusionsproteinen

Die Zellyse der Bakterien erfolgt wie bereits für GST-Fusionsproteine beschrieben. Die als 50 %-ige Lösung erhältliche Chelating Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde zunächst zweimal mit ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde für 5 min unter Invertieren bei RT mit einem Bettvolumen CoCl₂-Lösung (100 mM) inkubiert. Um freies Cobalt zu entfernen wurde anschließend noch dreimal mit ddH₂O gewaschen und abschließend noch einmal mit einem Bettvolumen Bindepuffer äquilibriert. Wie oben beschrieben wurden pro eingesetztem ml Lysat je 50 µl vorbereitete Sepharose eingesetzt, allerdings wurde das Lysat zuvor 1:1 mit Bindepuffer verdünnt. Das Gemisch wurde 1 h bei 4°C invertiert und anschließend nacheinander mit Waschpuffer, Bindepuffer und noch einmal mit Waschpuffer 10 min bei 4°C gerollert. Eluiert wurde zweimal 10 min bei 4°C mit je einem Bettvolumen Elutionspuffer.

3.3.3 Thrombin-Spaltung

Zum Abspalten der GST von einem GST-Fusionsprotein wurden 250 µg Protein in einem Volumen von 125 µl mit 0,12 U Thrombin (Amersham, Freiburg) ÜN bei 20°C inkubiert.

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen gemäß ihres Molekulargewichtes erfolgte mit einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Dabei wurde das Mini-Gel-System der Fa. Biometra (Göttingen) verwendet, bei dem Trenngele eine Größe von 0,1 x 5 x 8,3 cm haben. Die Proteinproben wurden mit 1/4 Probenvolumen 5 x SDS-PAGE-Auftragspuffer, der 200 mM DTT enthielt, versetzt. Nach einer 10-minütigen Denaturierung bei 95°C wurden die Proben zum Abkühlen auf Eis gestellt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 20 - 30 mA. Um auf das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine schließen zu können, wurde parallel ein Proteingrößenstandard aufgetrennt.

3.4.2 Färben von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Coomassie Brilliant Blue R-250-Färbung

Zum Anfärben von Proteine mit Coomassie Brilliant Blue R-250 wurden die Trenngele 30 bis 60 min bei RT in einer Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend unter leichtem Schütteln in Entfärbelösung inkubiert bis die Proteinbanden deutlich zu sehen waren und die Färbung des Hintergrunds ein Minimum erreicht hatte.

Silberfärbung

Die Silberfärbung stellt eine sensitivere Färbemethode dar. Alle Schritte wurden bei RT in einem Volumen von 50 -100 ml pro Gel durchgeführt. Zunächst wurde das Trenngel 10 min in Fixierlösung (Lsg.1) inkubiert und anschließend ebenfalls 10 min in Silberfärbungslösung 2 geschwenkt. Es wurde dann dreimal je 10 min mit ddH₂O gewaschen und im Anschluss 10 - 30 min in Silberfärbelösung (Lsg.4) inkubiert. Um die gefärbten Banden sichtbar zu machen, wurde dann bis zum Erreichen der gewünschten Bandenintensität in Entwicklerlösung (Lsg.5) geschwenkt. Zum Stoppen der Reaktion wurde 1 - 2 min in Lsg. 6 geschüttelt.

3.4.3 Trocknen der Gele

Gefärbte Polyacrylamidgele wurden zur langfristigen Aufbewahrung getrocknet. Dazu wurden die Gele zunächst für 30 min unter leichtem Schwenken in Geltrocknungslösung inkubiert, bevor sie auf einem Geltrocknungsrahmen (Roth, Karlsruhe) luftblasenfrei zwischen zwei in ddH₂O eingeweichte Blatt Cellophan eingespannt wurden.

3.4.4 Immunoblot

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

Die gewünschte Anzahl Zellen wurden aus einer Leishmanien-Kultur entnommen und für 30 s bei 5600 x g und RT sedimentiert. Der Zelleniederschlag wurde mit 1 ml kaltem 1 x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 100 µl SDS-Lysepuffer pro 10^8 Zellen resuspendiert, für 10 min auf 95°C erhitzt und anschließend kurz auf Eis gekühlt. Es wurden je 2×10^7 Zellen pro Tasche auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

Nach erfolgter gelelektrophoretischer Auftrennung konnten die Proteine mit Hilfe des „Semi-Dry-Verfahrens“ in einer Fastblot-Apparatur (Biometra, Göttingen) auf eine Polyvinyliden-difluorid-Membran (PVDF-Immobilon™-P-Transfer Membran, Millipore, Schwalbach) übertragen werden. Vor dem Transfer wurde die PVDF-Membran zur besseren Benetzung 1 min in Methanol geschwenkt und anschließend 10 min in Transferpuffer leicht geschüttelt. Sechs Whatman-Papiere, auf die Größe des Gels geschnitten, wurden ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Drei davon wurden als erstes auf die Anode der Blotapparatur gelegt. Auf dem oberen Whatman-Papier wurden nun nacheinander, luftblasenfrei die Membran, das Polyacrylamidgel und die drei verbleibenden Whatman-Papiere aufgeschichtet. Auf diesen Stapel wurde dann die Kathodenplatte aufgelegt und der Proteintransfer mit 4 mA/cm² Membranfläche für 20 min bei RT durchgeführt.

Immunologische Detektion

Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran wurde diese im Anschluss an den Proteintransfer 1 h bei 37°C in Blockierungslösung geschwenkt. Diese enthielt meist Magermilchpulver. Beim Nachweis von Phosphorylierungen wurde BSA als Blockierungssubstanz verwendet. Nach der Blockierung folgte die Inkubation im Primärantikörper, der in Blockierungslösung verdünnt wurde, ebenfalls für eine Stunde bei 37°C oder ÜN bei 4°C. Anschließend wurde die Membran viermal für je 5 min in 1 x PBST gewaschen. Danach folgte die Detektion mit dem Sekundärantikörper, der HRP-(Meerrettichperoxidase)-gekoppelt war, ebenfalls in einer Verdünnung in Blockierungslösung für 1 h bei 37°C. Vor der Entwicklung wurde die Membran noch dreimal in 1 x PBST und zweimal in 1 x PBS gewaschen.

Anschließend wurde sie mit einer frisch angesetzten Entwicklerlösung, zu gleichen Teilen bestehend aus den zwei Lösungen des Supersignalling Reagents (Pierce/Perbio Science, Bonn) getränkt und zwischen zwei Folien in eine Röntgenfilmkassette gelegt. Bei RT wurden Röntgenfilm zwischen 1 s und 1 h exponiert.

Abwaschen des gebundenen Antikörpers („stripping“)

War eine Detektion mit einem weiteren Primärantikörper erwünscht, so wurde die Membran für 30 min bei 68°C unter Schütteln in 100 mM β -Mercaptoethanol, 2 % SDS und 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7 inkubiert. Anschließend wurde zweimal je 10 min in 1 x PBST bei RT gewaschen. Danach konnte erneut blockiert werden.

3.4.5 Aufreinigung von Phosphoproteinen aus Leishmanien-Lysaten

Die Aufreinigung von Phosphoproteinen aus *L. mexicana* wurde aus jeweils 2×10^9 spätlogarithmischen Promastigoten nach Herstellerangaben mithilfe des *PhosphoProtein Purification Kit* (Qiagen, Hilden) vorgenommen. Die erhaltenen Eluate wurden 1:5 mit 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und durch eine Immunoblotanalyse untersucht.

3.4.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Zu 500 μ l Bradfordreagenz wurden 10 μ l der Proteinlösung gegeben und der Farbunterschied photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Mithilfe einer Eichkurve konnte die Proteinkonzentration anhand der Extinktion bestimmt werden.

3.4.7 Bestimmung von Phosphorylierungsstellen durch MS/MS

Die zu untersuchenden Proteine wurden möglichst weit auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die interessante Proteinbande wurde mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Diese Proben wurden an Heidi Rosenqvist an die Süddänische Universität in Odense/ Dänemark gesendet und anschließend wurden von ihr die massenspektrometrischen Analysen durchgeführt.

3.5 Aktivitätstests mit rekombinant exprimierten Proteinen

3.5.1 Kinase Aktivitätstest

Zum Nachweis der Aktivität von rekombinant exprimierten Kinasen wurden diese zusammen mit einem artifiziellen Substrat (Myelin basisches Protein - MBP) in Gegenwart von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ inkubiert. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE kann der Phosphorylierungsgrad des Substrates quantitativ und qualitativ ausgewertet werden. Dazu wurden 40 μ g/ml rekombinantes Protein zusammen mit 200 μ g/ml MBP, 200 μ Ci/ml $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ in 1 x Kinasepuffer 1 h bei 27°C bzw. 30°C inkubiert. Anschließend wurde $\frac{1}{4}$ des Volumens 5 x SDS-Gelauftragspuffer zugegeben und die Proben 10 min bei 95°C denaturiert. Nachdem die verschiedenen Ansätze auf einem 12%-igen SDS-Gel aufgetrennt und dieses getrocknet wurde, konnte ein Röntgenfilm (X-Ray, Retina, Fotochemische Werke, Berlin) darauf exponiert werden. Dies wurde meist über mehrere Stunden bis Tage bei -70°C getan.

3.5.2 *In vitro* Aktivierung von rekombinanten Kinasen

Durch eine Vorinkubation von rekombinanter Kinase mit ihrem Aktivator kann die Aktivität der Kinase im radioaktiven Aktivitätstest deutlich gesteigert werden. Dazu wurden 350 ng der Aktivatorkinase und 10 µg der Substratkinase mit 100 µM unmarkiertem ATP unter den optimalen Bedingungen der Aktivatorkinase inkubiert. Diese Reaktion wurde in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Nach 1 h Reaktionsdauer wurden 5 µl der Reaktion in den radioaktiven Kinase-Aktivitätstest überführt, in dem die optimalen Bedingungen für die aktivierte Kinase vorlagen.

3.5.3 Kinase-Aktivitätstests von Leishmanien-Lysaten mit rekombinanter Kinase

Für die benötigten Lysate wurden je 2×10^9 Leishmanien in 2 ml Lysepuffer (40 mM Tris-HCl pH 7,0, 2,5 mM EDTA, 15 mM DTT, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin, 1 mM ortho-Phenanthrolin) resuspendiert und durch zwei Frier-Tau-Zyklen (2 min in flüssigem Stickstoff, 45 min auf Eis) aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 15.800 x g abgetrennt. Um zelluläres ATP zu entfernen wurde der Überstand durch eine Sephadex G-25-Säule gegeben, die zuvor mit Äquilibrierungspuffer (40 mM Tris-HCl pH7,0, 0,1% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,1 mM EGTA, 0,1 % Triton X-100) gespült worden war. In einem 100 µl Ansatz wurden anschließend 2 µg rekombinante Kinase mit dem Lysat in dem optimalen Puffer mit 10 mM NaF sowie 10 mM Na-Orthovanadat unter Verwendung von 100 µM [γ -³²P] ATP (106 cpm/nmol) für 1 h bei 27 bzw. 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 x SDS-PAGE-Probenpuffer und 10-minütiges Erhitzen auf 95°C beendet. Anschließend wurden die Lysate mittels SDS-PAGE auf 10 - 15%-igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die Gele wurden Coomassie-gefärbt, getrocknet und ein Röntgenfilm exponiert.

Alternativ konnte anstelle des [γ -³²P]-ATP auch unmarkiertes ATP eingesetzt werden. Anschließend wurde das SDS-Gel Silber gefärbt und Bandenunterschiede zwischen Ansätzen mit und ohne rekombinanter Kinase analysiert.

3.6 Infektionsexperimente

3.6.1 Infektion von murinen Peritonealmakrophagen

Für die Isolierung von Peritonealmakrophagen aus Balb/c Mäusen wurden möglichst ältere Tiere verwendet. Das Fell der durch Genickbruch getöteten Maus wurde mit 70 %-igen Ethanol desinfiziert und über der Bauchdecke abpräpariert. Die Bauchdecke wurde ebenfalls desinfiziert und mit einer Pinzette angehoben, so dass 5 ml DMEM-Medium in die Bauchhöhle injiziert (Kanüle 0,6 mm x 30 mm) werden konnte. Der mit Medium gefüllte Bauch wurde 2 - 3 min massiert und wiederum desinfiziert. Anschließend wurde die Bauchdecke mit der angeschliffenen Seite der Kanüle nach unten erneut durchstoßen und

das Medium möglichst komplett zurückgewonnen und in ein steriles 50 ml-Röhrchen überführt.

Die Makrophageninfektion erfolgte in 8-well Chamber Slides mit Glasobjektträgern (Nunc International) und wurde über einen Zeitraum von bis zu 7 Tagen beobachtet. Jeweils $2,5 \times 10^5$ Makrophagen in 300 μ l DMEM-Medium wurden in die einzelnen Vertiefungen des Objektträgers pipettiert. Zur Anheftung der Makrophagen am Boden der Kammern wurden die Chamber Slides bei 34°C und 5 % CO₂ ÜN inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die *in vitro* Infektion mit den Leishmanien im Verhältnis 1:2 (Makrophagen:Leishmanien). Dazu wurde die entsprechende Menge der Leishmanien einmal mit DMEM-Medium gewaschen und zu den Makrophagen gegeben. Die Chamber Slides wurden ÜN bei 27°C und 5 % CO₂ inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Chamber Slides zunächst für 4 h bei 34°C und 5 % CO₂ inkubiert. Mit jeweils 300 μ l vorgewärmten DMEM-Medium wurden die Kammern anschließend zweimal gewaschen und erneut befüllt. Während der nächsten Tage wurde weiterhin bei 34°C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Probennahme wurde das Medium im jeweiligen Chamber Slide durch 300 μ l Fixierlösung pro Kammer ersetzt. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei RT wurden die Kammern zweimal mit je 300 μ l 1 x PBS gewaschen, mit je 300 μ l DAPI-Färbelösung (1:500-Verdünnung der DAPI-Stamlösung in 1 x PBS) versetzt und 20 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde wiederum zweimal mit 1 x PBS gewaschen, die Kammeraufsätze abgenommen und die Objektträger mittels einer MOWIOL/DABCO-Lösung eingedeckt. Die Proben wurden ÜN bei 4°C getrocknet und unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einer Anregungswellenlänge von 461 nm betrachtet.

3.6.2 Fußsohleninfektion von Balb/c Mäusen

Jeweils fünf weibliche Balb/c Mäuse im Alter zwischen sechs und zehn Wochen wurden mit LmxWt oder den zu untersuchenden Mutanten infiziert. Jeweils $1,4 \times 10^8$ Promastigote, die sich in der spätlogarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden 10 min bei 4°C und 2050 x g zentrifugiert, einmal mit 1 x PBS gewaschen und zu einer Dichte von $3,33 \times 10^8$ Zellen/ml in 1 x PBS aufgenommen. Jeder Maus wurden in die Fußsohle des linken Hinterlaufs 1×10^7 Promastigoten (in 30 μ l Suspension) injiziert (Kanüle 0,3 mm x 13 mm). Die Mäuse wurden zur Unterscheidung am rechten Ohr markiert und die Dicke des infizierten sowie des nichtinfizierten Fußes über mehrere Monate hinweg mittels einer Schieblehre (Oditest, Kroeplin, Schluechtern) gemessen.

3.6.3 Isolierung von Amastigoten aus Läsionen und anschließende Differenzierung zu Promastigoten

Der infizierte linke Hinterfuß der durch Genickbruch getöteten Balb/c-Maus wurde zunächst sorgfältig mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert, steril abgetrennt und in kleinere Stücke geschnitten. Das Läsionsgewebe wurde dann unter Spülen mit insgesamt 10 ml eiskalter

Proteaseinhibitorenlösung mit dem Stempel einer Spritze durch ein Metallsieb gerieben und der Durchfluss in einer Petrischale aufgefangen. Die so entstandene Zellsuspension wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 150 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und anschließend 10 min bei 1500 x g und 4°C zentrifugiert. Die so sedimentierten Amastigoten wurden in 10 ml Proteaseinhibitorenlösung resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend direkt zur Herstellung von Lysaten eingesetzt oder in Aliquots von 1 oder 2 x 10⁸ Zellen nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -70°C gelagert.

Zur *in vitro* Rückdifferenzierung zu Promastigoten wurden einmal mit SDM-Medium gewaschene Amastigote in SDM-Medium aufgenommen und bei 27°C inkubiert.

3.7 Mikroskopische Techniken

3.7.1 Immunfluoreszenz

Zum Nachweis bestimmter Proteine in Promastigoten konnten diese durch Immunfluoreszenz lokalisiert werden. Dazu wurden 500 µl promastigote Leishmanienkultur zentrifugiert, mit 1 x PBS gewaschen und in 500 µl 1 x PBS resuspendiert. 20 µl dieser Zellsuspension wurden zusammen mit 20 µl 4 %-igem Paraformaldehyd auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten 10-well Objektträger gegeben und blieben 15 min bei RT für die Fixierung stehen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen permeabilisiert. Dazu wurden 50 µl von Lösung 1 auf die Leishmanien gegeben und ebenfalls 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von Lösung 2 blockiert. Nach weiteren 15 min wurde die Primärantikörperlösung zugegeben. Diese setzte sich aus Blockierungslösung zusammen, der zusätzlich der Primärantikörper zugegeben wurde. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurde viermal mit Lösung 3 gewaschen. Darauf folgte eine 30-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Dazu wurde wieder Blockierungslösung benutzt, welcher der Sekundärantikörper in der gewünschten Verdünnung zugegeben wurde. Zusätzlich enthielt die Antikörperlösung 1:100 verdünntes DAPI, wodurch die DNA der Leishmanien gefärbt wurde. Anschließend wurde dreimal mit Lösung 3 gewaschen und zweimal mit 1 x PBS. Um die gefärbten Zellen luftdicht abzuschließen, wurden sie mit MOWIOL/DABCO überschichtet und ein Deckgläschen aufgelegt.

3.7.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden 10 ml einer Promastigotenkultur 10 min bei 2050 x g und 4°C zentrifugiert. Der Zelniederschlag wurde anschließend zweimal mit 1 x PBS gewaschen und danach in Fixierlösung resuspendiert. Die Einbettung der Zellen, Anfertigung der Schnitte und die eigentliche Mikroskopie wurde zentral im Institut durch Christel Schmetz durchgeführt.

3.8 *In silico*-Substratsuche mithilfe des Programmes PREDIKIN

Eine weitere Methode zur Suche nach Substraten von Proteinkinasen stellt das Computerprogramm PREDIKIN dar (Brinkworth et al., 2003). Dieses Programm kann unter <http://predikin.biosci.uq.edu.au/pkr/index.php> benutzt werden. Es macht Vorhersagen für die Zusammensetzung von Phosphorylierungsstellen von Substraten einer Kinase basierend auf der Aminosäuresequenz der katalytischen Domäne der Kinase. Mithilfe der so erhaltenen Konsensussequenz wurde die *L. major*-Datenbank auf mögliche Substrate durchsucht.

4. Ergebnisse

4.1 LmxMKK

4.1.1 Differenzierungsstudien

Der Einfluss von LmxMKK auf die Flagellenlänge sollte genauer untersucht werden. Dazu wurden Differenzierungsstudien mit *L. mexicana* Wt durchgeführt.

4.1.1.1 Differenzierung von Promastigoten zu Amastigoten

Für die Differenzierung von Promastigoten zu Amastigoten wurden Promastigote in angesäuertes Medium umgesetzt und bei 34°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 0h, 0,5h, 1h, 5h, 24h, 48h und 72h wurden Zellen für Immunoblotanalysen und lichtmikroskopische Untersuchungen geerntet. Für die Immunoblotanalyse wurden je 2 x 10⁷ Zellen pro Spur auf ein 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel geladen. LmxMKK wurde mit einem Antikörper detektiert, der ein C-terminales Peptid von LmxMKK erkennt. Nach 72 h war das Protein fast nicht mehr detektierbar.

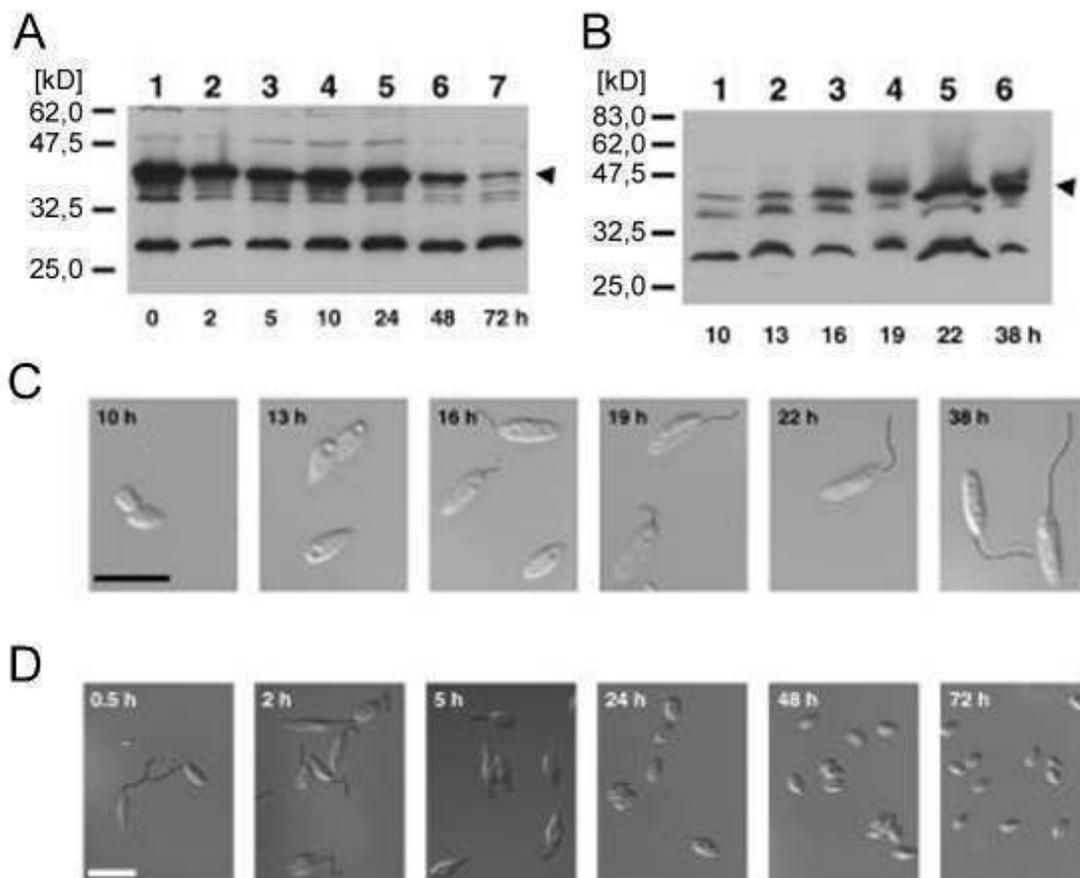


Abb. 4. 1 In vitro Differenzierung von LmxWt

A und D: Differenzierung von Pro- zu Amastigoten; B und C: Differenzierung von Amastigoten zu Promastigoten. A und B: Immunoblotanalyse mit einem Antikörper, der ein C-terminales Peptid in LmxMKK erkennt (Verdünnung 1:500). C und D: lichtmikroskopische Aufnahmen von differenzierenden Leishmanien. Der Balken entspricht 10μm.

Die fixierten Zellen für die lichtmikroskopische Analyse wurden auf einen 10-Well Objektträger gebracht und mit einem Leica Leitz DMRB Mikroskop Aufnahmen angefertigt. Dabei konnte eindeutig beobachtet werden, dass das Flagellum schon im Zeitraum von 5 bis 24 h eingeschmolzen wird. Damit wird das Flagellum zuerst verkürzt bevor die Proteinmenge der Kinase herunterreguliert wird.

4.1.1.2 Differenzierung von Amastigoten zu Promastigoten

Die Differenzierung von Amastigoten zu Promastigoten wurde wie unter 3.6.3 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden der Kultur nach 10h, 13h 16h, 19h, 22h und 38h Proben für den Immunblot und zur lichtmikroskopischen Analyse entnommen. Die Immunoblotanalyse wurde durchgeführt wie bei der Differenzierung von Promastigoten zu Amastigoten. Dabei konnte beobachtet werden, dass LmxMKK bereits 10 h nach der Initiation der Differenzierung exprimiert wird.

Auf den lichtmikroskopischen Aufnahmen war erkennbar, dass die Leishmanien nach 13 h noch kein Flagellum besitzen, aber nach 16 h schon ein kurzes Flagellum sichtbar ist. Das bedeutet, dass die Flagellenmorphogenese erst beginnt, wenn LmxMKK bereits exprimiert wird.

4.1.2 Suche nach Interaktionspartnern von LmxMKK

Einen Hinweis, wie LmxMKK Einfluss auf die Flagellenlänge nimmt, könnten mögliche Interaktionspartner sein. Diese waren bisher noch nicht bekannt. Da es sich bei LmxMKK um eine MAP Kinase Kinase handelt, ist es wahrscheinlich, dass deren Substrat eine MAP Kinase ist. Zum Zeitpunkt dieser Experimente waren in unserem Labor 9 MAP Kinase Homologe bekannt, von denen sich drei rekombinant exprimieren und aufreinigen ließen: LmxMPK1, LmxMPK3 und LmxMPK9.

Nachdem bekannt wurde, dass die Deletionsmutante von *LmxMPK3* einen ähnlichen Phänotyp zeigt wie die Nullmutante von *LmxMKK*, war der Gedanke naheliegend, dass diese beiden Proteine zum gleichen Signalweg gehören. In einem Kinase Aktivitätstest sollte überprüft werden, ob LmxMKK in der Lage ist LmxMPK3 zu phosphorylieren und möglicherweise auch zu aktivieren.

4.1.2.1 Kombinierte *in vitro*-Kinase Aktivitätstests verschiedener LmxMKK- und LmxMPK3-Mutanten

Für die rekombinante Expression von GST-LmxMPK3 und GST-LmxMPK3-KM wurde wie in 3.3.1 beschrieben vorgegangen. Die Wt Form von LmxMKK besitzt keine Autophosphorylierungsaktivität und ist auch nicht fähig MBP zu phosphorylieren. Deshalb wurden die konstitutiv aktivierte GST-LmxMKK-D und als Negativkontrolle GST-LmxMKK-KM verwendet.

Bei GST-LmxMKK-D wurden in der Aktivierungslippe mehrere Aminosäuren zu Aspartatresten mutiert. Durch deren negative Ladung wird eine Phosphorylierung an LmxMKK vorgetäuscht, was zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung führt. Bei GST-LmxMKK-KM wurde ein unter Kinasen hochkonserviertes Lysin zu einem Methionin mutiert, was zu einer Inaktivierung führt. GST-LmxMKK und GST-LmxMPK3 zeigen im SDS-Gel nur einen geringen Größenunterschied. Um sie von einander unterscheiden zu können, wurde bei den LmxMKK-Mutanten die GST durch Thrombin abgespalten. Dadurch verringerte sich das Molekulargewicht von LmxMKK um 26 kD.

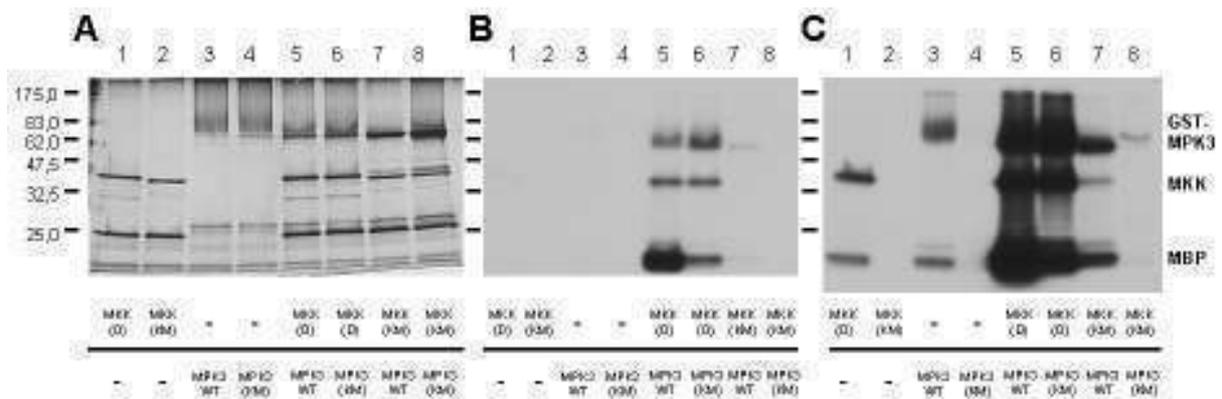


Abb. 4. 2 Kombinierte Kinase Aktivitätstest mit verschiedenen LmxMKK- und LmxMPK3-Mutanten

Links: Silbergefärbtes Polyacrylamidgel; Mitte Autoradiogramm nach 6 h Expositionszeit und Rechts: Autoradiogramm mit 5 d Expositionszeit

In den Kinase Aktivitätstests wurden jeweils 2 µg der beiden Kinasen eingesetzt. Nach einer 5-tägigen Exposition des Röntgenfilms konnte gezeigt werden, dass LmxMKK-D und GST-LmxMPK3 sich selbst und MBP phosphorylieren können. Die inaktiven Mutanten LmxMKK-KM und GST-LmxMPK3-KM zeigten hingegen keine Aktivität. Die Kombination von LmxMKK-D mit GST-LmxMPK3 zeigte bereits nach 6-stündiger Exposition des Films die stärkste Phosphorylierungsreaktion aller Ansätze. Besonders die MBP-Phosphorylierung war im Vergleich zu den Einzelansätzen deutlich erhöht. Aber auch LmxMKK-D und GST-LmxMPK3 waren deutlich stärker phosphoryliert. GST-LmxMPK3-KM wird von LmxMKK eindeutig phosphoryliert. Zusätzlich ist in dieser Spur eine Steigerung der MBP-Phosphorylierung zu sehen. Dies könnte bedeuten, dass eine Inkubation mit der inaktiven LmxMPK3 bereits zu einer Aktivitätssteigerung von LmxMKK führt. In dem Ansatz LmxMKK-KM mit der aktiven GST-LmxMPK3 konnte ebenfalls eine schwache Phosphorylierung der inaktiven LmxMKK-KM beobachtet werden, die nicht auftrat wenn LmxMKK-KM allein inkubiert wurde. Dies könnte ein Indiz für eine sogenannte „Feedback“-Phosphorylierung sein. Damit ist gemeint, dass nicht nur LmxMKK LmxMPK3 phosphoryliert, sondern dass diese Reaktion auch zu einem gewissen Anteil in der entgegengesetzten Richtung abläuft.

4.1.2.2 *In vivo*-Analyse der Phosphorylierung von LmxMPK3

Zur Untersuchung, inwieweit die beobachtete Phosphorylierung und Aktivierung von LmxMPK3 durch LmxMKK auch *in vivo* eine Rolle spielt, wurden die phosphorylierten Proteine verschiedener *Lmx*-Mutanten untersucht. Dazu wurde das PhosphoPurification Kit der Fa. Qiagen benutzt.

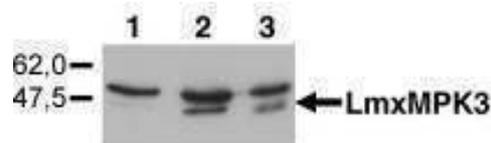


Abb. 4. 3: *In vivo*-Analyse der Phosphorylierung von LmxMPK3

Immunoblot mit einem Antikörper, der ein C-terminales Peptid von LmxMPK3 erkennt (1:500 verdünnt). Aufgetragen wurden die phosphorylierten Proteine aus Promastigoten; 1: Δ LmxMKK^{-/-}, 2: LmxWt und 3: Δ LmxMKK^{-/-} + LmxMKK-D. Der Röntgenfilm wurde 30 min exponiert.

Dabei werden die gesamten phosphorylierten Proteine aus Zellen aufgereinigt. Anschließend kann in der phosphorylierten Fraktion durch Immunoblot-Analyse nach bestimmten Proteinen gesucht werden. Es wurden die phosphorylierten Proteine von Wt Promastigoten, von Promastigoten der Δ LmxMKK^{-/-} Nullmutante und von Promastigoten der Δ LmxMKK^{-/-} + MKK-D-Mutante aufgereinigt. In einem anschließenden Immunoblot, bei dem ein polyklonales Antiserum gegen ein C-terminales Peptid von LmxMPK3 benutzt wurde, konnte gezeigt werden, dass sich LmxMPK3 unter den phosphorylierten Proteinen von Wt Promastigoten befindet. In der phosphorylierten Fraktion der *LmxMKK*-Deletionsmutante war LmxMPK3 hingegen nicht nachweisbar. In den Zellen, die konstitutiv aktive LmxMKK exprimieren, konnte hingegen LmxMPK3 in der phosphorylierten Fraktion nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass LmxMPK3 in Leishmanien nur dann phosphoryliert vorliegt, wenn LmxMKK anwesend ist.

4.1.3 Untersuchung der „Feedback“-Phosphorylierung von LmxMKK durch LmxMPK3

Mit kombinierten Kinase-Aktivitätstests sollte untersucht werden, ob LmxMPK3 LmxMKK ebenfalls phosphorylieren kann. Potentielle Phosphorylierungsmotive von LmxMPK3 sind SP- und TP-Motive. LmxMKK enthält je ein solches Motiv. Allerdings sind auch in der GST selbst schon zwei SP-Motive enthalten. Das zweite Motiv befindet sich so weit am COOH-terminalen Ende der GST, dass es auch durch eine Thrombinspaltung nicht von rekombinanter GST-LmxMKK entfernt wird. Deshalb sollten für die entsprechenden Aktivitätstests 6xHis-Fusionsproteine von LmxMKK benutzt werden.

4.1.3.1 Klonierung von *LmxMCK* in den pQE30-Vektor

Um *LmxMCK* in den pQE30-Vektor einzufügen, wurden pGEX-KG-*LmxMCK*-Mut2 und pGEX-KG-*LmxMCK*-K91M-Mut2 mit *Sma*I und *Sac*I gespalten und das 1180 bp-Fragment isoliert. pQE30 wurde mit *Bam*HI linearisiert und die Enden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt. Anschließend wurde es mit *Sac*I gespalten und mit den *LmxMCK*-Fragmenten ligiert. Die entstanden Plasmide heißen pQE30-*LmxMCK*-D und pQE30-*LmxMCK*-KM-D.

4.1.3.2 Untersuchung einer potentiellen *Feedback*-Phosphorylierung

Die beobachtete Phosphorylierung der inaktiven *LmxMCK*-KM durch GST-*LmxMCK* sollte genauer untersucht werden. Dazu wurden Kinase Aktivitätstests von unterschiedlich aktiver GST-*LmxMCK* mit His-*LmxMCK*-KM-D durchgeführt. Im Gegensatz zur bereits erwähnten *LmxMCK*-KM trägt diese Version der Kinase zusätzlich die Mutationen der D-Mutante.

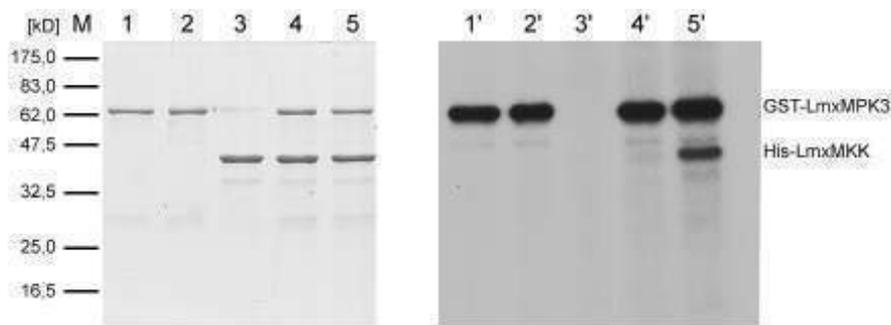


Abb. 4. 4: Kinase Aktivitätstest von GST-*LmxMCK*3 zusammen mit inaktiver His-*LmxMCK*-KM-D

Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm nach 48h Expositionszeit;
1: GST-*LmxMCK*3; 2: *in vitro*-aktivierte GST-*LmxMCK*3; 3: His-*LmxMCK*-KM-D; 4: GST-*LmxMCK*3 zusammen mit His-*LmxMCK*-KM-D und 5: *in vitro*-aktivierte GST-*LmxMCK*3 zusammen mit His-*LmxMCK*-KM-D

Im Autoradiogramm dieses Versuchs kann beobachtet werden, dass His-*LmxMCK*-KM-D (Spur 3) über keine Kinaseaktivität verfügt. Nach Inkubation mit GST-*LmxMCK*3 ist eine sehr leichte Phosphorylierung der inaktiven *LmxMCK*-Mutante zu erkennen (Spur 4). Wenn hingegen eine zuvor *in vitro*-aktivierte GST-*LmxMCK*3 eingesetzt wurde, verstärkte sich die Phosphorylierung von His-*LmxMCK*-KM-D (Spur 5) stark.

Diese Daten zeigen nicht nur, dass *LmxMCK* von *LmxMCK*3 phosphoryliert wird, sondern dass sich diese Phosphorylierung sogar deutlich verstärkt, wenn *LmxMCK*3 zuvor aktiviert wurde.

4.1.3.3 Mutation potentieller Phosphorylierungsstellen von *LmxMCK*

MAP Kinasen phosphorylieren ihre Substrate an Serin- oder Threoninresten, die von einem Prolin gefolgt werden. *LmxMCK* verfügt über je eine solche Aminosäure. Durch Mutation dieser Reste, sollte nun untersucht werden, ob *LmxMCK*3 *LmxMCK* an einem der beiden Motive phosphoryliert.

Durch eine PCR mit den Oligonukleotiden LmxMKK_SA und IdMKK-c-term wurde das Serin an Position 117 zu einem Alanin mutiert. Als Ausgangs-DNA diente das pGEX-KG6lmmkk-Plasmid. Das Amplifikat dieser PCR wurde in den pCR2.1-Vektor über eine TOPO-Cloning-Ligation eingefügt und anschließend durch Sequenzierung überprüft. Dieses Plasmid, pCR-LmxMKK-SA, wurde anschließend mit *Xba*I gespalten und in den pBSK-Vektor ligiert. Aus dem neu entstandenen Plasmid pBSK-LmxMKK-SA wurde mit *Sac*II ein Fragment geschnitten, welches gegen das entsprechende Fragment aus pGEX-KG6lmmkk ausgetauscht wurde. Das neu entstandene Plasmid heißt pGEX-KG-LmxMKK-SA.

Es wurde eine weitere PCR durchgeführt durch die das Threonin an Position 279 zu einem Alanin mutiert wurde. Dazu wurden die Primer LmxMKK_TA und IdMKK-n-term benutzt. Als Ausgangs-DNA diente ebenfalls das Plasmid pGEX-KG6lmmkk. Das 866 bp große Amplifikat wurde in den pCR2.1-Vektor kloniert.

Um die T279A-Mutation in das Expressionsplasmid pGEX-KG6lmmkk einzufügen, musste ein Teil von *LmxMKK* in den pBSK-Vektor transferiert werden. Dazu wurde pGEX-KG6lmmkk mit *Xba*I geschnitten und in den pBSK-Vektor eingefügt. Anschließend wurde pCR-LmxMKK-TA mit *Mlu*I und *Not*I geschnitten und das neu entstandene Fragment in pBSK-LmxMKK eingefügt. Aus dem neu entstandenen Plasmid pBSK-LmxMKK-TA wurde mit *Cl*aI und *Xho*I ein 641 bp-Fragment gespalten und gegen ein gleichgroßes Fragment aus dem pGEX-KG6lmmkk-Plasmid ausgetauscht.

Die Plasmide pGEX-KG-LmxMKK-SA und pGEX-KG-LmxMKK-TA wurden mit *Dra*III und *Eco*RV gespalten, um die S117A- und die T279A-Mutation miteinander zu kombinieren. Die Fragmente, welche die Mutationen trugen, wurden miteinander ligiert.

4.1.3.4 Rekombinante Expression und Proteinaufreinigung von LmxMKK-SA, LmxMKK-TA und LmxMKK-SA-TA mit anschließendem Aktivitätstest

Wie unter 3.3.1 beschrieben, wurden *E. coli*-Bakterien vom Stamm XL1 Blue, welche die Plasmide pGEX-KG-LmxMKK-Mut2, pGEX-KG6lmmkk, pGEX-KG-LmxMKK-SA, pGEX-KG-LmxMKK-TA bzw. pGEX-KG-LmxMKK-SA-TA tragen, zur rekombinanten Expression von GST-Fusionsproteinen der verschiedenen Mutanten von *LmxMKK* benutzt. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte über Glutathion-Sepharose der Firma BD Bioscience (Heidelberg).

Um die Aktivität der verschiedenen Mutanten zu überprüfen, wurde ein Aktivitätstest wie unter 3.5.1 beschrieben durchgeführt. In Abb. 4.5 ist erkennbar, dass nur die konstitutiv aktive GST-LmxMKK-D eine starke Autophosphorylierung zeigt und MBP phosphorylieren kann. Die Wt-Kinase zeigt nur eine sehr schwache Autophosphorylierungsaktivität und führt zu keiner MBP-Phosphorylierung (Wiese et al., 2003). Interessanterweise verschwindet die

schwache Autophosphorylierungsaktivität bei GST-LmxMKK-SA und GST-LmxMKK-SA-TA. Die GST-LmxMKK-TA-Mutante phosphoryliert sich ähnlich stark wie die Wt GST-LmxMKK.

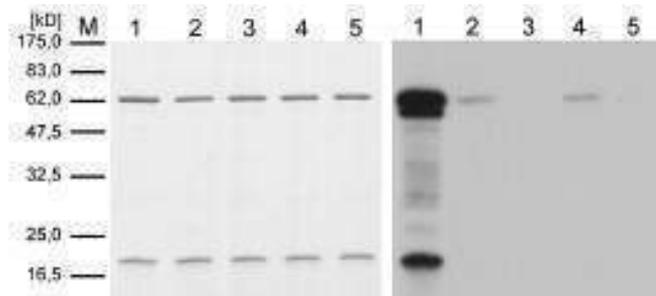


Abb. 4. 5: Kinase Aktivitätstest mit den „Feedback“-Mutanten von LmxMKK

Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm nach 1 d Expositionszeit; 1: GST-LmxMKK-D; 2: GST-LmxMKK; 3: GST-LmxMKK-SA; 4: GST-LmxMKK-TA und 5: GST-LmxMKK-SA-TA

4.1.3.5 Einfügen der neuen Mutationen in His-LmxMKK-KM-Mut2

Für die kombinierten Kinase Aktivitätstests mit LmxMPK3, mussten die neu generierten Mutationen auch in His-LmxMKK-KM-D eingefügt werden. Dazu wurden die Plasmide pQE30-LmxMKK-KM-Mut2 und pGEX-LmxMKK-Mut2-SA mit *Sac*II gespalten und das 792 bp-Fragment ausgetauscht. Das neue Plasmid heißt pQE30-LmxMKK-KM-Mut2-SA.

Da die TA-Mutation nicht durch einen Fragmentaustausch in die His-LmxMKK eingefügt werden konnte, wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden LmxMKK-TA und ldmkk-n-term auf pQE30-LmxMKK-KM-Mut2 und pQE30-LmxMKK-KM-Mut2-SA durchgeführt. Anschließend erfolgte eine TOPO-Cloning-Reaktion. Aus den Plasmiden pCR-LmxMKK-KM-TA-Mut2 und pCR-LmxMKK-KM-TA-Mut2-SA wurden mit *Cla*I und *Mlu*I die 589 bp-Fragmente isoliert und in pQE-LmxMKK-KM-Mut2-SA ligiert. Diese neuen Expressionplasmide heißen pQE30-LmxMKK-KM-TA-Mut2 und pQE30-LmxMKK-KM-TA-Mut2-SA.

4.1.3.5 Kombinierte Kinase Tests der „Feedback“-Mutanten der LmxMKK mit LmxMPK3

Zur Überprüfung ob LmxMPK3 LmxMKK an Serin 117 oder Threonin 279 phosphoryliert, wurden die neuen Mutanten mit GST-LmxMPK3 und durch GST-LmxMKK-D *in vitro*-aktivierter GST-LmxMPK3 inkubiert. Wenn die Phosphorylierung an einem der beiden untersuchten Reste stattfindet, sollte die entsprechende Mutante nicht mehr phosphoryliert werden. Aus Abb. 4.6 kann festgestellt werden, dass die Autophosphorylierung von GST-LmxMPK3 gleich bleibt, wenn sie zuvor *in vitro* durch GST-LmxMKK-D (Vergleiche Spur 1 mit Spur 10) aktiviert wurde. In den Spuren 2 bis 5 ist bei dieser Expositionszeit des Röntgenfilms keine Autophosphorylierung der Mutanten von LmxMKK zu erkennen. In den Spuren 6 bis 9 wurde zusätzlich GST-LmxMKK-D in der Konzentration zugegeben, wie sie in der *in vitro*-aktivierten GST-LmxMPK3 enthalten ist. In diesen Ansätzen ist eine Autophosphorylierung der GST-LmxMKK-D schwach erkennbar, jedoch keine Phosphorylierung der His-LmxMKK oder derer Mutanten.

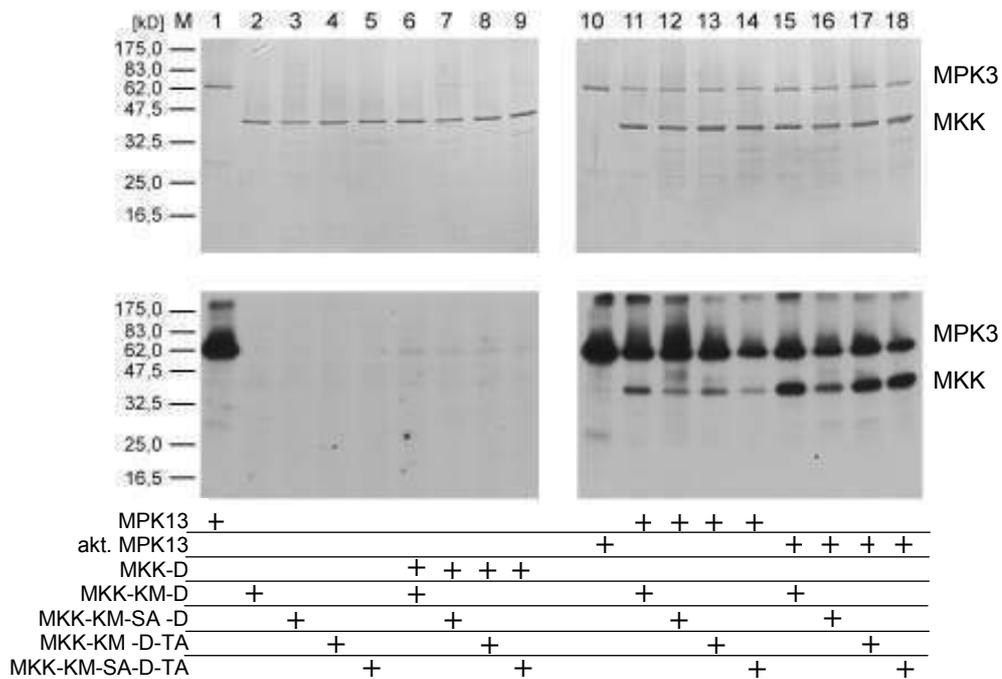


Abb. 4. 6 Kinase Aktivitätstest der LmxMKK-„Feedback“-Mutanten mit GST-LmxMPK3

Oben: Coomassie gefärbte SDS-Gele; Unten: Autoradiogramme nach 24 h Expositionszeit

In den Spuren 11 bis 14 wurde zu den Mutanten der LmxMKK GST-LmxMPK3 zugegeben und es ist eine schwache Phosphorylierung aller Versionen der LmxMKK zu erkennen. Diese scheint aber bei den LmxMKKs, bei denen das Serin zu einem Alanin mutiert wurde, etwas schwächer auszufallen. Wenn GST-LmxMPK3 vor dem Kinasetest durch GST-LmxMKK-D aktiviert wurde (Spur 15 bis 18), verstärkt sich die Phosphorylierung der LmxMKK-Mutanten deutlich. Wieder ist sichtbar, dass alle Mutanten phosphoryliert werden. Allerdings hat es den Anschein, dass His-LmxMKK-SA (Spur 16) am schwächsten phosphoryliert wird.

Da jedoch His-LmxMKK-SA-TA ebenfalls durch GST-LmxMPK3 phosphoryliert wird, kann sicher gesagt werden, dass die „Feedback“-Phosphorylierung an einem anderen Aminosäurerest als den Untersuchten stattfindet.

4.1.4 Untersuchung der Phosphorylierung von LmxMKK

4.1.4.1 Einfügen der S117A-Mutation in die konstitutiv aktivierte LmxMKK

Die Plasmide pGEX-KG-LmxMKK-Mut2 und pGEX-KG-LmxMKK-SA wurden durch die Restriktionsendonukleasen *MfeI* und *EcoRI* gespalten. Das die Mutation tragende Fragment wurde ausgetauscht. Das neu entstandene Expressionsplasmid heißt pGEX-KG-LmxMKK-SA-D.

4.1.4.2 Untersuchung des Einflusses von S117 auf die Autophosphorylierung von LmxMKK

Wie unter 3.3.1 beschrieben wurden die Plasmide pGEX-KG-LmxMKK-Mut2, pGEX-KG-LmxMKK-SA-D, pGEX-KG6lmmKK und pGEX-KG-LmxMKK-SA zur rekombinanten Proteinexpression von GST-LmxMKK-D, GST-LmxMKK-SA-D, GST-LmxMKK und GST-LmxMKK-SA benutzt. Die GST-Fusionsproteine wurden anschließend über eine Glutathion-Sepharose aufgereinigt.

Im anschließenden Kinase Aktivitätstest konnte beobachtet werden, dass die Aktivität von GST-LmxMKK drastisch absinkt, wenn das Serin an Position 117 zu Alanin mutiert ist. In Abb. 4.7 ist erkennbar, dass die Autophosphorylierung deutlich abnimmt und keine MBP-Phosphorylierungsaktivität mehr detektierbar ist.

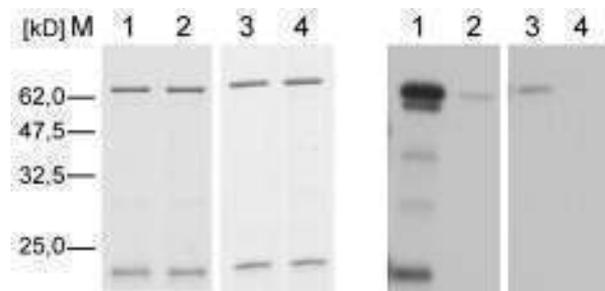


Abb. 4. 7: Kinase Aktivitätstest der SA-D-Mutanten

Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm nach 8 h

1: GST-LmxMKK-D; 2: GST-LmxMKK-SA-D; 3: GST-LmxMKK-Wt und 4: GST-LmxMKK-SA

Somit scheint das Serin an Position 117 die primäre Autophosphorylierungsstelle von LmxMKK zu sein. Außerdem hat es den Anschein, dass dieser Autophosphorylierung eine wichtige Rolle für die MBP-Phosphorylierung zukommt, da die LmxMKK-SA-Mutante nicht mehr in der Lage ist eine Substratphosphorylierung durchzuführen.

4.1.4.3 Mutation von Serin117 zu Aspartat

Da eine Phosphorylierung an Serin 117 für eine Substratphosphorylierungsaktivität von LmxMKK wichtig zu sein scheint, sollte dieser Rest zu einem Aspartat mutiert werden. Durch Einführung dieser negativen Ladung sollte eine Autophosphorylierung vorgetäuscht werden. Dies könnte zu einer MBP-Phosphorylierung führen.

Durch eine PCR mit den Oligonukleotiden LmxMKK-SD und pQE8.rev auf dem pQE30-LmxMKK-Plasmid bzw. dem pQE30-LmxMKK-D-Plasmid wurde das Serin an Position 117 zu einem Aspartat mutiert. Das entstandene Amplifikat wurde anschließend über eine TOPO-Cloning-Reaktion in den pCR2.1-Vektor ligiert. Das neu entstandene Plasmid heißt pCR-LmxMKK-SD. Nach erfolgreicher Überprüfung durch eine Sequenzierung wurde es mit dem Restriktionsenzym SacII geschnitten und gegen die unmutierte Form in pQE30-

LmxMKK und pQE30-LmxMKK-D ausgetauscht. Die neu entstandenen Plasmide heißen pQE30-LmxMKK-SD und pQE30-LmxMKK-SD-D.

4.1.4.4 Rekombinante Expression und Kinase Aktivitätstest von LmxMKK-SD

Die oben genannten Plasmide wurden in *E. coli* XL1 Blue exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte über Co²⁺-Sephrose, wie bereits unter 3.3.2 beschrieben. In den Eluaten wurde eine ähnliche Proteinkonzentration erzielt wie bei His-LmxMKK-D oder His-LmxMKK-Wt.

Um die Aktivität im Kinase Test einschätzen zu können, wurden ebenso His-LmxMKK-D, His-LmxMKK-Wt, His-LmxMKK-SA-D und His-LmxMKK-SA exprimiert und die Proteine aufgereinigt. Es wurden jeweils 2 µg Kinase unter den Standardbedingungen (Scholz, 2003) von LmxMKK mit [γ ³²P]-ATP inkubiert.

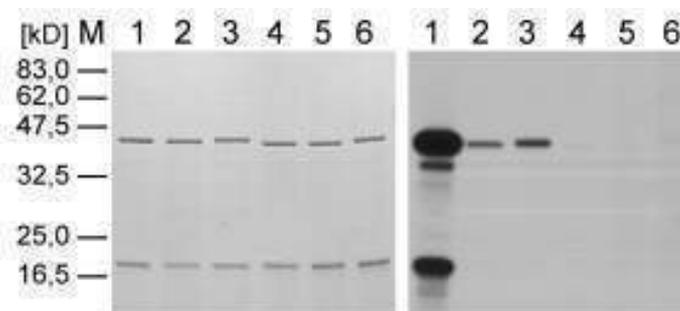


Abb. 4. 8: Kinase Aktivitätstest der LmxMKK-SD-Mutanten

Links: Coomassie gefärbtest SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm nach 10 h
1: His-LmxMKK-D; 2: His-LmxMKK-SA-D; 3: His-LmxMKK-SD-D; 4: His-LmxMKK-Wt; 5: His-LmxMKK-SA und 6: His-LmxMKK-SD

In Abb. 4.8 ist erkennbar, dass His-LmxMKK-SD-D eine ähnliche Aktivität zeigt wie His-LmxMKK-SA-D. Anstatt zu einer Kinase zu führen, die noch MBP aber nicht sich selbst phosphorylieren kann, ist noch eine leichte Autophosphorylierungsaktivität vorhanden, aber nicht mehr die Fähigkeit MBP zu phosphorylieren. His-LmxMKK-SD zeigt wie His-LmxMKK-SA keine Aktivität. Es ist aber interessant zu beobachten, dass LmxMKK-SD im SDS-Gel etwas höher läuft als die anderen LmxMKK-Mutanten.

4.1.4.5 Untersuchung von LmxMKK mit einem Phospho-Tyrosin spezifischen Antikörper

Es wurde ein Immunoblot mit Eluaten einer Proteinaufreinigung von GST-LmxMKK-D durchgeführt. Dadurch sollte überprüft werden, ob die konstitutiv aktive LmxMKK-D eine Phosphorylierung an einem Tyrosin aufweist. Dafür wurde der 4G10-Antikörper eingesetzt. Dieser Antikörper erkennt ausschließlich phosphoryliertes Tyrosin. Zum einen wurde direkt das Eluat eingesetzt, zum anderen wurde die gleiche Menge Kinase zuvor 1 h mit unmarkiertem ATP in 1 x Kinase Puffer inkubiert, um die Autophosphorylierung abzusättigen.

Bei dem Immunoblot ist nur in der zweiten Spur bei einer sehr langen Expositionszeit des Röntgenfilms eine schwache Bande im Autoradiogramm detektierbar. Dies bedeutet, dass LmxMKK-D eine schwache Autophosphorylierung an einem Tyrosin durchführt. Die Intensität fällt aber im Vergleich zur bekannten Autophosphorylierung im radioaktiven Kinase Aktivitätstest deutlich schwächer aus.

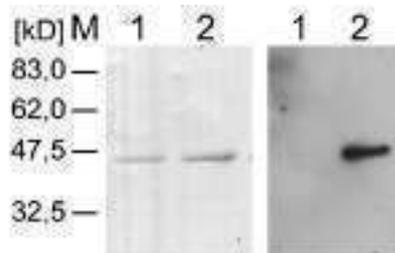


Abb. 4. 9: Immunoblot von GST-LmxMKK-D mit dem 4G10-Antikörper (1:2)

Links: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel; Rechts: exponierter Röntgenfilm (1h)
1: GST-LmxMKK-D; 2: GST-LmxMKK-D nach Inkubation mit ATP

Dies bedeutet, dass sich LmxMKK-D mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit hauptsächlich an Serin- und/oder Threoninresten phosphoryliert. Um dies nachzuweisen, werden spezifische Antikörper benötigt, die nur phosphoryliertes Serin oder phosphoryliertes Threonin erkennen. Solche Antikörper standen für diese Arbeit nicht zur Verfügung.

4.2 TbMEKg

LmxMKK und TbMEKg – das homologe Protein aus *T. brucei* - haben eine zu 64 % identische Aminosäuresequenz. Somit ist es naheliegend, dass es sich bei diesen beiden Proteinen um Orthologe handelt. In der Arbeitsgruppe von Eric Vassella am Institut für Zellbiologie der Universität Bern wurde TbMEKg untersucht und das entsprechende Gen in *Trypanosoma brucei* deletiert. Dabei wurde nicht der erwartete Phänotyp mit kurzen Flagellen beobachtet, sondern es kam lediglich zu einem Transmissionsstopp in der Tsetse-Mücke, dem Insektenvektor von *T. brucei* (unveröffentlichte Daten).

Um nun zu untersuchen, inwieweit diese beiden Proteine nur eine sehr ähnliche Aminosäuresequenz besitzen oder doch auch gleiche Funktionen ausführen können, sollte TbMEKg in der *LmxMKK*-Deletionsmutante überexprimiert werden. Dazu wurde von der Arbeitsgruppe von Eric Vassella ein Leishmanien-Überexpressionsvektor kloniert, der sowohl TbMEKg kodiert als auch ein Resistenzgen gegen Phleomycin. Zusätzlich befindet sich stromabwärts des ORF von *TbMEKg* die 3'-flankierende Region von *LmxMKK*. Das Plasmid heißt pX63-phleoTbMEKg-3'.

4.2.1 Untersuchung des Einflusses von *TbMEKg* in der *LmxMKK*-Deletionsmutante

Dieses Plasmid wurde in $\Delta LmxMKK$ -/- K4 transfiziert und zwei Einzelklone isoliert, die Phleomycin resistent sind. Das Vorhandensein des Plasmids wurde durch eine PCR bestätigt (Abb. 4.10). Dazu wurde genomische DNA aus den Klonen $\Delta LmxMKK$ -/- +TbMEKg K1 und $\Delta LmxMKK$ -/- +TbMEKg K2 isoliert. Diese wurde als Ausgangs-DNA für eine PCR mit den Oligonukleotiden TbMEKg.for und TbMEKg.rev genutzt. Bei Vorhandensein des Plasmids sollte ein DNA-Fragment mit einer Größe von ungefähr 500 bp amplifiziert werden. Als Kontrolle wurde diese PCR ebenfalls mit gDNA von LmxWt und $\Delta LmxMKK$ -/- K4 sowie mit dem pX63-phleoTbMEKg-3'-Plasmid durchgeführt.

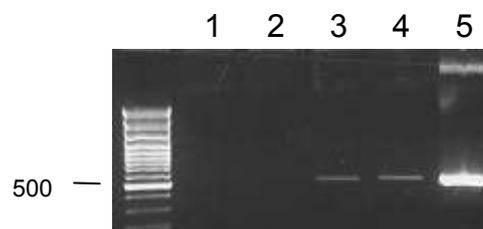


Abb. 4. 10: Bild eines Agarosegels, auf das PCR-Produkte aufgetragen wurden

1: LmxWt; 2: $\Delta LmxMKK$ -/-; 3 und 4: $\Delta LmxMKK$ -/- + TbMEKg K1 und K2; 5: pX63-phleoTbMEKg-3'

Eine Expression des Proteins konnte im Immunoblot nicht nachgewiesen werden, da die existierenden Antikörper gegen LmxMKK TbMEKg nicht erkennen und es keinen spezifischen Antikörper gegen TbMEKg gibt.

4.2.1.1 Flagellenlängenmessung der Mutanten

Nach der Elektroporation von $\Delta LmxMKK$ -/- K4 mit dem TbMEKg-Überexpressionsplasmid war bereits bei einer 400 x Vergrößerung im Lichtmikroskop sichtbar, dass die resistenten Zellen längere Flagellen besitzen als die *LmxMKK*-Deletionsmutante und auch wieder in der Lage sind zu schwimmen.

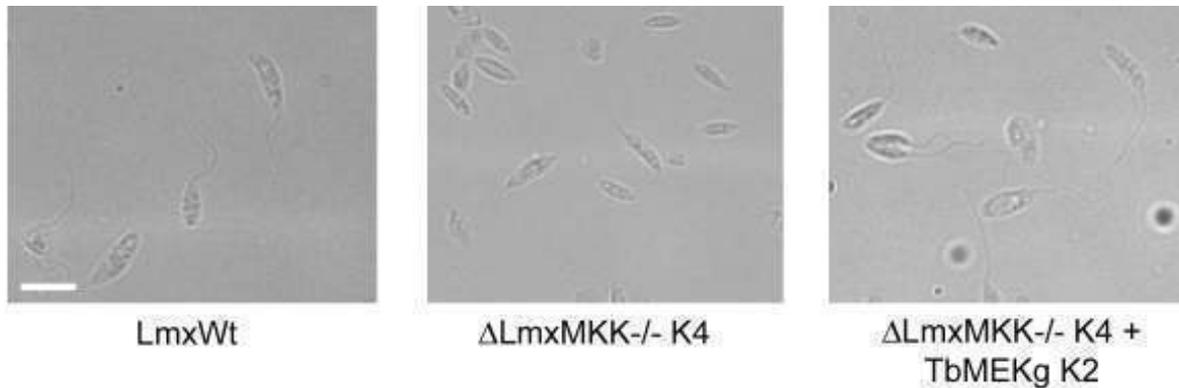


Abb. 4. 11: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Promastigoten

Der Balken entspricht 10 μ m.

Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen, wurden promastigote Wt Leishmanien und die TbMEKg-Klone1 und 2 fixiert und die Flagellenlänge von jeweils mindestens 200 Zellen am Leica Leitz DMRB Mikroskop gemessen. Dazu wurde die Software Openlab (Improvision, Heidelberg, Deutschland) benutzt.

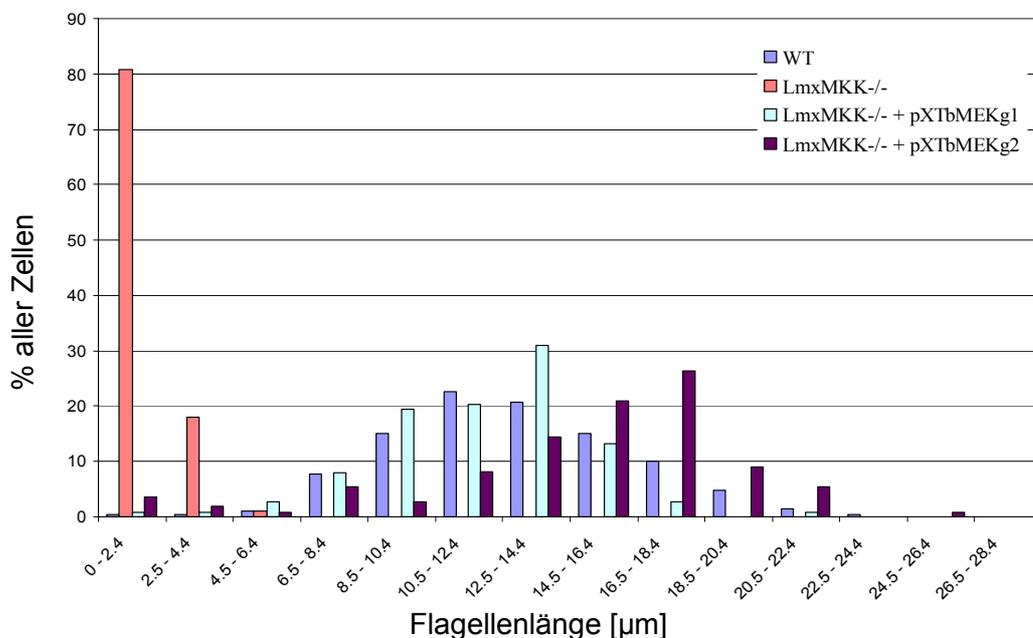


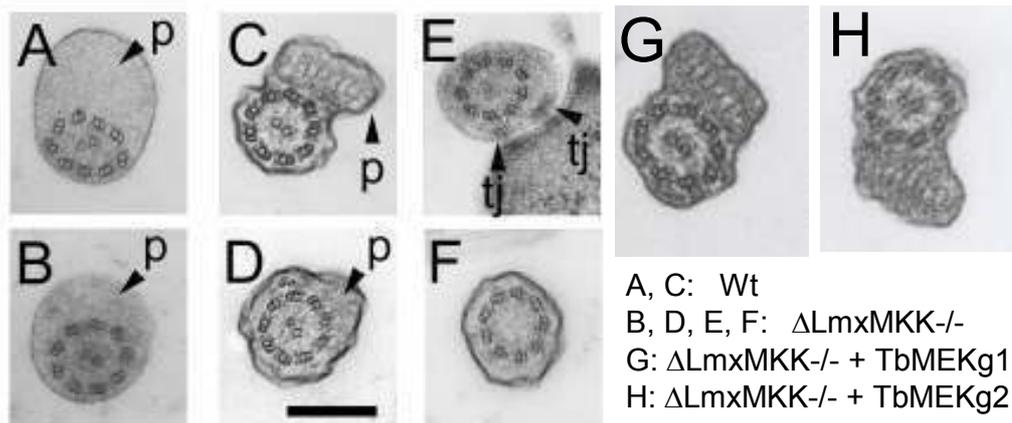
Diagramm 3. 1: Flagellenlängen von *Lmx*Wt, $\Delta LmxMKK$ -/-, $\Delta LmxMKK$ -/- +TbMEKg K1 und K2

Bei dieser Messung wurde für den Wt eine durchschnittliche Flagellenlänge von 11,9 μ m, für $\Delta LmxMKK$ -/- + TbMEKg K1 von 11,2 μ m und für $\Delta LmxMKK$ -/- + TbMEKg K2 von 13,5 μ m

bestimmt. In dem Diagramm ist gut zu erkennen, dass es bei den TbMEK_g-Mutanten zu einer ähnlichen Verteilung der Flagellenlänge wie bei Wt Promastigoten kommt.

4.2.1.2 TEM-Aufnahmen der TbMEK_g-Mutanten

Da bereits bei den lichtmikroskopischen Aufnahmen deutlich wurde, dass es zwischen der $\Delta LmxMKK$ - Deletionsmutante und den TbMEK_g-Mutanten morphologische Unterschiede gibt, wurden nun auch TEM-Aufnahmen angefertigt.



p: PFR tj: tight junction

Abb. 4. 12: TEM-Aufnahmen von Flagellenquerschnitten von verschiedenen Mutanten

Der Balken entspricht 0,25 µm.

Aus früheren TEM-Aufnahmen war bereits bekannt, dass die *LmxMKK*-Nullmutante diverse Defekte im Flagellum aufweist (Wiese et al., 2003). So war bei einem Großteil der betrachteten Zellen das PFR stark reduziert oder gar nicht vorhanden (Abb). Bei einem geringen Anteil der Zellen fehlte außerdem das innere zentrale Mikrotubuli-Paar.

Bei den TbMEK_g-Mutanten war deutlich sichtbar, dass die Ultrastruktur des Flagellums wiederhergestellt ist. Nicht nur das innere Mikrotubuli-Paar ist wieder in allen betrachteten Zellen vorhanden, sondern auch das PFR ist wieder vollständig mit seiner typischen kreuzschraffierten Struktur zu erkennen (Abb).

4.2.1.3 Infektionsexperimente mit den TbMEK_g-Mutanten

Klon1 und Klon2 dieser neu entstandenen Leishmanienmutanten wurden nun zur Infektion von je 5 weiblichen Balb/C-Mäusen benutzt. Die Infektion verlief ähnlich wie bei *Lmx*Wt. Während die *LmxMKK*-Deletionsmutante erst nach ca. 30 Wochen Läsionen bildete, waren bei den TbMEK_g-Mutanten bereits nach ca. 6 Wochen Dickenunterschiede der hinteren Füße messbar.

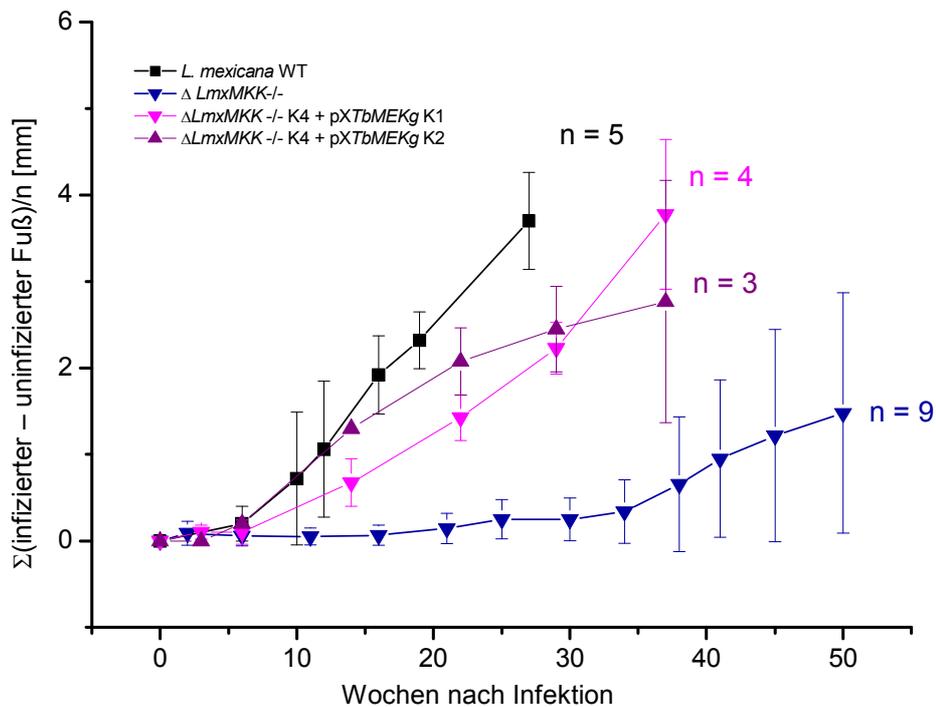


Diagramm 3.2: Infektionsverhalten der TbMEKg-Klone im Vergleich zu LmxWt und $\Delta LmxMKK^{-/-}$

In den beschriebenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass TbMEKg in der *LmxMKK*-Deletionsmutante in der Lage ist sowohl die Wt Flagellenlänge wiederherzustellen als auch wieder zu einem normalen Infektionsverhalten zu führen.

Daher liegt nun der Schluss nahe, dass möglicherweise TbMEKg auch das Substrat von LmxMKK, LmxMPK3, aktivieren kann. Um dies zu untersuchen, wurde ein Kinase Test von TbMEKg zusammen mit LmxMPK3 durchgeführt. Dazu wiederum musste TbMEKg als rekombinantes Protein exprimiert und aufgereinigt werden.

4.2.2 Analyse des rekombinanten Proteins TbMEKg

4.2.2.1 Klonierung von *TbMEKg* in das pGEX-KG-Plasmid

Um *TbMEKg* in das pGEX-KG Plasmid einzufügen, mussten zusätzliche Schnittstellen vor und hinter dem Gen eingefügt werden. Dazu wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden TbMEKgN.for und TbMEKgC.rev auf dem pX63-phleoTbMEKg-3'-Plasmid durchgeführt. Nach dem darauffolgenden TOPO-Cloning wurde das Plasmid pCR-TbMEKg an den neu eingefügten Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Hind*III gespalten und mit dem pGEX-KG-Vektor ligiert.

4.2.2.2 Rekombinante Expression und Aufreinigung von GST-TbMEKg

Das Plasmid pGEX-KG-TbMEKg wurde in *E.coli* XL1 blue Zellen transformiert. Die Überexpression wurde wie unter 3.3.1 beschrieben durchgeführt, wobei die

Proteinexpression durch Zugabe von IPTG in einer Konzentration von 50 μ M induziert wurde. Die Aufreinigung von GST-TbMEK_G erfolgt an Glutathion-Sepharose.

4.2.2.3 Kinase Aktivitätstests von GST-TbMEK_G

Es wurden 2 μ g der Kinase in einen Kinase Assay eingesetzt, um zu überprüfen wie aktiv GST-TbMEK_G ist. Dieser Test wurde unter Standardbedingungen (siehe Methoden 3.5.1) durchgeführt. GST-TbMEK_G zeigt sowohl Autophosphorylierungsaktivität als auch MBP-Phosphorylierung. Somit ist sie bereits aktiv im Gegensatz zu GST-LmxMKK, die eine aktivierende Mutation in der Aktivierungsschleife benötigt (Wiese et al., 2003).

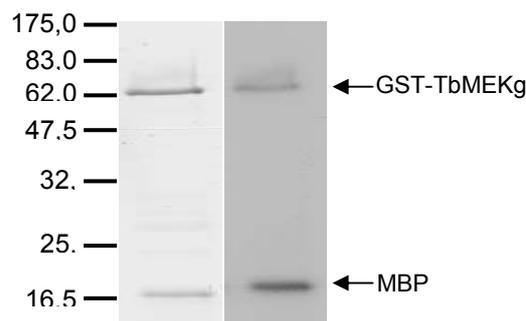


Abb. 4. 13: Kinase Aktivitätstest von GST-TbMEK_G

Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm nach 24 h

4.2.2.4 Kinase Aktivitätstest von TbMEK_G mit GST-LmxMPK3

Da für GST-TbMEK_G Kinaseaktivität nachgewiesen wurde, konnten nun kombinierte Kinase Tests zusammen mit GST-LmxMPK3 und der inaktiven GST-LmxMPK3-KM durchgeführt werden. Da die GST-Fusionsproteine von TbMEK_G und LmxMPK3 in etwa gleich groß sind, wurde bei GST-TbMEK_G die GST mit Thrombin abgespalten, was zu einer Verringerung der Größe um ca. 26 kD führte.

In der vierten Spur in Abb. 4.14 ist erkennbar, dass TbMEK_G eine starke Auto- und MBP-Phosphorylierungsaktivität besitzt. Die Phosphorylierung von MBP fällt sogar etwas stärker aus als die bei LmxMKK-D (Vergleiche Spur 1). Zusätzlich wird in allen Spuren, in denen TbMEK_G aufgetragen wurde ein weiteres Protein von ungefähr 32 kD phosphoryliert. Dabei könnte es sich um das zur Abspaltung der GST verwendete Thrombin handeln. Für diese Vermutung spricht auch, dass diese phosphorylierte Bande nicht auftaucht, wenn GST-TbMEK_G ungespalten in einen Kinase Aktivitätstest eingesetzt wird (Abb. 4.14). In Kombination mit GST-LmxMPK3 (Spur 10; gelber Stern) ist eine starke Aktivitätssteigerung von GST-LmxMPK3 sichtbar. Diese Aktivitätssteigerung entspricht in etwa der, die durch LmxMKK-D hervorgerufen wird (Vergleiche mit Spur 7). In Spur 14 (blauer Stern) ist eine starke Phosphorylierung der GST-LmxMPK3-KM in Kombination mit TbMEK_G detektierbar.

Dieses Ergebnis unterstreicht noch einmal, dass TbMEKg LmxMPK3 phosphorylieren und aktivieren kann.

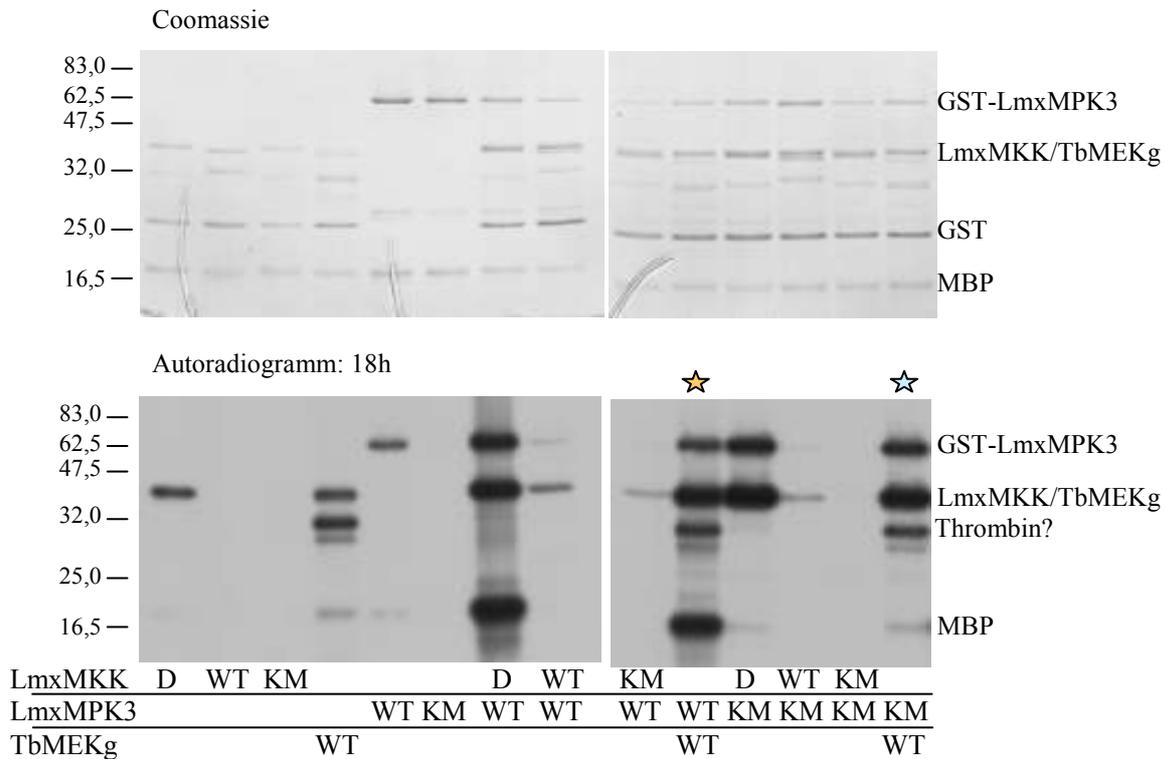


Abb. 4. 14: Kombiniertes Kinase Aktivitätstest von TbMEKg und verschiedenen LmxMKK-Mutanten zusammen mit GST-LmxMPK3

4.2.3 Mutation von Alanin214 zu Aspartat

4.2.3.1 Klonierung der Mutation

In der Phosphorylierungsschleife von LmxMKK befindet sich an Position 214 ein Alanin, wohingegen das homologe Protein, TbMEKg, an dieser Position ein Aspartat aufweist. Möglicherweise ist dieser Aminosäurerest für die erhöhte Aktivität von TbMEKg im Vergleich zu LmxMKK-Wt mitverantwortlich. Immerhin bewirkt das Einfügen von mehreren Aspartaten in genau dieser Umgebung von LmxMKK eine starke Aktivitätssteigerung, wie bei der D-Mutante gezeigt werden konnte.

Um diesen Aminosäurerest genauer zu untersuchen, sollte in LmxMKK das Alanin zu Aspartat mutiert werden. Dazu wurden die beiden phosphorylierten Oligonukleotide MKKAD.for und MKKAD.rev miteinander annealt. Dadurch wurde ein DNA-Fragment generiert, das direkt in das zuvor mit *Acc65I* und *HindIII* linearisierte pB41LmxMKK-Mut2-Plasmid ligiert werden konnte. Das neu entstandene Plasmid pB-LmxMKK-AD wurde anschließend mit *ClaI* und *MluI* gespalten und das die Mutation tragende Fragment mit dem entsprechenden Fragment aus pQE30-LmxMKK ausgetauscht. Das neue Plasmid heißt pQE30-LmxMKK-AD.

4.2.3.2 Rekombinante Expression und kombinierte Kinase Tests von LmxMKK-AD mit LmxMPK3

Das Plasmid pQE30-LmxMKK-AD wurde zur rekombinanten Expression von His-LmxMKK-AD in *E. coli* XL1 Blue Zellen benutzt. Die Aufreinigung von His-LmxMKK-AD erfolgte über Co²⁺-Sephrose. Um zu überprüfen, inwieweit die Mutation A214D zu einer Aktivitätssteigerung von LmxMKK führt, musste nicht nur His-LmxMKK-AD mit GST-LmxMPK3 inkubiert werden, sondern auch verschiedene andere LmxMKK-Mutanten und TbMEKg. LmxMKK-D, LmxMKK-Wt und LmxMKK-AD wurden als 6xHis-Fusionsproteine exprimiert. TbMEKg, LmxMPK3-Wt und LmxMPK3-KM hingegen als GST-Fusionsproteine. Von GST-TbMEKg wurde die GST mit Hilfe von Thrombin abgespalten, um einen erkennbaren Größenunterschied zu GST-LmxMPK3 im SDS-Gel zu erzielen. Der Kinase Test wurde unter den optimalen Bedingungen für LmxMKK durchgeführt.

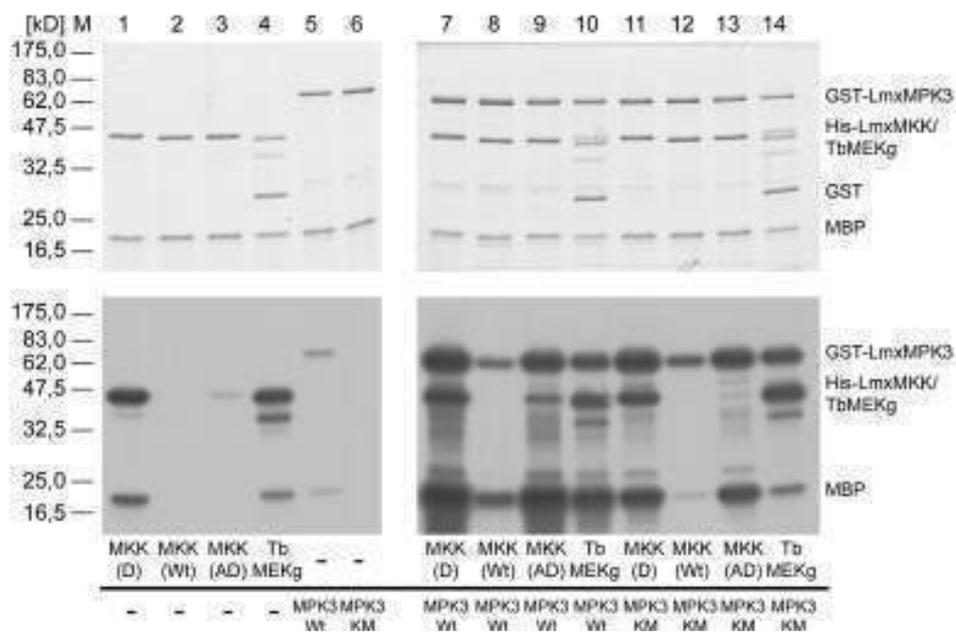


Abb. 4. 15: Kombiniertes Kinase Aktivitätstest von LmxMKK-AD, anderen LmxMKK-Mutanten und TbMEKg mit LmxMPK3

Oben: Coomassie gefärbtes SDS-Gel; Unten: Autoradiogramm nach 8 h Expositionszeit

Beim Vergleich von Spur 3 mit Spur 1 im Autoradiogramm von Abb. 4.15 fällt auf, dass His-LmxMKK-AD eine deutlich schwächere Aktivität als His-LmxMKK-D hat. Sie besitzt nur eine schwache Autophosphorylierungsaktivität und kann MBP nicht phosphorylieren. Sie ist jedoch aktiver als His-LmxMKK-Wt (Spur 2). In den kombinierten Ansätzen ist es interessant, dass His-LmxMKK-AD trotzdem sehr gut in der Lage ist GST-LmxMPK3 zu aktivieren (Spur 9). Die verstärkte MBP-Phosphorylierung findet auf einem ähnlichen Niveau statt, wie bei His-LmxMKK-D. Diese MBP-Phosphorylierung fällt tatsächlich noch intensiver aus als bei TbMEKg (Spur 10). In den kombinierten Ansätzen mit inaktiver GST-LmxMPK3-KM bestätigt sich diese Beobachtung. His-LmxMKK-AD (Spur 13) phosphoryliert GST-LmxMPK3-KM

genauso stark wie His-LmxMKK-D (Spur 11). Die Phosphorylierung von GST-LmxMPK3-KM durch TbMEKg hingegen fällt wieder etwas schwächer aus (Spur 14).

Das bedeutet, dass die AD-Mutation zu einer sehr spezifischen Aktivitätssteigerung führt. Interessanter Weise kann beobachtet werden, dass His-LmxMKK-Wt in der Lage ist die inaktive GST-LmxMPK3-KM zu phosphorylieren (Spur 12). Von LmxMKK wurde bisher angenommen, dass sie ohne Aktivierung lediglich in der Lage ist eine schwache Autophosphorylierung durchzuführen. Nun kann aber festgestellt werden, dass LmxMKK zwar kein artifizielles Substrat wie MBP phosphoryliert (Spur 2), jedoch ihr echtes Substrat, LmxMPK3, wenn auch nur leicht.

4.2.3.4 Untersuchung der Autophosphorylierung von LmxMKK-AD im Vergleich zu TbMEKg

Da auffiel, dass TbMEKg eine deutlich stärkere Autophosphorylierung durchführt als LmxMKK-AD, wurde der Phosphorylierungszustand von TbMEKg im Vergleich zu His-LmxMKK-D und His-LmxMKK-AD untersucht. Dazu wurde ein Immunoblot mit dem 4G10-Antikörper durchgeführt. Dieser erkennt ausschließlich phosphoryliertes Tyrosin. Als Proben wurden die Eluate der Proteinaufreinigung in der gleichen Konzentration wie bei einem Kinase Aktivitätstest eingesetzt.

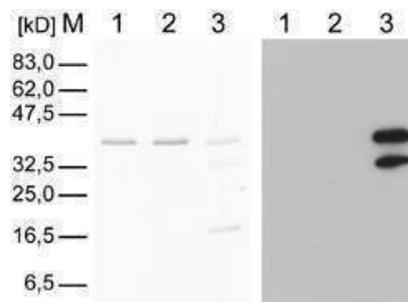


Abb. 4. 16: Immunoblot mit dem 4G10-Antikörper (1:2) auf den Eluaten der Proteinaufreinigung von His-LmxMKK-D (1), His-LmxMKK-AD (2) und bereits mit Thrombin gespaltene TbMEKg (3)

Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel; Rechts: Röntgenfilm nach 30 sec Exposition

In Abb. 4.16 ist erkennbar, dass sich der Phosphorylierungszustand von LmxMKK-D und LmxMKK-AD tatsächlich von dem von TbMEKg unterscheidet. Während die LmxMKK-Mutanten gar keine nachweisbare Tyrosinphosphorylierung besitzen, zeigt TbMEKg eine sehr starke Phosphorylierung an einem Tyrosin. Auf der Höhe des Thrombin (das nach der Abspaltung der GST noch anwesend ist) ist auch eine Bande auf dem Röntgenfilm zu erkennen. Auch im Kinase Test konnte schon beobachtet werden, dass Thrombin von TbMEKg phosphoryliert wird (Abb. 4.14). Diese Phosphorylierung scheint auch an einem Tyrosin stattzufinden.

4.3 Identifikation weiterer Interaktionspartner

Im Gegensatz zu der Nullmutante von *LmxMPK3* zeigt die Δ *LmxMKK*-/- Mutante eine deutlich verzögerte Infektiosität in Balb/C-Mäusen (Wiese et al., 2003). Die Mutante bildet erst nach ungefähr 30 Wochen Läsionen aus, wohingegen beim Wt bereits nach 5 Wochen Läsionen beobachtet werden können. Waren Läsionen aber erst einmal da, entwickelten sich diese ähnlich schnell, wie bei *LmxWt*. Amastigote, die aus solchen späten Läsionen isoliert, anschließend zu Promastigoten differenziert und danach für Reinfektionen eingesetzt wurden, führten im gleichen Tempo zur Läsionsbildung wie Wt Promastigote. Diese Beobachtungen lassen die Schlussfolgerungen zu, dass *LmxMKK* vermutlich für die Differenzierung zu Amastigoten, oder deren Proliferation wichtig jedoch nicht essentiell ist. Anfangs verharren die Zellen bei einem dieser Schritte, überleben jedoch und über die Zeit kann die fehlende Funktion kompensiert werden, wodurch wieder eine normale Entwicklung der Parasiten möglich wird.

Diese Daten sprechen dafür, dass *LmxMKK* möglicherweise weitere Substrate außer *LmxMPK3* hat. Außer dem unterschiedlichen Infektionsverhalten wurden zusätzlich Unterschiede in der Ultrastruktur der beiden Nullmutanten identifiziert (Erdmann et al., 2006), die ebenso für weitere Interaktionspartner von *LmxMKK* sprechen. In Abwesenheit von *LmxMPK3*, ist das PFR zwar meist vorhanden, zeigt aber deutliche Fehler im Aufbau. So gibt es viele Zellen, bei denen die PFR-Menge drastisch reduziert ist, aber auch Zellen, die PFR diffus um das gesamte Axonema verteilt haben. Gemein ist diesen Zellen aber, dass ihnen die strenge Struktur des PFR mit seinem Kreuzschraffur-ähnlichem Aussehen fehlt. Außerdem besaßen alle betrachteten Zellen das innere zentrale Mikrotubuli-Paar, welches bei der *LmxMKK*-Nullmutante in 11 % aller Zellen fehlte.

Da über den beobachteten Phänotyp der Deletionsmutanten von *LmxMKK* und *LmxMPK3* eine Interaktion der beiden entsprechenden Proteine gezeigt werden konnte, sollten nun auch weitere MAP Kinasen und MAP Kinase Kinasen auf mögliche Interaktionen mit *LmxMKK* untersucht werden. Dabei sollte besonderes Augenmerk auf Kinasen gelegt werden, die einen Einfluss auf die Regulation der Flagellenlänge und des flagellaren Aufbaus haben.

4.4 LmxMPK9

Aus Deletionsstudien war bereits bekannt, dass eine Nullmutante von *LmxMPK9* zu leicht verlängerten Flagellen führt (Bengs et al., 2005). Im Durchschnitt waren diese 2 μm länger als bei LmxWt. Um mögliche Interaktionen mit anderen Proteinen zu untersuchen, bei denen ebenfalls schon bekannt war, dass sie an der Regulation der Flagellenlänge beteiligt sind, musste LmxMPK9 zunächst rekombinant exprimiert, über einen Affinitäts-Tag aufgereinigt und in einem Kinase-Aktivitätstest charakterisiert werden.

4.4.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung von GST-LmxMPK9 mit anschließendem Kinase-Aktivitätstest

Um zu untersuchen inwieweit LmxMPK9 eine enzymatische Aktivität besitzt, wurde GST-LmxMPK9 in *E. coli* XL1 blue Zellen überexprimiert, anschließend über Glutathion-Sepharose aufgereinigt und in einen Kinase-Aktivitätstest eingesetzt. Um sicher zu stellen, dass das Eluat der GST-Aufreinigung nicht durch eine kontaminierende Kinase verunreinigt ist, wurde ebenso GST-LmxMPK9-KM überexprimiert, aufgereinigt und in einen Kinase-Aktivitätstest eingesetzt. Von dieser Mutante wurde erwartet, dass sie enzymatisch inaktiv ist, da ein essentielles Lysin mutiert wurde.

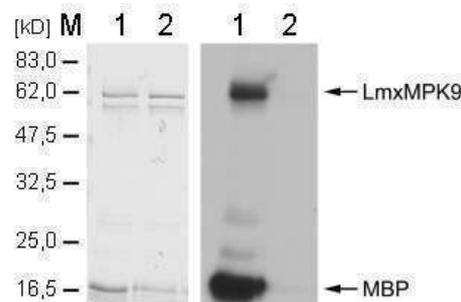


Abb. 4. 17: Kinase Aktivitätstest von LmxMPK9

Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm
1: GST-LmxMPK9; 2: GST-LmxMPK9-KM

Beide Proteine konnten in ähnlichen Konzentrationen aufgereinigt werden. Im Autoradiogramm des Kinase-Aktivitätstests konnte nur bei GST-LmxMPK9 eine Autophosphorylierung und eine Phosphorylierung von MBP detektiert werden, bei GST-LmxMPK9-KM hingegen nicht.

Durch eine Variation der Temperatur im Kinase-Aktivitätstest zwischen 4°C und 40°C konnte festgestellt werden, dass GST-LmxMPK9 ein Temperaturoptimum von ca. 27°C hat. Dies war auch zu erwarten, da aus vorangegangenen Versuchen bereits bekannt war, dass LmxMPK9 ausschließlich in Promastigoten exprimiert wird. Außerdem wurde eine Abhängigkeit der Aktivität von divalenten Kationen untersucht. Die Konzentration von Mn^{2+} wurde zwischen 0 und 10 mM und von Mg^{2+} zwischen 0 und 50 mM variiert. Bei höheren Ionenkonzentrationen zeigte GST-LmxMPK9 verstärkte Autophosphorylierung.

Interessanterweise zeigte sich die MBP-Phosphorylierung sehr abhängig von der Anwesenheit von Mn^{2+} . Deshalb kann LmxMPK9 auch als Mangan-abhängige Kinase eingestuft werden.

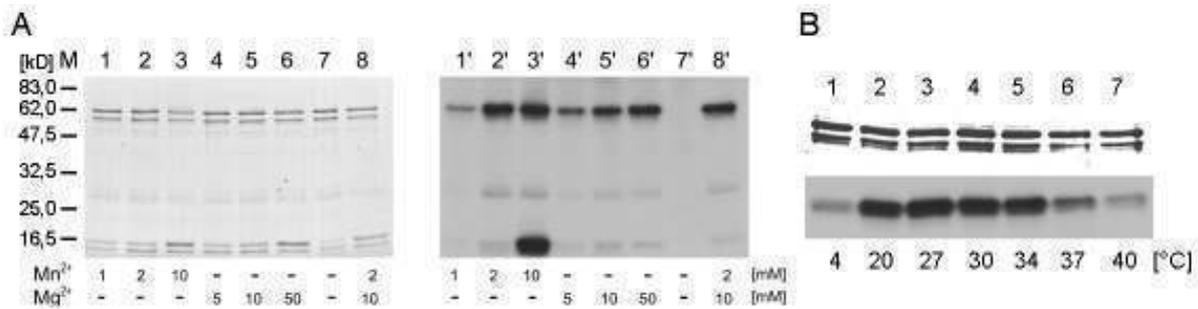


Abb. 4. 18: Kinase Aktivitätstest von LmxMPK9 unter verschiedenen Bedingungen

A: Variation der Konzentration divalenter Kationen; Links: Silber gefärbtes SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm

B: Variation der Temperatur; Oben: Silber gefärbtes SDS-Gel; Unten: Autoradiogramm

Das pH-Optimum von GST-LmxMPK9 wurde im Bereich von pH 5,5 - 9,0 untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass das pH-Optimum in Anwesenheit von 10 mM Mn^{2+} bei 7,2 liegt.

4.4.2 Kombinierte Kinase Tests mit MAP Kinase Kinase Homologen

GST-LmxMPK9 und GST-LmxMPK9KM wurden mit verschiedenen MAP Kinase Kinase Homologen aus *L. mexicana* inkubiert, um nach potentiellen Aktivatoren zu suchen. Dazu wurde zum einen LmxMKK benutzt (Daten nicht abgebildet) und zum anderen LmxPK4. Die Deletion von LmxPK4 in *L. mexicana* führt ähnlich wie die Deletion von *LmxMPK9* zu leicht verlängerten Flagellen (Kuhn, 2004).

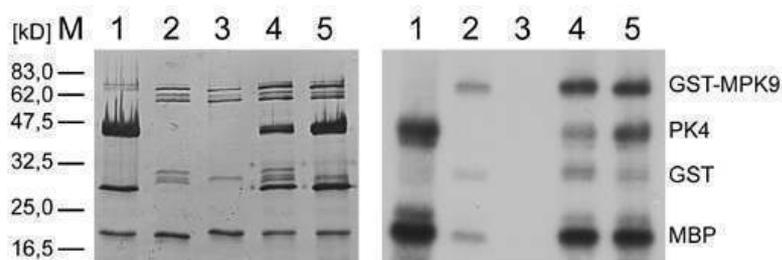


Abb. 4. 19: Kinase Aktivitätstest von LmxMPK9 zusammen mit LmxPK4

Links: Silber gefärbtes SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm;

1: LmxPK4; 2: GST-LmxMPK9; 3: GST-LmxMPK9-KM; 4: GST-LmxMPK9 zusammen mit LmxPK4 und 5: GST-LmxMPK9-KM zusammen mit LmxPK4

In Kombination mit LmxPK4 konnte eine deutliche Phosphorylierung von GST-LmxMPK9-KM (Abb. 4.19 Spur 5) beobachtet werden. Bei GST-LmxMPK9 (Spur 4) konnte ebenfalls eine starke Phosphorylierung festgestellt werden, allerdings keine stärkere Phosphorylierung von MBP. Somit kann LmxPK4 zwar scheinbar LmxMPK9 phosphorylieren, aber nicht aktivieren.

4.4.3 Coexpression mit Hilfe des pJC-duet Plasmids

Eine Möglichkeit Proteinkinasen zu aktivieren besteht darin, sie zusammen mit ihrem Aktivator zu exprimieren und anschließend separat von diesen aufzureinigen. Dazu kann man den Expressionvektor pJCduet benutzen. Dieser verfügt über zwei MCSs. In die erste wird das Gen für das zu aktivierende Protein kloniert, wodurch dieses mit einem 6 x His-Tag versehen wird. In die zweite MCS wird das Gen kloniert, welches für den Aktivator kodiert. Während der rekombinanten Expression bestehen optimale Bedingungen für die Wechselwirkung beider Proteine miteinander. Dadurch sollte eine Aktivierung stattfinden, wenn es sich bei LmxMPK9 um das Substrat von LmxPK4 handelt.

4.4.3.1 Klonierungen

Die Plasmide pJCduet-LmxMPK9 und pJCduet-LmxMPK9-KM standen beide bereits vor Arbeitsbeginn in unserem Labor zur Verfügung. Um LmxMPK9 mit LmxPK4 zu kombinieren, wurden diese beiden Plasmide mit *Bgl*II gespalten und mit dem pJCduet-LmxPK4-Vektor ligiert, welcher zuvor ebenfalls mit *Bgl*II linearisiert wurde. Die neuen Plasmide heißen pJCduet-LmxMPK9-LmxPK4 und pJCduet-LmxMPK9-KM-LmxPK4.

4.4.3.2 Rekombinante Coexpression mit anschließendem Kinase Aktivitätstest

Um mit diesen Konstrukten LmxMPK9 zu exprimieren, wurden die Plasmide in *E. coli* pAPlac transformiert. Die rekombinante Expression fand unter Standardbedingungen statt und die verschiedenen Versionen von LmxMPK9 wurden über Co^{2+} -Sepharose aufgereinigt. Die Proteinkonzentration in den Eluaten nach der Proteinaufreinigung fiel sehr gering aus. Trotzdem wurden Kinase Aktivitätstests durchgeführt.

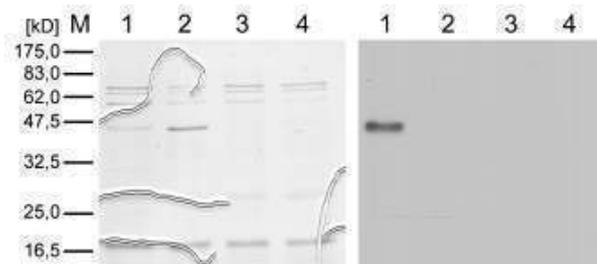


Abb. 4. 20: Kinase Aktivitätstest von His-LmxMPK9 coexprimiert mit LmxPK4

Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm nach 2 d

1: His-LmxMPK9; 2: His-LmxMPK9-KM; 3: His-LmxMPK9 coexprimiert mit LmxPK4
und 4: His-LmxMPK9-KM coexprimiert zusammen mit LmxPK4

In Abb. 4.20 kann in Spur 1 bei His-LmxMPK9 eine Autophosphorylierung beobachtet werden. Allerdings ist die Kinase nicht in der Lage MBP zu phosphorylieren. Wie erwartet zeigt His-LmxMPK9-KM keine Kinaseaktivität (Spur 2). Bei den mit LmxPK4 coexprimierten Versionen von LmxMPK9 ist im SDS-Gel (Spuren 3 und 4) keine Bande auf der erwarteten Höhe zu erkennen. Und auch im Autoradiogramm ist bei der coexprimierten His-LmxMPK9

(Spur 3) kein Signal sichtbar. Daher muss davon ausgegangen werden, dass zu wenig oder kein Protein aufgereinigt wurde.

Somit kann mit Hilfe des Coexpressionssystems keine neue Erkenntnis bezüglich der Interaktion zwischen LmxMPK9 und LmxPK4 gewonnen werden.

4.4.4 Kinase Tests in Kombination mit LmxCRK3

(Fu et al., 2005) veröffentlichten 2005, dass ICK durch CAK1p aktiviert wird. LmxMPK9 zeigt sehr hohe Homologie zu dieser ICK. Wenn man den Aktivator von LmxMPK9 sucht, ist somit die Suche nach dem Homologen von CAK1p in *L. mexicana* lohnenswert. Bei www.genedb.org konnte LmjCRK3 als ähnlichstes Protein von CAK1p in *L. major* identifiziert werden.

Die Arbeitsgruppe von J. Mottram in Glasgow/ Großbritannien arbeitet mit LmxCRK3 und hat freundlicherweise rekombinantes Protein für Kinase Tests zur Verfügung gestellt. LmxCRK3 wurde durch eine Coexpression mit His-Cyclin aktiv aufgereinigt.

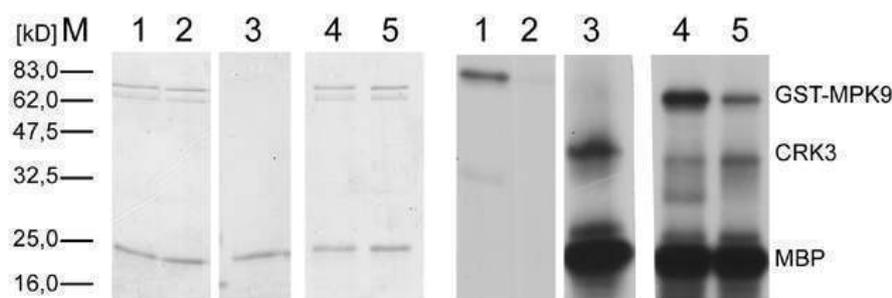


Abb. 4. 21: Kombinierte Kinase Aktivitätstests von GST-LmxMPK9 zusammen mit LmxCRK3

Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm nach 20 h

1: GST-LmxMPK9; 2: GST-LmxMPK9-KM; 3: LmxCRK3; 4: GST-LmxMPK9 zusammen mit LmxCRK3 und 5: GST-LmxMPK9-KM zusammen mit LmxCRK3

In Abb. 4.21 ist gut erkennbar, dass die rekombinante LmxCRK3, die von J. Mottram zur Verfügung gestellt wurde, sehr aktiv ist (Spur 3). Obwohl nur sehr wenig Protein eingesetzt wurde, sind eine leichte Auto- und eine sehr starke MBP-Phosphorylierung zu beobachten.

In Kombination mit LmxCRK3 werden GST-LmxMPK9 und die inaktive GST-LmxMPK9-KM etwas stärker phosphoryliert. Es ist aber keine verstärkte Phosphorylierung des MBP zu beobachten.

4.5 Neue Proteinkinasen

Auf der Suche nach weiteren MAP Kinasen, die an der Flagellenlängenregulation beteiligt sein könnten, wurde eine Datenbankanalyse durchgeführt (Wiese, 2007). Dazu wurde das Genom von *L. major* nach nachstehender Aminosäureabfolge durchsucht: TXYXXRXRYRXP. Dabei wurden die Gene von 2 neuen potentiellen MAP Kinasen identifiziert, die von Interesse sind: *LmxMPK13* und *LmxMPK14*. Das erste der beiden zeigt eine sehr hohe Homologie zu LF4, dem Long Flagellar Protein 4. Das Fehlen dieses Proteins in der begeißelten Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* führt zu einer extremen Verlängerung der beiden Flagellen auf die doppelte Länge (Berman et al., 2003).

Das zweite Gen zeigt große Homologie zu *LmxMPK9* für die in unserem Labor schon eine Beteiligung an der Flagellenlängenregulation gezeigt werden konnte (Bengs et al., 2005).

In den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der beiden Gene konnten alle typischen MAP Kinase Domänen identifiziert werden. Um letztendlich auf Proteinebene überprüfen zu können, ob es sich bei den beiden identifizierten ORFs überhaupt um Gene handelt, die für eine Proteinkinase kodieren, musste das jeweilige Gen aus einer *L. mexicana* gDNA-Bank isoliert und kloniert werden. Anschließend folgte die Klonierung in diverse Expressionsvektoren für die rekombinante Proteinexpression, Proteinaufreinigung über Affinitätschromatographie und Einsatz der Proteine im Kinase Aktivitätstest.

Um zu überprüfen, ob die kodierten Proteine tatsächlich einen Einfluss auf die Regulation der Flagellenlänge in *L. mexicana* haben, mussten Deletionsmutanten generiert werden. Diese Mutanten werden durch homologe Rekombination erzeugt.

4.6 *LmxMPK13*

4.6.1 Durchsuchen einer genomischen DNA-Bank nach *LmxMPK13*

Um in einer *L. mexicana* gDNA-Phagen-Bank nach *LmxMPK13* zu suchen, wurde eine Sonde benötigt. Dazu wurde auf einem in *L. major* und *L. mexicana* hochkonservierten Bereich des Gens eine PCR mit den Oligonukleotiden LmaLF4_1.for und LmaLF4_1.rev durchgeführt. Das 408 bp-große PCR-Produkt wurde nach dem folgenden TOPO-Cloning sequenziert und als Vorlage für eine weitere PCR mit den gleichen Oligonukleotiden genutzt. Dabei wurde das DIG-Kit der Fa. Roche verwendet, wodurch ein Digoxigenin-markiertes DNA-Fragment entstand, das als Sonde diente. Mit dieser wurde die gDNA-Bank durchsucht und Phagen identifiziert, die ein der Sonde entsprechendes DNA Fragment tragen. Nach der Präparation der Phagen-DNA konnte diese mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *NotI* und *XbaI* gespalten werden. Anschließend folgte die Klonierung über diese Schnittstellen in den pBSKII(+)-Vektor. Durch Sequenzierung konnte festgestellt werden, dass in pB-*LmxMPK13*X10 der komplette ORF von *LmxMPK13* enthalten ist. Zusätzlich sind auch Stromab- und Stromaufregionen vorhanden. Es folgte eine Sequenzierung des gesamten

Bereichs der von Interesse ist. Dieser beginnt ungefähr 1.000 bp vor dem Start-Codon von *LmxMPK13* und endet 1.000 bp nach dem Stopp-Codon.

Die vollständige Sequenz von *LmxMPK13* wurde in der NCBI-Datenbank unter der Zugangsnummer DQ812905 veröffentlicht.

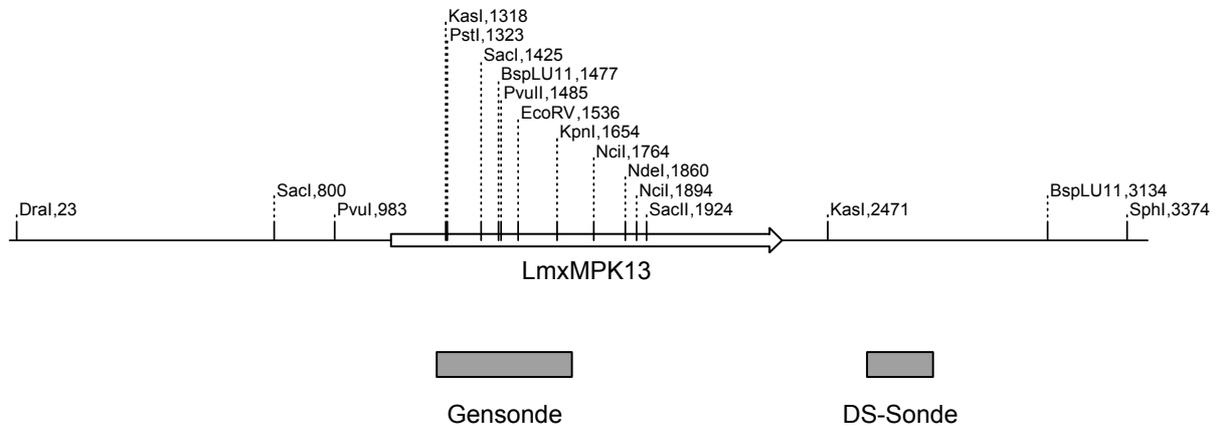


Abb. 4. 22: Schema von LmxMPK13 mit den flankierenden Regionen

Es sind wichtige Schnittstellen und die Lage der beiden Sonde dargestellt. Die Gensonde bindet im ORF von *LmxMPK13* und die DS-Sonde bindet im 3'-flankierenden Bereich.

Eigenschaften von LmxMPK13 und Homologie-Vergleiche

Das Gen *LmxMPK13* umfasst 1179 bp und kodiert somit für ein Protein mit 392 Aminosäuren. Dies entspricht einem Molekulargewicht von 44,5 kD. Im Bereich von As 4 - 287 befindet sich die Kinase Domäne des Enzyms. Diese besteht aus den 12 hochkonservierten Subdomänen, die im Anhang in der Sequenz von *LmxMPK13* markiert wurden. In den Subdomänen VIa bis IX liegen die meisten der hochkonservierten Aminosäuren. Bestimmte Motive ermöglichen die Einordnung von Kinasen in Serin/Threonin- oder Tyrosin-Kinasen (Hanks and Quinn, 1991; Hanks et al., 1988). Typische Serin/Threonin-Kinase-Sequenzen befinden sich in den Subdomänen VIb (DLKPEN) und VIII (G[TS]XX[YF]XAPE), Tyrosin-Kinasen weisen dagegen hier die Sequenzen DLRAAN oder DLAARN und P[IV][KR]W[TM]APE auf. Bei *LmxMPK13* befinden sich an diesen Stellen die Sequenzen DIKPEN und STRWYRAPE, was eher auf eine Serin/Threonin-Spezifität hinweist.

In Subdomäne 2 befindet sich an Position 33 ein hochkonserviertes Lysin, das für die Phosphatgruppenübertragung eine wichtige Rolle spielt. An Position 160 – 162 befindet sich das TXY-Motif, an dem MAP Kinasen von ihrem Aktivator phosphoryliert werden. Im Fall von *LmxMPK13* befindet sich zwischen dem Threonin und dem Tyrosin ein Glutamat.

Die höchste Homologie zu *LmxMPK13* zeigt eine putative Proteinkinase aus *L. major* mit 96 % identischen Aminosäuren. In anderen Organismen gibt es ebenfalls Homologe, wie z.B. eine Proteinkinase in *T. brucei* mit 60 % identischen Aminosäuren. Aber auch außerhalb der Kinetoplastida finden sich homologe Proteine, so auch das bereits unter 4.5 erwähnte

Long Flagellar Protein LF4 aus *C. reinhardtii*, mit 65 % identischer Aminosäuresequenz. Im Ciliaten *Paramecium tetraurelia* existieren gleich mehrere hypothetische Proteine mit einer sehr großen Ähnlichkeit zu LmxMPK13 (bis zu 63 %). Auch im Menschen gibt es ein homologes Protein, das 58 % identische Aminosäuren besitzt.

Ein Vergleich der Sequenzen der erwähnten Proteine ist im Anhang beigefügt.

4.6.2 Deletion von LmxMPK13 in *L. mexicana*

Zur Deletion von Gene in *L. mexicana* wird das Prinzip der homologen Rekombination genutzt. Dabei wird zwischen die flankierenden Bereiche des betreffenden Gens ein anderes Gen kloniert, das für eine Anitbiotikaresistenz kodiert. Wt Leishmanien reagieren auf dieses Antibiotikum sensitiv und sterben ab.

Bevor eine Strategie für die Deletion eines Gens geplant werden kann, muss überprüft werden, in welcher Kopienzahl das entsprechende Gen vorliegt.

4.6.2.1 Untersuchung der genomischen Kopienzahl von *LmxMPK13*

Mit Hilfe der Southern Blot Analyse kann die genomische Kopienzahl von Genen bestimmt werden. Dazu wurde genomische DNA von Wt Promastigoten isoliert und mit *Acc65I*, *EcoRV*, *HincII*, *NciI*, *PciI*, *PstI*, *PvuII* und *SacI* geschnitten. Die DNA von *LmxMPK13* wurde mit der LmxMPK13-Gensonde detektiert, die auch für das Durchsuchen der gDNA-Bank verwendet wurde. Bei der *NciI*-Spaltung sollte ein Fragment detektiert werden. Bei allen anderen Restriktionsspaltungen wurde erwartet, dass die LmxMPK13-Gensonde zwei Fragmente erkennt, wenn es sich um ein Single-Copy-Gen handelt.

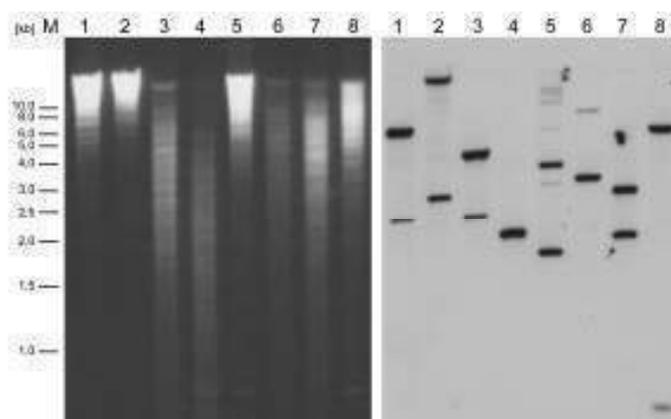


Abb. 4. 23: Southern Blot Analyse zur Bestimmung der Kopienzahl von *LmxMPK13*

Links: Bild des Agaorsegels; Rechts: Röntgenfilm nach 2h Expositionszeit
1: *Acc65I*; 2: *EcoRV*; 3: *HincII*; 4: *NciI*; 5: *PciI*; 6: *PstI*; 7: *PvuII* und 8: *SacI*

In Abb. 4.23 ist zu sehen, dass bei allen Proben die vorhergesagte Anzahl von Fragmenten erkannt wurde. Dies bedeutet, dass *LmxMPK13* in nur einer Kopie im haploiden Genom von *Leishmania mexicana* vorliegt.

4.6.2.2 Herstellung der Deletionskonstrukte von *LmxMPK13*

Um Konstrukte zur Deletion von *LmxMPK13* herzustellen, mussten die Stromauf- und Stromabregion des Gens durch eine PCR amplifiziert werden. Für die Amplifikation der Stromaufregion wurden die Oligonukleotide MPK13del_1 und MPK13del_2 und für die Stromabregion MPK13del_3 und MPK13del_4 benutzt. Als Ausgangs-DNA diente pB-LmxMPK13X10. Durch die PCR wurden am 5'-Ende der Stromaufregion eine *EcoRV*- und am 3'-Ende eine *NcoI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Am 5'-Ende der Stromabregion erfolgte die Insertion einer *NheI*-Spaltstelle und am 3'-Ende wurde eine Schnittstelle für *EcoRV* eingefügt. Die Stromabregion wurde nach erfolgreichem TOPO-Cloning in den pBSKII(+)-Vektor eingefügt, wodurch das Plasmid pB-dsmpk13 entstand. Anschließend wurde die Stromaufregion an das 5'-Ende der Stromabregion kloniert. Das entstandene Plasmid wurde pB-usdsmpk13 genannt. Dieses wurde nun über die eingefügten *NcoI*- und *NheI*-Schnittstellen linearisiert und die verschiedenen Resistenzgene eingefügt. Diese neuen Plasmide heißen pB-usmpk13HYGdsmpk13, pB-usmpk13NEOdsmpk13 und pB-usmpk13PHLEOdsmpk13.

4.6.2.3 Präparation der DNA-Fragmente für die homologe Rekombination und anschließende Transfektion

Die Deletionskonstrukte pB-usmpk13HYGdsmpk13, pB-usmpk13NEOdsmpk13 und pB-usmpk13PHLEOdsmpk13 wurden mit *EcoRV* und *BspHI* geschnitten, die 3062bp-Bande (Hyg), die 2840bp-Bande (NEO) bzw. die 2411bp-Bande (PHLEO) aus einem Agarosegel extrahiert, nach einer Ethanol-fällung steril in ddH₂O gelöst und in die Wt Leishmanien transfiziert. Ca. 2 Wochen nach der Elektroporation (wie unter 3.2.4 beschrieben) entstanden zwei Hygromycin und drei Phleomycin resistente Klone.

Die erhaltenen Mutanten wurden durch Southern Blot Analyse überprüft. Dazu wurde gDNA aus Wt Leishmanien und den einzelnen Klonen isoliert und anschließend mit *PciI* und *PvuI* geschnitten. Mit den Oligonukleotiden MPK13_seq8 und MPK13_seq11 konnte auf Wt-gDNA eine Sonde generiert werden, die im Stromabbereich von *LmxMPK13* bindet (Abb. 4.22). Somit konnte anhand der Größe der detektierten Fragmente im Southern Blot darauf geschlossen werden, um welches der Resistenzgene es sich handelt und ob noch eine Kopie von *LmxMPK13* vorhanden ist. Für den Wt wurde ein 1656 bp großes Fragment erwartet, für das Hygromycinresistenzgen ein 1468 bp großes Fragment und für das Phleomycinresistenzgen ein 1356 bp großes Fragment.

Zusätzlich wurde der Southern Blot noch mit einer zweiten Sonde hybridisiert, die das *LmxMPK13*-Gen detektiert. Es sollten zwei Fragmente von 491 und 1657 bp Größe detektiert werden, wenn noch ein oder beide Wt Allele vorliegen.

Es bestätigten sich drei Nullmutanten. Diese positiven Klone heißen Δ LmxMPK13^{-/-}H2, Δ LmxMPK13^{-/-}P2 und Δ LmxMPK13^{-/-}P3.

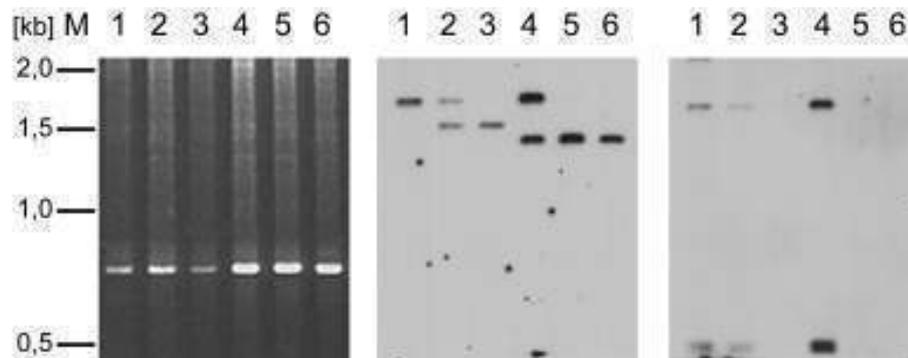


Abb. 4. 24: Southern Blot Analyse von Δ LmxMPK13-Mutanten

Links: Agarosegel; Mitte: DS-Sonde; Rechts: *LmxMPK13*-Gensonde; jeweils 2 h Expositionszeit
1: LmxWt; 2: Δ LmxMPK13^{+/-} H1; 3: Δ LmxMPK13^{-/-} H2; 4: Δ LmxMPK13^{+/-} P1; 5: Δ LmxMPK13^{-/-} P2
und 6: Δ LmxMPK13^{-/-} P3

Bereits nach einer Elektroporationsrunde wurden bei 3 Klonen beide Allele von *LmxMPK13* gegen ein Resistenzgen ausgetauscht. Um wirklich sicher zu gehen, dass keine Zellen mehr in diesen Klonen enthalten sind, die das Wt *LmxMPK13* Gen enthalten, wurden die Klone vereinzelt. Über eine Selektionskontrolle ist dies nicht möglich, da auf jeden Fall eine Kopie des Resistenzgens eingebaut wurde. Die Klone H2, P2 und P3 wurden so verdünnt, dass auf jedes dritte Well einer 96-Well Platte eine Zelle kommt. Die Einzelklone wurden wieder in 10 mL Kulturen überführt und je 3 Einzelklone pro Ausgangsklon ein weiteres Mal durch eine Southern Blot Analyse überprüft. Dazu wurde die genomische DNA isoliert und mit den Restriktionsendonukleasen *PvuI* und *SphI* gespalten. Es wurde die Sonde benutzt, die in der Stromabregion von *LmxMPK13* bindet (Abb. 4.22). Für *LmxMPK13* wurde eine 2392 bp große Bande erwartet, wie sie auch bei LmxWt (Abb. 4.25 Spur 1) sichtbar ist. Für den Fall, dass das Hygromycinresistenzgen eingefügt wurde, sollte eine 1722 bp große Bande detektiert werden und für das Phleomycinresistenzgen ein 1610 bp großes Fragment. Bei Δ LmxMPK13^{-/-} H2 und seinen vereinzelt Klonen H2.1, H2.2 und H2.3 (Spuren 2 - 5) wurde außer der Hygromycin-Bande auch die Wt-Bande detektiert.

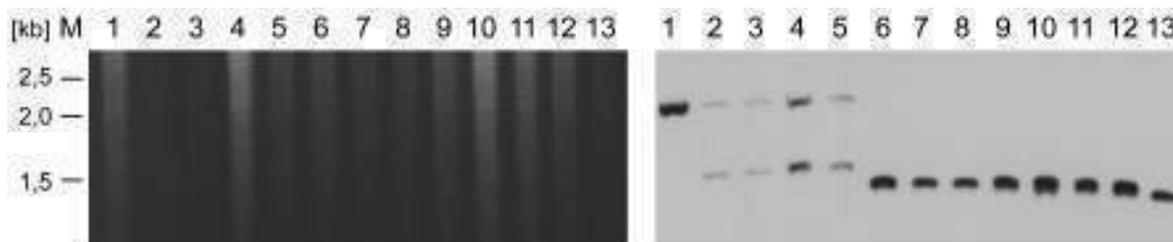


Abb. 4. 25: Southern Blot Analyse der vereinzelt Δ LmxMPK13^{-/-}-Mutanten mit der DS-Sonde

Links: Agarosegel; Rechts: Autoradiogramm nach 2 h Expositionszeit
1: LmxWt; 2: Δ LmxMPK13^{+/-} H2; 3: Δ LmxMPK13^{+/-} H2.1; 4: Δ LmxMPK13^{+/-} H2.2; 5: Δ LmxMPK13^{+/-} H2.3; 6: Δ LmxMPK13^{-/-} P2; 7: Δ LmxMPK13^{-/-} P2.1; 8: Δ LmxMPK13^{-/-} P2.2; 9: Δ LmxMPK13^{-/-} P2.3; 10: Δ LmxMPK13^{-/-} P3; 11: Δ LmxMPK13^{-/-} P3.1; 12: Δ LmxMPK13^{-/-} P3.2; 13: Δ LmxMPK13^{-/-} P3.3

Dies bedeutet, dass es sich hierbei um keine Nullmutanten handelt. Für die anderen beiden potentiellen Deletionsklone $\Delta LmxMPK13^{-/-}$ P2 und $\Delta LmxMPK13^{-/-}$ P3 (Spur 6 und 10) konnte bestätigt werden, dass *LmxMPK13* fehlt. Deren vereinzelte Klone P2.1, P2.2, P2.3, P3.1, P3.2 und P3.3 zeigten wie die Ausgangsklone nur die Bande für das Phleomycinresistenzgen.

Für die weitere Arbeit wurden die vereinzelten Klone $\Delta LmxMPK13^{-/-}$ P2.1 und $\Delta LmxMPK13^{-/-}$ P3.1 ausgewählt.

4.6.3 Charakterisierung der $\Delta LmxMPK13$ -Deletionsmutanten

4.6.3.1 Wachstumskinetik

Um das Wachstum der $\Delta LmxMPK13$ -Deletionsmutanten mit Wt-Promastigoten zu vergleichen, wurden Wt Promastigote und Promastigote der $\Delta LmxMPK13^{-/-}$ Klone P2.1 und P3.1 aus der logarithmischen Wachstumsphase verwendet, um Kulturen mit 5×10^5 Zellen/ml zu inokulieren. In Zeitabständen von jeweils 24h wurde die Zelldichte der drei Kulturen mit Hilfe des CASY Cellcounter & Analyzer (Schärfe System, Reutlingen) bestimmt. Dabei konnte beobachtet werden, dass es im promastigoten Lebensstadium keinen nennenswerten Unterschied im Wachstum der $\Delta LmxMPK13$ -Deletionsmutanten im Vergleich zum Wt gibt.

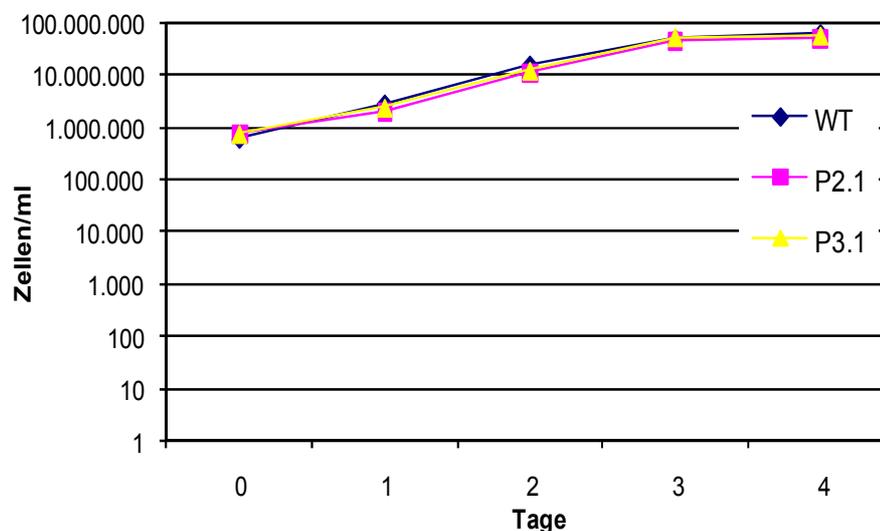


Diagramm 3. 3: Wachstumskurve von $\Delta LmxMPK13^{-/-}$ P2.1 und P3.1 im Vergleich zu LmxWt

4.6.3.2 *In vitro*-Differenzierung

Die *LmxMPK13*-Nullmutanten P2.1 und P3.1 und der Wt wurden zeitgleich zu axenischen Amastigoten differenziert und diese nach drei Tagen wieder zu Promastigoten rückdifferenziert. Dadurch sollte überprüft werden, ob *LmxMPK13* bei der Umwandlung der Leishmanien von einem Lebensstadium zum anderen eine Rolle spielt. Um diesen Prozess

zu dokumentieren wurden in 24-stündigen Intervallen Proben für lichtmikroskopische Aufnahmen genommen.

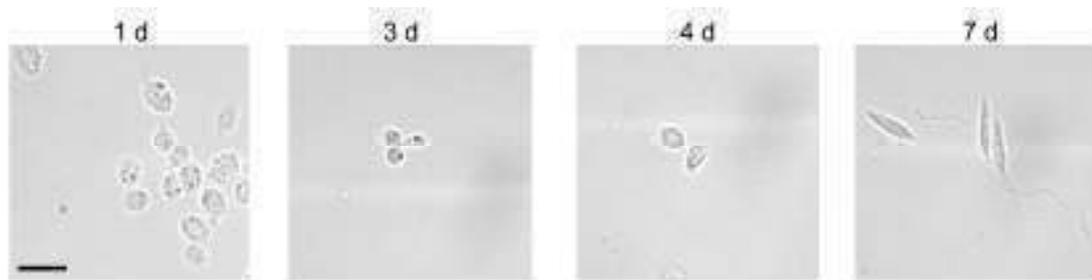


Abb. 4. 26: Lichtmikroskopische Analyse der *in vitro* Differenzierungen von Δ LmxMPK13-/- P3.1
Der Balken entspricht 10 μ m.

Es konnten keine Unterschiede zwischen dem Wt und den Δ LmxMPK13-Mutanten beobachtet werden. Abb. 4.26 zeigt beispielhaft einige Aufnahmen der Differenzierung von Δ LmxMPK13-/- P3.1.

4.6.3.3 Untersuchung des Infektionsverhaltens

- Infektion von murinen Peritonealmakrophagen

Die Makrophagen wurden wie unter 3.6.1 beschrieben gewonnen und behandelt. Drei Tage nach der Infektion wurden die Makrophagen fixiert und die DNA mit DAPI gefärbt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

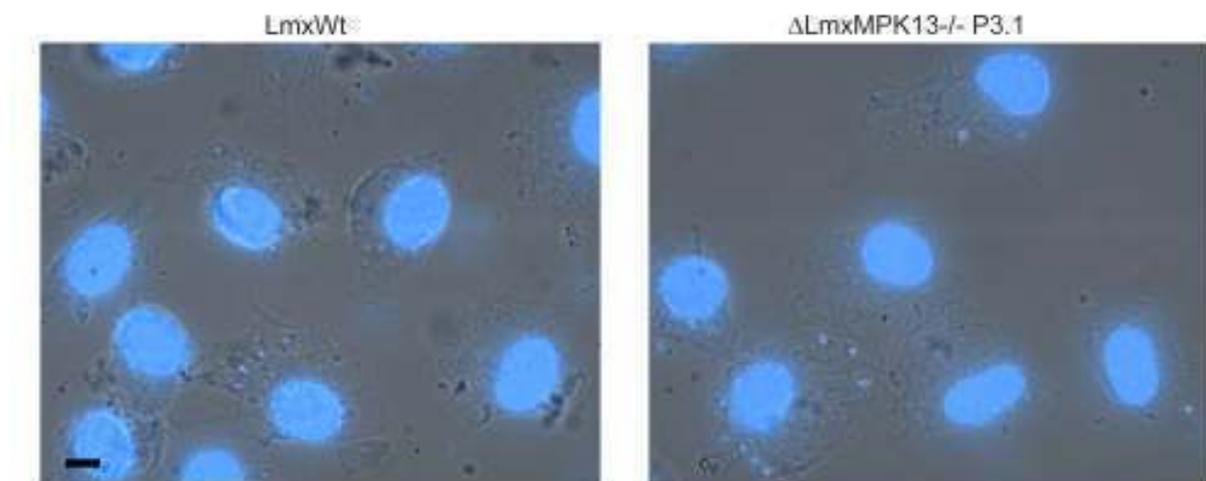


Abb. 4. 27: Infektion von Peritonealmakrophagen

Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. Der Balken entspricht 10 μ m.

Es wurde beobachtet, dass auch die Δ LmxMPK13-Deletionsmutanten P2.1 und P3.1 in der Lage sind Makrophagen zu infizieren.

-Infektion von Balb/c-Mäusen

Um das Infektionsverhalten *in vivo* zu untersuchen, wurden zudem auch weibliche Balb/c-Mäuse mit Promastigoten infiziert. Dazu wurden Wt-Promastigote, Δ LmxMPK13-/-P2.1 bzw. Δ LmxMPK13-/-P3.1 in den rechten Hinterlauf von jeweils 5 Mäusen injiziert.

Diese Infektionen sind noch nicht abgeschlossen. Aus den bisherigen Messungen kann aber schon geschlussfolgert werden, dass Δ LmxMPK13-/- P2.1 ein dem Wt ähnliches Infektionsverhalten zeigt. Bei Δ LmxMPK13-/- P3.1 haben sich bis zum heutigen Tag noch keine Läsionen gebildet. Da allerdings die Infektionsquote selbst bei LmxWt gering war (nur 2 von 5 Mäusen bildeten Läsionen), sollte dieses Ergebnis nicht überbewertet werden.

4.6.3.4 Flagellenlängenmessung

Um zu untersuchen, ob LmxMPK13 auch an der Flagellenlängenregulation beteiligt ist, wurden die Flagellen von ca. 200 Promastigoten des Wt, von Δ LmxMPK13-/- P2.1 und von Δ LmxMPK13-/- P3.1 gemessen. Dazu wurde ein Leica Leitz DMRB Mikroskop und die OpenLab-Software (Improvision, Heidelberg) genutzt.

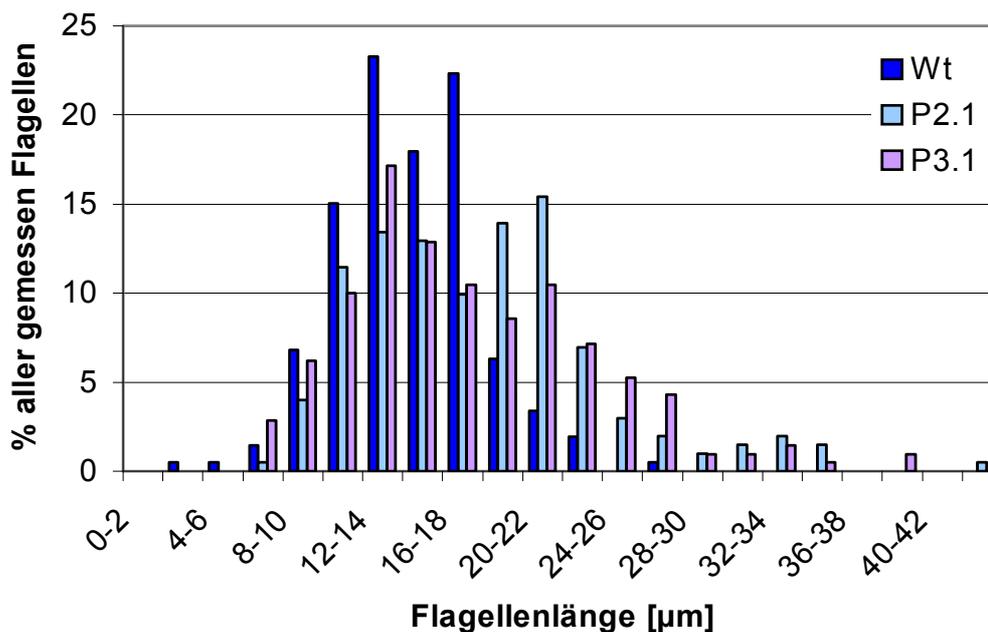


Diagramm 3. 4: Flagellenlängenmessung von LmxWt, Δ LmxMPK13-/- P2.1 und Δ LmxMPK13-/- P3.1

Tatsächlich konnte eine leichte Verlängerung der Flagellen bei den *LmxMPK13*-Deletionsmutanten festgestellt werden. Für den Wt wurde eine durchschnittliche Flagellenlänge von 13,9 μ m gemessen. Bei Δ LmxMPK13-/- P2.1 wurde ein Wert von 17,5 μ m und bei Δ LmxMPK13-/- P3.1 von 16,4 μ m bestimmt. Durch den sogenannten „student t-test“ konnte festgestellt werden, dass es sich bei den Nullmutanten um signifikant längere Flagellen handelt als beim Wt ($\alpha < 5\%$).

	Durchschnittliche Flagellenlänge [μm]	Standardabweichung [μm]	α [%]
LmxWt	13,9	3,8	
$\Delta\text{LmxMPK13-/- P2.1}$	17,5	7,5	0,001
$\Delta\text{LmxMPK13-/- P3.1}$	16,4	6,8	0,1

Tab. 4. 1: Mittelwerte der Flagellenlängen mit den zugehörigen Standardabweichungen und Signifikanzwerten

Im Diagramm ist deutlich zu erkennen, dass der Wt eine stark abgegrenzte Normalverteilung aufzeigt. Viele Flagellen der LmxMPK13-Mutanten liegen im Längenbereich des Wt. Zusätzlich findet sich eine Zellpopulation die deutlich längere Flagellen besitzt. Das längste Flagellum wurde mit 42,4 μm bei $\Delta\text{LmxMPK13-/- P2.1}$ gemessen.

4.6.3.5 Untersuchung des PFR-Gehalts durch Immunfluoreszenzanalyse

Zum Nachweis ob PFR über die gesamte Länge des Flagellums eingebaut ist, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dazu wurden Promastigote auf 10-well-Objektträgern fixiert. Es folgte eine Färbung mit DAPI und dem L8C4-Antikörper. Dieser erkennt PFR2. Der Sekundärantikörper ist mit Alexa Fluor 488 gekoppelt.

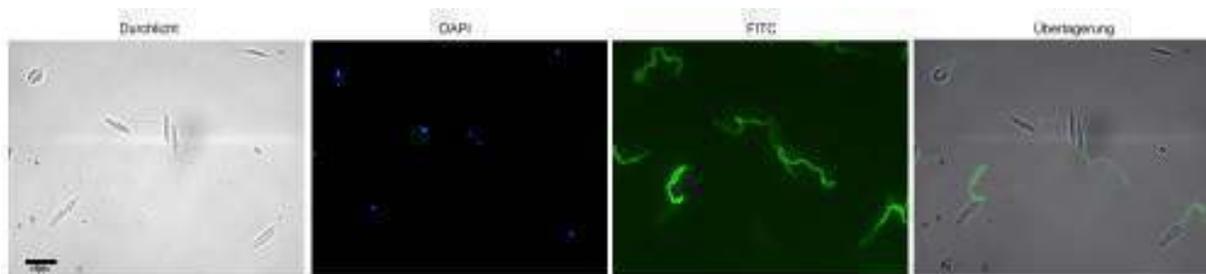


Abb. 4. 28: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von $\Delta\text{LmxMPK13-/- P3.1}$

Die DNA wurde mit DAPI gefärbt und PFR2 mit dem L8C4-Antikörper detektiert. Als Sekundärantikörper wurde AlexaFluor488 benutzt.

In Abb. 4.28 ist gut erkennbar, dass PFR über die gesamte Länge des Flagellums eingebaut wurde.

4.6.3.6 TEM-Analyse der LmxMPK13-Nullmutanten

Um den Phänotyp der Nullmutanten genauer zu untersuchen, wurden Bilder der Zellen mit einem Transmissionselektronenmikroskop aufgenommen. Dazu wurde sowohl $\Delta\text{LmxMPK13-/- P2.1}$ als auch $\Delta\text{LmxMPK13-/- P3.1}$ verwendet. Besonders wurde dabei auf den Aufbau des Flagellums und auf die Flagellartasche geachtet, aber auch auf den Gesamtaufbau der Zellen. In den Aufnahmen konnten keine Unterschiede zu LmxWt festgestellt werden.

4.6.4 Reintegration von *LmxMPK13* in die Nullmutanten

4.6.4.1 Herstellung eines Plasmids zur Expression von *LmxMPK13* in Leishmanien

Das Plasmid pX9TYMPK7ds wurde mit *XhoI* und *SacI* gespalten und ein Fragment aus pX14polNcoIPAC einligiert. Dadurch wurde eine *NcoI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Das entstandene Plasmid wurde pX-TYMPK7dsNcoI genannt.

Mittels einer PCR mit den Oligonukleotiden *LmxMPK13_BglII_for* und *LmxMPK13_BglII_rev* auf dem pJCduet-*LmxMPK13*-Plasmid wurden vor und hinter dem ORF von *LmxMPK13* *BglII*-Schnittstellen eingefügt. Das Amplifikat wurde durch eine TOPO-Ligation in den pCR2.1-Vektor eingebracht. Nachdem das Konstrukt durch eine Sequenzierung überprüft worden war, konnte ein Fragment mit *BglII* aus diesem Plasmid geschnitten werden und im pX-TYMPK7dsNcoI-Plasmid *LmxMPK7* und deren Stromab-Region ersetzen. Das neu entstandene Konstrukt pX-PACTYL*LmxMPK13* wurde direkt für eine Elektroporation der Leishmanien eingesetzt.

4.6.4.2 Herstellung eines Fragments zur genomischen Reintegration von *LmxMPK13*

Mit den Primern *MPK13us_DraI* und *MPK13ds_DraI* wurde auf dem Plasmid pBSK-usd�mpk13 eine PCR durchgeführt. Das Amplifikat wurde per TOPO-Ligation in den pCR2.1-Vektor eingefügt. Dieses Konstrukt wurde anschließend mit *EcoRI* gespalten und das ca. 2 kb-Fragment in den pBSKII(+)-Vektor eingefügt.

Durch eine Restriktionsspaltung mit *NcoI* und *NheI* wurde dieses Plasmid linearisiert und mit einem Fragment aus pX-TYL*LmxMPK13*, das TY-*LmxMPK13* kodiert, ligiert. Anschließend wurde das entstandene Plasmid durch eine weitere Restriktionsspaltung mit *NcoI* linearisiert und ein *NcoI*-Fragment aus dem pX-TYL*LmxMPK13*-Plasmid eingefügt. Somit entstand das Konstrukt pBSK-usPACTYL*LmxMPK13ds*. Dieses neue Plasmid wurde mit *DraI* präparativ verdaut und das ca. 5000 bp-Fragment aufgereinigt und steril aufgenommen.

4.6.4.3 Elektroporation von *LmxWt* mit episomalen und genomischen „Addback“-Konstrukten

LmxWt sollte ebenfalls mit TY*LmxMPK13* versehen werden, um Unterschiede in der Expression und der Phosphorylierung von *LmxMPK13* in verschiedenen Lebensstadien und unter verschiedenen Bedingungen untersuchen zu können. Das aufgereinigte DNA-Fragment, das für die Integration von TY*LmxMPK13* in den ursprünglichen Genloкус bestimmt ist, und das Plasmid für die episomale Expression wurden in *LmxWt* transfiziert und positive Klone durch Selektionsdruck mit dem Antibiotikum Puromycin identifiziert.

Mit Hilfe einer PCR wurde das Vorhandensein des jeweiligen Konstruktes überprüft. Dazu wurde genomische DNA von *LmxWt*, vier genomischen Puromycin resistenten „Addback“-Klonen und 6 episomalen Klonen isoliert. Zur Amplifikation eines Fragments mit einer spezifischen Größe wurden die Oligonukleotide pXPHLEO2 und *MPK13_seq7* verwendet.

Für den Wt konnte wie zu erwarten kein Fragment amplifiziert werden. Bei den potentiellen genomischen „Addback“-Mutanten wurde ebenfalls kein Amplifikat detektiert. Die episomalen Konstrukte waren hingegen nachweisbar.

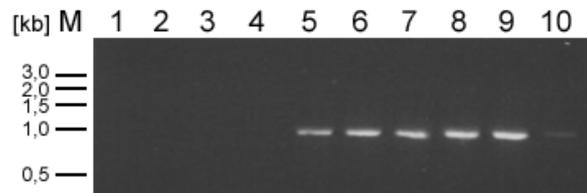


Abb. 4. 29: Agarosegel, Auftrag der PCR zum Nachweis von *TY-LmxMPK13*

1-4: alle Klone von Δ LmxWt+gTY-LmxMPK13; 5-10: alle 6 Klone von Δ LmxWt+pX-TYLmxMPK13

Durch einen Southern Blot sollte geklärt werden, ob bei den genomischen Klonen tatsächlich keine Insertion stattgefunden hat oder ob die vorhandene DNA-Menge unter der Nachweisgrenze der PCR lag. Dazu wurde die gDNA aller Puromycin resistenten Klone und des Wt mit den Restriktionsendonukleasen *SphI* und *PvuI* gespalten und auf einem 0,7%-igen Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Blot wurde die Nylonmembran mit einer DNA-Sonde hybridisiert, die an der Stromabregion von *LmxMPK13* bindet.

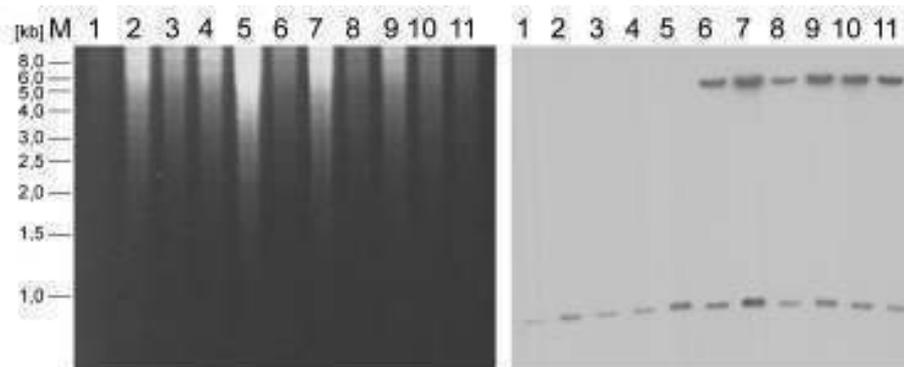


Abb. 4. 30: Southern Blot Analyse

Links: Agarosegel; Rechts: Autoradiogramm nach 2 h Expositionszeit

1: LmxWt; 2-5: 4 Klone von Δ Lmx+gTY-LmxMPK13; 6-11: 6 Klone von Δ Lmx + pX-TYLmxMPK13

Abb. 4.30 bestätigt die Ergebnisse der PCR. Bei dem Wt und den genomischen Klonen ist nur *Wt-LmxMPK13* (Bande bei ca. 1kb) detektierbar. Bei den episomalen Klonen ist zusätzlich die ca. 5 kb große Bande des *LmxMPK13-TY-Plasmids* zu erkennen. Da bei einer episomal exprimierten TYLmxMPK13 nicht davon ausgegangen werden kann, dass ihr Expressionsniveau dem des Wt entspricht, wurde sich bei den weitergehenden Untersuchungen auf die „Addback“-Klone der *LmxMPK13-Deletionsmutanten* konzentriert.

4.6.4.4 Einbringen der „Addback“-Konstrukte in die LmxMPK13-Nullmutanten

Wie bereits für LmxWt beschrieben wurden die beiden „Addback“-Konstrukte in Δ LmxMPK13^{-/-} P2.1 und Δ LmxMPK13^{-/-} P3.1 transfiziert. Puromycinresistente Klone wurden ebenfalls durch PCR wie oben beschrieben überprüft. Alle genomischen „Addback“-Klone stellten sich erneut als negativ heraus. Es wurde kein DNA-Fragment amplifiziert (Daten nicht gezeigt). Die episomalen „Addback“-Klone hingegen waren positiv. Da für den Wt gezeigt werden konnte, dass die PCR sehr zuverlässig funktioniert, wurde auf eine Überprüfung der PCR-Daten durch einen Southern Blot verzichtet.

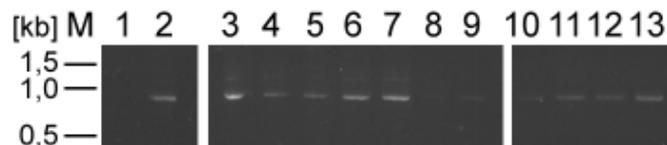


Abb. 4. 31: Agarosebild der PCR zur Überprüfung der episomalen „Addback“ Klone

1: LmxWt; 2-7: Δ LmxMPK13^{-/-} P2.1 + pX-TYMPK13; 8-13: Δ LmxMPK13^{-/-} P3.1 + pX-TYMPK13

Zur Überprüfung der Expression von TYLmxMPK13 wurde ein Immunoblot mit Promastigoten durchgeführt. Zur Detektion wurde der 1:500 verdünnte BB2-Antikörper eingesetzt. Dieser erkennt den TY-Tag. Von diesem Antikörper war bereits bekannt, dass er in *L. mexicana* eine starke Kreuzreaktion zeigt, die bei ca. 38 kD läuft. Rechnerisch sollte TYLmxMPK13 ca 7 kD größer sein als diese Kreuzreaktion. Im Immunoblot zeigte sich aber, dass bei kurzen Expositionszeiten des Röntgenfilms noch keine Bande auf der erwarteten Höhe von TYLmxMPK13 sichtbar war. Bei längeren Expositionszeiten überstrahlte die Bande der Kreuzreaktion diesen Größenbereich vollständig.

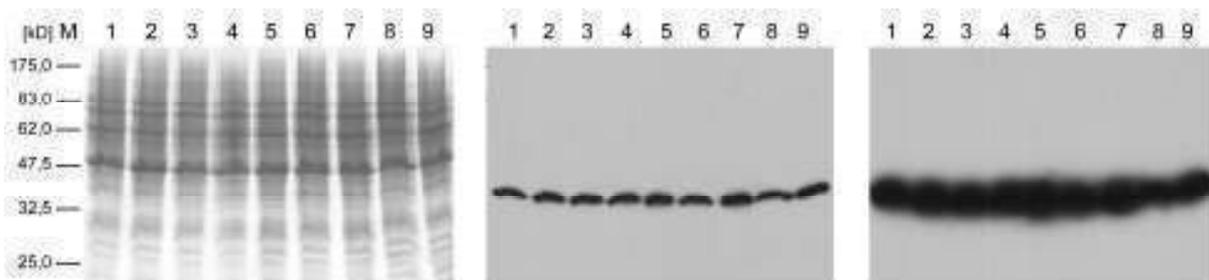


Abb. 4. 32: Immunoblot von Zellextrakten der „Addback“-Klone mit dem BB2 Antikörper (1:500)

Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel; Mitte: Autoradiogramm nach 30 sec Exposition; Rechts: Autoradiogramm nach 1 h Exposition

1: Wt; 2-5: Δ LmxMPK13^{-/-}-P2.1+pX-TYMPK13 K1-K4; 6-9: Δ LmxMPK13^{-/-}-P3.1+pX-TYMPK13 K1-K4

4.6.4.5 Phosphoproteinaufreinigung aus den episomalen „Addback“-Klonen von LmxMPK13

Da das Protein TYLmxMPK13 im Immunoblot in einem Gesamtzellextrakt aus Promastigoten nicht detektiert werden konnte, weil die Kreuzreaktion zu stark ausfiel, sollte nun überprüft werden, ob sich ausschließlich TYLmxMPK13 unter den phosphorylierten Proteinen befindet und nicht das die Kreuzreaktion hervorrufende Protein.

Es wurde eine Phosphoproteinaufreinigung der LmxMPK13-Deletionsmutanten und der episomalen „Addback“-Mutanten durchgeführt. In einem anschließenden Immunoblot konnten die verschiedenen Fraktionen mit Hilfe des BB2-Antikörpers auf TYLmxMPK13 untersucht werden.

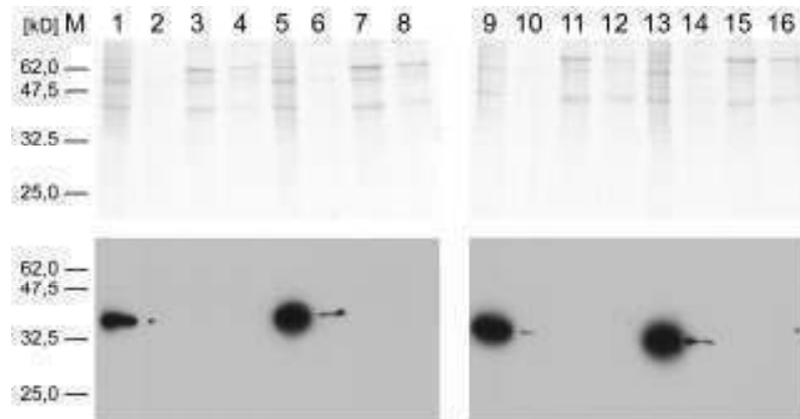


Abb. 4. 33: Immunoblot nach einer Phosphoproteinaufreinigung mit dem BB2 Antikörper (1:500)

Oben: Coomassie gefärbte SDS-Gele; Unten: Autoradiogramme nach 1 h Expositionszeit
 1-4: Δ LmxMPK13-/-P2.1; 5-8: Δ LmxMPK13-/-P2.1+pX-TYLmxMPK13.1; 9-12: Δ LmxMPK13-/-P3.1; 13-16: Δ LmxMPK13-/-P3.1+pX-TYLmxMPK13.6
 1,5,9 und 13: Gesamtzellextrakt; 2,6,10 und 14: nicht phosphorylierte Proteine im Durchlauf; 3,7,11 und 15: Eluat 3 der Phosphoproteinaufreinigung und 4,8,12 und 16: Eluat 4 der Phosphoproteinaufreinigung

Abb. 4.33 zeigt, dass es keinen Unterschied zwischen den Deletionsmutanten und den „Addback“-Mutanten gibt. Würde TY-LmxMPK13 in einer Menge exprimiert werden, die detektiert werden kann, sollte es entweder in dem Durchlauf der Aufreinigung oder in den Eluaten als zusätzliche Bande auftauchen. Es sind nur die sehr starke Bande der Kreuzreaktion im Gesamtzellextrakt und eine sehr schwache Bande der Kreuzreaktion im stark verdünnten Durchlauf der Aufreinigung detektierbar.

4.6.4.6. Flagellenlängenmessung der „Addback“-Klone

Obwohl kein Protein nachgewiesen werden konnte, wurde überprüft, ob die Puromycin resistenten Mutanten eine Veränderung bezüglich der Flagellenlänge zeigen. Dazu wurden die „Addback“-Klone Δ LmxMPK13-/- P2.1 + pX-TYLmxMPK13.1 und Δ LmxMPK13-/- P3.1 + pX-TYLmxMPK13.6 unter einem erhöhten Selektionsdruck von 100 μ M Puromycin inkubiert. Anschließend wurde die Flagellenlänge im Vergleich zur jeweiligen Deletionsmutante gemessen. Für Δ LmxMPK13-/- P2.1 + pX-TYLmxMPK13.1 wurde eine durchschnittliche Flagellenlänge von 15,5 μ m gemessen, was 2,2 μ m kürzer ist als bei der Deletionsmutante. Die durchschnittliche Flagellenlänge von Δ LmxMPK13-/- P3.1 + pX-TYLmxMPK13.6 beträgt 12,3 μ m und ist somit 4,1 μ m kürzer als bei Δ LmxMPK13-/- P3.1. Auch im Diagramm sieht man, dass es bei den „Addback“-Klonen deutlich weniger Zellen mit sehr langen Flagellen

gibt. Bei Δ LmxMPK13-/- P3.1 + pX-TYLmxMPK13.6 kann man außerdem beobachten, dass bei diesem „Addback“-Klon deutlich mehr Zellen ein sehr kurzes Flagellum besitzen.

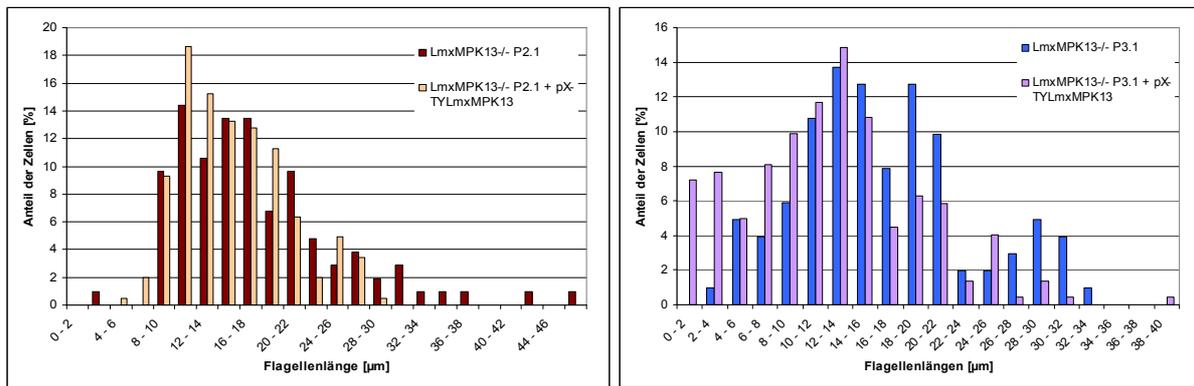


Diagramm 3. 5: Flagellenlängen der LmxMPK13-Nullmutanten und der „Addback“-Klone

Links: Δ LmxMPK13-/- P2.1 und der „Addback“-Klon Δ LmxMPK13-/- P2.1 + pX-TYLmxMPK13.1; Rechts: Δ LmxMPK13-/- P3.1 und der „Addback“-Klon Δ LmxMPK13-/- P3.1 + pX-TYLmxMPK13.6

Um zu untersuchen ob der beobachtete Effekt durch TY-LmxMPK13 hervorgerufen wird, wurde bei den beiden „Addback“-Klonen, die mit einer hohen Puromycinkonzentration kultiviert wurden, das Antibiotikum komplett weggelassen. Nach einer Adaptionszeit von ca. 2 Wochen wurde erneut die Flagellenlänge von ca. 200 Zellen bestimmt. Δ LmxMPK13-/- P2.1 + pX-TYLmxMPK13.1 zeigte ohne Antibiotikum eine durchschnittliche Flagellenlänge von 18 μ m und Δ LmxMPK13-/- P3.1 + pX-TYLmxMPK13.6 von 16,8 μ m. In den Diagrammen ist sehr gut zu erkennen, dass es eine deutliche Verteilung zu längeren Flagellen gibt, wenn das Antibiotikum entzogen wird. Somit scheint TY-LmxMPK13 doch exprimiert zu werden, auch wenn das Protein im Immunoblot nicht detektiert werden konnte.

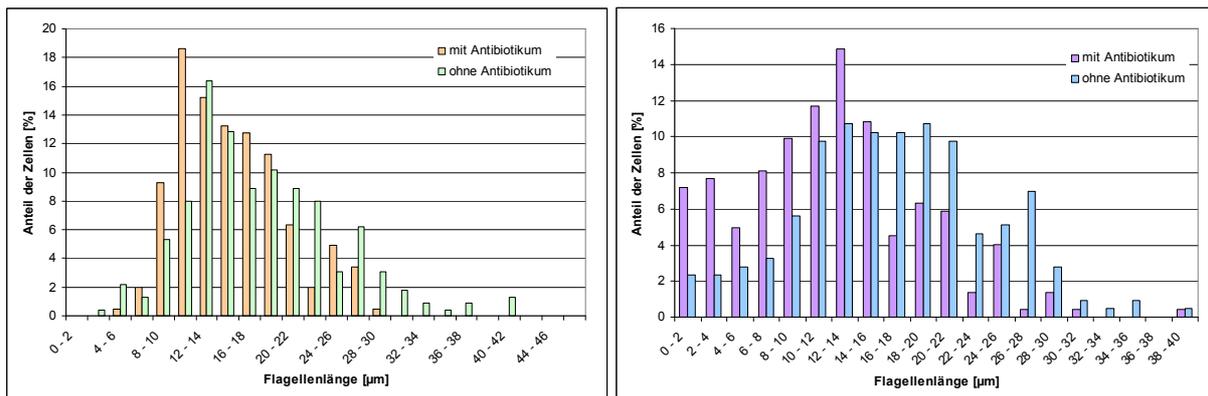


Diagramm 3. 6: Flagellenlängenverteilung der „Addback“-Mutanten in An- und Abwesenheit des Antibiotikums Puromycin

Links: Δ LmxMPK13-/- P2.1 + pX-TYLmxMPK13.1; Rechts: Δ LmxMPK13-/- P3.1 + pX-TYLmxMPK13.6

	Wt	P2.1	P3.1
Wt/ Nullmutante	13,8 ± 3,8 µm	17,6 ± 7,5 µm	16,4 ± 6,8 µm
„Addback“ mit Antibiotikum		15,5 ± 5,0 µm	12,3 ± 7,0 µm
„Addback“ ohne Antibiotikum		18,0 ± 7,0 µm	16,8 ± 7,3 µm

Tab. 4. 2 durchschnittliche Flagellenlängen mit den zugehörigen Standardabweichungen

4.6.5 Rekombinante Expression von LmxMPK13

4.6.5.1 Herstellung von Expressionskonstrukten

Der ORF von LmxMPK13 wurde durch eine PCR mit den Oligonukleotiden MPK13expr_for und MPK13expr_rev auf dem pBSK-LmxMPK13-Plasmid amplifiziert. Durch eine veränderte Sequenz in dem Vorwärts-Primer wurden vor dem Start-ATG eine *EcoRI*-, eine *NcoI*- und eine *BamHI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Zusätzlich wurden durch den Rückwärts-Primer nach dem Stopp-Codon eine *EcoRV*- und eine *HindIII*-Schnittstelle generiert. Über die *EcoRI* und die *HindIII*-Schnittstellen konnte *LmxMPK13* unter Beibehaltung des Leserasters in den pJCduet-Vektor eingefügt werden. Die *BamHI*- und die *HindIII*-Schnittstelle dienten der Integration von *LmxMPK13* in die Expressionsplasmide pQE30, dem pASK-IBA7 und pMALc2. In pGEX-KG konnte *LmxMPK13* durch eine Spaltung mit den Enzymen *NcoI* und *HindIII* eingefügt werden.

4.6.5.2 Testexpression der verschiedenen Fusionsproteine

Die unterschiedlichen Expressionskonstrukte wurden in *E.coli* BL21-Zellen transformiert und für eine Proteinexpression im 5 ml Maßstab benutzt. Dadurch sollte untersucht werden, welche Plasmide für die rekombinante Expression geeignet sind. Dabei wurde die Expression mit ansteigenden IPTG-Konzentrationen von 0 µM, 10 µM, 100 µM und 1 mM induziert. Die Bakterien wurden 4h nach der Induktion zentrifugiert und per SDS-PAGE analysiert.

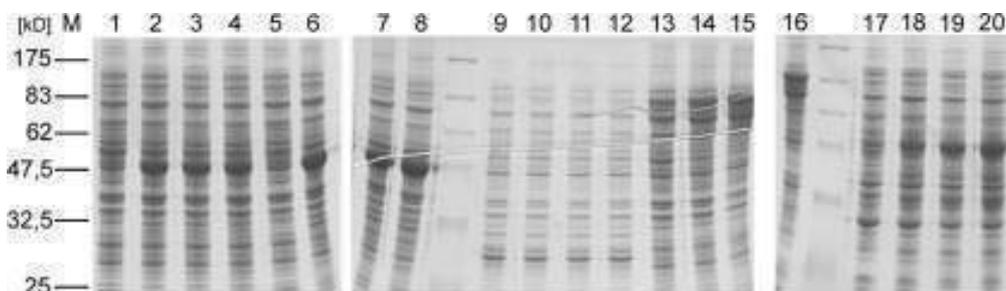


Abb. 4. 34: Testexpression der LmxMPK13-Expressionsplasmide

1-4: pGEX-KG-LmxMPK13; 5-8: pQE30-LmxMPK13; 9-12: pASK-IBA7-LmxMPK13; 13-16: pMALc2-LmxMPK13 und 17-20: pJCduet-LmxMPK13
 1,5,9,13 und 17: keine IPTG-Zugabe; 2,6,10,14 und 18: 10 µM IPTG; 3,7,11,15 und 19: 100 µM IPTG und 4,8,12,16 und 20: 1 mM IPTG

In Abb. 4.34 ist gut zu sehen, dass bei dem pGEX-KG-Konstrukt, dem pQE30-Vektor, dem pMAL2c-Konstrukt und dem pJCduet-Plasmid mit steigenden IPTG-Konzentrationen eine deutliche Bande im Lysat auftaucht. Bei pGEX-KG-LmxMPK13 läuft diese Bande allerdings zu niedrig. Durch den GST-Tag wäre ein Protein mit einer Größe von 71,5 kD zu erwarten gewesen. Bei dem pASK-IBA7-Vektor ist keine zusätzliche Bande sichtbar. Die deutlichste Abhängigkeit der Menge des rekombinanten Proteins von der IPTG-Konzentration ist bei pJCduet-LmxMPK13 zu beobachten. Daher wurde dieses Konstrukt anschließend für die Proteinaufreinigungen gewählt.

4.6.6 Herstellung einer inaktiven Mutante von LmxMPK13

4.6.6.1 Klonierung

Nachfolgend sollte das konservierte Lysin an Position 33 zu einem Methionin mutiert werden, um eine inaktive Mutante von LmxMPK13 zu generieren. Dazu wurden zwei PCRs mit unterschiedlichen Primerpaaren durchgeführt. Je ein Primer enthielt die zu mutierende Sequenz mit einer neu generierten *NruI*-Schnittstelle (MPK13-KM.for bzw. MPK13-KM.rev). Das andere Oligonukleotid entsprach einem Teil der Sequenz des Ampicillin-Resistenzgens, das eine *ScaI*-Schnittstelle enthält (*ScaI*.for bzw. *ScaI*.rev). Als Ausgangs-DNA wurde pBSKLmxMPK13 verwendet. Die beiden entstandenen Amplifikate wurden direkt mit *NruI* und *ScaI* geschnitten und miteinander ligiert. Dadurch entstand pBSKLmxMPK13KM. Dieses neue Plasmid wurde anschließend mit *EcoRI* und *HindIII* geschnitten und der LmxMPK13-KM kodierende Teil in das pJCduet-Plasmid ligiert. Dieses neu entstandene Konstrukt heißt pJCduet-LmxMPK13-KM.

4.6.6.2 Rekombinate Expression und Kinase Test von His-LmxMPK13

Wie unter 3.3.1 beschrieben wurden His-LmxMPK13 und His-LmxMPK13KM rekombinant exprimiert und anschließend an Co^{2+} -Sephrose aufgereinigt (Abb: 4.35, links). Für die rekombinante Expression wurden *E. coli* pAPlac benutzt.

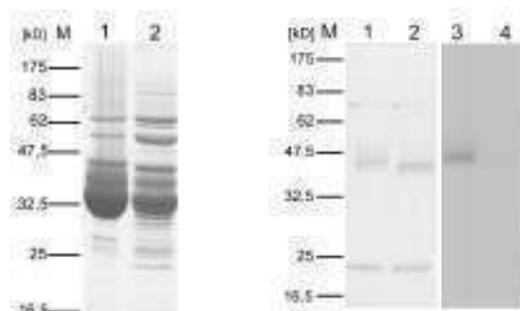


Abb. 4. 35: Rekombinante Proteinexpression, mit anschließendem Kinase Aktivitätstest von His-LmxMPK13 und His-LmxMPK13-KM

Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel von Eluat 1 der Proteinaufreinigung; 1: His-LmxMPK13; 2: His-LmxMPK13-KM; Rechts: Kinaseaktivitätstest mit Coomassie gefärbtem SDS-Gel und Autoradiogramm nach 1 d Expositionszeit; 1 und 3: His-LmxMPK13; 2 und 4: His-LmxMPK13-KM

Anschließend wurde ein Kinase Aktivitätstest durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass His-LmxMPK13 sich gut selbst und MBP schwach phosphoryliert. His-LmxMPK13KM zeigt weder Auto- noch MBP-Phosphorylierung.

Für His-LmxMPK13 wurden im Kinase Test verschiedene Bedingungen wie die Konzentration zweiwertiger Kationen, Temperatur und pH-Wert variiert. Dabei wurde festgestellt, dass die Kinase bei 34°C etwas aktiver ist als bei 27°C (Abb. 4.36 A). Es konnte keine Abhängigkeit von verschiedenen pH-Werten beobachtet werden (B). LmxMPK13 braucht sowohl Mn^{2+} als auch Mg^{2+} (C). Allerdings scheint Mn^{2+} eine größere Rolle für die Autophosphorylierung zu spielen und Mg^{2+} für die MBP-Phosphorylierung.

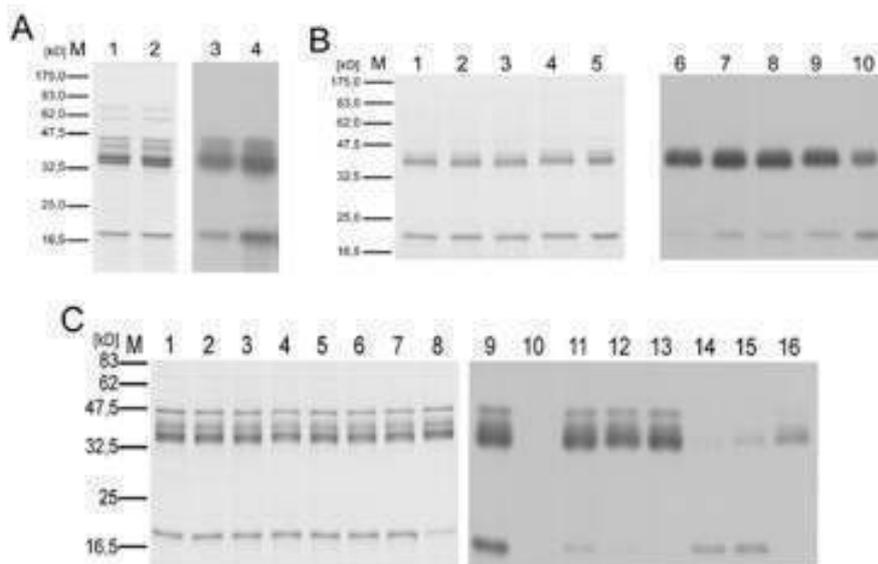


Abb. 4. 36: Bestimmung der optimalen Bedingungen für His-LmxMPK13 im Kinase Aktivitätstest

Links: Coomassie gefärbtest SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm

A Variation der Temperatur; 1 und 3: 27°C; 2 und 4: 34 °C

B Variation des pH-Werts; 1,6: pH 6,5; 2,7: pH 7,0; 3,8: pH 7,2; 4,9: pH 7,5 und 5,10: pH 8,0

C Variation der Konzentration divalenter Kationen; 1,9: 10 mM Mg^{2+} und 2 mM Mn^{2+} ; 2,10: keine divalenten Kationen; 3,11: 1 mM Mn^{2+} ; 4,12: 2 mM Mn^{2+} ; 5,13: 10 mM Mn^{2+} ; 6,14: 5 mM Mg^{2+} ; 7,15; 10 mM Mg^{2+} ; 8+16: 50 mM Mg^{2+}

4.6.7 Kombinierte Kinase Tests mit MAP Kinase Kinasen

Für eine starke MBP-Phosphorylierung muss LmxMPK13 höchstwahrscheinlich aktiviert werden. Deshalb wurden His-LmxMPK13 und His-LmxMPK13KM in Kombination mit MAP Kinase Kinase Homologen in Anwesenheit von $[\gamma^{32}P]$ -ATP inkubiert. Bei einer Inkubation zusammen mit GST-LmxPK4 konnte eine verstärkte Phosphorylierung von His-LmxMPK13 und His-LmxMPK13-KM beobachtet werden (Abb. 4.37).

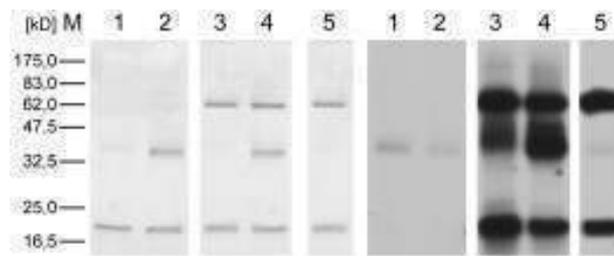


Abb. 4. 37: Kombiniertes Kinase Aktivitätstest von His-LmxMPK13 zusammen mit GST-LmxPK4

Links: Coomassie gefärbtes Gel; Rechts Autoradiogramm nach 1 d Expositionszeit
 1: His-LmxMPK13; 2: His-LmxMPK13-KM; 3: His-LmxMPK13 zusammen mit GST-LmxPK4; 4: His-LmxMPK13-KM zusammen mit GST-LmxPK4; 5: GST-LmxPK4

Die MBP-Phosphorylierung war bei einer gemeinsamen Inkubation von GST-LmxPK4 und His-LmxMPK13 etwas stärker, als bei His-LmxMPK13 allein. Dabei kann nicht bestimmt werden, ob diese verstärkte Phosphorylierung von der Aktivierung von His-LmxMPK13 herrührt, oder ob sie von GST-LmxPK4 verursacht wird.

4.6.8 Coexpression von LmxMPK13 zusammen mit LmxPK4

4.6.8.1 Klonierung der Expressionskonstrukte

Um eine potentielle Aktivierung von LmxMPK13 durch LmxPK4 zu untersuchen, besteht die Möglichkeit beide Kinasen in den pJCduet-Vektor zu klonieren und gleichzeitig in *E. coli* zu exprimieren. LmxMPK13 wird dabei mit einem 6 x His-Tag versehen und kann daher separat aufgereinigt werden kann.

Dazu wurden pJCduet-LmxMPK13 und pJCduet-LmxMPK2LmxPK4 jeweils mit *Bgl*II geschnitten und so ligiert, dass *LmxMPK2* gegen *LmxMPK13* ausgetauscht wurde. Das neue Plasmid heißt pJCduet-LmxMPK13-LmxPK4.

Als Negativkontrolle für nachfolgende Kinasetests wurde die inaktive Kinase LmxMPK13-KM, coexprimiert mit LmxPK4, benötigt. Dazu wurden die Plasmide pJCduet-LmxMPK13-LmxPK4 und pJCduet-LmxMPK13-KM mit *Eco*RI und *Sac*II geschnitten und die KM-Mutation in das Coexpressionskonstrukt eingefügt. Das entstandene Konstrukt heißt pJCduet-LmxMPK13-KM-LmxPK4.

4.6.8.2 Rekombinante Coexpression und Aufreinigung von His-LmxMPK13 und His-LmxMPK13KM

His-LmxMPK13(LmxPK4) und His-LmxMPK13KM(LmxPK4) wurden nach dem gleichen Protokoll exprimiert und aufgereinigt wie His-LmxMPK13 und His-LmxMPK13KM. Um zu überprüfen, ob eine Expression von LmxPK4 stattfindet und inwieweit die Eluate der Aufreinigung mit LmxPK4 kontaminiert sind, wurde ein Immunoblot der Eluate mit einem Antikörper durchgeführt, der ein C-terminales Peptid von LmxPK4 erkennt.

In den Eluaten war LmxPK4 detektierbar. Bei His-LmxMPK13-KM allerdings deutlich mehr als bei His-LmxMPK13. Das heißt, dass in den Eluaten, die in den Kinase Tests eingesetzt werden, auch LmxPK4 enthalten waren.

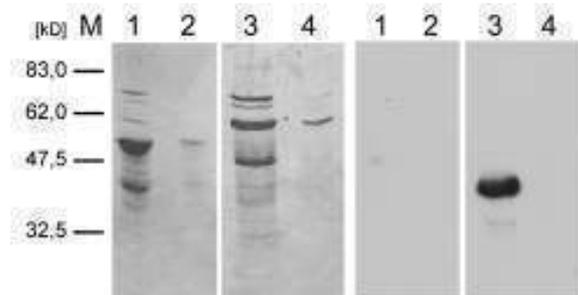


Abb. 4. 38: Immunoblot der Coexpressionen von LmxMPK13 zusammen mit LmxPK4

Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm nach 5 sec Expositionszeit
Es wurde ein Antikörper benutzt, der ein C-terminales Peptid von LmxPK4 detektiert (1:500 verdünnt). Als Proben wurden die Eluate der Proteinaufreinigung einmal unverdünnt und einmal 1:10 verdünnt eingesetzt.

1 und 2: His-LmxMPK13 und 3 und 4: His-LmxMPK13-KM

4.6.8.3 Kinase Test mit coexprimierter His-LmxMPK13 und His-LmxMPK13KM

Die coexprimierten Proteine wurden in der gleichen Art und Weise in den Kinase Test eingesetzt wie die einzeln exprimierten Proteine. Bei His-LmxMPK13(LmxPK4) konnte eine erhebliche Aktivitätssteigerung festgestellt werden (Abb. 4.39 Spur 3). Diesmal war nicht nur eine deutlich stärkere Autophosphorylierung detektierbar (wie in den kombinierten Kinase Assays zusammen mit LmxPK4; siehe 4.6.7), sondern es konnte auch ein starker Anstieg der MBP-Phosphorylierung beobachtet werden. Da dies bei der coexprimierten His-LmxMPK13KM nicht zu beobachten war (Spur 8), kann ausgeschlossen werden, dass diese Aktivität von kontaminierender LmxPK4 stammt.

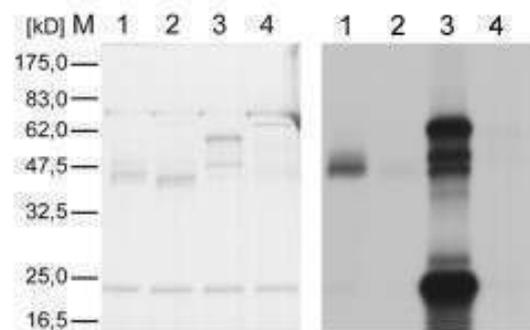


Abb. 4. 39: Kinase Aktivitätstest der Coexpressionen von LmxPK4 zusammen mit LmxMPK13

Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm nach 1 d Expositionszeit
1: His-LmxMPK13; 2: His-LmxMPK13-KM; 3: His-LmxMPK13 coexprimiert mit LmxPK4 und 4: His-LmxMPK13-KM coexprimiert mit LmxPK4

Das bedeutet, dass eine Coexpression von LmxMPK13 zusammen mit LmxPK4 zu einer deutlichen Aktivierung von LmxMPK13 führt.

4.6.9 Untersuchung der Phosphorylierung verschiedener LmxMPK13-Mutanten mit dem 4G10-Antikörper

Es wurde ein Immunoblot mit dem 4G10-Antikörper durchgeführt, um zu untersuchen, ob LmxMPK13 durch LmxPK4 an einem Tyrosinrest phosphoryliert wird. Dieser detektiert ausschließlich phosphoryliertes Tyrosin.

Für diesen Immunoblot wurden verschiedene Mutanten von LmxMPK13 rekombinant exprimiert, über einen His-Tag aufgereinigt und mit unmarkiertem ATP in 1 x Kinasepuffer bei 30°C inkubiert. Es wurden LmxMPK13-Wt, LmxMPK13-KM, LmxMPK13(LmxPK4) und LmxMPK13-KM(LmxPK4) verwendet. Auf dem Röntgenfilm ist erkennbar, dass His-LmxMPK13 bereits nach der Proteinaufreinigung an einem Tyrosin phosphoryliert vorliegt. Diese Phosphorylierung nimmt auch durch eine Inkubation mit ATP nicht zu.

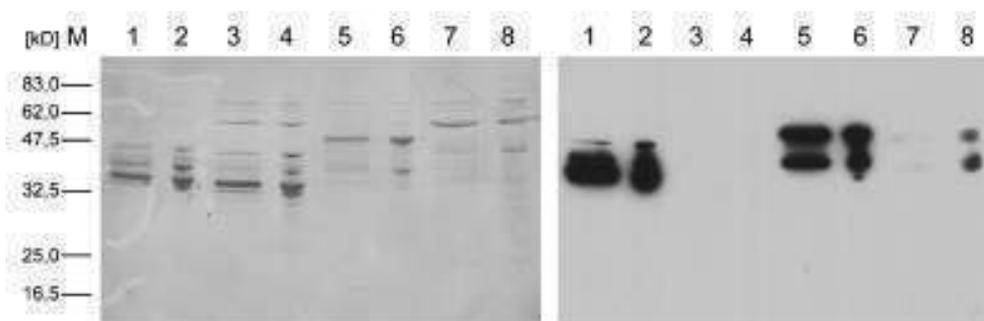


Abb. 4. 40: Immunoblot der Eluate der LmxMPK13-Aufreinigung mit dem 4G10 Antikörper (1:2 verdünnt)

Links: Silber gefärbtes SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm nach 5 min Expositionszeit
Abwechselnd wurden Eluate der Proteinaufreinigung direkt (1, 3, 5, 7) oder nach Inkubation mit ATP aufgetragen (2, 4, 6, 8)
1 und 2: His-LmxMPK13; 3 und 4: His-LmxMPK13-KM; 5 und 6: His-LmxMPK13 coexprimiert mit LmxPK4; 7 und 8: His-LmxMPK13-KM coexprimiert mit LmxPK4

Für die aktivierte Variante von His-LmxMPK13 sieht der Immunoblot identisch aus, wie für die allein exprimierte His-LmxMPK13. His-LmxMPK13-KM ist zu keinem Zeitpunkt an einem Tyrosin phosphoryliert. Wird His-LmxMPK13-KM hingegen mit LmxPK4 coexprimiert, ist bereits vor dem Kinase Test eine schwache Tyrosinphosphorylierung sichtbar (Spur 7). Wird die inaktive Kinase zusammen mit ATP inkubiert, verstärkt sich diese Phosphorylierung deutlich (Spur 8). Dieses Ergebnis erscheint unwahrscheinlich, da es sich um eine inaktive Kinase handelt. Allerdings wurde bereits unter 4.6.8.2 gezeigt, dass gerade im Eluat von His-LmxMPK13-KM ein gewisser Anteil von LmxPK4 bei der Coexpression mit aufgereinigt wird.

4.6.10 Mutation des TEY-Motiv von LmxMPK13

MAP-Kinasen werden durch Phosphorylierung des Threonins und des Tyrosins im TXY-Motiv aktiviert. Bei LmxMPK13 befinden sich diese hochkonservierten Aminosäuren an den Positionen 160 und 162. Zwischen ihnen befindet sich ein Glutamat. Um zu

untersuchen, ob LmxMPK13 an einem dieser Reste phosphoryliert wird oder sich selbst phosphorylieren kann, wurden verschiedene Mutanten generiert, bei denen entweder das Threonin zu einem Alanin (AEY-Mutante), das Tyrosin zu einem Phenylalanin (TEF-Mutante) oder beide Reste (AEF-Mutante) mutiert wurden.

4.6.10.1 Erzeugung der Mutationen

Die Mutationen wurden über eine PCR mit den Oligonukleotiden MPK13_AEY, MPK13_TEF bzw. MPK13_AEF eingefügt. Als Forward-Primer diente MPK13expr_for. Die entstandenen PCR-Produkte wurden jeweils über TOPO-Cloning (Invitrogen, Karlsruhe) in den pCR2.1 Vektor eingefügt. Durch Restriktionsspaltung dieser Plasmide mit *KpnI* und *HindIII* konnte ein Fragment aus dem pJCduet-LmxMPK13-Plasmid eingefügt werden. Durch eine anschließende Spaltung mit *SacI* und *SacII* konnten die neu generierten Mutationen in pJCduet-LmxMPK13 ligiert werden. Die neu entstandenen Plasmide heißen pJCduet-LmxMPK13-AEY, pJCduet-LmxMPK13-TEF und pJCduet-LmxMPK13-AEF.

4.6.10.2 Einfügen der Mutationen ins Phosphorylierungsmotiv der inaktiven LmxMPK13-KM

Für die Untersuchung einer potentiellen Phosphorylierung von LmxMPK13 an einem oder beiden Resten im TEY-Motiv durch LmxPK4 sollten die Mutationen im TEY-Motiv auch in die inaktive LmxMPK13-KM eingefügt werden.

Dazu wurden die neu generierten pJCduet-Konstrukte mit den mutierten Varianten von *LmxMPK13* und pJCduet-LmxMPK13-KM mit den Restriktionsendonukleasen *PvuII* und *HindIII* gespalten. Das kleinere Fragment, welches die Mutationen im TEY-Motiv trug, wurde dadurch in den Vektor eingefügt, der noch ein Fragment von *LmxMPK13* mit der KM-Mutation beinhaltet. Die drei neuen Plasmide heißen pJCduet-LmxMPK13-KM-AEY, pJCduet-LmxMPK13-KM-TEF und pJCduet-LmxMPK13-KM-AEF.

4.6.10.3 Rekombinante Expression und Kinase Aktivitätstest der TEY-Mutanten

Alle neuen Plasmide, pJCduet-LmxMPK13AEY, pJCduet-LmxMPK13TEF und pJCduet-LmxMPK13AEF sowie pJCduet-LmxMPK13-KM-AEY, pJCduet-LmxMPK13-KM-TEF und pJCduet-LmxMPK13-KM-AEF wurden in *E. coli* pAPlac transformiert und rekombinant exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte über Co²⁺-Sephrose wie unter 3.3.2 beschrieben. Um zu überprüfen, inwieweit die neu generierten Mutationen einen Einfluss auf die Aktivität von LmxMPK13 haben oder ob an einem oder beiden Aminosäureresten eine Phosphorylierung durch LmxPK4 stattfindet, wurden Kinase Aktivitätstests durchgeführt. Dazu wurden jeweils 2 µg Protein unter Standardpufferbedingungen bei 30°C mit [³²P]-ATP inkubiert.

In Abb. 4.41 ist erkennbar, dass LmxMPK13 trotz Mutationen einer oder beider Phosphorylierungsstellen im TEY-Motiv noch in der Lage ist sich selbst zu phosphorylieren

(Spuren 2 – 4 im Vergleich zu Wt in Spur 1). Dies bedeutet, dass zum einen die Autophosphorylierung außerhalb des TEY-Motivs stattfindet und zum anderen, dass dieses Motiv für die Autophosphorylierungsaktivität keine übergeordnete Rolle spielt.

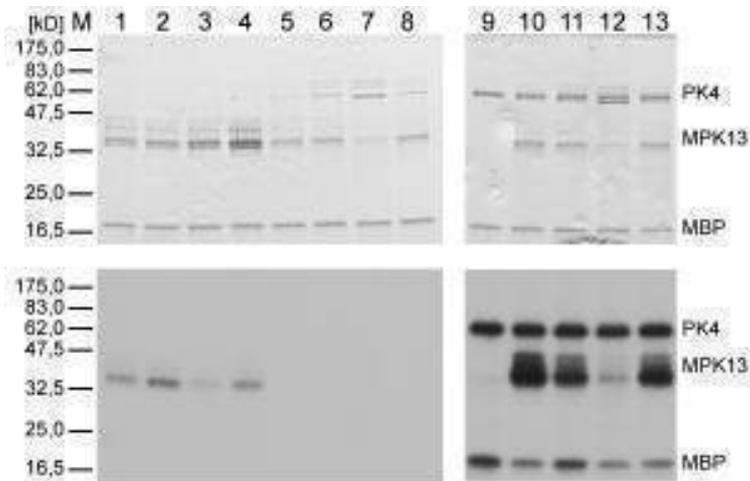


Abb. 4. 41: Kinase Aktivitätstest der TEY-Mutanten in Kombination mit LmxPK4

Oben: Coomassie gefärbte SDS-Gele; Unten: Autoradiogramme nach 5 h Exposition
 1: His-LmxMPK13; 2: His-LmxMPK13-AEY; 3: His-LmxMPK13-TEF; 4: His-LmxMPK13-AEF; 5/10: His-LmxMPK13-KM; 6/11: His-LmxMPK13-KM-AEY; 7/12: His-LmxMPK13-KM-TEF; 8/13: His-LmxMPK13-KM-AEF; 9-13: GST-LmxPK4

In den Spuren 6 - 8 ist zu sehen, dass die LmxMPK13-TEY-Mutanten die Autophosphorylierungsaktivität verlieren, wenn die Kinase zusätzlich eine KM-Mutation trägt. Werden solche Mutanten zusammen mit GST-LmxPK4 inkubiert, führt dies zu einer Phosphorylierung von LmxMPK13. Im Fall der AEY- und AEF-Mutanten (Spuren 11 und 13) fällt diese Phosphorylierung ähnlich stark aus, wie bei His-LmxMPK13-KM (Spur 10). His-LmxMPK13-KM-TEF wird etwas schwächer von GST-LmxPK4 phosphoryliert. Allerdings ist von His-LmxMPK13-KM-TEF auch etwas weniger als von den anderen Mutanten auf das SDS-Gel aufgetragen worden.

4.6.10.4 Einfügen der TEY-Mutationen in die Coexpressionskonstrukte

In den kombinierten Kinase Tests mit den TEY-Mutanten und LmxPK4 wurde nur festgestellt, dass LmxPK4 an einem Rest außerhalb des TEY-Motivs phosphoryliert. Diese Mutationen sollten nun ebenfalls in die Coexpressionskonstrukte eingefügt werden. Dadurch sollte überprüft werden, ob diese Reste überhaupt eine Rolle für die Aktivität von LmxMPK13 spielen.

Dazu wurden die Plasmide pJCduet-LmxMPK13-AEY, pJCduet-LmxMPK13-TEF und pJCduet-LmxMPK13-AEF mit den Restriktionsendonukleasen *Pst*I und *Not*I gespalten. Das die Mutation tragende DNA-Fragment wurde anschließend in den ebenso linearisierten pJCduet-LmxMPK13-LmxPK4 bzw. pJCduet-LmxMPK13-KM-LmxPK4 ligiert. Es entstanden

sechs neue Expressionsplasmide; pJCduet-LmxMPK13-AEY-LmxPK4, pJCduet-LmxMPK13-TEF-LmxPK4 und pJCduet-LmxMPK13-AEF-LmxPK4 sowie pJCduet-LmxMPK13-KM-AEY-LmxPK4, pJCduet-LmxMPK13-KM-TEF-LmxPK4 und pJCduet-LmxMPK13-KM-AEF-LmxPK4.

4.6.10.5 Rekombinante Coexpression und Kinase Test der TEY-Mutanten von LmxMPK13

Die rekombinante Proteinexpression wurde wie bei allen anderen LmxMPK13-Mutanten durchgeführt. In den anschließenden Aktivitätstest wurden 2 µg Protein unter Standardbedingungen bei 30°C mit [γ^{32} P]-ATP inkubiert.

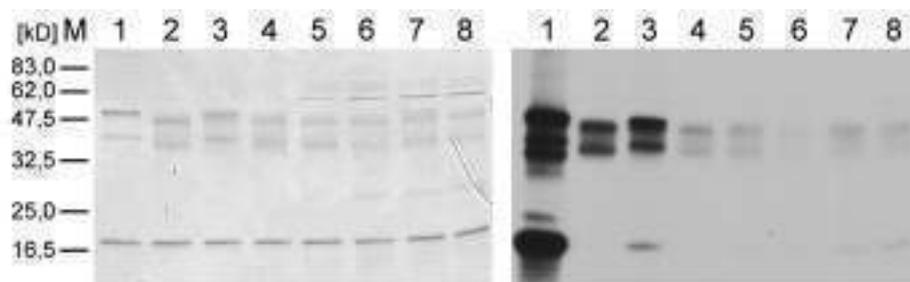


Abb. 4. 42: Kinase Aktivitätstest der mit LmxPK4 coexprimierten LmxMPK13-TEY-Mutanten

Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm nach 7,5 h Expositionszeit

1: His-LmxMPK13; 2: His-LmxMPK13-AEY; 3: His-LmxMPK13-TEF; 4: His-LmxMPK13-AEF; 5: His-LmxMPK13-KM; 6: His-LmxMPK13-KM-AEY; 7: His-LmxMPK13-KM-TEF; 8: His-LmxMPK13-KM-AEF

In Abb. 4.42 ist zu erkennen, dass die Mutationen einen erheblichen Einfluss auf die Aktivität von LmxMPK13 haben. In den Spuren 2 - 4 ist das Autoradiogramm der coexprimierten TEY-Mutanten sichtbar. Die AEY- und TEF-Mutante (Spuren 2 und 3) zeigen eine respektable Autophosphorylierungsaktivität, die TEF-Mutante allerdings nur noch eine sehr schwache MBP-Phosphorylierung und im Fall der ADY-Mutante gar keine MBP-Phosphorylierung mehr. Die AEF-Mutante (Spur 4) phosphoryliert ebenfalls kein MBP und besitzt auch keine nennenswerte Autophosphorylierungsaktivität. Die KM-Versionen der TEY-Mutanten besitzen wie erwartet keine Aktivität.

Interessanterweise konnte im Coomassie-gefärbten SDS-Gel beobachtet werden, dass His-LmxMPK13 und His-LmxMPK13-TEF etwas höher laufen als alle anderen Mutanten. Dies war bei den nicht coexprimierten Proteinen nicht zu beobachten (Vergleiche mit Abb. 4.41).

4.6.10.6 Überprüfung, ob LmxPK4 bei allen Mutanten coexprimiert wurde

Da bei allen Mutanten im TEY-Motiv im Vergleich zu His-LmxMPK13-Wt eine deutliche Veränderung der Aktivität beobachtet werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob LmxPK4 in allen Ansätzen ausreichend coexprimiert wurde.

Dazu wurden sowohl die *E. coli* Lysate als auch die Eluate der Proteinaufreinigung in einem Immunoblot mit einem Antikörper überprüft, der ein C-terminales Peptid von LmxPK4 erkennt.

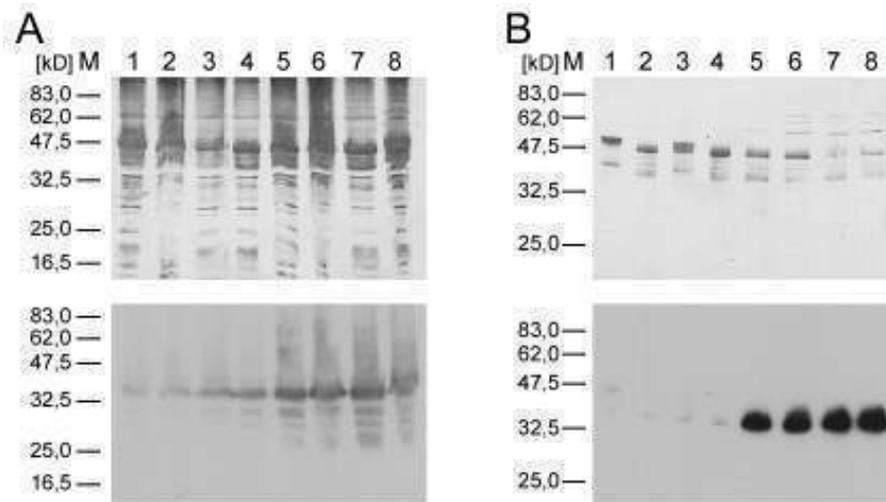


Abb. 4. 43: Immunoblot zur Überprüfung der Coexpressionen mit einem Antikörper, der ein C-terminales Peptid von LmxPK4 erkennt (1:500)

Oben: Silber gefärbte SDS-Gele; Unten: Autoradiogramme nach jeweils 1 sec Expositionszeit

A Überprüfung der *E.coli*-Lysate, ob LmxPK4 ausreichend exprimiert wurde; **B** Test der Eluate der Proteinaufreinigung, inwieweit LmxPK4 kontaminierend vorliegt;

1: His-LmxMPK13; 2: His-LmxMPK13-AEY; 3: His-LmxMPK13-TEF; 4: His-LmxMPK13-AEF; 5: His-LmxMPK13-KM; 6: His-LmxMPK13-KM-AEY; 7: His-LmxMPK13-KM-TEF; 8: His-LmxMPK13-KM-AEF

Bei den untersuchten *E. coli*-Lysaten (Abb. 4.43 A) konnte in allen Proben schon nach einer kurzen Expositionszeit eine Bande auf Höhe von LmxPK4 detektiert werden. Beim Vergleich der Spuren 2 – 4 mit Spur 1 ist erkennbar, dass die Intensität der LmxPK4-Expression bei den TEY-Mutanten auf einem ähnlichem Niveau stattfindet, wie bei LmxMPK13-Wt. Erstaunlicherweise ist die LmxPK4-Menge in der Coexpression mit den KM-Mutanten deutlich größer. Dementsprechend fällt die Verunreinigung der Eluate dieser Mutanten mit LmxPK4 auch deutlich höher aus als bei den einfachen TEY-Mutanten und LmxMPK13-Wt (Abb. 4.43 B).

4.6.11 Identifikation der Phosphorylierungsstellen

Zum Identifizieren der Aminosäurereste von LmxMPK13, die durch LmxPK4 phosphoryliert werden, wurden Eluate der Coexpressionen und der allein exprimierten LmxMPK13-Mutanten auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Coomassie-gefärbten Proteinbanden von LmxMPK13 wurden mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und an Heidi Rosenqvist (Süddänischen Universität in Odense, Dänemark) geschickt. Dort wurden die Proteine mit Trypsin verdaut und die phosphorylierten Peptide von den

unphosphorylierten an einer TiO_4 -Säule getrennt. Anschließend erfolgte die Analyse durch MS/MS, um die Phosphorylierungsstellen zu identifizieren.

Für die allein exprimierte LmxMPK13 konnten Phosphorylierungen an T160 und Y162 nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um die bereits untersuchten Aminosäurereste des TEY-Motivs. Beide Reste liegen auf einem Peptid. Es wurde die Form des Peptids identifiziert, bei der eine der beiden Aminosäuren phosphoryliert waren. In einem von zwei Durchläufen konnte zusätzlich auch die doppelt-phosphorylierte Variante nachgewiesen werden. Zusätzlich liegen wahrscheinlich mehrere C-terminale Phosphorylierungen vor, die allerdings nicht genau lokalisiert werden konnten.

Bei LmxMPK13-KM wurden keine phosphorylierten Peptide gefunden. Wurde die inaktive LmxMPK13 allerdings mit LmxPK4 coexprimiert, konnten mehrere phosphorylierte Peptide analysiert werden. Wie schon bei LmxMPK13-Wt konnten wieder die gleichen Phosphorylierungen im TEY-Motiv nachgewiesen werden. Die doppelt-phosphorylierte Variante war diesmal in beiden Versuchsdurchläufen identifizierbar. Zusätzlich wurde eine Phosphorylierung an T14 gefunden. Auch hier existieren C-terminale Phosphorylierungen, die allerdings wieder nicht eindeutig auf einzelne Aminosäurereste eingegrenzt werden konnten, da teilweise bei zu 11 potenzielle Phosphorylierungsstellen auf einem Peptid liegen. Es sieht allerdings so aus, als ob es sich hierbei um andere Aminosäurereste handelt als bei LmxMPK13-Wt. Die Spektren der MS/MS-Analyse sind im Anhang beigefügt.

4.6.12 Identifikation von Substraten von LmxMPK13

4.6.12.1 PREDIKIN

Die PREDIKIN Software wurde von Brinkworth et al. beschrieben und ist ein Angebot aus dem Internet, mit dem eine Konsensussequenz des Substrates einer Kinase rund um das Phosphorylierungsmotiv gebildet werden kann (Brinkworth et al., 2003). Dabei vergleicht die Software die Aminosäuresequenz der Kinase mit Kinasen, deren Substrate bekannt sind und gibt Wahrscheinlichkeiten für verschiedene Aminosäuren an den Positionen -3 bis +3 um den phosphorylierten Aminosäurerest des Substrates an.

LmxMPK13 wurde von dieser Software in die Subfamilie der RAGE-1 Kinasen eingeordnet. Die Familie wurde als CDC2/MAP Kinase-ähnlich bestimmt. Der gefundene Konsensus lautet: M[ARY][AFKLNIRST][ST]X[MV][NS]. Dabei steht X für eine beliebige Aminosäure und eckige Klammern für mehrere mögliche Aminosäuren, die an der gleichen Position sein könnten. Erstaunlicherweise konnte an Position +1 keine Voraussage getroffen werden. Bei Substraten von MAP Kinasen befindet sich an dieser Position immer ein Prolinrest. An

Position -2 sollte sich bevorzugt ebenfalls ein Prolin befinden, wenn es sich bei LmxMPK13 um eine MAP Kinase handelt.

Mit der Konsensussequenz wurde nach passenden Proteinen in der *L. major* Datenbank bei www.GeneDB.org gesucht. Dabei wurden 20 Proteine identifiziert, die die Konsensussequenz aufweisen. Zwei dieser Proteine haben an Position +1 ein Prolin: LmjF35.2900 und LmjF03.0460. Da an Position +1 keine Vorraussage getroffen werden konnte, sind nach der Meinung von Ross Brinkworth alle Ergebnisse nur mit Vorsicht zu geniessen. Daher wurde dieser Weg nicht weiter verfolgt und keins der entsprechenden Gene kloniert.

4.6.12.2 Identifizierung von Substraten von LmxMPK13 aus Leishmanienlysaten

Bindung von Interaktionspartnern an rekombinante LmxMPK13-Mutanten

Wenn Proteinkinasen mit ihren Substraten interagieren, müssen sie kurzzeitig aneinander binden. Um über diese Bindung den Interaktionspartner zu identifizieren, wurde His-LmxMPK13 während der rekombinanten Proteinaufreinigung nicht eluiert, sondern an der Sepharose-Matrix belassen. Anschließend wurde ein S-100 Promastigotenlysate zugegeben und eine 1h inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde die beladene Sepharose mit SDS-Auftragspuffer gekocht und per SDS-PAGE analysiert. Man muss davon ausgehen, dass diese Interaktion nur sehr kurz andauert. Es wurde daher nicht nur His-LmxMPK13 sondern auch rekombinante His-LmxMPK13-KM benutzt. Es ist davon auszugehen, dass die Interaktion bei der KM-Mutante länger andauert, da es zu keiner Phosphatgruppenübertragung kommt. Beide Proteine wurden mit LmxPK4 coexprimiert.

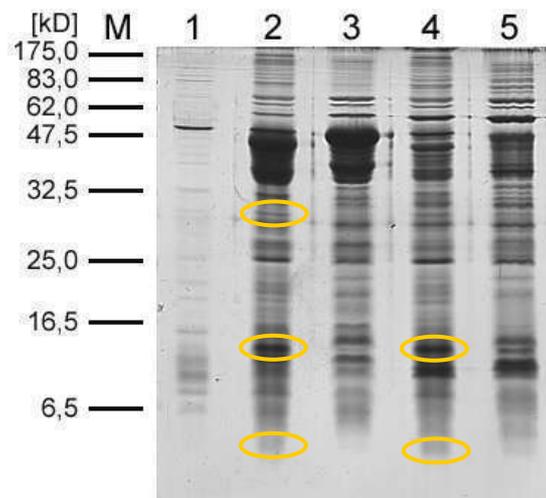


Abb. 4. 44: SDS-Polyacrylamidgel eines Bindungsversuchs – Silber gefärbt

1: Lysat aus Promastigoten; 2: His-LmxMPK13 zusammen mit Promastigotenlysate; 3: His-LmxMPK13; 4: His-LmxMPK13-KM zusammen mit Promastigotenlysate; 5: His-LmxMPK13-KM
Die gelb markierten Banden wurden mit MALDO-TOF analysiert.

Tatsächlich sind in den Spuren 2 (His-LmxMPK13 mit Lysat) und 4 (His-LmxMPK13-KM mit Lysat) Banden erkennbar, die in den Kontrollspuren 3 und 5 ohne Leishmanienlysate nicht zu

sehen sind. Zusätzlich wurde unbehandelte Co^{2+} -Sepharose, an der kein His-Fusionsprotein präadsorbiert wurde, ebenfalls mit dem gleichen Leishmanienlysat inkubiert (Spur 1). Alle markierten Banden wurden zur Identifikation einer MALDI-TOF Analyse unterzogen. Leider war diese nicht erfolgreich. Keine Bande konnte einem bekannten Protein zugeordnet werden.

Radioaktive Kinasetests zusammen mit Leishmanienlysaten

Eine andere Möglichkeit Substrate von Proteinkinasen zu identifizieren, besteht darin das rekombinante Protein mit Zelllysaten in einen Kinase Aktivitätstest mit $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ einzusetzen.

Dazu wurde aus 1×10^9 Wt Promastigoten ein S-100 Lysat hergestellt. Mit Hilfe der HiTrap-Desalting Säulen (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde das zelluläre ATP nach dem Prinzip der Gelfiltration entfernt. Anschließend wurde in den Kinase Test $4 \mu\text{g}$ rekombinante LmxMPK13 zusammen mit ca. $60 \mu\text{g}$ Lysat in einem $100 \mu\text{l}$ Ansatz 1h bei 30°C inkubiert. In Abb. 4.45 ist als Negativkontrolle einem Ansatz kein rekombinantes Protein zugegeben worden (Spur 1). Trotzdem sind im Autoradiogramm auch in dieser Spur einige Banden zu erkennen. Somit kann sicher gesagt werden, dass sich in dem Lysat noch andere aktive Kinasen befinden. Sollte in einem Ansatz mit rekombinantem Protein ein potentiell Substrat phosphoryliert werden, müsste sich im Vergleich zu dieser Negativkontrolle eine zusätzliche Bande zeigen.

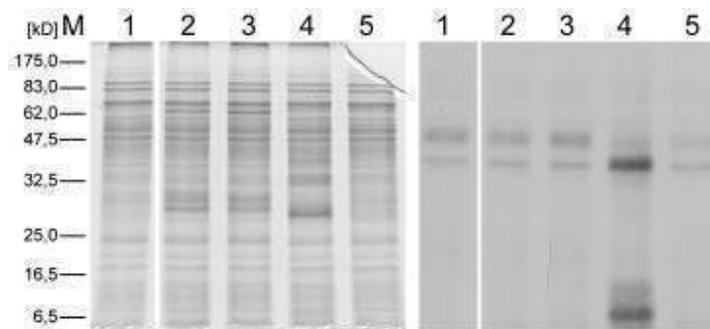


Abb. 4. 45: Kinase Aktivitätstest zusammen mit Leishmanienlysaten

Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm nach 7h Exposition

1: nur Lysat aus Promastigoten; 2: GST-LmxMKK-D mit Lysat; 3: GST-LmxMKK mit Lysat; 4: mit LmxPK4 coexprimierte His-LmxMPK13 zusammen mit Lysat; 5: LmxMPK14 zusammen mit Lysat

In den Spuren mit GST-LmxMKK, GST-LmxMKK-D und His-LmxMPK14 sind keine zusätzlichen Banden auf dem Röntgenfilm detektierbar. In der Spur in der sich mit LmxPK4 coexprimierte His-LmxMPK13 befindet (Abb. 4.45, Spur 4), sind im Bereich von 5 – 8 kD zwei neue Banden im Autoradiogramm zu sehen, die in allen anderen Spuren nicht auftauchen. Es scheint, dass die aktivierte His-LmxMPK13 potentielle Substrate im promastigoten Wt Lysat phosphoryliert.

Dieser Versuch wurde nun mit anderen vorhandenen His-LmxMPK13-Mutanten wiederholt. Wenn die inaktive His-LmxMPK13-KM zu den Lysaten gegeben wurde, konnten die beiden Banden nicht detektiert werden, unabhängig davon ob His-LmxMPK13 mit LmxPK4 coexprimiert wurde oder nicht (Abb. 4.46). In der Spur mit His-LmxMPK13 sind diese Banden ebenfalls nicht erkennbar. Nur in dem Ansatz in dem sich His-LmxMPK13 befand, die mit LmxPK4 coexprimiert wurde, konnten Banden im Bereich zwischen 5 - 8 kD nachgewiesen werden.

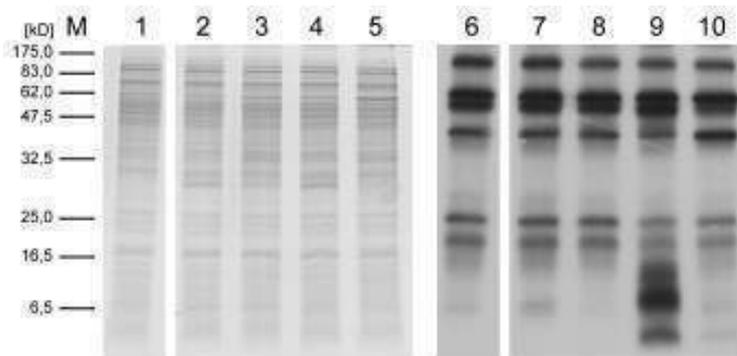


Abb. 4. 46: Kinase Aktivitätstest von LmxMPK13-Mutanten zusammen mit Lysaten aus Promastigoten

Links: Coomassie gefärbtes 15 %-iges SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm nach 7 h Expositionszeit
 1/6: Leishmanienlysat aus Promastigoten; 2/7: His-LmxMPK13 zusammen mit Lysat; 3/8: His-LmxMPK13-KM zusammen mit Lysat; 4/9: His-LmxMPK13 coexprimiert mit LmxPK4 zusammen mit Lysat; 5/10: His-LmxMPK13-KM coexprimiert mit LmxPK4 zusammen mit Lysat

Somit wurden nicht nur die Ergebnisse aus dem ersten Test bestätigt, sondern es wurde auch gezeigt, dass LmxMPK13 diese Banden nur phosphoryliert, wenn sie von LmxPK4 aktiviert wurde. Dass die beobachteten Phosphorylierungen von einer LmxPK4-Kontamination aus der Proteinaufreinigung stammen kann ausgeschlossen werden, da bei der inaktiven His-LmxMPK13-KM, die mit PK4 coexprimiert wurde, keine zusätzlichen Banden detektierbar waren.

Zur Identifikation der im Autoradiogramm zusätzlich auftretenden Banden wurde versucht über ein längeres (18 cm) 20 %-iges SDS-Gel eine bessere Auftrennung zu erreichen (nicht abgebildet). Allerdings konnte auf diese Art und Weise keine Auftrennung erreicht werden, die für eine Identifizierung über MALDI-TOF ausreichend gewesen wäre.

Bei einer Recherche in der Online-Datenbank GeneDB (www.genedb.org) wurde festgestellt, dass es im Genom von *L. major* nur 40 vorhergesagte Proteine im Bereich von 5 - 8 kD und bei *L. infantum* sogar nur 31 potentielle Proteine gibt. In deren Sequenz wurde nach potentiellen MAP Kinase Phosphorylierungsmotiven gesucht. Diese sind entweder SP oder TP. Bei den beiden verschiedenen Spezies blieben nur noch 8 Proteine, die sowohl in dem genannten Molekulargewichtsbereich liegen als auch eine potentielle MAP Kinase Phosphorylierungsstelle besitzen. Diese Proteine sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

<i>L. major</i> :		<i>L. infantum</i> :
LmjF36.0340	NOP10p	LinJ36.2320
LmjF30.0680		LinJ30.1000
LmjF24.1600		LinJ31.3260
LmjF35.065		LinJ29.1230
LmjF27.1605		LinJ30.1020
LmjF29.2530	HP	LinJ29.2890
LmjF28.2790		LinJ30.1010
LmjF02.0400		LinJ31.1300

Bei nur 2 dieser 8 Proteine ist das Homologe in der anderen Spezies ebenfalls vorhanden. Zum einen handelt es sich um ein Homolog von NOP10p und zum anderen um ein hypothetisches Protein mit unbekannter Funktion.

4.6.13 Charakterisierung von LmxNOP und LmxHP

Um zu überprüfen ob LmxMPK13 tatsächlich eines dieser Proteine phosphoryliert, sollten diese rekombinant exprimiert werden. Dazu wurden die Gene mittels PCR auf gDNA von Wt *L. mexicana* mit den Oligonukleotiden NOP_for und NOP_rev bzw. HP_for und HP_rev amplifiziert. Dabei wurden mehrere Restriktionsschnittstellen vor und nach dem jeweiligen ORF eingefügt, so dass anschließend sofort in verschiedene Expressionsplasmide kloniert werden konnte. So wurden vor dem Gen jeweils eine *EcoRI*, eine *NcoI* und eine *BamHI*-Schnittstelle eingefügt. Hinter dem ORF wurden eine *EcoRV* und eine *HindIII*-Spaltstelle eingefügt. Über die *BamHI* und die *HindIII*-Schnittstelle wurden beide Gene anschließend in den pQE30-Vektor ligiert, wodurch die Expressionskonstrukte pQE30-LmxNOP und pQE30-LmxHP entstanden.

Da bei *L. mexicana* die Sequenzen von *NOP* und *HP* bisher noch nicht bekannt waren, wurden nach der PCR 4 Klone sequenziert. Für *LmxNOP* ergaben sich 3 identische Klone und ein weiterer, der eine Punktmutation trug. Im Folgenden wurde mit der dominanten Sequenz weiter gearbeitet. Die Sequenzierung von *LmxHP* zeigte, dass hier alle 4 Klone identisch waren. Der Vergleich der Sequenzen mit Homologen aus anderen Organismen ist im Anhang beigefügt.

4.6.13.1 Eigenschaften von LmxNOP und LmxHP

LmxNOP

Das Gen *LmxNOP* ist 192 bp lang. Damit kodiert es für ein Protein mit 63 Aminosäuren, was einem potentiellen Molekulargewicht von 7,4 kD entspricht. Die Aminosäuren 1 - 58 kodieren für eine potentielle Zink-bindende RNA-Bindedomäne. Im Bereich von Aminosäure 12 – 52 befindet sich zusätzlich eine Domäne, die starke Ähnlichkeit zu dem Nukleolaren RNA-Bindeprotein NOP10p besitzt. An Position 35 befindet sich ein Serin, das von einem Prolin gefolgt wird und somit eine potentielle Phosphorylierungsstelle für MAP Kinasen darstellt.

Homologe Proteine zu LmxNOP finden sich in einer Vielzahl anderer Organismen. So gibt es in *L. major* ein Protein mit einer zu 95 % identischen Aminosäuresequenz. In *T. brucei* und *T. cruzi* haben die jeweiligen homologen Proteine noch zu 80 % die gleiche Aminosäurereihenfolge. Aber auch in vielen höheren Organismen finden sich sehr homologe Proteine. So hat LmxNOP 60 % identische Aminosäuren wie humanes NOP10p. Im Anhang befindet sich ein Vergleich der Sequenzen der homologen Proteine.

LmxHP

Das Gen *LmxHP* umfasst 204 Basenpaare. Somit ist das kodierte Protein 67 Aminosäuren lang. Dies entspricht einem Molekulargewicht von 7,5 kD.

An Position 13 befindet sich ein Threonin, das von einem Prolin gefolgt wird. Dabei handelt es sich um die potentielle Phosphorylierungsstelle für MAP Kinasen.

Es konnten keine potentiellen konservierten Domänen identifiziert werden und es wurden auch keine homologen Proteine in Organismen außerhalb der Kinetoplastida gefunden. In *L. infantum* gibt es ein homologes Protein mit 97 % identischer Aminosäuresequenz und in *L. major* mit 94%. Ansonsten konnten nur noch in *T. cruzi* und *T. brucei* homologe Proteine gefunden werden. Diese haben eine zu 56 % bzw. 51 % identische Aminosäuresequenz.

4.6.14 Rekombinante Expression und Kinase Aktivitätstest von LmxNOP und LmxHP

Für die rekombinante Expression von His-LmxNOP und His-LmxHP wurden die Expressionsplasmide pQE30-LmxNOP und pQE30-LmxHP in *E.coli* BL21 transformiert. Die Expression und Aufreinigung über den His-Tag erfolgte wie unter 3.3.2 beschrieben.

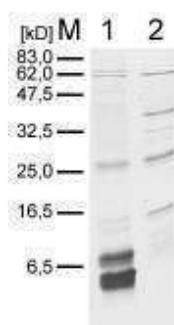


Abb. 4. 47: Eluate der Proteinaufreinigung aufgetragen auf 15 %-igen SDS-Gel und anschließend mit Coomassie gefärbt

1: His-LmxNOP und 2: His-LmxHP

His-LmxNOP ließ sich sehr gut aufreinigen, His-LmxHP hingegen nicht. Es wurden verschiedene Bedingungen variiert, um die Expression von His-LmxHP zu verbessern. Dies führte aber zu keiner höheren Proteinkonzentration.

4.6.14.1 Kombinierte Kinase Tests zusammen mit verschiedenen LmxMPK13-Mutanten

Obwohl bei der Proteinaufreinigung von His-LmxHP nachweislich nicht mehr Protein aufgereinigt wurde als aus einem leeren pJCduet-Vektor (der ebenfalls für eine Proteinaufreinigung eingesetzt wurde) sollte ein Kinase Test in Kombination mit verschiedenen His-LmxMPK13-Mutanten durchgeführt werden. His-LmxNOP wurde ebenfalls in einen Aktivitätstest eingesetzt.

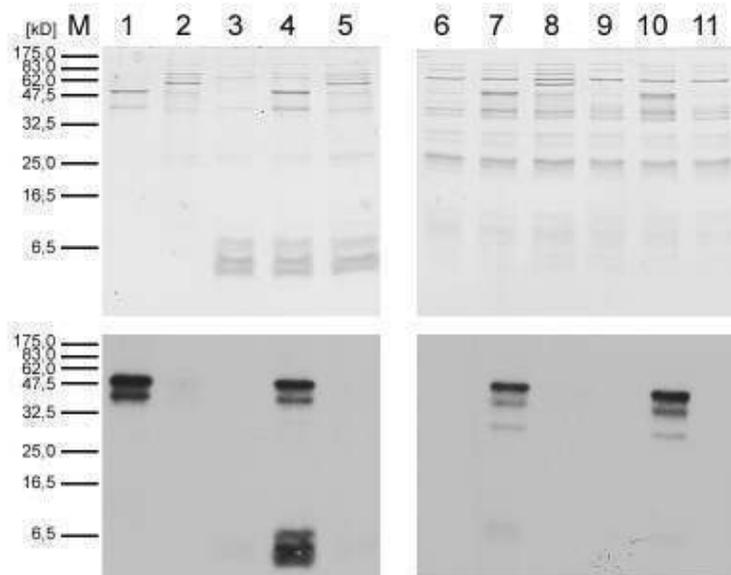


Abb. 4. 48: Kombinierte Kinase Aktivitätstests von LmxNOP und LmxHP zusammen mit verschiedenen mit LmxPK4 coexprimierten LmxMPK13-Mutanten

Oben: Coomassie gefärbtes SDS-Gele; Unten: Autoradiogramme nach 6,5 h Expositionszeit
1,4,7 und 10: His-LmxMPK13; 2,5,8 und 11: His-LmxMPK13-KM; 3-5: His-LmxNOP; 6-8: His-LmxHP
und 9-11: Aufreinigung eines leeren pJCduet-Vektors

In Abb. 4.48 ist erkennbar, dass His-LmxNOP (Spur 3), His-LmxHP (Spur 6) und das Proteingemisch, das aus dem leeren pJCduet-Vektor aufgereinigt wurde, keine Aktivität besitzen. In Kombination mit His-LmxMPK13, die mit LmxPK4 coexprimiert wurde (Spur 4), ist eine deutliche Schwärzung des Röntgenfilms auf der Höhe zu sehen, die His-LmxNOP entspricht. Das bedeutet, dass LmxNOP von der aktivierten LmxMPK13 phosphoryliert wird. Es kann ausgeschlossen werden, dass diese Phosphorylierung durch eine Kontamination mit LmxPK4 hervorgerufen wird, da diese Phosphorylierung nicht auftrat, wenn His-LmxNOP mit coexprimierter His-LmxMPK13-KM inkubiert wird (Spur 5).

In dem kombinierten Aktivitätstest der aktivierten His-LmxMPK13 mit dem Proteingemisch, in dem sich möglicherweise auch His-LmxHP befindet (Spur 7), ist ebenfalls eine schwache Bande im Autoradiogramm bei ca. 7 kD sichtbar, die His-LmxHP entsprechen könnte. Diese Phosphorylierung fällt allerdings im Vergleich zu der von His-LmxNOP sehr schwach aus. In dem Kontrollansatz mit dem Proteingemisch, das aus *E. coli* mit leerem pJCduet-Vektor aufgereinigt wurde (Spur 10), ist jedoch auf gleicher Höhe ebenfalls eine leichte Schwärzung

des Röntgenfilms sichtbar. Somit scheint dieses Signal von einem Protein aus *E. coli* zu stammen, welches aus den Bakterien mit aufgereinigt wurde.

4.6.14.2 Episomale Expression von TY-LmxNOP in *L. mexicana*

Klonierung eines episomalen Expressionskonstruktes für TY-LmxNOP in *L. mexicana*

Für eine Insertion von LmxNOP in den pX-PAC-Vektor wurden zusätzliche Restriktionsschnittstellen vor und hinter *LmxNOP* benötigt. Um das Protein in den rekombinanten Leishmanien anschließend nachweisen zu können, sollte LmxNOP zusätzlich mit einem TY-Tag versehen werden. Dazu wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden NOP_BglII_for und NOP_BglII_rev durchgeführt, wobei als Ausgangs-DNA das Plasmid pQE30-LmxNOP diente. Nach anschließendem TOPO-Cloning konnte durch eine Spaltung mit *BglII* das *LmxNOP*-Fragment isoliert werden und in dem ebenso geschnittenen pX-TYMPK7dsNcoI-Plasmid LmxMPK7 und deren Stromabregion ersetzen. Dieses Plasmid heißt pX-TYLmxNOP und konnte direkt in die Elektroporation von LmxWt eingesetzt werden.

Elektroporation von LmxWt mit pX-TYLmxNOP

Das Plasmid pX-TYLmxNOP trägt ein Resistenzgen für Puromycin. Dadurch konnte nach der Elektroporation mit Puromycin auf positive Klone selektiert werden. Nach der Transfektion wuchsen sehr viele resistente Klone. Es wurden aber nur sechs Klone isoliert und weitergehend überprüft. Zum Nachweisen, dass die resistenten Leishmanien das Plasmid tragen, wurde gDNA isoliert und auf dieser eine PCR durchgeführt. Als Oligonukleotide wurden pXPHLEO2 und NOP_BglII_rev verwendet. In allen Klonen konnte das pX-TYLmxNOP-Plasmid nachgewiesen werden.

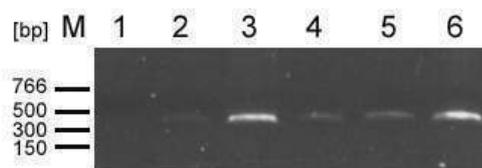


Abb. 4. 49: Agarosegel einer PCR zum Nachweis von TY-LmxNOP in Δ Lmx+pX-TYLmxNOP

Um nun zu überprüfen, ob auch das Protein TY-LmxNOP exprimiert wird, wurde ein Immunoblot durchgeführt. Dazu wurden promastigote Leishmanien geerntet und aus diesen anschließend Extrakte für einen Immunoblot hergestellt. Auf einem 15%-igen SDS-Gel wurden pro Spur 2×10^7 Zellen aufgetragen. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion mit dem BB2-Antikörper, der den TY-Tag erkennt.

In Abb. 4.50 ist bei ca. 38 kD die bereits unter 4.6.4.4 erwähnte Kreuzreaktion deutlich detektierbar. TY-LmxNOP sollte ein ungefähres Molekulargewicht von 7,5 kD haben. Auf dieser Höhe ist in der Abbildung jedoch selbst bei einer Exposition des Röntgenfilms über 45 min. keine Bande erkennbar. Dies bedeutet, dass falls TY-LmxNOP exprimiert wird, dies in so geringen Mengen geschieht, dass es unter der Nachweisgrenze des Immunoblots liegt.

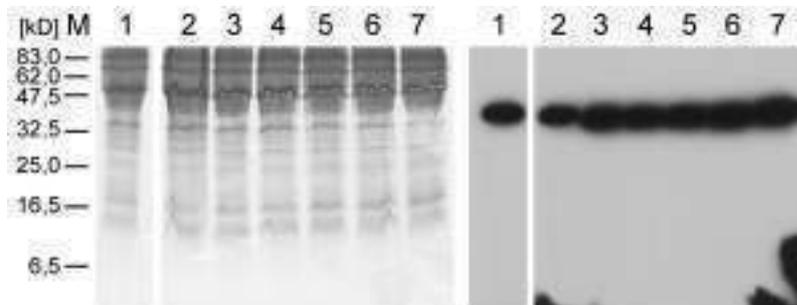


Abb. 4. 50: Immunoblot mit Leishmanienlysaten mit dem BB2 Antikörper (1:500)

Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel: Rechts: Autoradiogramm nach 45 min Expositionszeit
1: LmxWt; 2 - 7: Lmx + pX-TYlmxNOP Klon 1 -6

Falls dies der Fall ist, könnte TY-LmxNOP dennoch über Immunfluoreszenzanalyse sichtbar gemacht werden. Dazu wurden LmxWt Promastigote und die sechs TY-LmxNOP-Klone auf 10-well Objektträgern fixiert und 1:10 mit dem BB2-Antikörper gefärbt. Der Sekundärantikörper war mit AlexaFluor488 gekoppelt. Die Zellen wurden am Leica Leitz DMBR Mikroskop betrachtet und Aufnahmen gemacht.

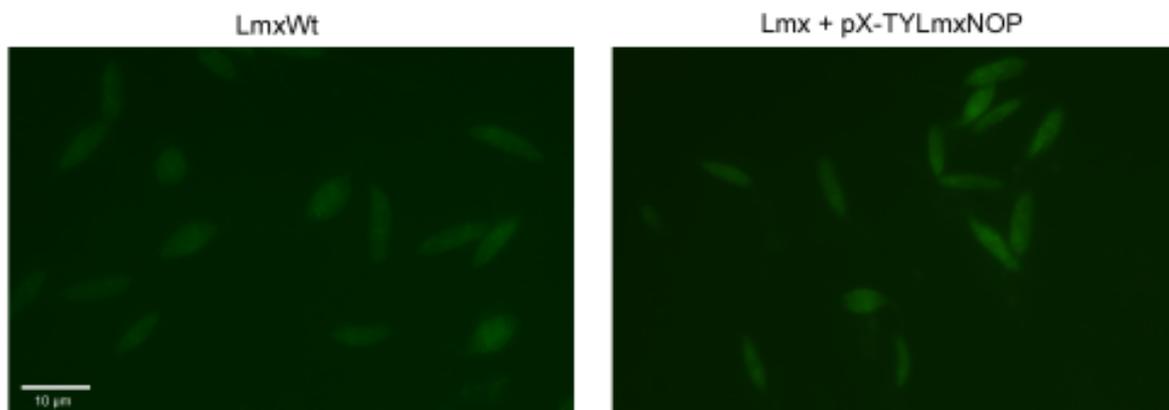


Abb. 4. 51: Fluoreszenzanalyse mit dem BB2 Antikörper (1:10)

Der Sekundärantikörper war AlexaFluor488 gekoppelt. Der Balken entspricht 10µm.

Dabei war kein Unterschied zwischen LmxWt und den Mutanten erkennbar. Bei einer langen Exposition von 6 s war eine diffuse Färbung im Bereich des Zytosol zu beobachten, die bei LmxWt eventuell etwas schwächer ausfiel. Da diese Färbung aber sowohl bei LmxWt, als auch bei den Mutanten auftrat, kann davon ausgegangen werden, dass sie durch Kreuzreaktion des TY-Tags hervorgerufen wurde.

Phosphoproteinaufreinigung der TY-LmxNOP-Mutanten

Eine weitere Möglichkeit warum TY-LmxNOP im Immunoblot nicht nachweisbar ist, könnten Lipide sein, die im SDS-Gel ebenfalls in einem sehr niedrigen Bereich laufen. Diese sind sehr abundant und können andere Proteine, die auf gleicher Höhe laufen, im Immunoblot durchaus überdecken. Zur Abtrennung diese Lipide wurden die phosphorylierten Proteine von promastigoten LmxWt und Δ Lmx+TYLmxNOP aufgereinigt. Das Gesamtzellextrakt, der Durchlauf (die nicht phosphorylierten Proteine) und die Eluate 3 und 4 der Aufreinigung wurden anschließend auf einem 15 %-igen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem BB2-Antikörper analysiert. Dieser Antikörper erkennt den TY-Tag.

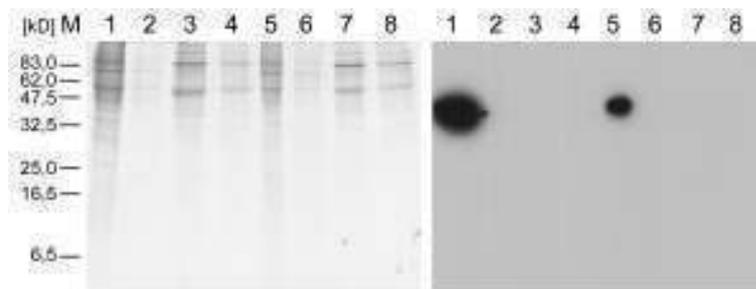


Abb. 4. 52: Immunoblot der Phosphoaufreinigungen mit dem BB2 Antikörper (1:500)

Links: 15 %-iges SDS-Gel Coomassie gefärbt; Rechts: Autoradiogramm nach 1 h Expositionszeit
 1-4: Phosphoaufreinigung von LmxWt; 5-8: Phosphoaufreinigung von Δ Lmx + pX-TYLmxNOP; 1 und 5: Gesamtzellextrakte; 2 und 6: Durchlauf der Phosphoaufreinigung; 3 und 7: Eluate 3; 4 und 8: Eluate 4

In Abb. 4.52 ist deutlich zu erkennen, dass bei ca. 38 kD die bereits beschriebene Kreuzreaktion im Gesamtzelllysate auftritt (Spuren 1 und 5). Sehr schwach war die Kreuzreaktion auch unter den nicht-phosphorylierten Proteinen nachweisbar (Spuren 2 und 6). Eine Bande von ca. 7,5 kD konnte auch bei sehr langen Expositionszeiten (1,5 h) nirgendwo detektiert werden

Somit muss davon ausgegangen werden, dass TYLmxNOP nicht exprimiert wird, obwohl das Plasmid in den Parasiten enthalten ist und die Leishmanien Puromycin resistent sind.

4.7 LmxMPK14

4.7.1 Durchsuchen einer λ DASH II Phagen-Bank nach dem ORF von *LmxMPK14*

4.7.1.1 Herstellung einer genspezifischen Sonde

Da eine *L. mexicana* gDNA-Bank nach *LmxMPK14* durchsucht werden sollte, wurde eine Sonde benötigt. Dazu wurde auf einem hochkonserviertem Bereich von *L. major* und *L. mexicana* eine PCR mit den Oligonukleotiden LmxMPK14_1.for und LmxMPK14_1.rev durchgeführt. Das ca. 450 bp-große PCR-Produkt wurde nach dem folgenden TOPO-Cloning sequenziert und darauf eine weitere PCR mit den gleichen Oligonukleotiden durchgeführt. Dabei wurde das DIG-Kit der Fa. Roche verwendet, wodurch ein Digoxigenin-markiertes DNA-Fragment entstand, das als Sonde diente. Mit dieser wurde nun die gDNA-Bank durchsucht, und Phagen identifiziert, die ein der Sonde entsprechendes DNA Fragment tragen. Nach der Präparation der Phagen-DNA wurde diese mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *NotI* und *XbaI* gespalten. Anschließend folgte die Klonierung in den pBSKII(+)-Vektor. Durch Sequenzierung konnte festgestellt werden, dass in pB-LmxMPK14X4 der komplette ORF von *LmxMPK14* enthalten ist. Zusätzlich sind auch Stromab- und Stromaufregionen bei der Phagen-DNA enthalten. Es folgte eine Sequenzierung des entsprechenden Bereichs. Dieser beginnt ungefähr 1.000 bp vor dem Start-Codon von *LmxMPK14* und endet 1.000 bp nach dem Stopp-Codon. Die vollständige Sequenz von *LmxMPK14* wurde in der NCBI-Nukleotid-Datenbank unter der Zugangsnummer DQ812906 veröffentlicht.



Abb. 4. 53: Schematische Darstellung von *LmxMPK14* mit den flankierenden Bereichen

Dargestellt sind verschiedene wichtige Schnittstellen und die Positionen an denen die Gensonde und die Sonde, die einem Teil der Stromabregion von *LmxMPK14* entspricht, binden.

4.7.1.2 Eigenschaften von *LmxMPK14*

LmxMPK14 umfasst 1980 bp und kodiert somit für ein Protein mit 660 Aminosäuren. Dies entspricht ca. 68 kD. Im Bereich von As 4 – 303 befindet sich die Kinase Domäne. Diese besteht aus den 12 hochkonservierten Subdomänen (im Anhang in der Sequenz von *LmxMPK14* markiert). In den Subdomänen VIa bis IX liegen die meisten der

hochkonservierten Aminosäuren vor. Bestimmte Motive ermöglichen die Einordnung von Kinasen in Serin/Threonin- oder Tyrosin-Kinasen (Hanks et al., 1988; Hanks und Quinn, 1991). Typische Serin/Threonin-Kinase-Sequenzen befinden sich in den Subdomänen VIb (DLKPEN) und VIII (G[TS]XX[YF]XAPE), Tyrosin-Kinasen weisen hier dagegen die Sequenzen DLRAAN oder DLAARN und P[IV][KR]W[TM]APE auf. Bei LmxMPK14 befinden sich an diesen Positionen die Sequenzen DMKPEN und STRWYRAPE, was eher auf eine Serin/Threonin-Spezifität hinweist.

In Subdomäne 2 befindet sich an Position 33 ein hochkonserviertes Lysin, das für die Phosphatgruppenübertragung eine wichtige Rolle spielt. An Position 175 – 177 befindet sich das TXY-Motif, an dem MAP Kinasen von ihrem Aktivator phosphoryliert werden. Im Fall von LmxMPK14 befindet sich zwischen dem Threonin und dem Tyrosin ein Asparat.

Bei der Suche nach homologen Proteinen in *L. major* konnte eine putative Proteinkinase identifiziert werden, deren Aminosäuresequenz zu 94 % identisch ist zu der von LmxMPK14. In *Trypanosoma brucei* wurde ein homologes Protein mit 49 % identischer Aminosäuresequenz gefunden (Tb927.3.690) und in *Trypanosoma cruzi* ein Protein mit immerhin noch 60 % identischer Aminosäuren (Tc00.1047053509231.20). Zusätzlich konnten auch in anderen Organismen Homologe gefunden werden, wie z.B. *Arabidopsis thaliana* (49 %), *Chlamydomonas reinhardtii* (49 %), *Oryza sativa* (51 %) und *Homo sapiens* (49 %). Ein Vergleich der Sequenzen befindet sich im Anhang.

In der Aminosäuresequenz von LmxMPK14 konnten weder Signalpeptide, noch irgendwelche anderen Lokalisationssequenzen identifiziert werden. Somit handelt es sich höchstwahrscheinlich um ein zytoplasmatisches Protein.

Die Kinase Domäne nimmt die N-terminale Hälfte von LmxMPK14 ein. Dem C-Terminus konnte bisher keine Funktion zugeordnet werden. Dieser zusätzliche Teil ist auch nur in den homologen Proteinen der Kinetoplastiden anzutreffen.

4.7.2 Deletion von *LmxMPK14* in *L. mexicana*

4.7.2.1 Bestimmung der Kopienzahl von *LmxMPK14* im Genom von *L. mexicana*

Um *LmxMPK14* aus dem Genom von LmxWt zu entfernen, musste als erstes festgestellt werden, wie viele Kopien des Gens vorliegen. Dazu wurde gDNA des Wt mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespalten. In einem anschließendem Southern Blot mit einer DIG-markierten DNA-Sonde sollte anhand der Anzahl der erkannten Fragmente die Kopienzahl von *LmxMPK14* im Genom bestimmt werden. Es wurde die gleiche Sonde benutzt, wie für das Durchsuchen der gDNA-Bank.

Die gDNA wurde mit *Acc65I*, *EcoRV*, *HincII*, *NciI*, *PciI*, *PstI*, *PvuII* und *SacI* geschnitten. Für *EcoRV*, *PciI*, *PvuII* und *SacI* wurde jeweils ein DNA-Fragment erwartet. Für die restlichen Restriktionsspaltungen jeweils zwei DNA-Fragmente.

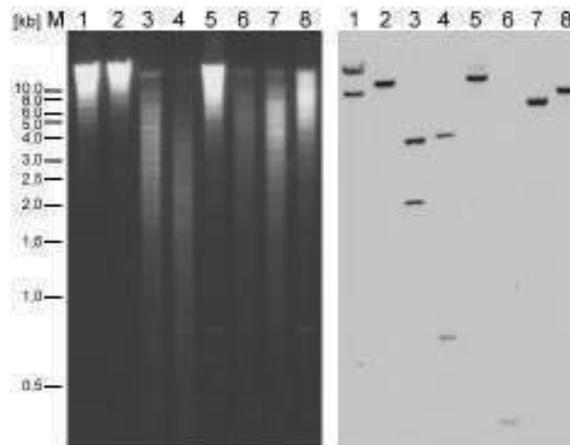


Abb. 4. 54: Southern Blot Analyse zur Bestimmung der Kopienzahl von *LmxMPK14*

Links: Agarosegel; Rechts: Autoradiogramm nach 2 h Expositionszeit;
1: *Acc65I*; 2: *EcoRV*; 3: *HincII*; 4: *NciI*; 5: *PciI*; 6: *PstI*; 7: *PvuII* und 8: *SacI*

In Abb. 4.54 ist zu erkennen, dass die Fragmente auftraten, wie sie für eine einzelne Kopie von *LmxMPK14* vorhergesagt wurden. Somit kann in Zusammenhang mit *LmxMPK14* von einem Single-Copy-Gen gesprochen werden.

4.7.2.2 Klonierung der Deletionskonstrukte für *LmxMPK14*

Für die Amplifikation der Stromauf- und Stromabregion von *LmxMPK14* durch PCR wurden für die Stromaufregion die Primer *delMPK14_1* und *delMPK14_2* benutzt und für die Stromabregion *delMPK14_3* und *delMPK14_4*. Als Ausgangs-DNA diente das pBSKII(+)-Plasmid, das die Phagen-DNA aus dem *L. mexicana*-gDNA-Bank Screening enthielt. Durch die PCR wurden am 5'-Ende der Stromaufregion eine *DraI*- und am 3'-Ende eine *NcoI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Am 5'-Ende der Stromabregion erfolgte die Insertion einer *NheI*-Spaltstelle und am 3'-Ende ebenfalls eine Spaltstelle für *DraI*. Die Stromabregion wurde nach erfolgreichem TOPO-Cloning in den pBSK(II)-Vektor eingefügt, wodurch das Plasmid pB-dsmpk14 entstand. Anschließend wurde die Stromaufregion vor die Stromabregion kloniert, wodurch wiederum das Plasmid pB-usdsmpk14 entstand. Dieses wurde nun mit den eingefügten *NcoI*- und *NheI*-Schnittstellen linearisiert und die verschiedenen Resistenzgene eingefügt. Diese neuen Plasmide heißen pB-usmpk14HYGdsmpk14, pB-usmpk14NEOdsmpk14 und pB-usmpk14PHLEOdsmpk14.

4.7.2.3 Deletion von *LmxMPK14*

Die Plasmide pB-usmpk14HYGdsmk14, pB-usmpk14NEOdsmk14 und pB-usmpk14PHLEOdsmk14 wurden mit *DraI* gespalten, um die einzelnen Allele von *LmxMPK14* gegen die Resistenzgene auszutauschen. Die DNA-Fragmente, die das Resistenzgen mit den Stromauf- und Stromabregionen von *LmxMPK14* trugen, wurden aufgereinigt und durch Elektroporation die Leishmanien transfiziert. Nach einer ersten Elektroporationsrunde von *LmxWt* konnten zwei Hygromycin resistente Klone isoliert werden. Diese wurden einer zweiten Transfektion mit dem Neomycin- und Phleomycinkonstrukt unterzogen. Dabei entstand bei dem ersten Hygromycinklon $\Delta LmxMPK14+/-$ H1 ein zusätzlich Phleomycin resistenter Klon $\Delta LmxMPK14-/-$ H1P1. Bei der Elektroporation des zweiten Hygromycinklons $\Delta LmxMPK14+/-$ H2 konnten zwei Phleomycin resistente Klone isoliert werden: $\Delta LmxMPK14-/-$ H2P1 und $\Delta LmxMPK14-/-$ H2P2.

4.7.2.4 Kontrolle der potentiellen Deletionsklone durch Southern Blot Analyse

Um im Southern Blot den korrekten Einbau der Resistenzgene und die Deletion von *LmxMPK14* zu überprüfen, wurde eine neue Sonde generiert, die einem ca. 450 bp Fragment in der Stromabregion von *LmxMPK14* entspricht. Dazu wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden MPK14_8 und MPK14_sonde1 auf dem pB-*LmxMPK14*-Plasmid durchgeführt. Das entstandene Fragment wurde in einer zweiten PCR mit Digoxigenin markiert und konnte so direkt als Sonde für den Southern Blot eingesetzt werden.

Es wurde gDNA von *Wt* Promastigoten und folgenden Mutanten isoliert: $\Delta LmxMPK14-/-$ -H1P1, $\Delta LmxMPK14-/-$ H2P1 und $\Delta LmxMPK14-/-$ H2P2. Diese wurde mit *NdeI* gespalten, wodurch die Sonde unterschiedlich große Fragmente erkannte, je nachdem ob sie an *Wt*-DNA, neben einem Hygromycin-Resistenzgen oder einem Phleomycin-Resistenzgen band. Für *LmxMPK14* wurde eine Bande von 3240 bp erwartet, für das Hygromycin-Resistenzgen 1313 bp und für das Phleomycin-Resistenzgen 1637 bp. In den Spuren 2 und 3 in Abb. 4.55 sind alle drei Banden nachweisbar. Somit wurde mindestens ein Allel verdoppelt. Es liegt keine Doppeldeletionsmutante vor. In Spur 1 hingegen ist die 3240 bp Bande nicht mehr nachweisbar. Somit ist der Klon $\Delta LmxMPK14-/-$ H1P1 eine echte Nullmutante.

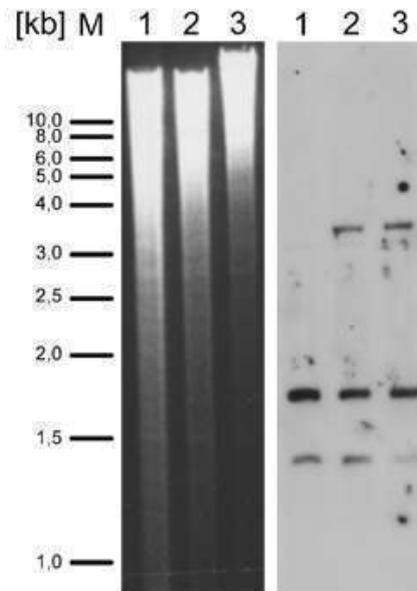


Abb. 4. 55: Southern Blot Analyse der Δ LmxMPK14-Mutanten mit der DS-Sonde

Links: Agarosegel; Rechts: Autoradiogramm nach einer Expositionszeit von 2 h;
1: Δ LmxMPK14^{-/-} H1P1; 2: Δ LmxMPK14^{-/-} H2P1 und 3: Δ LmxMPK14^{-/-} H2P2

4.7.2.5 Messung der Flagellenlänge von Δ LmxMPK14^{-/-} H1P1

Um zu überprüfen, ob LmxMPK14 auch einen Einfluss auf die Regulation der Flagellenlänge hat, wurde die Flagellenlänge der Deletionsmutante Δ LmxMPK14^{-/-} H1P1 im Vergleich zu Wt Promastigoten gemessen. Dazu wurde das Leica Leitz DMRB Mikroskop und die Openlab Software benutzt. Es wurde jeweils die Flagellenlänge von ca. 200 Zellen bestimmt.

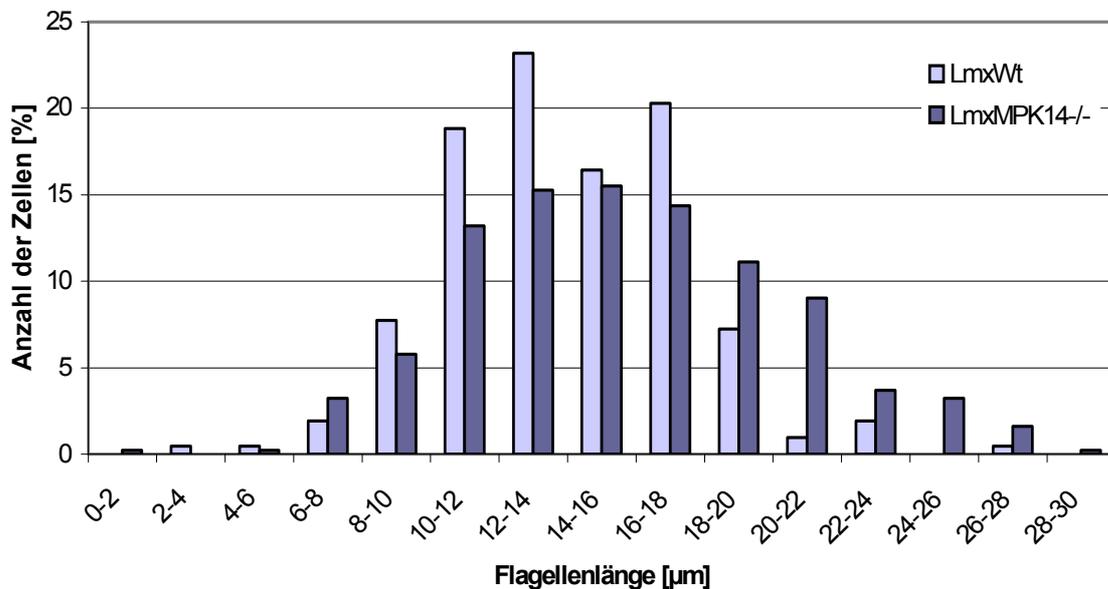


Diagramm 3. 7: Flagellenlängenverteilung von Δ LmxMPK14^{-/-} H1P1 und LmxWt

Für Wt Promastigote wurde eine durchschnittliche Flagellenlänge von 13,9 μ m bestimmt. Δ LmxMPK14^{-/-} H1P1 Promastigote hatten im Durchschnitt ein 1,8 μ m längeres Flagellum mit 15,7 μ m Gesamtlänge. Das bedeutet, dass LmxMPK14 ebenfalls einen leichten Effekt auf

die Länge des Flagellums hat. Das Fehlen von LmxMPK14 führt zu geringfügig längeren Flagellen. Dieser Unterschied fällt allerdings noch geringer aus als bei den *LmxMPK13*-Deletionsmutanten.

4.7.3 Klonierung von *LmxMPK14* in verschiedene Expressionsplasmide und anschließende Kinase Aktivitätstests

4.7.3.1 Klonierung und Testexpression

Für die Klonierung von *LmxMPK14* in verschiedene Expressionsvektoren mussten das Gen flankierende Restriktionsschnittstellen eingefügt werden. Dies wurde mit Hilfe einer PCR mit den Oligonukleotiden LmxMPK14exp.for und LmxMPK14exp.rev bewerkstelligt. Als Ausgangs-DNA diente das pBSK(II)-Plasmid, welches das Phageninsert aus dem gDNA-Bank-Screening trug. Dadurch wurden vor dem Gen eine *EcoRI*-Schnittstelle, eine Schnittstelle für *Bam*HI und eine für *Nco*I eingefügt. Nach dem Stop-Codon von *LmxMPK14* wurden eine *EcoRV*- und eine *Xho*I-Restriktionsschnittstelle eingefügt.

Mit Hilfe der *Nco*I- und *Xho*I-Schnittstellen konnte *LmxMPK14* in den pGEX-KG-Vektor eingefügt werden. Ein *Bam*HI-*Xho*I-Fragment wurde sowohl in den pQE-30-Vektor als auch in das pASK-IBA7-Plasmid ligiert. In den pJCduet-Vektor konnte das Gen über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *EcoRV* überführt werden.

Um zu überprüfen, welches Expressionskonstrukt die höchsten Proteinausbeuten bringt, wurden Testexpressionen mit ansteigenden IPTG-Konzentrationen durchgeführt. Beispielhaft sind in Abb. 4.56 die Testexpressionen vom pGEX-KG-LmxMPK14 und pJCduet-LmxMPK14-Plasmids dargestellt.

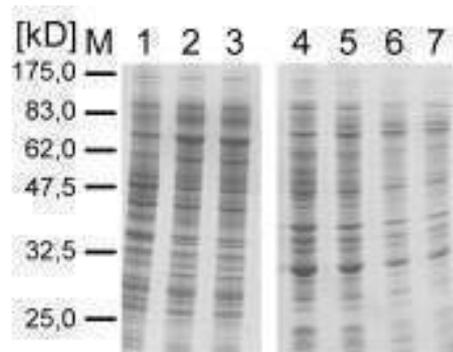


Abb. 4. 56: Testexpression von verschiedenen LmxMPK14-Expressionen

Coomassie gefärbtes SDS-Gel

1-3: pGEX-KG-LmxMPK14; 1; ohne IPTG; 2: 100 µM IPTG; 3: 1 mM IPTG; **4-7:** pJCduet-LmxMPK14; 4: ohne IPTG; 5: 10 µM IPTG; 6: 100µM IPTG; 7: 1 mM IPTG

Selbst mit zunehmenden IPTG-Konzentrationen konnte bei keinem der unterschiedlichen Expressionskonstrukte eine Bande detektiert werden, die der vorhergesagten Proteingröße von 68 kD entspricht, und nur bei IPTG-Zugabe auftaucht.

4.7.3.2 Rekombinante Expression von His-LmxMPK14 mit anschließender Proteinaufreinigung

Obwohl das Ergebnis der Testexpression nicht sehr vielversprechend war, wurde eine Proteinexpression im 500 ml Maßstab durchgeführt. Dazu wurde das pJCduet-LmxMPK14-Plasmid in pAPlac-Zellen transformiert. Die rekombinante Expression und die Proteinaufreinigung über eine Co^{2+} -Sephrose wurden wie unter 3.3.2 beschrieben durchgeführt.

Wie in Abb. 4.57 erkennbar, funktionierte die Proteinaufreinigung nicht so gut, wie bei anderen Proteinkinasen. Bei dem erwarteten Molekulargewicht von 68 kD war eine Bande sichtbar, allerdings zusätzlich auch etwas größere und kleinere ähnlich starke Banden. Außerdem tauchten sehr viele deutlich kleinere Banden auf.



Abb. 4. 57: Proteinaufreinigung von His-LmxMPK14

Coomassie gefärbtes SDS-Gel

4.7.3.3 Herstellung einer inaktiven Mutante von LmxMPK14

Das konservierte Lysin an Position 33 sollte zu einem Methionin mutiert werden, um eine inaktive Mutante zu erzeugen. Dazu wurden zwei PCRs mit unterschiedlichen Primerpaaren durchgeführt. Je ein Primer enthielt die mutierte Sequenz mit einer neu generierten *SpeI*-Schnittstelle (MPK14-KM.for bzw. MPK14-KM.rev). Der andere Primer entsprach einem Teil der Sequenz des Ampicillin-Resistenzgens, der eine *Scal*-Schnittstelle enthielt (*Scal*.for bzw. *Scal*.rev). Als Ausgangs-DNA wurde pBSK-LmxMPK14 verwendet. Die beiden entstandenen Amplifikate wurden direkt mit *SpeI* und *Scal* geschnitten und miteinander ligiert. Dadurch entstand pBSK-LmxMPK14KM. Dieses neue Plasmid wurde anschließend mit *PciI* und *HindIII* geschnitten und das die KM-Mutation tragende Fragment in das Plasmid pJCduet-LmxMPK14 eingefügt. Das neu entstandene Konstrukt heißt pJCduet-LmxMPK14-KM.

4.7.3.4 Kinase-Aktivitätstest von His-LmxMPK14 und His-LmxMPK14-KM

Im nachfolgenden Kinase Aktivitätstests konnte gezeigt werden, dass His-LmxMPK14 eine schwache Autophosphorylierung zeigt, aber MBP recht stark phosphoryliert. His-LmxMPK14-KM zeigte im Kinase Test weder Auto- noch MBP-Phosphorylierungsaktivität. Somit handelt es sich dabei um eine „kinase-tote“-Mutante.

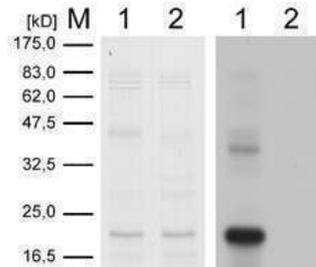


Abb. 4. 58: Kinase Aktivitätstest von His-LmxMPK14 und His-LmxMPK14-KM

Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm nach 1 d Expositionszeit
1: His-LmxMPK14; 2: His-LmxMPK14-KM

4.7.3.5 Optimierung der Bedingungen des Kinase Aktivitätstest für LmxMPK14

Für eine bessere Charakterisierung von LmxMPK14 wurden die Bedingungen des Kinase Aktivitätstest optimiert. Bei LmxMPK14 konnte kein Aktivitätsunterschied zwischen 27°C und 34°C festgestellt werden (Abb. 4.59 A). In beiden Ansätzen ist eine MBP-Phosphorylierung sichtbar, aber nur eine schwache Autophosphorylierung bei der erwarteten Größe von 68 kD. Zusätzlich sind mehrere kleinere phosphorylierte Proteinbanden im Autoradiogramm sichtbar. LmxMPK14 zeigte nur eine sehr geringe Abhängigkeit vom pH-Wert. In Abb. 4.59 B sieht man in allen Ansätzen eine gute MBP-Phosphorylierung. Die Autophosphorylierung ist sehr schwach, dafür sind wieder bei niedrigeren Molekulargewichten phosphorylierte Banden sichtbar. In Abb. 4.59 C ist erkennbar, dass LmxMPK14 die Anwesenheit divalenter Kationen benötigt, da sie sonst keine Aktivität zeigt (Spur 10). Bei hohen Ionenkonzentrationen von 10 mM Mn^{2+} oder 50 mM Mg^{2+} nimmt die Aktivität der Kinase ebenfalls wieder ab (Spuren 13 und 16) während sie bei mittleren Ionenkonzentrationen, unabhängig davon ob Mn^{2+} oder Mg^{2+} zur Verfügung stehen, sehr gut funktioniert.

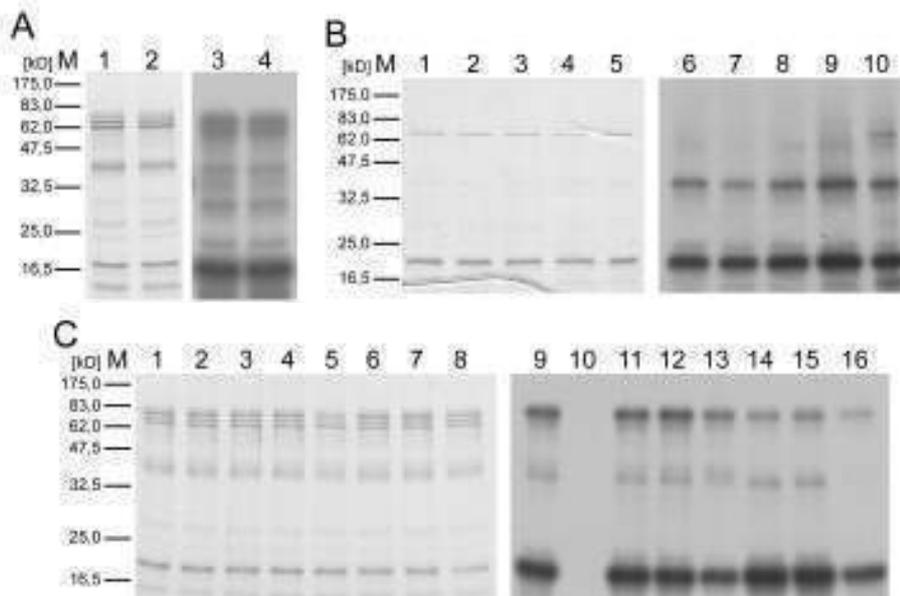


Abb. 4. 59: Kinase Aktivitätstest von His-LmxMPK14 unter verschiedenen Bedingungen

A: Temperatur – 1/3: 27°C; 2/4: 34°C; **B: pH-Wert** – 1/6: pH 6,5; 2/7: pH 7,0; 2/8: pH 7,2; 4/9: pH 7,5; 5/10: pH 8,0; **C: divalente Kationen** – 1/9: 2 mM Mn^{2+} + 10 mM Mg^{2+} ; 2/10: ohne divalente Kationen; 3/11: 5 mM Mg^{2+} ; 4/12: 10 mM Mg^{2+} ; 5/13: 50 mM Mg^{2+} ; 6/14: 1 mM Mn^{2+} ; 7/15: 2 mM Mn^{2+} und 8/16: 10 mM Mn^{2+}

4.7.4 Kinase Aktivitätstests von LmxMPK14 zusammen mit LmxPK4

In vorangegangenen Versuchen konnte beobachtet werden, dass LmxPK4 LmxMPK9 und LmxMPK13 phosphorylieren kann (Abb. 4.19 und 4.37). Die Aminosäuresequenz von LmxMPK14 ist zu 49 % identisch und zu 68 % ähnlich zu der Sequenz von LmxMPK9. Möglicherweise ist LmxMPK14 das tatsächliche Substrat von LmxPK4 und LmxMK9 wurde nur aus dem Grund phosphoryliert, da es dem wirklichen Substrat sehr ähnlich ist. Um diese Theorie zu überprüfen, sollten kombinierte Kinase Aktivitätstests von LmxMPK14 zusammen mit LmxPK4 durchgeführt werden.

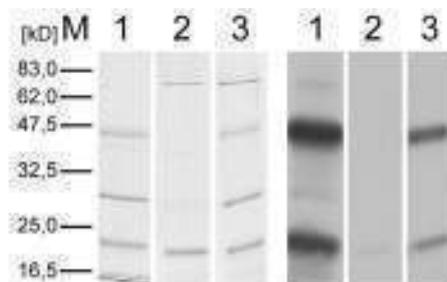


Abb. 4. 60: Kombiniertes Kinase Aktivitätstest von His-LmxMPK14 mit LmxPK4

Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm nach 1 d Expositionszeit
1: LmxPK4; 2: His-LmxMPK14; 3: His-LmxMPK14 zusammen mit LmxPK4

Dazu wurden His-LmxMPK14 über pJCduet-LmxMPK14-Plasmid und GST-LmxPK4 über pGEX-KG-LmxPK4 exprimiert und aufgereinigt. Um LmxPK4 im SDS-Gel noch besser von LmxMPK14 zu unterscheiden, wurde durch einen Thrombinverdau die GST abgespalten. In

dem Kinase Test wurden jeweils 2 µg rekombinantes Protein eingesetzt und diese in Anwesenheit von [γ ³²P]-ATP bei 30°C inkubiert.

In Abb. 4.60 ist in Spur 1 eine starke Aktivität von LmxPK4 zu sehen. Das Protein zeigt sowohl Auto- als auch MBP-Phosphorylierung. In Spur 2 wurde LmxMPK14 allein inkubiert. Es ist keine Autophosphorylierung detektierbar. Im Vergleich zu LmxPK4 (Spur 1) wird MBP nur sehr schwach phosphoryliert. Erstaunlicherweise ist in dem kombinierten Ansatz (Spur 3) eine schwächere MBP-Phosphorylierung detektierbar als in dem Einzelansatz von LmxPK4. Auch die Autophosphorylierung von LmxPK4 fällt deutlich schwächer aus, obwohl im Coomassie-gefärbten SDS-Gel erkennbar ist, dass in beiden Proben gleich viel Protein eingesetzt wurde (Spur 1 und 3). Eine Phosphorylierung oder gar Aktivierung von LmxMPK14 durch LmxPK4 kann nicht beobachtet werden.

4.7.5 Coexpression von His-LmxMPK14 zusammen mit LmxPK4

Obwohl im kombinierten Kinase Aktivitätstest von LmxMPK14 und LmxPK4 keine Phosphorylierung oder Aktivitätssteigerung einer der beiden Kinasen beobachtet werden konnte, sollte ein Coexpressionskonstrukt hergestellt werden. Möglicherweise ist die Anwesenheit von LmxPK4 schon für eine korrekte Faltung von LmxMPK14 notwendig, so dass diese erst dann ihre volle Aktivität zeigt.

4.7.5.1 Klonierung von pJCduet-LmxMPK14-LmxPK4

Um LmxMPK14 zusammen mit LmxPK4 in den pJCduet-Vektor zu integrieren, wurden die Plasmide pJCduet-LmxMPK14 und pJCduet-LmxMPK13-LmxPK4 mit der Restriktionsendonuklease *Bgl*II gespalten und das *LmxMPK14*-Fragment in den *LmxPK4*-tragenden pJCduet-Vektor eingefügt. Das neu entstandene Coexpressionskonstrukt heißt pJCduet-LmxMPK14-LmxPK4.

4.7.5.2 Rekombinante Coexpression von LmxMPK14 mit anschließendem Kinase Test

Für die Coexpression von LmxMPK14 mit LmxPK4 wurde das Plasmid pJCduet-LmxMPK14-LmxPK4 in *E. coli* Zellen des pAPlac-Stammes transformiert. Die rekombinante Expression erfolgte in 500 mL LB-Medium. Es wurde ein Immunoblot durchgeführt, um zu überprüfen, ob LmxPK4 ebenfalls exprimiert wird und wenn ja, ob sie auch im Eluat der LmxMPK14-Aufreinigung als Kontamination vorliegt. Dazu wurde *E. coli*-Lysat und Eluat 1 der Proteinaufreinigung auf einem 12%-igen SDS-Gel aufgetragen, geblottet und LmxPK4 mit einem Antikörper detektiert, der ein C-terminales Peptid erkennt.

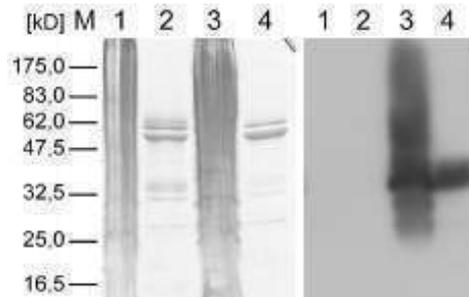


Abb. 4. 61: Immunoblot der Coexpression von LmxMPK14 mit LmxPK4 mit einem Antikörper, der ein C-terminales Peptid von LmxPK4 erkennt (1:500)

Links: Silber gefärbtes SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm nach 2 sec Exposition

1: Lysat der Expression von His-LmxMPK14; 2: Eluat von His-LmxMPK14; 3: Lysat der Coexpression von His-LmxMPK14 mit LmxPK4; 4: Eluat der Coexpression

In Abb. 4.61 ist deutlich erkennbar, dass im Lysat der Coexpression (Spur 3) LmxPK4 in großen Mengen vorhanden ist. Die Reaktion des Antikörpers ist spezifisch, da in Spur 1, die dem Lysat der LmxMPK14-Aufreinigung allein entspricht, kein Signal detektiert wurde. Im Eluat der LmxMPK14-Aufreinigung, die allein exprimiert wurde, war erwartungsgemäß keine LmxPK4 detektierbar. In dem Eluat der Coexpression konnte LmxPK4 hingegen nachgewiesen werden. Somit ist die Kinase Kinase als Kontamination im Eluat der LmxMPK14-Aufreinigung enthalten. Ob dies den Aktivitätstest von LmxMPK14 stört, musste anschließend überprüft werden.

Für den Kinase Test wurden jeweils 2 µg rekombinantes Protein eingesetzt und in Anwesenheit von [γ ³²P]-ATP bei 30°C eine 1h inkubiert. Die MBP-Phosphorylierung in beiden Ansätzen ist in etwa gleich stark. Die Autophosphorylierung von His-LmxMPK14 ist in dem Ansatz mit dem coexprimierten Protein etwas stärker. Allerdings ist auch diese nur als sehr schwach einzustufen, da es sich bei dem abgebildeten Autoradiogramm um eine sehr lange Exposition handelt. Bei ca. 35 kD ist eine schwache Färbung des Röntgenfilms zu sehen. Möglicherweise handelt es sich dabei um Abbauprodukte von LmxMPK14.

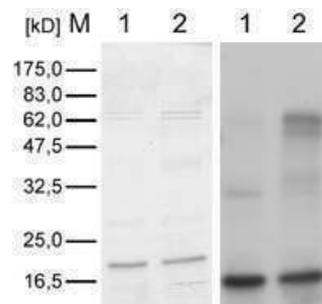


Abb. 4. 62: Kinase Aktivitätstest der mit LmxPK4 coexprimierten His-LmxMPK14

Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm nach 1 d Expositionszeit
1: His-LmxMPK14; 2: His-LmxMPK14 coexprimiert zusammen mit LmxPK4

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass auch mit dem Coexpressionssystem keine Aktivierung von LmxMPK14 durch LmxPK4 erreicht werden konnte.

4.7.6 Kinase Tests von His-LmxMPK14 und His-LmxMPK14-KM zusammen mit LmxCRK3

His- und His-LmxMPK14-KM wurden zusammen mit LmxCRK3 in radioaktiven Kinase Tests inkubiert. LmxCRK3 zeigte trotz geringer Proteinmengen eine sehr starke MBP-Phosphorylierung (Abb. 4.63 Spur 3 und 8). In Kombination mit His-LmxMPK14 und His-LmxMPK14-KM konnte eine verstärkte Phosphorylierung dieser beiden Proteine beobachtet werden. MBP wurde allerdings nicht vermehrt sondern eher schwächer phosphoryliert (Vergleiche Spuren 1 und 2 mit den Spuren 4 und 5).

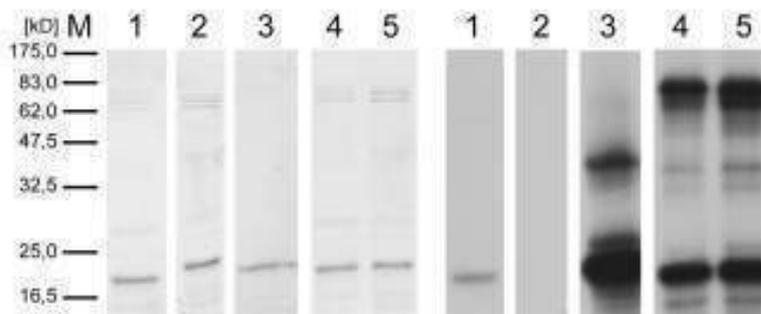


Abb. 4. 63: Kombiniertes Kinase Aktivitätstest von LmxMPK14 zusammen mit LmxCRK3

Links: Coomassie gefärbtes SDS-Gel; Rechts: Autoradiogramm nach 1 d Expositionszeit

1: His-LmxMPK14; 2: His-LmxMPK14-KM; 3: LmxCRK3; 4: LmxCRK3 zusammen mit His-LmxMPK14; 5: LmxCRK3 zusammen mit His-LmxMPK14-KM

Dies könnte bedeuten, dass LmxCRK3 LmxMPK14 als Substrat dem MBP vorzieht. Eine Aktivierung von LmxMPK14 konnte jedoch nicht beobachtet werden.

5. Diskussion

5.1 *LmxMKK*

5.1.1 Analyse des *LmxMKK*-Expressionsniveaus durch Differenzierungsanalysen

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass *LmxMKK* ausschließlich in Promastigoten exprimiert wird (Wiese et al., 2003). Diese stadienspezifische Expression spiegelt sich auch in einem starken Abfall der mRNA-Menge in Amastigoten wider (Duncan et al., 2001). Die Flagellen der *LmxMKK*-Nullmutante waren nur ungefähr 1/5 so lang wie die des Wildtyp (Wt). Daher muss angenommen werden, dass *LmxMKK* an der Regulation der Flagellenlänge beteiligt ist. Um den Zusammenhang zwischen dem Protein und der Flagellenlänge genauer zu untersuchen, wurden Differenzierungsstudien durchgeführt. Bei der Differenzierung von Amastigoten zu Promastigoten wurde festgestellt, dass *LmxMKK* bereits nach 10 h exprimiert wird, die Flagellen allerdings erst nach 16 h lichtmikroskopisch detektierbar waren. Wurden Promastigote zu Amastigoten differenziert, konnte *LmxMKK* sogar noch nach 72 h durch eine Immunoblotanalyse nachgewiesen werden. Die Flagellen wurden aber schon innerhalb der ersten 24 h eingeschmolzen. Da die Proteinmenge von *LmxMKK* nicht direkt mit der Flagellenlänge korreliert, kann festgehalten werden, dass andere Regulationsmechanismen existieren müssen. Der Phosphorylierungszustand und die Aktivität von *LmxMKK* während der Differenzierung sind zwar noch unbekannt, es könnten aber Phosphorylierungsmechanismen an der Regulation beteiligt sein. Wie diese Einfluss auf die Flagellenlänge nehmen, ist allerdings noch nicht bekannt.

Zum einen könnte *LmxMKK* direkt die Expression verschiedener Gene regulieren, die für flagellare Proteine kodieren. Ebenso könnte die mRNA-Stabilität solcher flagellaren Bestandteile beeinflusst werden, wodurch es bei fehlender Aktivität von *LmxMKK* zu einem Abbau dieser Bestandteile kommt. Oder aber *LmxMKK* reguliert die Flagellenlänge auf der Proteinebene. Dabei besteht bei einem Abfall der Aktivität von *LmxMKK* die Möglichkeit, dass flagellare Proteine abgebaut werden oder der Intraflagellare Transport (IFT) so verändert wird, dass das Flagellum nicht in der vollen Länge ausgebildet werden kann.

5.1.2 Identifikation von Interaktionspartnern von *LmxMKK*

Potentielle Aktivatoren von *LmxMKK*

Mögliche Aktivatoren von *LmxMKK* sind bisher noch nicht bekannt. Säuger-MKKs werden an dem Motiv [ST]XXX[ST] von einer MAPKKK phosphoryliert, wobei eine einzelne Phosphorylierung an einer der beiden Phosphorylierungsstellen schon zu einer partiellen Aktivierung führen kann (Alessi, et al., 1994; Zheng und Guan, 1993). Pflanzen-MKKs hingegen werden an der Sequenz [ST]XXXXX[ST] von ihrem Aktivator phosphoryliert. Im Gegensatz zu den MKKs aus Säugern phosphorylieren diese auch das artifizielle Substrat MBP (Hardin und Wolniak, 1998; Calderini et al., 2001). *LmxMKK* zeigt im Bereich ihrer

Aktivierungsschleife die Sequenz $^{212}\text{TLAVSST}^{218}$. Somit könnte sie sowohl an den Aminosäureresten S212 und S216 oder aber an den Resten S212 und T218 aktiviert werden. Die meisten MKKs in *Leishmania mexicana* haben fünf Aminosäurereste zwischen den beiden Phosphorylierungsstellen. Für LmxPK4 und LmxPK5 konnte auch schon gezeigt werden, dass sie sehr gut MBP phosphorylieren (Kuhn et al., 2004; Melzer, 2007). LmxMKK hingegen phosphoryliert selbst in der konstitutiv aktiven Form MBP schlechter als sie sich autophosphoryliert. Um herauszufinden, an welchen Resten LmxMKK von ihrem Aktivator phosphoryliert wird, kann versucht werden, aktive LmxMKK aus Leishmanien zu immunpräzipitieren und anschließend die Phosphorylierungsstellen durch eine MS/MS-Analyse zu identifizieren.

Da LmxMKK ein MAPKK Homolog ist, kommen natürlich MAPKKK Homologe als Aktivator in Frage. In *L. major* wurde bereits 2005 MRK1 untersucht, die sich als essentiell für den Parasiten herausstellte (Agron et al., 2005). In einer Genomanalyse wurden insgesamt sogar 23 potentielle MAPKKK Homologe vorhergesagt (Parsons et al., 2005). Aber auch andere Proteine kommen als Aktivator für LmxMKK in Frage. So phosphoryliert die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) ihre Substrate an der Sequenz [ST]XXX[pSpT] (Fiol et al., 1987). Die dementsprechende Sequenz $^{212}\text{TLAVS}^{216}$ entspricht dem Aktivierungsmotiv von LmxMKK. Eine Phosphorylierung in diesem Bereich könnte also durchaus zu einer Aktivierung von LmxMKK führen. Ob eine Phosphorylierung an Position S216 durch eine andere Kinase oder durch Autophosphorylierung stattfindet ist bisher noch nicht bekannt. Das Herunterregulieren von *GSK3 β* durch RNAi in *Chlamydomonas reinhardtii* führte allerdings zu einer deutlichen Verkürzung der Flagellen (Wilson und Lefebvre, 2004), was dem Phänotyp von LmxMKK in *L. mexicana* entspricht.

Um den Aktivator von LmxMKK zu identifizieren, besteht die Möglichkeit, potentielle Aktivatoren *in vitro* zu testen. Dazu müssten die rekombinanten Proteine mit LmxMKK-KM und LmxMKK-Wt in einen Kinase Aktivitätstest eingesetzt werden. Wenn LmxMKK-KM phosphoryliert und LmxMKK-Wt zusätzlich auch aktiviert wird, sollte dies anschließend *in vivo* in den Parasiten untersucht werden. Eine Deletionsmutante des entsprechenden Gens könnte benutzt werden, um zu untersuchen, ob LmxMKK in dieser phosphoryliert wird. Es kann allerdings auch versucht werden den Aktivator von LmxMKK direkt in Leishmanien Lysaten zu identifizieren. Durch eine mehrfache Fraktionierung der Lysate, z.B. durch Ionenaustauscherchromatographie, kann das phosphorylierende Protein immer weiter eingegrenzt und anschließend durch MALDI-TOF identifiziert werden. Für ERK2 konnte auf diese Art und Weise der Aktivator identifiziert werden (Nakielny et al., 1992).

Identifikation möglicher Gerüstproteine

Die gängige Theorie über den Ablauf der Aktivierung einer MAP Kinase Kaskade geht davon aus, dass sich die Interaktion auf jeweils zwei Moleküle beschränkt, wobei eines das andere phosphoryliert. Alternativ ist es jedoch auch möglich, dass die Kaskade räumlich und zeitlich durch ein Gerüstprotein koordiniert wird, welches mit allen drei Kinasen interagiert. Mithilfe künstlicher Gerüstproteine konnte gezeigt werden, dass diese eine Signalweiterleitung durch ein MAP Kinase-Modul ermöglichen (Harris et al., 2001; Park et al., 2003). Für *S. cerevisiae* konnte z.B. gezeigt werden, dass das Gerüstprotein Ste5 essentiell für die Funktionalität des Moduls ist, welches für die sexuelle Reproduktion verantwortlich ist (Bardwell et al., 2001). In höheren Eukaryoten ist KSR für die korrekte Weiterleitung und Regulation der ERK-MAPK-Kaskaden verantwortlich (Morrison und Davis, 2003). KSR besitzt eine Domäne, die mit wenigen Unterschieden einer Kinase-Domäne entspricht. Diese ist allerdings nicht aktiv, da der hochkonservierte Lysinrest in Subdomäne II fehlt (Müller et al., 2000; Ohmachi et al., 2002).

Solche Gerüstproteine lassen sich wahrscheinlich am einfachsten durch eine Immunpräzipitation identifizieren. Falls es solche Proteine auch in Leishmanien gibt, sollte nach diesen auch gesucht werden, da mit ihnen möglicherweise über eine weitere Präzipitation weitere Komponenten einer MAP Kinase Kaskade identifiziert werden können. Womöglich können manche Interaktionen sogar nur in Anwesenheit der Gerüstproteine nachgewiesen werden.

Identifikation von Substraten von LmxMCK

Da die Deletionsmutante von *LmxMPK3* einen ähnlichen Phänotyp zeigte wie die Nullmutante von *LmxMCK*, schien es naheliegend, dass diese beiden Kinasen miteinander interagieren. *In vivo* konnte eine Phosphorylierung von *LmxMPK3* durch *LmxMCK* nachgewiesen werden und *in vitro* sogar eine Aktivierung. Dabei handelt es sich um die erste nachgewiesene Interaktion zwischen einem MAPKK Homolog und einem MAPK Homolog in *L. mexicana*. Dadurch wird auch die Existenz der gesamten MAP Kinase Kaskade in Leishmanien wahrscheinlicher. Bis heute sind die möglichen Aktivatoren und Effektoren dieser Kaskaden in Leishmanien völlig unbekannt. Somit war bisher auch nicht klar, inwieweit die homologen Proteine funktionell sind. Mit der Möglichkeit *LmxMPK3* zu aktivieren, rückt nun auch die Identifizierung eines Substrats einer MAP Kinase in *L. mexicana* deutlich näher. Diese Substrate könnten entweder in die Regulation der Genexpression von Komponenten, die an der Verlängerung des Flagellums beteiligt sind, eingreifen oder direkt mit Komponenten des IFT interagieren.

Es gibt allerdings Indizien dafür, dass *LmxMCK* außer *LmxMPK3* weitere Substrate phosphoryliert. Die Phänotypen der beiden Nullmutanten sind sich zwar sehr ähnlich, jedoch

nicht identisch. So besitzen 11 % der Zellen der Deletionsmutante von *LmxMCK* kein zentrales Mikrotubulipaar im Axonem des Flagellums. Außerdem ist in vielen Flagellen kein PFR ausgebildet (Wiese et al., 2003). Die Nullmutante von *LmxMPK3* hingegen hat immer das zentrale Mikrotubulipaar ausgebildet und nur sehr wenige Flagellen zeigen gar kein PFR. Die meisten zeigen allerdings Defekte in der Struktur des PFR. So hat es den Anschein, dass die PFR-Bestandteile zwar exprimiert und in das Flagellum transportiert werden, sie dort aber nicht korrekt zusammengesetzt werden (Erdmann et al., 2006). Zusammenfassend erweckt dies den Eindruck, dass *LmxMCK* eine zentrale Schaltstelle bei der Regulation der Flagellenmorphogenese ist und zusätzlich zu *LmxMPK3* weitere Substrate besitzt. Diese könnten für die Expression von PFR-Proteinen verantwortlich sein. Im Allgemeinen besitzen MAPKKs eine sehr hohe Substratspezifität (Chang und Karin, 2001). Aber schon für Ste7 in Hefe konnte gezeigt werden, dass sie Kss1 und Fus3 phosphoryliert. MKK7 phosphoryliert verschiedene Isoformen von SAPK1/JNK1 und p38 (Fleming et al., 2000) und MEK1 phosphoryliert ERK1, ERK2 und eine potentiell Golgi-assoziierte ERK (Acharya et al., 1998). In *L. mexicana* konnte in der 3'-UTR aller PFR-Gene ein regulatorisches Motiv identifiziert werden, das für eine Senkung der mRNA-Menge in Amastigoten auf 1/10 des Promastigotenstadiums verantwortlich ist (Mishra et al., 2003). Dieses Motiv konnte weder in der 3'-UTR von *LmxMCK* noch in der von *LmxMPK3* gefunden werden. Eine Hypothese ist, dass *LmxMCK* eine MAPK phosphorylieren könnte, die wiederum ein RNA-Bindeprotein phosphoryliert, welches dann die mRNA von PFR stabilisiert. Dies könnte dann zur Expression der PFR-Proteine führen. *LmxMPK3* hingegen könnte an der Regulation des IFT beteiligt sein, wobei möglicherweise die Verlängerung des Flagellums und die korrekte Zusammensetzung des PFRs unterstützt werden. Dessen Aufbau ist in der Nullmutante von *LmxMPK3* so stark gestört, dass die typische gekreuzte Struktur nicht vorhanden ist (Erdmann et al., 2006). Bisher wurde noch nicht untersucht, ob die Aktivität von Kinesin II durch Phosphorylierungen reguliert wird. In den beiden Motordomänen konnten allerdings MAP Kinase Phosphorylierungsstellen identifiziert werden (Wiese et al., bisher nicht veröffentlicht).

Möglichkeiten weitere Substrate zu identifizieren

Eine altbewährte Methode zur Identifikation von Kinase-Substraten ist das genetische Screening. Dabei werden Mutanten gesucht, die den gleichen Phänotyp aufweisen. So konnte z.B. ein kompletter Signalweg in *S. cerevisiae* aufgeklärt werden, der von einem Pheromonsignal an der Zelloberfläche bis zu dem Transkriptionsfaktor Ste12p geht (Sprague, 1991). Bisher sind keine weiteren MAP Kinasen in *L. mexicana* bekannt, die bei der Verlängerung der Flagellen eine Rolle spielen. Daher gibt es auch noch keine Indizien dafür, welches Protein ein zusätzliches Substrat von *LmxMCK* ist.

Um Substrate von MAPKKs zu identifizieren, gibt es mehrere Möglichkeiten. Eine weitere klassische Methode ist das *Yeast two-hybrid screening* (Yang et al., 1992). Diese ist jedoch nicht sehr zuverlässig, da es oft zu falsch-positiven Ergebnissen kommt (Manning und Cantley, 2002). Ähnliche Probleme gibt es auch für andere *in vivo*-Methoden, wie die Kinase mit ihrem Substrat als Komplex zu co-immunpräzipitieren oder aufzureinigen (Rigaut et al., 1999).

Desweiteren kann eine *L. mexicana* cDNA-Expressionsbank in einem radioaktiven Kinasetest durchsucht werden (Fukanaga und Hunter, 1997). Diese Methode wurde zwar bereits ohne Erfolg angewendet (Scholz, 2003), es bestanden jedoch Zweifel an der Qualität der vorhandenen cDNA-Bank. Somit könnte diese Herangehensweise mit einer neuen Bank durchaus wiederholt werden.

Es kann außerdem versucht werden mit einer rekombinanten inaktiven Mutante von LmxMKK, die an einer Matrix gebunden ist, Interaktionspartner aus einem Leishmanienlysat zu binden. Oder aber man inkubiert konstitutiv aktive LmxMKK in einem radioaktiven Kinase Test zusammen mit Lysaten aus Promastigoten. Da LmxMKK nur in Promastigoten exprimiert wird, macht es keinen Sinn mit Lysaten aus Amastigoten zu arbeiten. Wichtig dabei ist es bei den optimalen Bedingungen für die Kinase zu arbeiten und das zelluläre ATP aus dem Lysat zu entfernen, um ein möglichst starkes Signal mit wenig Hintergrund detektieren zu können (Knebel et al., 2001). Wenn in solchen Lysaten Proteine phosphoryliert werden und als zusätzliche Banden auf dem Röntgenfilm detektiert werden könnten, würden in einem nächsten Schritt die Lysate für den Kinase Test soweit per Ionenaustauscherchromatographie fraktioniert werden, bis in dem SDS-Polyacrylamidgel eine einzelne Bande der Schwärzung auf dem Röntgenfilm zugeordnet werden kann. Diese kann anschließend durch Maldi-TOF identifiziert werden. Wichtig dabei ist es allerdings mit einer aktivierten Kinase zu arbeiten (Cohen und Knebel, 2006). Möglicherweise ist die konstitutiv aktive LmxMKK-D dafür nicht ausreichend und es wird stattdessen der Aktivator von LmxMKK benötigt.

Eine weitere Methode um Substrate von Kinasen zu identifizieren stellt die Verwendung veränderter, radioaktiver ATP-Analoga sowie einer entsprechend mutierten Kinase dar (Shah et al., 1997; Habelhah et al., 2001; Eblen et al., 2003). Die Kinase wird dabei so mutiert, dass sie ein entsprechend verändertes ATP-Analogon zur Substratphosphorylierung verwenden kann. Dieses kann von der Wt-Kinase jedoch nicht umgesetzt werden.

5.1.3 „Feedback“-Phosphorylierung

Zusätzlich zur Phosphorylierung von LmxMPK3 durch LmxMKK-D konnte in dem kombinierten Kinase Aktivitätstest beobachtet werden, dass LmxMPK3 ebenfalls LmxMKK phosphoryliert (Abb. 4.2). Dies konnte durch weitere *in vitro* Versuche mit inaktiver LmxMKK-KM-D verifiziert werden (Abb.4.4). Was für einen Effekt diese „Feedback“-

Phosphorylierung auf LmxMCK hat und ob diese auch *in vivo* in den Leishmanien auftritt, ist bisher noch nicht bekannt. Falls dieser Mechanismus dort auftritt, könnte er zu einer Erhöhung oder Verringerung der Kinaseaktivität führen oder eine Degradation zur Folge haben. Ein Beispiel für die verschiedenen Rollen, die eine Phosphorylierung spielen kann, ist die eukaryotische cdc2-Kinase und die sie regulierenden Moleküle. So wird cdc2 während der Interphase durch Phosphorylierungen von Wee1 und Myt1 inaktiviert. Zu Beginn der Mitose wird cdc2 durch die Cdc25-Phosphatase dephosphoryliert, die wiederum von cdc2 phosphoryliert wird, um die Phosphataseaktivität zu steigern. Aktive cdc2 phosphoryliert auch ihre Inhibitor kinase Wee1, wodurch diese für eine Degradation durch die E3 Ubiquitin-Ligase markiert wird. Dadurch wird die Inaktivierung von cdc2 verhindert (Watanabe et al., 2004). Auch für die MAP Kinase Kinase MEK1 konnte eine „Feedback“-Phosphorylierung durch ERK nachgewiesen werden. Mansour et al. nahmen 1994 an, dass dies keinen Einfluss auf die Aktivität von MEK hat (Mansour et al., 1994). Doch es wird dadurch eine weitere Phosphorylierung durch PAK (Rac-p21-aktivierte Kinase) verhindert, was die Bildung des MEK1-ERK-Komplexes unterstützt (Eblen et al., 2004).

Um die potentielle Phosphorylierungsstelle von LmxMPK3 an LmxMCK zu identifizieren, wurde deren Sequenz genauer untersucht. Da davon ausgegangen wird, dass MAP Kinasen ihre Substrate an einem Serin- oder Threoninrest phosphorylieren, der von einem Prolinrest gefolgt wird, wurden solche Motive in der Sequenz von LmxMCK gesucht. Es wurde je ein solches Motiv entdeckt und die potentiellen Phosphorylierungsstellen zu Alanin mutiert. Alle neu generierten Mutanten wurden noch immer von LmxMPK3 phosphoryliert, wodurch die untersuchten Aminosäurereste als Phosphorylierungsstellen ausgeschlossen werden können. Dies gilt auch für alle möglichen Phosphorylierungsstellen innerhalb der Aktivierungsschleife von LmxMCK, da stets mit Mutanten gearbeitet wurde, die zusätzlich die D-Mutation trugen, bei der alle Phosphorylierungsstellen innerhalb der Aktivierungsschleife durch Aspartatreste ausgetauscht worden waren. Durch die Mutation von S117 zu Alanin wurde eine Mutante generiert die über keine Aktivität verfügt. Wurde die SA-Mutation mit der D-Mutation kombiniert, war eine leichte Autophosphorylierung detektierbar, die aber maximal das Niveau von LmxMCK-Wt erreichte. Daher besteht die Vermutung, dass es sich bei S117 um eine interne Autophosphorylierungsstelle von LmxMCK handelt. Erst wenn dort eine Phosphorylierung vorliegt, ist LmxMCK möglicherweise in der Lage MBP zu phosphorylieren. Um diese Hypothese zu untermauern, wurde eine weitere Mutante generiert, bei der S117 zu einem Aspartat mutiert wurde. Durch diese SD-Mutation sollte eine Phosphorylierung an S117 vorgetäuscht werden, ähnlich wie es bei der D-Mutante in der Phosphorylierungsschleife der Fall ist. Im Kinase Aktivitätstest zeigte diese nun aber genauso wenig Aktivität wie die SA-Mutante. Der einzige Unterschied, der bei diesen beiden Mutanten beobachtet werden konnte, ist, dass LmxMCK-SD im SDS-Polyacrylamid-Gel etwas höher läuft. Dieser

„shift“ ist mit bloßem Auge sichtbar und kann daher nicht nur von dem Größenunterschied des Aspartatrests im Vergleich zum Alaninrest stammen. Solche Größenunterschiede können durch Phosphorylierungen hervorgerufen werden. Phosphorylierungen an Serin-, Threonin-, oder Tyrosinresten führen zu einer Größenänderung von ca. 80 Dalton (Erickson et al., 1990). Dies ist aber unwahrscheinlich, da auch bei dieser Mutante die potentielle Phosphorylierungsstelle S117 nicht mehr intakt ist und wie bei der SA-Mutante keine Aktivität mehr nachweisbar war. Eine Kombination der SD- mit der D-Mutante führte im Kinase Aktivitätstest zu einer ähnlich schwachen Autophosphorylierung wie die SA-D-Mutante. Dieses unterschiedliche Laufverhalten könnte auch durch eine Konformationsänderung verursacht werden. Möglicherweise kommt es aufgrund des Aminosäureaustausches zu einer anderen Faltung und daher läuft das Protein im SDS-Gel anders und zeigt auch keine Aktivität.

Mit Position 117 in der Aminosäuresequenz befindet sich der Serinrest knapp hinter der α_C -Helix. Wenn man sich diesen Bereich im dreidimensionalen Modell von MEK1 anschaut (Ohren et al., 2004), muss man aber feststellen, dass dieser genau auf der entgegengesetzten Seite zur Aktivierungsschleife im Protein liegt. Somit ist es schwer vorstellbar, dass sich LmxMCK an diesem Rest intramolekular autophosphorylieren soll. Aber auch eine intermolekulare Autophosphorylierung ist sehr unwahrscheinlich, da MKKs meist Dimere ausbilden. Für humane MEK1 und MEK2 konnte gezeigt werden, dass sich bei diesen Dimeren zwei Kinasemoleküle so aneinander lagern, dass beide Aktivierungsrippen direkt aneinander liegen (Ohren et al., 2004). Somit würde S117 an der Außenseite eines Dimers liegen und könnte von dem zweiten Molekül des Dimers nicht phosphoryliert werden.

Durch MS/MS sollten die „Feedback“-Phosphorylierungsstellen von LmxMPK3 in LmxMCK relativ einfach zu identifizieren sein. Mit dieser Methode ist eventuell auch die Aminosäure zu finden, an der die Autophosphorylierung stattfindet. Wenn dies geschehen ist, kann untersucht werden, inwieweit diese Phosphorylierung *in vivo* eine Rolle spielt.

5.1.4 Vergleich von LmxMCK mit TbMEKg

In der Arbeitsgruppe von Eric Vassella in Bern wurde das Homolog von *LmxMCK* in *T. brucei* *TbMEKg* untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass es, im Gegensatz zur Nullmutante von *LmxMCK*, durch die Deletion des Gens nicht zu einer Verkürzung des Flagellums kommt. Stattdessen konnte ein Transmissionsstopp im Insektenvektor der Tsetse-Fliege beobachtet werden (Vassella et al., unveröffentlichte Daten). Daher war es interessant zu untersuchen, ob *TbMEKg* nur eine hohe Homologie zu *LmxMCK* zeigt, aber funktionell anders arbeitet, oder ob *TbMEKg* auch in der Lage ist die Funktion von *LmxMCK* in der *LmxMCK*-Nullmutante zu übernehmen. Dazu wurde *TbMEKg* in der *LmxMCK*-Deletionsmutante exprimiert. Tatsächlich konnte beobachtet werden, dass die rekombinanten Klone normal

lange Flagellen ausbildeten, welche die Zellen in die Lage versetzten zu schwimmen. Auch in Infektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass TbMEK_G in der Lage ist das Fehlen von LmxM_{KK} zu kompensieren. Rekombinante TbMEK_G war in Kinase Aktivitätstests in der Lage LmxM_{PK3} zu phosphorylieren und zu aktivieren. Dabei erstaunte vor allem, dass TbMEK_G-Wt eine deutliche Auto- und MBP-Phosphorylierung zeigte. LmxM_{KK}-Wt ist dazu nicht in der Lage. Erst wenn mehrere Aminosäuren im Bereich der Aktivierungsschleife zu Aspartatresten mutiert wurden, ist LmxM_{KK} aktiv (Wiese et al., 2003).

Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass das Flagellum in *T. brucei* im Gegensatz zu Leishmanien zu keinem Zeitpunkt des Lebenszykluses komplett eingeschmolzen wird. Eine interessante Veröffentlichung von Kohl et al. zeigt sogar, dass bei *T. brucei* die Verlängerung eines neuen Flagellums während der Zellteilung die Ausbildung zytoskelettaler Strukturen kontrolliert (Kohl et al., 2003). So werden durch das Flagellum die Zellgröße, die Form, die Polarität und die Zellteilung von *T. brucei* kontrolliert. Dies geschieht aber nicht nur durch die Länge des Flagellums, sondern vor allem auch durch die Länge der FAZ („flagellar attachment zone“). Dass dies auf Leishmanien nicht so übertragen werden kann, zeigen schon die Deletionsmutanten von *LmxM_{KK}* und *LmxM_{PK3}*. Obwohl diese deutlich verkürzte Flagellen aufweisen, funktioniert die Zytokinese normal. Da bei *T. brucei* auch andere wichtige Prozesse durch die eigentliche Flagellenlänge reguliert werden, kann man sich vorstellen, dass dieser Mechanismus streng reguliert und die Signalkaskade nur schwer komplett zu unterbrechen ist. Andererseits ist es auch vorstellbar, dass die Signalwege auch komplett anders verlaufen, da *T. brucei* das Flagellum zu keinem Zeitpunkt des Lebenszykluses komplett einschmelzen muss.

In *Chlamydomonas* konnte außerdem gezeigt werden, dass der Signalweg zum Einschmelzen des Flagellums und derjenige zum ständigen Abbau des Flagellums, um die Flagellenlänge zu kontrollieren, nicht identisch sind (Pan et al., 2004). So können die Flagellen in der Grünalge unabhängig von einem funktionierenden IFT eingeschmolzen werden. Mithilfe des IFT läuft der Vorgang des Einschmelzens des Flagellums aber deutlich schneller ab. Möglicherweise gibt es für das Verlängern des Flagellums ebenso zwei verschiedene Signalwege: einen zum Verlängern des Flagellums und einen zweiten um eine konstante Länge zu halten.

Untersuchung der unterschiedlichen Aktivität von LmxM_{KK} und TbMEK_G

TbMEK_G unterscheidet sich im Bereich der Aktivierungsschleife bis auf eine Aminosäure nicht von LmxM_{KK} (siehe 9.1.1). Anstelle des Alaninrests an Position 214 befindet sich bei TbMEK_G ein Aspartatrest. Dies ist eine mögliche Erklärung, weshalb TbMEK_G keine aktivierende Mutation benötigt. Da in diesem Bereich bereits ein Aspartat vorliegt, könnte das ausreichen, um eine Phosphorylierung vorzutauschen, bzw. ist dadurch für eine aktive

TbMEKg in diesem Bereich keine Phosphorylierung nötig. Ob dies auch *in vivo* in *T. brucei* zutrifft kann aber noch nicht gesagt werden. Bei der *in vitro* beobachteten Aktivität handelt es sich oft um eine Basalaktivität, die von einer richtigen Aktivierung durch die Aktivator kinase noch deutlich übertroffen wird.

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede in der Aktivität der beiden Kinasen mit dieser einen Aminosäure zusammenhängen, wurde A214 in LmxMKK zu einem Aspartatrest mutiert. In Abb. 4.15 ist zu erkennen, dass LmxMKK-AD in Abwesenheit von LmxMPK3 kein MBP phosphoryliert. Wird LmxMKK-AD aber zusammen mit LmxMPK3-KM inkubiert, kommt es zu einer Phosphorylierung von MBP. Ein ähnliches Ergebnis konnte auch für LmxMKK-Wt beobachtet werden. In der gleichen Abbildung ist zu sehen, dass LmxMKK-Wt keine MBP-Phosphorylierung durchführen kann. Bei der gleichen Expositionszeit ist jedoch erkennbar, dass es zu einer leichten MBP-Phosphorylierung kommt, wenn LmxMKK mit LmxMPK3-KM inkubiert wurde. Somit hat es den Anschein, dass die Anwesenheit von LmxMPK3 einen Einfluss auf die Aktivität von LmxMKK hat. Möglicherweise lagert sich inaktive LmxMPK3 an LmxMKK an, was zu einer Aktivitätssteigerung führen könnte. Dies steht im Einklang der Daten, die aus den „Feedback“-Phosphorylierungsversuchen gewonnen wurden. Hier konnte festgestellt werden, dass LmxMPK3 LmxMKK ebenfalls phosphorylieren kann. Wichtiger aber ist die Beobachtung, dass LmxMKK-AD LmxMPK3 mit einer ähnlichen Intensität phosphoryliert wie TbMEKg. Dies ist allerdings noch etwas schwächer als bei LmxMKK-D. Die neu generierte AD-Mutation führt zwar nicht zu einer ebenso aktiven Mutante gegenüber MBP wie die D-Mutation, sie ist allerdings fast genauso gut in der Lage LmxMPK3 zu aktivieren.

Interessanterweise wurde außerdem in Immunoblotanalysen festgestellt, dass LmxMKK-D und LmxMKK-AD fast gar nicht an Tyrosinresten phosphoryliert sind, TbMEKg hingegen schon. Möglicherweise handelt es sich dabei um die Phosphorylierung, die im Autoradiogramm der Kinase Aktivitätstests als Autophosphorylierung bei TbMEKg beobachtet wurde. LmxMKK-AD phosphorylierte sich im radioaktiven Kinase Aktivitätstest fast gar nicht. Der naheliegendste Grund für diese zusätzliche Phosphorylierung ist ein Tyrosinrest, der nur in TbMEKg vorhanden ist, im homologen Protein in *L. mexicana* hingegen nicht, wodurch auch keine Phosphorylierung mehr auftreten kann. Insgesamt gibt es vier Tyrosinreste in TbMEKg, die in LmxMKK nicht existieren: Y150, Y197, Y223 und Y287. Besonders interessant ist dabei Y223 da es direkt in der Nähe der Aktivierungsschleife liegt. Möglicherweise ist sogar dies der Grund für die Aktivität von TbMEKg-Wt im *in vitro*-Aktivitätstest. Durch die Phosphorylierung in der Nähe der Aktivierungsschleife könnte es zu einer teilweisen Aktivierung von TbMEKg kommen, die mit der AD-Mutante bei LmxMKK nur teilweise nachempfunden wurde. Ob die Tyrosinphosphorylierung bei TbMEKg tatsächlich an diesem Aminosäurerest stattfindet,

könnte in zukünftigen Versuchen durch MS/MS-Analyse untersucht werden. Falls es gelingt die Phosphorylierungsstelle zu identifizieren, müsste im Anschluss durch eine Mutationsanalyse untersucht werden, ob diese Phosphorylierung auch tatsächlich einen Einfluss auf die Aktivität von TbMEK γ hat.

5.2 Beziehung zwischen LmxPK4 und LmxMPK9

Nachdem ein Substrat von LmxMKK identifiziert werden konnte, rückten andere Proteinkinasen, die an der Flagellenlängenregulation beteiligt sind, ins Interesse. Wie schon zuvor diskutiert besteht die Möglichkeit, dass LmxMKK weitere Substrate und Interaktionspartner besitzt. Dabei handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auch um Proteinkinasen. In unserem Labor sind allerdings keine weiteren Kinasen bekannt, die bei der Verlängerung der Flagellen eine Rolle spielen. Dafür war aber bereits bekannt, dass LmxPK4 und LmxMPK9 bei der Verkürzung von Flagellen eine Rolle spielen. Die jeweiligen Deletionsmutanten zeigen mit leicht verlängerten Flagellen im Vergleich zu LmxWt einen ähnlichen Phänotyp (Bengs et al., 2005; Kuhn, 2004). Um zu überprüfen, ob diese beiden Proteine miteinander interagieren, sollten sie zusammen in kombinierte Kinase Aktivitätstests eingesetzt werden. LmxPK4 konnte bereits rekombinant exprimiert werden, für LmxMPK9 musste dies zuvor noch optimiert werden. Mithilfe eines GST-Tags gelang die Aufreinigung des rekombinanten Proteins an einer Glutathion-Sepharose. GST-LmxMPK9-Wt zeigte eine gute MBP- und Autophosphorylierung. Eine KM-Mutante zeigte keine Aktivität und kann somit als kinasetote Mutante bezeichnet werden.

In den kombinierten Kinase Aktivitätstests der verschiedenen LmxMPK9-Mutanten mit LmxPK4 konnte beobachtet werden, dass GST-LmxMPK9 und GST-LmxMPK9-KM von LmxPK4 phosphoryliert werden. Eine verstärkte Phosphorylierung von MBP in dem Ansatz mit LmxPK4 und LmxMPK9 konnte nicht beobachtet werden (Abb. 4.19). Das spricht gegen eine Aktivierung von LmxMPK9 durch LmxPK4. Möglicherweise waren aber auch die Versuchsbedingungen nicht optimal. Zwar wurden zuvor die optimalen Bedingungen für LmxMPK9 bestimmt, aber ob diese auch für LmxPK4 optimal sind, war nicht bekannt. Für LmxPK4 wurden zur Bestimmung der optimalen Bedingungen andere Testbedingungen verwendet, als bei LmxMPK9 (Bengs et al., 2005; Kuhn und Wiese, 2005). So wurde LmxMPK9 z.B. bis zu einer Mn²⁺-Konzentration von 10 mM untersucht, LmxPK4 nur bis zu 4 mM. Außerdem kann man sich auch vorstellen, dass die Dauer der gemeinsamen Inkubation nicht für eine Aktivierung ausreichte.

Um diese Probleme zu umgehen, besteht die Möglichkeit zwei Proteine in *E. coli* gemeinsam zu exprimieren und nur eines davon über einen His-Tag aufzureinigen. Dazu wurde der Expressionsvektor pJCduet benutzt. Leider konnte deutlich weniger rekombinante His-LmxMPK9 an Co²⁺-Sepharose aufgereinigt werden als GST-LmxMPK9 an der

Glutathion-Sepharose. Bei His-LmxMPK9-KM wurde nicht einmal die Proteinmenge wie bei der Wt-Variante erreicht und bei den coexprimierten Proteinen noch deutlich weniger. Wahrscheinlich hat der GST-Tag durch seine Größe (26 kD) eine stabilisierende Wirkung auf das restliche Protein, was zu einer höheren Ausbeute führt. Der His-Tag hingegen besteht insgesamt nur aus 10 Aminosäuren, was vermutlich keine stabilisierende Wirkung hat. Außerdem ist LmxPK4 viel leichter in *E. coli* überexprimierbar als LmxMPK9. Es ist vorstellbar, dass bei einer Coexpression noch weniger LmxMPK9 gebildet wird, da LmxPK4 bevorzugt wird. Daher konnte mit diesem Coexpressionssystem leider kein weiterer Hinweis auf eine Interaktion von LmxPK4 mit LmxMPK9 gefunden werden.

5.3 Substratsuche für LmxPK4

Da LmxMPK9 zwar von LmxPK4 phosphoryliert aber nicht aktiviert wird, wurde nach weiteren potentiellen Interaktionspartnern recherchiert. Bei einer Datenbankanalyse des neu sequenzierten *L. major*-Genoms wurden zwei interessante Kandidaten gefunden, die möglicherweise einen Einfluss auf die Flagellenlänge haben.

LmxMPK13 zeigte sehr hohe Homologie zu LF4 aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Dessen Deletion in der Grünalge führt zu doppelt so langen Flagellen, wie die des Wt. Außerdem sind LmxMPK13 und LmxMPK14 sehr ähnlich zu LmxMPK9. Diese drei Kinasen bilden in einem phylogenetischen Baum der 15 MAP Kinasen in *L. mexicana* einen eigenen Ast (Wiese, 2007). Da LmxMPK9 wie bereits beschrieben, von LmxPK4 phosphoryliert wird und dessen Deletion ebenfalls zu längeren Flagellen führt, ist durchaus vorstellbar, dass das Homologe LxMPK13 oder LmxMPK14 vielleicht das wirkliche Substrat ist, bei dem es im Kinase Aktivitätstest auch zu einer Aktivierung kommt.

5.3.1 Deletion von LmxMPK13 und LmxMPK14

Um zu untersuchen, ob diese Proteine wirklich an der Flagellenlängenregulation beteiligt sind, wurden Doppeldelentionsmutanten generiert. Für LmxMPK13 gelang das erstaunlicherweise in nur einer Elektroporationsrunde. Normalerweise werden in Leishmanien Nullmutanten erzeugt, indem man in zwei Transfektionsschritten jeweils ein Allel gegen ein Antibiotikaresistenzgen austauscht. Aber auch in anderen Fällen ist bereits gezeigt worden, dass auch mit nur einem Selektionsmarker beide Allele des betreffenden Gens ausgetauscht werden konnten. So wurde bei der Deletion einer Tyrosin-Phosphatase in *L. donovani* nur durch eine Erhöhung der Hygromycin B-Konzentration bei einer Einzelalleldelentionsmutante von 50 μM auf 200 μM , dass zweite Allel ebenfalls ausgetauscht (Nascimento et al., 2006). Außerdem ist es auch schon gelungen in einer Elektroporationsrunde mit zwei Resistenzmarkern gleichzeitig beide Allele des betreffenden Gens auszutauschen (Clos et al., unveröffentlichte Daten).

Von den *LmxMPK13*-Deletionsmutanten wurde anschließend die durchschnittliche Flagellenlänge bestimmt, wobei tatsächlich eine Beteiligung an der Regulation der Flagellenlänge nachgewiesen werden konnte. Die Flagellen der Nullmutante sind über 25 % länger als die des Wt. Wurde *LmxMPK13* auf einem Plasmid in die Deletionsmutanten eingefügt, konnte eine Verkürzung der Flagellen auf die ungefähre Länge von LmxWt festgestellt werden. Diese Differenz in der Flagellenlänge ist zwar signifikant, liegt aber deutlich unter den Werten, die bei der Deletion von *LF4* in *C. reinhardtii* beobachtet werden konnten (Berman et al., 2003). Hier führte die Deletion des Homologen zu doppelt so langen Flagellen. Dafür entspricht es aber in etwa dem Phänotyp der *LmxPK4*-Nullmutante.

LmxMPK14 konnte ebenfalls deletiert werden. Auch hier war eine leichte Verlängerung der Flagellen im Vergleich zum Wt messbar. Allerdings existiert nur ein Einzelklon und es wurde kein „Addback“-Klon generiert, um den beschriebenen Phänotyp zu verifizieren. Aber auch hier kann festgehalten werden, dass die Deletion von *LmxMPK14* zu einem ähnlichen Phänotyp führt wie der der Nullmutanten von *LmxPK4* und *LmxMPK9*.

Da mehrere Deletionsmutanten von MAP Kinase Homologen den gleichen Phänotyp zeigen wie die *LmxPK4*-Nullmutante, ist es durchaus vorstellbar, dass *LmxPK4* mehrere Substrate besitzt. Andererseits ist es aber auch möglich, dass es mehrere Signalwege gibt, die an der Verkürzung der Flagellen beteiligt sind. Wird einer dieser Wege durch eine Deletion unterbrochen, könnten die anderen Signalwege diese Funktion noch teilweise übernehmen. Damit könnte die geringe Verlängerung der Flagellen in den Deletionsmutanten von *LmxMPK9*, *LmxMPK13* und *LmxMPK14* sowie *LmxPK4* im Vergleich zur Deletion von *LF4* in *C. reinhardtii* erklärt werden. Auch in der Grünalge gibt es mehrere Signalwege, die in die Regulation der Flagellenlänge eingreifen. Die Deletion der CDK-ähnliche Kinase *LF2* führte zu Zellen, mit zwei unterschiedlich langen Flagellen (Tam et al., 2007). Eines davon war meist deutlich kürzer als beim Wt, während das zweite zu einem gewissen Anteil sogar deutlich länger sein konnte.

5.3.2 Kinase Aktivitätstests von *LmxMPK13* und *LmxMPK14* mit *LmxPK4*

Da nun bekannt war, dass sowohl *LmxMPK13* als auch *LmxMPK14* an der Verkürzung der Flagellenlänge in einem ähnlichen Niveau beteiligt sind wie *LmxPK4*, wurde nun in kombinierten Kinase Aktivitätstests untersucht, ob die jeweiligen Proteine miteinander interagieren.

Sowohl *LmxMPK13* als auch *LmxMPK14* ließen sich mithilfe des pJCduet-Expressionsplasmids rekombinant als His-Fusionsproteine exprimieren. Dies war besonders erfreulich, da dieser Ansatz bei *LmxMPK9* nicht zufriedenstellend funktioniert hatte. Doch bei beiden Ansätzen erschien nicht nur eine einzelne Bande auf der vorhergesagten Höhe im SDS-Gel. Das Eluat der Aufreinigung von His-*LmxMPK13* zeigte mindestens drei Banden, wovon die größte in etwa bei der vorhergesagten Größe von

45,5 kD lief. Die anderen Banden waren kleiner. Dies deutet auf einen Abbau des Proteins oder eine frühzeitige Terminierung während der Expression hin. Bei der Aufreinigung von His-LmxMPK14 wurden ebenfalls mehrere Banden im SDS-Gel erhalten, die teilweise aber sogar höher liefen, als bei dem berechneten Molekulargewicht von 68 kD. Möglicherweise liegt dieses Protein in mehreren Phosphorylierungsstufen vor, die auch zu höher laufenden Banden im SDS-Gel führen können (Erickson et al., 1990). Es traten aber auch hier Proteinbanden auf, die deutlich niedriger liefen als bei 68 kD. Als Erklärung kommen hier die gleichen Möglichkeiten in Frage, wie auch schon bei His-LmxMPK13.

Zur Überprüfung, ob die aufgereinigten Proteine aktiv sind und somit wirklich als Proteinkinasen bezeichnet werden können, wurden Kinase Aktivitätstests durchgeführt. Damit Verunreinigungen aus der Proteinaufreinigung nicht falsch interpretiert werden, wurde jeweils eine KM-Mutante generiert und diese ebenfalls in den Test eingesetzt. Dabei fiel auf, dass His-LmxMPK13-KM etwas niedriger im SDS-Polyacrylamidgel läuft als His-LmxMPK13. Dies befürwortet die Theorie, dass His-LmxMPK13 in verschiedenen Phosphorylierungsstufen vorliegt. Bei His-LmxMPK13-KM ist dies nicht mehr der Fall, da sie nicht in der Lage sein sollte sich selbst zu phosphorylieren. His-LmxMPK13 zeigte im Kinase Aktivitätstest eine deutliche Auto- und eine sehr schwache MBP-Phosphorylierung. Die Mutante His-LmxMPK13-KM zeigte keinerlei Aktivität. His-LmxMPK14 phosphorylierte sich selbst nur schwach, dafür aber MBP deutlich besser als His-LmxMPK13. His-LmxMPK14-KM zeigte auch keine Aktivität. Beide Proteine besitzen Phosphotransferase-Aktivität und können daher als Proteinkinasen bezeichnet werden.

Im nächsten Schritt wurden His-LmxMPK13 und His-LmxMPK14 zusammen mit LmxPK4 in einen Kinase Aktivitätstest eingesetzt, um zu überprüfen, ob eine der beiden neu klonierten Kinasen mit LmxPK4 interagiert. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass His-LmxMPK13 von GST-LmxPK4 phosphoryliert wird. Allerdings wurde wieder keine Aktivierung beobachtet, so wie es schon bei LmxMPK9 der Fall war. His-LmxMPK14 hingegen wurde von LmxPK4 nicht phosphoryliert. Somit konnte LmxMPK14 bereits jetzt als Substrat von LmxPK4 ausgeschlossen werden. LmxMPK13 ist aber immer noch ein Kandidat für das Substrat von LmxPK4. Um dies weitergehend zu untersuchen, wurde LmxMPK13 mit LmxPK4 mithilfe des pJCduet-Expressionssystems coexprimiert und anschließend separat über einen His-Tag aufgereinigt. Im anschließenden Kinase Aktivitätstest wurde tatsächlich eine deutliche Aktivitätssteigerung beobachtet. His-LmxMPK13 phosphorylierte MBP wenn überhaupt nur sehr schwach. Bei der coexprimierten His-LmxMPK13 konnte im Gegensatz eine sehr starke Phosphorylierung von MBP festgestellt werden. Auch hier konnte wieder beobachtet werden, dass die coexprimierten Mutanten im SDS-Polyacrylamidgel etwas höher liefen, als die allein exprimierten Formen. Dies deutet bereits darauf hin, dass

LmxMPK13 von LmxPK4 mit weiteren Phosphorylierungen versehen wurde und somit im Gel langsamer läuft.

Es kann festgehalten werden, dass LmxMPK13 in *E. coli* durch LmxPK4 aktiviert wird. Warum dies in dem *in vitro* Aktivitätstest nicht funktionierte, kann vielfältige Gründe haben. Zum einen sind die Bedingungen für eine Aktivierung in den Bakterien wahrscheinlich optimaler als es im Kinase Aktivitätstest überhaupt möglich ist. Zum anderen hatten die beiden Proteine während der rekombinanten Expression viel mehr Zeit zum Interagieren als während eines *in vitro* Versuchs bei dem die Proteine nur 1 h miteinander inkubiert werden. Daher ist es auch durchaus möglich, dass diese beiden Proteine auch *in vivo* in den Leishmanien miteinander interagieren. Einen Nachweis dafür konnte ich in den durchgeführten Versuchen leider nicht erbringen. Da kein Antikörper existierte, der LmxMPK13 in Leishmanien detektieren kann, wurde versucht eine Mutante von LmxMPK13, die mit einem N-terminalen TY-Tag versehen war, in die LmxMPK13 Nullmutante zu transfizieren. Bei diesen „Addback“-Mutanten konnte sowohl das Gen *LmxMPK13* durch PCR nachgewiesen werden, als auch eine Verkürzung der Flagellen auf die Länge von LmxWt beobachtet werden. Allerdings war der TY-Tag weder in einer Immunoblot-Analyse noch in einer Immunfluoreszenz-Analyse nachweisbar. Da ein Phänotyp beobachtet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Kinase in den Leishmanien exprimiert wird, allerdings in so geringen Mengen, dass sie mit den vorhandenen Methoden nicht nachweisbar ist. Somit war auch eine Untersuchung von TY-LmxMPK13 auf ihren Phosphorylierungsstatus nicht möglich.

5.4 Identifikation der Phosphorylierungsstellen in LmxMPK13

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Aktivierung von LmxMPK13 durch LmxPK4 in *E. coli* tatsächlich dem typischen Muster der Aktivierung einer MAPK durch die entsprechende MAPKK entspricht, wurden Mutationen in das TEY-Motiv von LmxMPK13 eingefügt. Sowohl der Threonin- als auch der Tyrosinrest sollten von LmxPK4 phosphoryliert werden, wenn es sich um die typische Aktivierung einer MAP Kinase handelt. Wird einer der beiden Aminosäurereste zu einer Aminosäure mutiert, die nicht mehr phosphoryliert werden kann, sollte es zu einem Intensitätsverlust der Phosphorylierung durch LmxPK4 kommen. Werden beide Reste mutiert, sollte LmxMPK13 nicht mehr von LmxPK4 phosphoryliert werden. Die Ergebnisse der entsprechenden Kinase Aktivitätstests sahen jedoch anders aus. Alle drei Mutanten wurden von LmxPK4 phosphoryliert. Sogar bei LmxMPK13-ADF-KM konnte keine sonderlich starke Reduktion der Phosphorylierung durch LmxPK4 beobachtet werden. Daher muss LmxMPK13 an einem Aminosäurerest außerhalb des TEY-Motivs phosphoryliert werden. Dieses Ergebnis schließt allerdings eine Phosphorylierung innerhalb des TEY-Motivs durch LmxPK4 nicht aus. Es zeigt lediglich, dass LmxMPK13 mindestens an

einem Aminosäurerest außerhalb des TEY-Motivs von LmxPK4 phosphoryliert wird. Um nun zu untersuchen, ob dieses Motiv einen Einfluss auf die Aktivität von LmxMPK13 hat, wurden die Mutationen auch in die Coexpressionskonstrukte eingefügt. Tatsächlich konnte in den folgenden Kinase Aktivitätstests festgestellt werden, dass die coexprimierte LmxMPK13 bereits durch die Mutation nur einer der beiden Phosphorylierungsstellen einen sehr starken Verlust der Aktivität zeigt. Die ADY- und ADF-Mutanten zeigten maximal soviel Aktivität wie LmxMPK13-Wt, die allein exprimiert wurde. Nur die coexprimierte LmxMPK13-TEF zeigte eine leicht erhöhte MBP-Phosphorylierung. Daraus kann man die Schlussfolgerung ziehen, dass der Aminosäurerest T160 möglicherweise eine bedeutendere Rolle für die Aktivierung von LmxMPK13 spielt. Der Tyrosinrest der ADY-Mutante könnte durch eine Autophosphorylierungsaktivität von LmxMPK13 phosphoryliert werden. Dadurch kommt es zu einer Aktivität, die in etwa der von LmxMPK13-Wt entspricht. LmxMPK13-ADF zeigt hingegen fast gar keine Aktivität. Bei dem Threoninrest könnte es sich um eine Phosphorylierungsstelle von LmxPK4 handeln. Erst dadurch wird eine Aktivitätssteigerung im Vergleich zu LmxMPK13-Wt erzielt. Außerdem würde dies zu der Beobachtung passen, dass die coexprimierte LmxMPK13 im SDS-Gel etwas höher läuft als die allein exprimierte LmxMPK13. Für solche Änderung im Laufverhalten können Phosphorylierungen der Grund sein. Coexprimierte LmxMPK13-ADY und LmxMPK13-ADF dagegen laufen auf der gleichen Höhe wie die allein exprimierte LmxMPK13-Wt. Bei Untersuchungen von ERK5 erreicht eine TDF-Mutante noch etwa 10 % der Aktivität von aktivierter ERK5 (Mody et al., 2003). Dort erzielte eine ADY-Mutante noch ca. 1 – 2 % der Aktivität und eine ADF-Mutante konnte gar nicht mehr aktiviert werden.

Diese Theorie widerspricht allerdings der gängigen Annahme, dass MAPKs von ihrer aktivierenden MAPKK an beiden Resten des TXY-Motivs phosphoryliert werden (Cobb und Goldsmith, 1995). Fu et al. beschrieben mit ICK eine MAPK ähnliche Proteinkinase, die auch über ein konserviertes TXY-Motiv verfügt, sich aber an dem Tyrosinrest selbst phosphoryliert und nur an dem Threoninrest von ihrem Aktivator phosphoryliert wird (Fu et al., 2005). Dabei ist interessant, dass ICK hohe Homologie zu LmxMPK9, LmxMPK13 und LmxMPK14 zeigt. Aber auch bei typischen MAPK konnte eine unterschiedlich starke Bedeutung der beiden Phosphorylierungen für die Aktivität der Kinase beobachtet werden. Eine Dephosphorylierung des Threoninrests bei ERK8 führt zu einem Aktivitätsverlust von mehr als 95%. Eine Dephosphorylierung des Tyrosinrests senkt die Aktivität hingegen nur um 15 - 20 % (Klevernic et al., 2006). Tatsächlich konnte sogar gezeigt werden, dass sowohl MKK1, MKK3, MKK4 als auch MKK6 ihre Substrate bevorzugt am Tyrosinrest des TXY-Motivs phosphorylieren (Fleming et al., 2000; Haystead et al., 1992). MKK5 und MKK7 hingegen phosphorylieren hauptsächlich den Threoninrest (Mody et al., 2003; Lawler et al., 1998).

Es kann nun mit Sicherheit gesagt werden, dass das TEY-Motiv von LmxMPK13 tatsächlich für die Aktivierung von LmxPK4 in *E. coli* essentiell ist. Zu diesem Zeitpunkt war aber noch nicht bekannt, ob eine Phosphorylierung an den Phosphorylierungsstellen des TEY-Motivs stattfindet.

In MS/MS-Analysen wurde festgestellt, dass LmxMPK13-KM während der Coexpression von LmxPK4 an beiden Resten des TEY-Motivs phosphoryliert wird. Es wurden sowohl die Peptide identifiziert an denen jeweils eine Aminosäure des TEY-Motivs phosphoryliert war, als auch die doppelt phosphorylierte Variante. Für die allein exprimierte LmxMPK13 kann allerdings keine eindeutige Aussage getroffen werden. In einem Versuch war dieses Peptid nur in den beiden einfach phosphorylierten Formen nachweisbar und in einem zweiten Versuch zusätzlich auch in der doppelt phosphorylierten Variante. Somit kann keine eindeutige Aussage getroffen werden. Da aber in der inaktiven LmxMPK13-KM, die mit LmxPK4 coexprimiert wurde, alle beschriebenen Formen des entsprechenden Peptids nachweisbar waren, steht fest, dass LmxMPK13 sowohl am Threonin- als auch am Tyrosinrest von LmxPK4 phosphoryliert wird. Es ist durchaus möglich, dass sich LmxMPK13 an nur einem der beiden Reste autophosphoryliert. Durch die erste Phosphorylierung käme es schon zu einer strukturellen Änderung in der Aktivierungsschleife, wodurch sich die Kinase an dem zweiten Aminosäurerest nicht mehr phosphorylieren kann. Es besteht die Möglichkeit, dass dieses Peptid in dem zweiten Versuchsdurchlauf nicht detektiert wurde, da es durch andere Peptide überlagert wurde. Außerdem kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass bei der zweiten Analyse, eine Verunreinigung zwischen den verschiedenen Proben aufgetreten ist.

Falls LmxMPK13 sich allerdings tatsächlich an beiden Aminosäureresten autophosphoryliert, spricht dies gegen die bekannten Mechanismen, durch welche MAPK aktiviert werden. Es besteht immer noch die Möglichkeit, dass es sich bei LmxMPK13 um eine Kinase handelt, die eine sehr hohe Homologie zu MAPKs zeigt, aber einer anderen Kinase Familie angehört. Dies würde allerdings nicht erklären, warum auch LmxPK4 diese beiden Aminosäurereste phosphoryliert. Allerdings konnte auch bei ERK8 festgestellt werden, dass diese sich während der Expression in *E. coli* oder Insektenzellen an beiden Resten des TXY-Motivs autophosphoryliert (Klevernig et al., 2006). Wurde diese Kinase hingegen in HEK-293-Zellen exprimiert war sie nur am Tyrosinrest phosphoryliert. Eine Phosphorylierung an beiden Aminosäureresten konnte erst durch eine Stimulierung der Zellen erreicht werden. Dies könnte auch bei LmxMPK13 der Fall sein. Möglicherweise tritt die doppelte Phosphorylierung nur durch die hohe Proteinkonzentration während der rekombinanten Expression auf.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass LmxMPK13 an dem Aminosäurerest T14 ebenfalls von LmxPK4 phosphoryliert wird. Dort kann sich LmxMPK13 nicht autophosphorylieren. Es

ist durchaus vorstellbar, dass es sich auch bei dieser Phosphorylierung nur um ein Artefakt handelt, das durch die rekombinante Expression in den Bakterien hervorgerufen wird. Andererseits könnte es aber auch zu einer Aktivitätssteigerung führen oder aber eine Markierung zum Abbau des Proteins darstellen, um die Kinase wieder zu inaktivieren. Bei GSK3 führt eine N-terminale Phosphorylierung eines Serinrests zu einer Inaktivierung (Frame et al., 2001). Durch die Phosphorylierung wird der N-Terminus zu einem Pseudosubstrat, wodurch nicht nur die Bindung des Substrats an GSK3 verhindert wird, sondern auch der Zugang zum katalytischen Zentrum blockiert wird. Bei CRKs sind ebenfalls N-terminale Phosphorylierungsstellen bekannt. Bei LmmCRK1 sind diese T15 und Y16 und bei LmmCRK3 T14 und Y15 (Mottram et al., 1993; Grant et al., 1998). Diese Reste liegen in der angenommenen ATP-Binderegion. Für das homologe murine Protein p34^{cdc2} konnte nachgewiesen werden, dass eine spezifische Dephosphorylierung dieser Aminosäurereste zu einer Aktivierung führt (Norbury et al., 1991). Somit haben auch diese Phosphorylierungen in cdc2-ähnlichen Proteinkinasen eine inhibierende Funktion.

Da bei LmxMPK13 die Aktivität durch die Coexpression mit LmxPK4 aber steigt, scheint diese Art der Inaktivierung nicht vorzuliegen. Welche Bedeutung die Phosphorylierung an T14 für die Aktivität von LmxMPK13 hat, muss in zukünftigen Versuchen durch eine Mutationsanalyse überprüft werden.

Zusätzlich wurden im C-Terminus von LmxMPK13 mehrere phosphorylierte Aminosäurereste ausgemacht. Im Fall der allein exprimierten LmxMPK13 konnten aber nicht alle Phosphorylierungsstellen eindeutig identifiziert werden. Für die coexprimierte LmxMPK13-KM konnten Phosphorylierungen an S338 und T339 nachgewiesen werden. Möglicherweise kann sich LmxMPK13 an diesen Resten ebenso autophosphorylieren, oder aber es handelt sich um andere Aminosäurereste auf den gleichen Peptiden. Auf diesen befinden sich insgesamt 18 Serin- oder Threoninreste, wodurch eine Identifikation der Phosphorylierungsstelle sehr schwierig ist. Eine Autophosphorylierung an mehreren verschiedenen Aminosäureresten, sowohl N- als auch C-terminal, konnte auch bei aktivierter ERK5 nachgewiesen werden (Mody et al., 2003). Teilweise befinden sich diese Phosphorylierungsstellen auch innerhalb der Kinasedomäne von ERK5. Welcher Funktion diese Autophosphorylierungen dienen, ist bisher noch unbekannt. Es wurde allerdings die Vermutung aufgestellt, dass es sich bei dem C-Terminus von ERK5 um dessen Substrat handelt. Es konnte bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass der isolierte C-Terminus die Transkription stimuliert (Kasler et al., 2000). Daher könnte es sich bei diesem um einen Transkriptionsfaktor oder einen transkriptionellen Coaktivator handeln.

Bei allen identifizierten Phosphorylierungsstellen muss noch nachgewiesen werden, ob die Phosphorylierungen, die während der rekombinanten Expression auftraten, auch in den

Parasiten vorhanden sind. Dazu muss LmxMPK13 aus den Leishmanien aufgereinigt und anschließend durch MS/MS analysiert werden. Bisher konnte LmxMPK13 allerdings mit keinem Antikörper in Gesamtzelllysaten von Promastigoten durch eine Immunoblotanalyse detektiert werden. Daher sind die existierenden Antikörper nicht dazu geeignet ausreichende Mengen der Kinase zu immunpräzipitieren. Wie bereits beschrieben war eine Expression von TY-LmxMPK13 in Leishmanien nicht erfolgreich. Daher könnte man versuchen LmxMPK13 mit einem anderen Tag aus den Parasiten zu präzipitieren und anschließend die Phosphorylierungsstellen zu identifizieren. In Frage kommt dafür vor allem der TAP-Tag, da es sich hierbei um eine sehr milde Aufreinigungsmethode handelt. TAP steht dabei für Tandem-Affinitätsreinigung. Der TAP-Tag kodiert für eine Protein-A-Bindedomäne, eine Erkennungssequenz der TEV-Protease sowie eine Calmodulin-Bindedomäne.

5.5 Substratsuche für LmxMPK13

Durch die deutliche Aktivitätssteigerung von LmxMPK13, die durch die Coexpression mit LmxPK4 hervorgerufen wird, konnte nach Substraten von LmxMPK13 gesucht werden. Es wird davon ausgegangen, dass die beobachtete Aktivität einer Proteinkinase im *in vitro* Test eher einer Basalaktivität entspricht, und erst durch eine Aktivierung die volle Aktivität und damit verbunden auch die volle Spezifität der Kinase zur Geltung kommt. Durch eine allosterische Kontrolle der Enzymaktivität und -spezifität wird erst eine Effizienz in der Signalweiterleitung erreicht. Dazu werden verschiedene Mechanismen benutzt: Bindung des Effektors, Phosphorylierung sowie Interaktionen von Proteindomänen und -untereinheiten (Goldsmith, 1996; Huse und Kuriyan, 2002; Johnson et al., 1996; Nolen et al., 2004). So kann es durch die Aktivierung einer Kinase zu einer Konformationsänderung kommen, wodurch die Substratbindung erst ermöglicht wird. Die häufigste Protein-Protein-Interaktion, bei der die Kinasedomänen beteiligt sind, ist die Bildung von Dimeren. Dadurch werden eine Transphosphorylierung an der Aktivierungsrippe und eine anschließende Aktivierung ermöglicht (Pellicena und Kuriyan, 2006).

In *in vitro* Versuchen wurden Leishmanien Promastigoten Lysate mit rekombinanter LmxMPK13 inkubiert. Dabei konnte beobachtet werden, dass die coexprimierte His-LmxMPK13 mehrere Banden im Bereich von 5 - 8 kD phosphoryliert. Die Möglichkeit, dass es sich dabei um Substrate handelt, die durch eine Phosphorylierung zur Degradierung markiert wurden und somit als kleinere Banden detektiert werden, kann ausgeschlossen werden, da immer mit frisch angesetzten Protease-Inhibitoren gearbeitet wurde. Eine Identifizierung dieser Proteine durch MALDI-TOF war nicht möglich. Daher wurden die *L. major* und *L. infantum* Genome nach Genen durchsucht, die für Proteine kodieren, welche in dem gesuchten Größenbereich liegen. Diese Proteine wurden anschließend nach

potentiellen MAP Kinase Phosphorylierungsstellen durchsucht, wobei es sich um SP- oder TP-Motive handelt. In den beiden Genomen wurden jeweils 8 Kandidaten gefunden, die den Suchkriterien entsprachen, aber nur zwei kamen in beiden Genomen vor. Es ist anzunehmen, dass das homologe Protein in *L. mexicana* ebenfalls das gesuchte Motiv trägt. Bei diesen beiden potentiellen Substraten handelt es sich zum einen um ein hypothetisches Protein mit bisher unbekannter Funktion, das nur in Trypanosomatiden vorkommt, und ein Homolog zu NOP10p, einem nukleolaren RNA-Bindeprotein. Nachdem beide ORFs durch eine PCR auf gDNA von *L. mexicana* amplifiziert wurden, konnten sie anschließend sequenziert werden. Das hypothetische Protein konnte leider nicht weiterführend untersucht werden, da es nicht gelang ausreichende Mengen für einen kombinierten Kinase Aktivitätstest mit der aktivierten LmxMPK13 zu exprimieren. Möglicherweise können die Expressions- und Aufreinigungsbedingungen aber noch weiter verbessert werden, um eine ausreichende Menge rekombinanten Proteins zu erhalten. Andernfalls können auch andere Tags zur Aufreinigung verwendet werden. Ein GST-Tag wirkt stabilisierend, könnte aber aufgrund seiner Größe ebenfalls problematisch sein. Ein Strep-Tag hingegen ist sehr klein und das Fusionsprotein kann anschließend unter physiologischen Bedingungen aufgereinigt werden.

Das zweite Protein, das in der Datenbank-Analyse das Interesse weckte, wurde erfolgreich als His-Fusionsprotein exprimiert und aufgereinigt. In den nachfolgenden Kinase Aktivitätstests konnte beobachtet werden, dass LmxNOP10p von der aktivierten LmxMPK13 phosphoryliert wird. Somit kann LmxNOP10p als ein *in vitro*-Substrat von LmxMPK13 bezeichnet werden.

Zusammen mit drei weiteren hoch konservierten Proteinen (Cbf5p, Gar1p und Nhp2p) und einer snoRNA bildet NOP10p im Menschen einen RNA-Protein-Komplex (RNP), der zur Pseudouridinylierung von rRNA dient. Die snoRNAs gehören dabei der H/ACA-Familie an. Die Pseudouridinylierung von rRNA ist nicht zwangsläufig essentiell, sondern dient vielmehr zur genauen Einstellung der rRNA-Faltung und der Interaktion mit ribosomalen Proteinen (Bachellerie et al., 2002). Auch in *T. brucei* und *L. major* konnten snoRNAs und die zugehörigen snoRNPs identifiziert werden (Barth et al., 2005; Liang et al., 2007). Allerdings scheinen diese snoRNAs und die zugehörigen Proteinkomplexe hier eine bedeutendere Rolle zu spielen. SLA1 ist der interessanteste Vertreter der H/ACA-Moleküle in Trypanosomatiden. Es modifiziert die SL (Spliced Leader)-RNA und hat somit direkten Einfluss auf das Transsplicing. Durch ein Herunterregulieren von Cbf5p durch RNAi in *T. brucei* konnte das Transsplicing sogar inhibiert werden (Barth et al., 2005). Eine Phosphorylierung von NOP10p wurde bisher noch nicht beschrieben. Allerdings kann man sich durchaus vorstellen, dass solch bedeutende Prozesse wie Transsplicing stark reguliert sind und möglicherweise eine Phosphorylierung Einfluss auf die Bildung des RNP-

Komplexes hat. Es könnte dadurch die Konformation von NOP10p verändert werden oder aber die Bindungsmöglichkeiten der anderen Interaktionspartner des RNP-Komplexes beeinflussen. Um diese Hypothese zu verifizieren, muss der Phosphorylierungsstatus von LmxNOP10p in den Parasiten untersucht werden. Standardmäßig wird dazu das Protein mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers, der LmxNOP10p erkennt, aus den Leishmanien immunpräzipitiert. Leider stand für diese Arbeit aber ein solcher Antikörper nicht zur Verfügung. Daher wurde versucht in den Parasiten ein NOP10p zu exprimieren, dass mit einem N-terminalen TY-Tag versehen war. Obwohl die transfizierte DNA in den selektierten Klonen vorhanden war, konnte das Fusionsprotein nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise lag das Expressionsniveau des Proteins unter der Nachweisgrenze des Antikörpers. Daher sollte dieser Ansatz in zukünftigen Versuchen mit einem anderen Tag wiederholt werden. Eine sehr milde Möglichkeit zur Aufreinigung von Proteinen besteht bei dem TAP-Tag. Dieser ist dafür aber deutlich größer, womit ein Übertragen der gewonnenen Daten auf das Wt-Protein nur bedingt möglich ist.

Aber selbst wenn bei LmxNOP10p eine Phosphorylierung nachgewiesen werden sollte, scheint es noch fragwürdig, ob LmxNOP10p tatsächlich das Substrat von LmxMPK13 ist. Für die meisten snoRNAs in *L. major* konnte die Ziel-rRNA vorhergesagt werden. Dabei handelt es sich entweder um große oder um kleine rRNA-Untereinheiten. Wie eine Pseudouridylierung einer dieser rRNAs zu einer Änderung der Flagellenlänge führen soll, was dem Phänotyp der *LmxMPK13*-Nullmutante entspricht, ist dabei aber völlig unklar. Für das bekannteste H/ACA-Beispiel in *T. brucei* SLA1 haben Barth et al. die Hypothese aufgestellt, dass SLA1 hauptsächlich als Chaperon für die SL-RNA dient (Barth et al., 2005) und somit auch einer weiteren Funktion nachkommt, als einzig und allein der Pseudouridylierung. Ebenso konnte bereits gezeigt werden, dass Cbf5p, Gar1p und Nop10p gemeinsam einen Komplex bilden können, ohne Nhp2p und einer snoRNA. Cbf5p und Nop10p können sogar direkt aneinander binden (Henras et al., 2004). Möglicherweise kann NOP10p in Leishmanien auch noch weiteren Funktionen nachkommen, als bisher angenommen wurde.

Interessant ist ein Vergleich der Daten aus der PREDIKIN-Untersuchung von LmxMPK13 mit der Sequenz von LmxNOP10p. Die Daten aus dem PREDIKIN-Programm wurden nicht weiter verwendet, da für die Position +1 keine Vorhersage gemacht werden konnte. An den Positionen -2 und -1 passen die Vorhersagen genau auf LmxNOP10p. An Position -3 befindet sich ein Alaninrest anstelle des vorhergesagten Methionins. An den Positionen +2 und +3 besitzt LmxNOP10p jeweils einen Aspartatrest anstatt des vorhergesagten Methionins oder Valins bzw. des Asparagins oder Serins. Die Größe dieser Aminosäurereste ist ähnlich der des Aspartats. Somit passt LmxNOP10p zwar nicht perfekt zu der

vorhergesagten Konsensussequenz aus dem PREDIKIN-Programm, hat aber eindeutig Ähnlichkeiten.

Sollte sich LmxNOP10p nicht als Substrat von LmxMPK13 bestätigen, müsste versucht werden auf andere Art und Weise das Substrat zu identifizieren. Zusätzlich zu den unter 5.1.2 bereits beschriebenen Möglichkeiten um Substrate von Kinasen zu identifizieren, kann für MAP Kinasen auch ein so genannter Peptid-Chip zum Einsatz kommen. Auf solchen Chips befinden sich Peptide, die Phosphorylierungsstellen verschiedenster Kinase-Substrate besitzen (Hayashi et al., 2005). Wird dieser Chip mit rekombinanter aktiver Kinase in Anwesenheit von [γ - 32 P]-ATP inkubiert, kann anhand der unterschiedlich stark phosphorylierten Peptide eine Konsensussequenz für die Phosphorylierungsstelle des Substrats gebildet werden.

5.6 LmxMPK9 und LmxMPK14

Da LmxMPK14 als Substrat von LmxPK4 ausgeschlossen werden konnte, aber trotzdem an der Flagellenlängenregulation beteiligt ist, war es durchaus interessant auch dieses Protein weitergehend zu untersuchen.

Durch Homologievergleiche wurden zwei Proteine im Menschen identifiziert, deren Aminosäuresequenz zu 50 bzw. 49 % identisch zu der von LmxMPK14 ist. Dabei handelt es sich um MAK (male germ cell-associated kinase) und ICK (intestinal cell kinase). Diese beiden sind nah miteinander verwandt und haben große Ähnlichkeit mit MAPKs und CDKs (Koji et al., 1992; Togawa et al., 2000). So verfügen sie unter anderem auch über das hoch konservierte TXY-Motiv. Während ICK mRNA in fast allen untersuchten menschlichen Geweben nachgewiesen werden konnte (Togawa et al., 2000; Yang et al., 2002), ist die Expression von MAK mRNA auf männliche Keimzellen während und nach der Meiose beschränkt (Matsushime et al., 1990). Da LmxMPK9 sehr hohe Homologie zu LmxMPK14 zeigt, ist es naheliegend, dass auch deren Aminosäuresequenz der von ICK und MAK ähnelt. So zeigt sie 54 % identische Aminosäuren mit ICK und 49 % mit MAK.

Fu et al. haben 2005 herausgefunden, dass ICK zwar auch durch eine duale Phosphorylierung am TDY-Motiv aktiviert wird, es sich bei der Phosphorylierung an Y159 aber um eine Autophosphorylierung handelt (Fu et al., 2005). Durch diese Autophosphorylierung kommt es zu einer Basalaktivität. Erst durch die zweite Phosphorylierung an T157 durch die Aktivator kinase wird die volle Aktivität erreicht. In der gleichen Veröffentlichung wurde auch dargelegt, dass T157 durch rekombinantes CAK1p phosphoryliert wird. Dabei handelt es sich um eine CDK-activating Kinase aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die höchste Homologie zu CAK1p im Menschen zeigt CCRK (cell cycle related kinase). Auch dieses Protein ist in der Lage ICK *in vitro* an T157 zu phosphorylieren und damit zu aktivieren (Fu et al., 2006). Die meiste Ähnlichkeit zu CCRK im

L. major-Genom zeigt CRK3 mit 41 % identischen Aminosäuren. Das entsprechende Homolog in *L. mexicana* LmxCRK3 wird von der Arbeitsgruppe von Jeremy Mottram in Glasgow/Schottland bearbeitet. Durch eine Coexpression mit His-Cyclin6 wird aktive, rekombinante LmxCRK3 erhalten. Dieses Protein wurde freundlicherweise für Kinase Aktivitätstest mit LmxMPK9 und LmxMPK14 zur Verfügung gestellt.

Wie unter 4.4.4 und 4.7.6 gezeigt wurde, kommt es durch LmxCRK3 nur zu einer leichten Phosphorylierung von LmxMPK9 und zu einer deutlich stärkeren Phosphorylierung von LmxMPK14. In Kombination mit LmxMPK14 bzw. der inaktiven LmxMPK14-KM phosphoryliert LmxCRK3 MBP etwas schwächer als wenn es allein mit MBP inkubiert wird. Dies könnte bedeuten, dass LmxCRK3 LmxMPK14 als Substrat dem MBP vorzieht. Um diese These zu untermauern, müsste untersucht werden, an welchen Aminosäureresten LmxMPK14 phosphoryliert wird. Dies kann zum einen durch Mutationsanalysen geschehen oder aber durch massenspektrometrische Untersuchungen. Wenn es sich bei LmxMPK14 um das Substrat von LmxCRK3 handelt, sollte eine Phosphorylierung allerdings zu einer Aktivierung von LmxMPK14 führen. Dies konnte in den durchgeführten Kinase Aktivitätstests jedoch nicht beobachtet werden. Bei der Interaktion von LmxPK4 mit LmxMPK13 war das gleiche Problem aufgetreten. In einem Kinasetest in dem beide rekombinanten Proteine separat zugegeben wurden, konnte nur eine Phosphorylierung von LmxMPK13 durch LmxPK4 beobachtet werden. Wurden diese coexprimiert, konnte aktivierte LmxMPK13 aufgereinigt werden. Möglicherweise besteht im Fall von LmxCRK3 und LmxMPK14 das gleiche Problem, dass die *in vitro*-Bedingungen des Kinasetests nicht optimal sind, wodurch eine Aktivierung nicht möglich ist. Da allerdings LmxCRK3 mit His-Cyclin6 coexprimiert wird, ist eine weitere Coexpression mit LmxMPK14 sehr schwierig. Die Firma Novagen bietet dazu ein Coexpressionssystem an mit dem bis zu vier Protein gleichzeitig exprimiert werden können. Dabei handelt es sich um zwei Coexpressionssysteme (pETDuet™ und pACYCDuet™) mit unterschiedlichen „Origin of replication“ und Resistenzmarkern sowie jeweils zwei MCS.

Zusätzlich zu den *in vitro*-Tests sollte in zukünftigen Versuchen auch die Situation in den Leishmanien untersucht werden. Dabei besteht wieder die Möglichkeit LmxMPK14 sowohl aus LmxWT als auch aus der Deletionsmutante von LmxCRK3 über einen Tag oder einen spezifischen Antikörper zu präzipitieren und anschließend Phosphorylierungen durch MS/MS zu identifizieren.

5.7 Einfluss der verschiedenen Signalwege auf die Regulation der Flagellenlänge

In dieser Arbeit wurden mehrere Proteinkinasen beschrieben, deren Deletion in den Parasiten entweder zu einer Verlängerung oder zu einer Verkürzung der Flagellen führten. Daher kann man davon ausgehen, dass LmxMPK3 und LmxMCK bei der Verlängerung der

Flagellen eine wichtige Rolle spielen und LmxPK4, LmxMPK9, LmxMPK13 und LmxMPK14 bei der Verkürzung. Wie diese Regulation genau stattfindet ist bisher noch nicht bekannt. Unwahrscheinlich ist, dass diese Kinasen auf RNA-Ebene eingreifen, da bei der Deletionsmutante von LmxMPK3 keine Reduktion der PFR mRNA-Menge gezeigt werden konnte, die Proteinmenge aber deutlich reduziert ist (unveröffentlichte Daten Erdmann und Wiese). Nun besteht die Möglichkeit, dass entweder die Menge an flagellaren Proteinen verändert wird oder aber dass Einfluss auf die Aktivität von Proteinen genommen wird, die aktiv am IFT beteiligt sind. Eventuell wird die Aktivität der Motorproteine Kinesin II oder Dynein1b durch Phosphorylierung beeinflusst. Es ist vorstellbar, dass LmxMKK und LmxMPK3 den anterograden Transport fördern. Werden diese Proteine deletiert, findet der Proteintransport in das Flagellum nur noch auf einer niedrigen Stufe statt. Der retrograde Transport funktioniert hingegen weiterhin, wodurch mehr Flagellenbestandteile aus dem Flagellum heraus transportiert werden als hinein. Dadurch würde das Flagellum schrumpfen. Oder aber die Beladung der Transportpartikel könnte reguliert werden. Wurden in der Alge *C. reinhardtii* die Flagellen chemisch induziert eingeschmolzen, wanderten Transportpartikel ohne flagellare Bausteine in das Flagellum und transportierten die abgebauten Flagellenbestandteile in den Zellkörper (Pan und Snell, 2005).

LmxPK4, LmxMPK9, LmxMPK13 und LmxMPK14 hingegen könnten den retrograden Transport fördern. Durch deren Deletion würde der Proteintransport von der Flagellenspitze zum Zellkörper gehemmt werden und somit schwächer werden als der anterograde Transport. Dieser Überschuss an flagellarem Material an der Flagellenspitze könnte zu einer Verlängerung des Flagellums führen. Da der beobachtete Effekt nur so gering ist, lässt sich damit erklären, dass anscheinend mehrere Signalwege für die Verkürzung der Flagellen zuständig sind. Wird einer dieser Wege unterbrochen, können die anderen dessen Aufgabe größtenteils übernehmen. Möglicherweise würde die gleichzeitige Deletion von LmxMPK9, LmxMPK13 und LmxMPK14 zu einer deutlicheren Verlängerung der Flagellen führen.

Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass diese Signalwege der Hemmung jeweils einer Richtung des IFT dienen. LmxMKK und LmxMPK3 könnten den retrograden Transport hemmen. Durch die Deletion wird die Hemmung unterbrochen und es tritt ein verstärkter Transport von der Flagellenspitze zum Zellkörper ein, was wiederum ein kürzeres Flagellum zur Folge hätte. Ebenso könnten LmxPK4, LmxMPK9, LmxMPK13 und LmxMPK14 den anterograden Transport hemmen.

6. Zusammenfassung

Leishmanien sind parasitische Protozoen mit einem zweigeteilten Lebenszyklus. Die Promastigoten sind spindelförmig, tragen am vorderen Ende der Zelle ein Flagellum und leben im Darm von Sandmücken. Die Amastigoten hingegen leben im Phagolysosom von Makrophagen des Säugetierwirts. Sie sind oval und kleiner als die Promastigoten und das Flagellum ist soweit verkürzt, dass es nicht aus der Flagellartasche herausragt.

Mit *LmxMCK* wurde bereits 2003 ein MAP Kinase Kinase Homolog beschrieben, dessen Deletion zu einer deutlichen Verkürzung der Flagellen führt. In der vorliegenden Arbeit wurde das entsprechende Protein weiter charakterisiert. Mit *LmxMPK3* konnte ein Substrat von *LmxMCK* identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die erste nachgewiesene Interaktion einer MAP Kinase Kinase mit einer MAP Kinase in Trypanosomatiden, die auch in *in vivo* Versuchen bestätigt wurde. In *in vitro* Versuchen konnte eine *Feedback*-Phosphorylierung von *LmxMCK* durch *LmxMPK3* beobachtet werden.

Auf der Suche nach weiteren Proteinkinasen, die an der Regulation der Flagellenlänge beteiligt sind, wurden *LmxMPK9* und *LmxPK4* genauer untersucht. Die Deletion der entsprechenden Gene führte in beiden Fällen zu einer leichten Verlängerung der Flagellen. In *in vitro* Kinase Aktivitätstests konnte jedoch keine Aktivierung von *LmxMPK9* durch *LmxPK4* nachgewiesen werden. Die Sequenzierung des Genoms von *L. major* erlaubte die Identifizierung der potentiellen MAP Kinasen *LmxMPK13* und *LmxMPK14*. Die Deletion der beiden Gene führte auch hier zu Parasiten mit leicht verlängerten Flagellen. Tatsächlich konnte für *LmxMPK13* eine Aktivierung durch die Coexpression mit *LmxPK4* in *E. coli* beobachtet werden. *LmxMPK14* hingegen interagiert nicht mit *LmxPK4*. In MS/MS-Analysen konnte bestätigt werden, dass *LmxPK4* *LmxMPK13* sowohl am Threonin- als auch am Tyrosinrest des TEY-Motivs phosphoryliert. Allerdings wurden zusätzlich auch Phosphorylierungen am N- und C-Terminus von *LmxMPK13* identifiziert, deren Bedeutung noch nicht geklärt ist.

Durch aktivierte *LmxMPK13* wurden im Kinase Aktivitätstest mit Promastigotenlysaten Proteine mit einem niedrigen Molekulargewicht phosphoryliert. Diese konnten allerdings nicht direkt identifiziert werden. Das ungefähre Molekulargewicht und das Bedingung eines MAP Kinase Phosphorylierungsmotivs erlaubten die Eingrenzung auf zwei mögliche Substrate bei einer genomweiten Suche bei *L. major*. Eines davon, ein Homolog zu NOP10p, wurde im Kinase Aktivitätstest von der aktivierten *LmxMPK13* phosphoryliert und kann somit als *in vitro*-Substrat von *LmxMPK13* bezeichnet werden.

In dieser Arbeit gelang es das erste Mal Interaktionen zwischen MAP Kinase Kinasen und MAP Kinasen in *L. mexicana* nachzuweisen. Für *LmxMCK* und *LmxMPK3* konnte diese Interaktion *in vivo* bestätigt werden. Für *LmxPK4* und *LmxMPK13* konnte zusätzlich mit *LmxNOP10p* noch ein potentielles Substrat einer MAP Kinase identifiziert werden.

7. Summary

The protozoan parasite *Leishmania mexicana* has a digenetic life cycle. It lives extracellularly as flagellated promastigotes in the midgut of the insect vector, the phlebotomine sandfly. Following infection of a mammal, the promastigotes are taken up by macrophages. Here they differentiate into smaller, “non-flagellated” amastigotes within the phagolysosomes.

LmxMKK, a mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase of *Leishmania mexicana*, is required for growth of a full-length flagellum. In this work, LmxMPK3 could be identified as a substrate of LmxMKK. LmxMPK3 is phosphorylated and activated by LmxMKK *in vitro*. Furthermore LmxMKK is required for phosphorylation of LmxMPK3 *in vivo*. For the first time an interaction between a MAP kinase kinase and a MAP kinase has been demonstrated in *Leishmania*. Furthermore a feedback-phosphorylation of LmxMKK by LmxMPK3 was identified.

It had been shown before that LmxPK4 and LmxMPK9 are involved in flagellar shortening. Deletion mutants of these kinases display elongated flagella. However combined *in vitro* kinase assays revealed no activation of LmxMPK9 by LmxPK4. Once the sequencing project of the *L. major* genome was completed, the search for additional MAP kinases which could be involved in flagella length regulation led to the identification of two new MAP kinase genes, *LmxMPK13* and *LmxMPK14*. The deletion of either of these genes in *L. mexicana* resulted in a significant elongation of the flagellum. LmxMPK13 was activated by co-expression with LmxPK4 in *Escherichia coli*. A phosphorylation of the threonine and tyrosine residue of the TEY-motif of LmxMPK13 by LmxPK4 could be confirmed by tandem mass spectrometry analysis. Additional phosphorylations at the N- and C-terminus of LmxMPK13 were identified, but their function remains to be determined.

In *in vitro* kinase assays with lysates from promastigotes, activated LmxMPK13 phosphorylates several small proteins. As these proteins could not be identified directly by mass spectrometry analysis the genome of *L. major* was screened for proteins matching the criteria of low molecular weight and presence of a SP- or TP-motif. These are the typical phosphorylation sites of MAP kinases. One of them, LmxNOP10p, was indeed phosphorylated in protein kinase assays by the activated LmxMPK13. Therefore, LmxNOP10p is at least an *in vitro*-substrate of LmxMPK13.

To conclude, I have demonstrated an *in vitro* interaction between MAP kinase kinases and MAP kinases for LmxMKK and LmxMPK3, and LmxPK4 and LmxMPK13, respectively. Moreover, the interaction between LmxMKK and LmxMPK3 could be verified *in vivo*. Finally, I have identified LmxNOP10p as a potential substrate of LmxMPK13. Thus for the first time a signal transduction cascade with three elements was shown in *Leishmania*.

8. Literaturverzeichnis

- Acharya, U., Mallabiabarrena, A., Acharya, J.K. und Malhotra, V. (1998) Signaling via mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis. *Cell*, **92**, 183-192.
- Agron, P.G., Reed, S.L. und Engel, J.N. (2005) An essential, putative MEK kinase of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*, **142**, 121-125.
- Alessi, D.R., Saito, Y., Campbell, D.G., Cohen, P., Sithanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C.J., Cowley, S. (1994) Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J*, **13**, 1610-1619.
- Bachelier, J.P., Cavaille, J. und Huttenhofer, A. (2002) The expanding snoRNA world. *Biochimie*, **84**, 775-790.
- Bardwell, A.J., Flatauer, L.J., Matsukuma, K., Thorner, J., Bardwell, L. (2001) A conserved docking site in MEKs mediates high-affinity binding to MAP kinases and cooperates with a scaffold protein to enhance signal transmission. *J Biol Chem*, **276**, 10374-10386.
- Barth, S., Hury, A., Liang, X.H. und Michaeli, S. (2005) Elucidating the role of H/ACA-like RNAs in trans-splicing and rRNA processing via RNA interference silencing of the *Trypanosoma brucei* CBF5 pseudouridine synthase. *J Biol Chem*, **280**, 34558-34568.
- Bastin, P., MacRae, T.H., Francis, S.B., Matthews, K.R. und Gull, K. (1999) Flagellar morphogenesis: protein targeting and assembly in the paraflagellar rod of trypanosomes. *Mol Cell Biol*, **19**, 8191-8200.
- Bastin, P., Pullen, T.J., Moreira-Leite, F.F. und Gull, K. (2000) Inside and outside of the trypanosome flagellum: a multifunctional organelle. *Microbes Infect*, **2**, 1865-1874.
- Bates, P.A., Robertson, C.D., Tetley, L. und Coombs, G.H. (1992) Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology*, **105 (Pt 2)**, 193-202.
- Bengs, F., Scholz, A., Kuhn, D. und Wiese, M. (2005) LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol*, **55**, 1606-1615.
- Berman, J.D. (1997) Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis*, **24**, 684-703.
- Berman, S.A., Wilson, N.F., Haas, N.A. und Lefebvre, P.A. (2003) A novel MAP kinase regulates flagellar length in *Chlamydomonas*. *Curr Biol*, **13**, 1145-1149.
- Beverly, S.M. (1991) Gene amplification in *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol*, **45**, 417-444.
- Bogdan, C., Donhauser, N., Doring, R., Rollinghoff, M., Diefenbach, A. und Rittig, M.G. (2000) Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med*, **191**, 2121-2130.
- Bringaud, F., Baltz, D. und Baltz, T. (1998) Functional and molecular characterization of a glycosomal PPI-dependent enzyme in trypanosomatids: pyruvate, phosphate dikinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7963-7968.
- Brinkworth, R.I., Breinl, R.A. und Kobe, B. (2003) Structural basis and prediction of substrate specificity in protein serine/threonine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 74-79.
- Brittingham, A. und Mosser, D.M. (1996) Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol Today*, **12**, 444-447.
- Brun, R. und Schönenberger, M. (1979) Cultivation and *in vitro* cloning of procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. *Acta Trop*, **36**, 289-292.
- Calderini, O., Glab, N., Bergounioux, C., Heberle-Bors, E., Wilson, C. (2001) A novel tobacco mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase, NtMEK1, activates the cell cycle-regulated p43Ntf6 MAP kinase. *J Biol Chem*, **276**, 18139-18145.
- Caux, C., Liu, Y.J. und Banchereau, J. (1995) Recent advances in the study of dendritic cells and follicular dendritic cells. *Immunol Today*, **16**, 2-4.
- Chang, L. und Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410**, 37-40.
- Clayton, C.E. (1999) Genetic manipulation of kinetoplastida. *Parasitol Today*, **15**, 372-378.
- Clayton, C.E. (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *Embo J*, **21**, 1881-1888.
- Cobb, M.H., Goldsmith, E.J. (1995) How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* **270**, 14843-14846.

- Cohen, P., Knebel, A. (2006) KESTREL: a powerful method for identifying the physiological substrates of protein kinases. *Biochem J*, **393**, 1-6.
- Cole, D.G., Diener, D.R., Himelblau, A.L., Beech, P.L., Fuster, J.C. und Rosenbaum, J.L. (1998) *Chlamydomonas* kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons. *J Cell Biol*, **141**, 993-1008.
- Croft, S.L. und Coombs, G.H. (2003) Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol*, **19**, 502-508.
- Das, A. und Bellofatto, V. (2003) RNA polymerase II-dependent transcription in trypanosomes is associated with a SNAP complex-like transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 80-85.
- De Castro, S.L. und Luz, M.R. (1993) The second messenger cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in pathogenic microorganisms with special reference to protozoa. *Can J Microbiol*, **39**, 473-479.
- Dell, K.R. und Engel, J.N. (1994) Stage-specific regulation of protein phosphorylation in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*, **64**, 283-292.
- Domenicali Pfister, D., Burkard, G., Morand, S., Renggli, C.K., Roditi, I. und Vassella, E. (2006) A Mitogen-activated protein kinase controls differentiation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell*, **5**, 1126-1135.
- Duncan, R., Alvarez, R., Jaffe, C.L., Wiese, M., Klutch, M., Shakarian, A., Dwyer, D. und Nakhasi, H.L. (2001) Early response gene expression during differentiation of cultured *Leishmania donovani*. *Parasitol Res*, **87**, 897-906.
- Eblen, S.T., Slack-Davis, J.K., Tarcsafalvi, A., Parsons, J.T., Weber, M.J. und Catling, A.D. (2004) Mitogen-activated protein kinase feedback phosphorylation regulates MEK1 complex formation and activation during cellular adhesion. *Mol Cell Biol*, **24**, 2308-2317.
- Eblen, S.T., Kumar, N.V., Shah, K., Henderson, M.J., Watts, C.K., Shokat, K.M., Weber, M.J. (2003) Identification of novel ERK2 substrates through use of an engineered kinase and ATP analogs. *J Biol Chem*, **278**, 14926-14935.
- Ellis, J., Sarkar, M., Hendriks, E. und Matthews, K. (2004) A novel ERK-like, CRK-like protein kinase that modulates growth in *Trypanosoma brucei* via an autoregulatory C-terminal extension. *Mol Microbiol*, **53**, 1487-1499.
- Erdmann, M., Scholz, A., Melzer, I.M., Schmetz, C. und Wiese, M. (2006) Interacting protein kinases involved in the regulation of flagellar length. *Mol Biol Cell*, **17**, 2035-2045.
- Erickson, A.K., Payne, D.M., Martino, P.A., Rossomando, A.J., Shabanowitz, J., Weber, M.J., Hunt, D.F., Sturgill, T.W. (1990) Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. **265**, 19728-19735.
- Evans, T.G., Reed, S.S. und Hibbs, J.B., Jr. (1996) Nitric oxide production in murine leishmaniasis: correlation of progressive infection with increasing systemic synthesis of nitric oxide. *Am J Trop Med Hyg*, **54**, 486-489.
- Farina, M., Arrias, M., Souto-Padron, T., De Souza, W. (1986) Further studies of the organization of the paraxial rod of Trypanosomatids. *J Protozool.*, **33**, 552-557.
- Fiol, C.J., Mahrenholz, A.M., Wang, Y., Roeske, R.W. und Roach, P.J. (1987) Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. *J Biol Chem*, **262**, 14042-14048.
- Fleming, Y., Armstrong, C.G., Morrice, N., Paterson, A., Goedert, M. und Cohen, P. (2000) Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7. *Biochem J*, **352 Pt 1**, 145-154.
- Frame, S., Cohen, P. und Biondi, R.M. (2001) A Common Phosphate Binding Site Explains the Unique Substrate Specificity of GSK3 and Its Inactivation by Phosphorylation. *Mol Cell*, **7**, 1321-1327.

- Fu, Z., Larson, K.A., Chitta, R.K., Parker, S.A., Turk, B.E., Lawrence, M.W., Kaldis, P., Galaktionov, K., Cohn, S.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. und Sturgill, T.W. (2006) Identification of yin-yang regulators and a phosphorylation consensus for male germ cell-associated kinase (MAK)-related kinase. *Mol Cell Biol*, **26**, 8639-8654.
- Fu, Z., Schroeder, M.J., Shabanowitz, J., Kaldis, P., Togawa, K., Rustgi, A.K., Hunt, D.F. und Sturgill, T.W. (2005) Activation of a nuclear Cdc2-related kinase within a mitogen-activated protein kinase-like TDY motif by autophosphorylation and cyclin-dependent protein kinase-activating kinase. *Mol Cell Biol*, **25**, 6047-6064.
- Fukunaga, R., Hunter, T. (1997) MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J*, **16**, 1921-1933.
- Gale, M., Jr. und Parsons, M. (1993) A *Trypanosoma brucei* gene family encoding protein kinases with catalytic domains structurally related to Nek1 and NIMA. *Mol Biochem Parasitol*, **59**, 111-121.
- Gibson, W. und Bailey, M. (1994) Genetic exchange in *Trypanosoma brucei*: evidence for meiosis from analysis of a cross between drug-resistant transformants. *Mol Biochem Parasitol*, **64**, 241-252.
- Gilinger, G. und Bellofatto, V. (2001) Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res*, **29**, 1556-1564.
- Goldsmith, E.J. (1996) Allosteric enzymes as models for chemomechanical energy transducing assemblies. *Faseb J*, **10**, 702-708.
- Gossage, S.M., Rogers, M.E. und Bates, P.A. (2003) Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol*, **33**, 1027-1034.
- Grant, K.G., Hassan, P., Anderson, J.S. und Mottram, J. (1998) The *crk3* gene of *Leishmania mexicana* encodes a stage-regulated cdc2-related Histone H1 kinase that associates with p12^{cks1}. *J Biol Chem*, **273**, 10153-9.
- Guan, K.L. und Dixon, J.E. (1991) Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem*, **192**, 262-267.
- Habelhah, H., Shah, K., Huang, L., Burlingame, A.L., Shokat, K.M., Ronai, Z. (2001) Identification of new JNK substrate using ATP pocket mutant JNK and a corresponding ATP analogue. *J Biol Chem*, **276**, 18090-18095.
- Hammarton, T.C., Kramer, S., Tetley, L., Boshart, M. und Mottram, J.C. (2007) *Trypanosoma brucei* Polo-like kinase is essential for basal body duplication, kDNA segregation and cytokinesis. *Mol Microbiol*, **65**, 1229-1248.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Handman, E. (2001) Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev*, **14**, 229-243.
- Hanks, S.K. und Quinn, A.M. (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol*, **200**, 38-62.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. und Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, **241**, 42-52.
- Hardin, S.C., Wolniak, S.M. (1998) Molecular cloning and characterization of maize ZmMEK1, a protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen- and stress-activated protein kinase kinases. *Planta*, **206**, 577-584.
- Harris, K., Lamson, R.E., Nelson, B., Hughes, T.R., Marton, M.J., Roberts, C.J., Boone, C., Pryciak, P.M. (2001) Role of scaffolds in MAP kinase pathway specificity revealed by custom design of pathwaydedicated signaling proteins. *Curr Biol*, **11**, 1815-1824.
- Hassan, P., Fergusson, D., Grant, K.M. und Mottram, J.C. (2001) The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*, **113**, 189-198.

- Hayashi, M., Fearn, C., Eliceiri, B., Yang, Y., Lee, J.D. (2005) Big mitogen-activated protein kinase 1/extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway is essential for tumor-associated angiogenesis. *Cancer Res*, **65**, 7699-7706.
- Haystead, T.A., Dent, P., Wu, J., Haystead, C.M. und Sturgill, T.W. (1992) Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase. *FEBS Lett.*, **306**, 17-22.
- Henras, A.K., Capecyrou, R., Henry, Y. und Caizergues-Ferrer, M. (2004) Cbf5p, the putative pseudouridine synthase of H/ACA-type snoRNPs, can form a complex with Gar1p and Nop10p in absence of Nhp2p and box H/ACA snoRNAs. *Rna*, **10**, 1704-1712.
- Hepburn, N.C. (2003) Cutaneous leishmaniasis: an overview. *J Postgrad Med*, **49**, 50-54.
- Hermoso, T., Fishelson, Z., Becker, S.I., Hirschberg, K. und Jaffe, C.L. (1991) Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. *Embo J*, **10**, 4061-4067.
- Hua, S.B. und Wang, C.C. (1994) Differential accumulation of a protein kinase homolog in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biochem*, **54**, 20-31.
- Huang, H., Werner, C., Weiss, L.M., Wittner, M. und Orr, G.A. (2002) Molecular cloning and expression of the catalytic subunit of protein kinase A from *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*, **32**, 1107-1115.
- Huse, M. und Kuriyan, J. (2002) The conformational plasticity of protein kinases. *Cell*, **109**, 275-282.
- Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S.M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C.V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R.M., Cronin, A., Cruz, A.K., Davies, R.M., De Gaudenzi, J., Dobson, D.E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A.C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J.C., Muller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'Neil, S., Pentony, M., Pohl, T.M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J.C., Rutter, S., Saunders, D., Schafer, M., Schein, J., Schwartz, D.C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D.F., Blackwell, J.M., Stuart, K.D., Barrell, B. und Myler, P.J. (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, **309**, 436-442.
- Johnson, L.N., Noble, M.E. und Owen, D.J. (1996) Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*, **85**, 149-158.
- Joiner, A.K. (1988) Molecular Basis of Interactions between Parasites und the Complement Cascade. *The Biology of Parasitism*, 309-328.
- Kallunki, T., Su, B., Tsigelny, I., Sluss, H.K., Derijard, B., Moore, G., Davis, R. und Karin, M. (1994) JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev*, **8**, 2996-3007.
- Kamhawi, S. (2006) Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*, **22**, 439-445.
- Kasler, H.G., Victoria, J., Duramad, O. und Winoto, A. (2000) ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8382-8389
- Killick-Kendrick, R. (1990) The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann Parasitol Hum Comp*, **65 Suppl 1**, 37-42.
- Kleevernic, I.V., Stafford, M.J., Morrice, N., Pegg, M., Morton, S. und Cohen, P. (2006) Characterization of the reversible phosphorylation and activation of ERK8. *Biochem J*, **394**, 365-373.
- Knebel, A., Morrice, N., Cohen, P. (2001) A novel method to identify protein kinase substrates: eEF2 kinase is phosphorylated and inhibited by SAPK4/p38delta. *EMBO J*, **20**, 4360-4369.
- Kohl, L., Robinson, D. und Bastin, P. (2003) Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis und cytokinesis of trypanosomes. *Embo J*, **22**, 5336-5346.

- Koji, T., Jinno, A., Matsushime, H., Shibuya, M. und Nakane, P.K. (1992) In situ localization of male germ cell-associated kinase (mak) mRNA in adult mouse testis: specific expression in germ cells at stages around meiotic cell division. *Cell Biochem Funct*, **10**, 273-279.
- Kozminski, K.G., Beech, P.L. und Rosenbaum, J.L. (1995) The *Chlamydomonas* kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane. *J Cell Biol*, **131**, 1517-1527.
- Krupa, A., Preethi, G. und Srinivasan, N. (2004) Structural modes of stabilization of permissive phosphorylation sites in protein kinases: distinct strategies in Ser/Thr and Tyr kinases. *J Mol Biol*, **339**, 1025-1039.
- Kuhn, D. (2004) In vitro und in vivo Analyse von LmxPK4, einer MAP Kinase Kinase aus *Leishmania mexicana*. *Fachbereich Chemie*. Universität Hamburg, Hamburg, p. 152.
- Kuhn, D. und Wiese, M. (2005) LmxPK4, a mitogen-activated protein kinase kinase homologue of *Leishmania mexicana* with a potential role in parasite differentiation. *Mol Microbiol*, **56**, 1169-1182.
- Kyriakis, J.M. und Avruch, J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, **81**, 807-869.
- Laufer, G. und Gunzl, A. (2001) In-vitro competition analysis of procyclin gene and variant surface glycoprotein gene expression site transcription in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **113**, 55-65.
- Lawler, S., Fleming, Y., Goedert, M. und Cohen, P. (1998) Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases *in vitro*. *Curr. Biol*, **8**, 1387-1390.
- Lee, K., Du, C., Horn, M. und Rabinow, L. (1996) Activity and autophosphorylation of LAMMER protein kinases. *J Biol Chem*, **271**, 27299-27303.
- Lee, S.A. und Hasbun, R. (2003) Therapy of cutaneous leishmaniasis. *Int J Infect Dis*, **7**, 86-93.
- Liang, X.H., Hury, A., Hoze, E., Uliel, S., Myslyuk, I., Apatoff, A., Unger, R. und Michaeli, S. (2007) Genome-wide analysis of C/D and H/ACA-like small nucleolar RNAs in *Leishmania major* indicates conservation among trypanosomatids in the repertoire and in their rRNA targets. *Eukaryot Cell*, **6**, 361-377.
- Mair, G., Shi, H., Li, H., Djikeng, A., Aviles, H.O., Bishop, J.R., Falcone, F.H., Gavrilescu, C., Montgomery, J.L., Santori, M.I., Stern, L.S., Wang, Z., Ullu, E. und Tschudi, C. (2000) A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *Rna*, **6**, 163-169.
- Mansour, S.J., Candia, J.M., Gloor, K.K., Ahn, N.G. (1996) Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAPKK1) and MAPKK2 mediate similar transcriptional and morphological responses. *Cell Growth & Differentiation*, **7**, 243-250.
- Marcus, S., Polverino, A., Barr, M. und Wigler, M. (1994) Complexes between STE5 and components of the pheromone-responsive mitogen-activated protein kinase module. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7762-7766.
- Marshall, W.F. und Rosenbaum, J.L. (2001) Intraflagellar transport balances continuous turnover of outer doublet microtubules: implications for flagellar length control. *J Cell Biol*, **155**, 405-414.
- Matsushime, H., Jinno, A., Takagi, N. und Shibuya, M. (1990) A novel mammalian protein kinase gene (mak) is highly expressed in testicular germ cells at and after meiosis. *Mol Cell Biol*, **10**, 2261-2268.
- Matte, A., Tari, L.W. und Delbaere, L.T. (1998) How do kinases transfer phosphoryl groups? *Structure*, **6**, 413-419.
- Matthews, K.R., Tschudi, C. und Ullu, E. (1994) A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev*, **8**, 491-501.
- Medina-Acosta, E. und Cross, G.A. (1993) Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. *Mol Biochem Parasitol*, **59**, 327-329.
- Melzer, I.M. (2007) Biochemische Charakterisierung von LmxMPK1, einer essentiellen MAP Kinase aus *Leishmania mexicana*. *Fachbereich Chemie*. Universität Hamburg, Hamburg.
- Mishra, K.K., Holzer, T.R., Moore, L.L. und LeBowitz, J.H. (2003) A negative regulatory element controls mRNA abundance of the *Leishmania mexicana* Paraflagellar rod gene PFR2. *Eukaryot Cell*, **2**, 1009-1017.

- Mody, N., Campbell, D.G., Morrice, N., Pegg, M. und Cohen, P. (2003) An analysis of the phosphorylation and activation of extracellular-signal-regulated kinase 5 (ERK5) by mitogen-activated kinase kinase 5 (MKK5) *in vitro*. *Biochem J*, **372**, 567-575.
- Morrison, D.K., Davis, R.J. (2003) Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19:91-118**. 91-118.
- Mottram, J.C. (1994) cdc2-related protein kinases and cell cycle control in trypanosomatids. *Parasitol Today*, **10**, 253-257.
- Mottram, J.C., Kinnaird, J.H., Shiels, B.R., Tait, A. und Barry, J.D. (1993) A novel CDC2-related protein kinase from *Leishmania mexicana*, LmmCRK1, is post-translationally regulated during the life cycle. *J Biol Chem*, **268**, 21044-21052.
- Mottram, J.C., McCready, B.P., Brown, K.G. und Grant, K.M. (1996) Gene disruptions indicate an essential function for the LmmCRK1 cdc2-related kinase of *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol*, **22**, 573-583.
- Muller, I.B., Domenicali-Pfister, D., Roditi, I. und Vassella, E. (2002) Stage-specific requirement of a mitogen-activated protein kinase by *Trypanosoma brucei*. *Mol Biol Cell*, **13**, 3787-3799.
- Müller, J., Cacace, A.M., Lyons, W.E., McGill, C.B., Morrison, D.K. (2000) Identification of B-KSR1, a novel brain-specific isoform of KSR1 that functions in neuronal signaling. *Mol Cell Biol*, **20**, 5529-5539.
- Murray, H.W. (1994) Cytokines in the treatment of leishmaniasis. *Baillieres Clinical Infectious Diseases*, **1**, 127-143.
- Nakaar, V., Gunzl, A., Ullu, E. und Tschudi, C. (1997) Structure of the *Trypanosoma brucei* U6 snRNA gene promoter. *Mol Biochem Parasitol*, **88**, 13-23.
- Nakielny, S., Campbell, D.G., Cohen, P. (1992) MAP kinase kinase from rabbit skeletal muscle. A novel dual specificity enzyme showing homology to yeast protein kinases involved in pheromone-dependent signal transduction. *FEBS Lett*, **308**, 183-189.
- Nascimento, M., Zhang, W.W., Ghosh, A., Houston, D.R., Berghuis, A.M., Olivier, M. und Matlashewski, G. (2006) Identification and characterization of a protein-tyrosine phosphatase in *Leishmania*: Involvement in virulence. *J Biol Chem*, **281**, 36257-36268.
- Naula, C. und Seebeck, T. (2000) Cyclic AMP signaling in trypanosomatids. *Parasitol Today*, **16**, 35-38.
- Nolen, B., Taylor, S. und Ghosh, G. (2004) Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell*, **15**, 661-675.
- Norbury, C., Blow, J. und Nurse, P. (1991) Regulatory phosphorylation of the p34^{cdc2} protein kinase in vertebrates. *EMBO J*, **10**, 3321-3329.
- Nozaki, T., Toh-e, A., Fujii, M., Yagisawa, H., Nakazawa, M. und Takeuchi, T. (1999) Cloning and characterization of a gene encoding phosphatidyl inositol-specific phospholipase C from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, **102**, 283-295.
- Ohmachi, M., Rocheleau, C.E., Church, D., Lambie, E., Schedl, T., Sundaram, M.V. (2002) *C. elegans* ksr-1 and ksr-2 have both unique and redundant functions and are required for MPK-1 ERK phosphorylation. *Curr Biol*, **12**, 427-433.
- Ohren, J.F., Chen, H., Pavlovsky, A., Whitehead, C., Zhang, E., Kuffa, P., Yan, C., McConnell, P., Spessard, C., Banotai, C., Müller, W.T., Delaney, A., Omer, C., Sebolt-Leopold, J., Dudley, D.T., Leung, I.K., Flamme, C., Warmus, J., Kaufmann, M., Barrett, S., Teclé, H. und Hasemann, C.A. (2004) Structures of human MAP kinase kinase1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 1192-7.
- Overath, P., Stierhof, Y.D. und Wiese, M. (1997) Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites - Tumultuous traffic in a pocket. *Trends Cell Biol*, **7**, 27-33.
- Pan, J., Wang, Q. und Snell, W.J. (2004) An aurora kinase is essential for flagellar disassembly in *Chlamydomonas*. *Dev Cell*, **6**, 445-451.
- Pan, J. und Snell, W.J. (2005) *Chlamydomonas* shortens its flagella by activating axonemal disassembly, stimulating IFT particle trafficking, and blocking anterograde cargo loading. *Dev Cell*, **9**, 431-438.

- Park, S.H., Zarrinpar, A., Lim, W.A. (2003) Rewiring MAP kinase pathways using alternative scaffold assembly mechanisms. *Science*, **299**, 1061-1064.
- Parsons, M., Ledbetter, J.A., Schieven, G.L., Nel, A.E. und Kanner, S.B. (1994) Developmental regulation of pp44/46, tyrosine-phosphorylated proteins associated with tyrosine/serine kinase activity in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **63**, 69-78.
- Parsons, M. und Ruben, L. (2000) Pathways involved in environmental sensing in trypanosomatids. *Parasitol Today*, **16**, 56-62.
- Parsons, M., Worthey, E.A., Ward, P.N. und Mottram, J.C. (2005) Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*, **6**, 127.
- Pazour, G.J., Dickert, B.L. und Witman, G.B. (1999) The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly. *J Cell Biol*, **144**, 473-481.
- Peacock, C.S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J.C., Quail, M.A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajawndream, M.A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Ormond, D., Rutter, S., Squares, R., Whitehead, S., Rabbinowitsch, E., Arrowsmith, C., White, B., Thurston, S., Bringaud, F., Baldauf, S.L., Faulconbridge, A., Jeffares, D., Depledge, D.P., Oyola, S.O., Hilley, J.D., Brito, L.O., Tosi, L.R., Barrell, B., Cruz, A.K., Mottram, J.C., Smith, D.F. und Berriman, M. (2007) Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet*, **39**, 839-847.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K. und Cobb, M.H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, **22**, 153-183.
- Pellicena, P. und Kuriyan, J. (2006) Protein-protein interactions in the allosteric regulation of protein kinases. *Curr Opin Struct Biol*, **16**, 702-709.
- Piperno, G. und Mead, K. (1997) Transport of a novel complex in the cytoplasmic matrix of *Chlamydomonas* flagella. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4457-4462.
- Pradel, L.C., Bonhivers, M., Landrein, N. und Robinson, D.R. (2006) NIMA-related kinase TbNRKC is involved in basal body separation in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*, **119**, 1852-1863.
- Proudfoot, L., O'Donnell, C.A. und Liew, F.Y. (1995) Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol*, **25**, 745-750.
- Puentes, S.M., Da Silva, R.P., Sacks, D.L., Hammer, C.H. und Joiner, K.A. (1990) Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J Immunol*, **145**, 4311-4316.
- Rascon, A., Vilorio, M.E., De-Chiara, L. und Dubra, M.E. (2000) Characterization of cyclic AMP phosphodiesterases in *Leishmania mexicana* and purification of a soluble form. *Mol Biochem Parasitol*, **106**, 283-292.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., Seraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol*, **17**, 1030-1032.
- Robinson, K.A. und Beverley, S.M. (2003) Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*, **128**, 217-228.
- Rogers, M.E., Chance, M.L. und Bates, P.A. (2002) The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, **124**, 495-507.
- Rolin, S., Paindavoine, P., Hanocq-Quertier, J., Hanocq, F., Claes, Y., Le Ray, D., Overath, P. und Pays, E. (1993) Transient adenylate cyclase activation accompanies differentiation of *Trypanosoma brucei* from bloodstream to procyclic forms. *Mol Biochem Parasitol*, **61**, 115-125.
- Rosenbaum, J.L. und Witman, G.B. (2002) Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 813-825.

- Sanchez, M.A., Zeoli, D., Klamo, E.M., Kavanaugh, M.P. und Landfear, S.M. (1995) A family of putative receptor-adenylate cyclases from *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*, **270**, 17551-17558.
- Schlein, Y., Jacobson, R.L. und Messer, G. (1992) *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 9944-9948.
- Schlein, Y., Jacobson, R.L. und Shlomai, J. (1991) Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proc Biol Sci*, **245**, 121-126.
- Scholey, J.M. (2003) Intraflagellar transport. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 423-443.
- Scholz, A. (2003) Charakterisierung eines Mitogen-aktivierten Proteinkinase Kinase Homologs aus *Leishmania mexicana*. *Fachbereich Bio-, Chemie- und Verfahrenstechnik*. Fachhochschule Lausitz, Senftenberg, p. 69.
- Shah, K., Liu, Y., Deirmengian, C., Shokat, K.M. (1997) Engineering unnatural nucleotide specificity for Rous sarcoma virus tyrosine kinase to uniquely label its direct substrates. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 3565-3570.
- Sherwin, T. und Gull, K. (1989) Visualization of detyrosination along single microtubules reveals novel mechanisms of assembly during cytoskeletal duplication in trypanosomes. *Cell*, **57**, 211-221.
- Signor, D., Wedaman, K.P., Orozco, J.T., Dwyer, N.D., Bargmann, C.I., Rose, L.S. und Scholey, J.M. (1999) Role of a class DHC1b dynein in retrograde transport of IFT motors and IFT raft particles along cilia, but not dendrites, in chemosensory neurons of living *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*, **147**, 519-530.
- Song, L. und Dentler, W.L. (2001) Flagellar protein dynamics in *Chlamydomonas*. *J Biol Chem*, **276**, 29754-29763.
- Sorensen, A.L., Hey, A.S. und Kharazmi, A. (1994) *Leishmania major* surface protease Gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro. *Apmis*, **102**, 265-271.
- Sprague, G.F., Jr. (1991) Signal transduction in yeast mating: receptors, transcription factors, and the kinase connection. *Trends Genet*, **7**, 393-398.
- Stiles, J.K., Hicock, P.I., Shah, P.H. und Meade, J.C. (1999) Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol*, **93**, 781-807.
- Sundar, S. (2003) Indian kala-azar--better tools needed for diagnosis and treatment. *J Postgrad Med*, **49**, 29-30.
- Tam, L.W., Wilson, N.F. und Lefebvre, P.A. (2007) A CDK-related kinase regulates the length and assembly of flagella in *Chlamydomonas*. *J Cell Biol*, **176(6)**, 819-829.
- Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T. und Nishida, E. (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol*, **2**, 110-116.
- Tanoue, T. und Nishida, E. (2002) Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Pharmacol Ther*, **93**, 193-202.
- Tanoue, T. und Nishida, E. (2003) Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal*, **15**, 455-462.
- Taylor, M.C., Kelly, J.M., Chapman, C.J., Fairlamb, A.H. und Miles, M.A. (1994) The structure, organization, and expression of the *Leishmania donovani* gene encoding trypanothione reductase. *Mol Biochem Parasitol*, **64**, 293-301.
- Togawa, K., Yan, Y.X., Inomoto, T., Slaugenhaupt, S. und Rustgi, A.K. (2000) Intestinal cell kinase (ICK) localizes to the crypt region and requires a dual phosphorylation site found in map kinases. *J Cell Physiol*, **183**, 129-139.
- Ullu, E., Matthews, K.R. und Tschudi, C. (1993) Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. *Mol Cell Biol*, **13**, 720-725.
- Wanders, P. (2004) In vitro und in vivo Charakterisierung einer LmxMPK5-Deletionsmutante in *Leishmania mexicana*. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.
- Wang, Q., Melzer, I.M., Kruse, M., Sander-Juelch, C. und Wiese, M. (2005) LmxMPK4, a mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue essential for promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. *Kinetoplastid Biol Dis*, **4**, 6.

- Wang, Z., Harkins, P.C., Ulevitch, R.J., Han, J., Cobb, M.H. und Goldsmith, E.J. (1997) The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2327-2332.
- Watanabe, N., Arai, H., Nishihara, Y., Taniguchi, M., Hunter, T. und Osada, H. (2004) M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCF β -TrCP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4419-4424.
- Wiese, M. (1991) Klonierung des Gens einer membrangebundenen, sauren Phosphatase von *Leishmania mexicana*. *Fakultät für Biologie*. Universität Tübingen.
- Wiese, M. (1998) A mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue of *Leishmania mexicana* is essential for parasite survival in the infected host. *Embo J*, **17**, 2619-2628.
- Wiese, M. (2007) *Leishmania* MAP kinases--familiar proteins in an unusual context. *Int J Parasitol*, **37**, 1053-1062.
- Wiese, M., Kuhn, D. und Grunfelder, C.G. (2003a) Protein kinase involved in flagellar-length control. *Eukaryot Cell*, **2**, 769-777.
- Wiese, M., Wang, Q. und Gorcke, I. (2003b) Identification of mitogen-activated protein kinase homologues from *Leishmania mexicana*. *Int J Parasitol*, **33**, 1577-1587.
- Wilson, N.F. und Lefebvre, P.A. (2004) Regulation of flagellar assembly by glycogen synthase kinase 3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell*, **3**, 1307-1319.
- Yang, S.H., Yates, P.R., Whitmarsh, A.J., Davis, R.J. und Sharrocks, A.D. (1998) The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a mitogen-activated protein kinase targeting motif. *Mol Cell Biol*, **18**, 710-720.
- Yang, T., Jiang, Y. und Chen, J. (2002) The identification and subcellular localization of human MRK. *Biomol Eng*, **19**, 1-4.
- Yang, X., Hubbard, E.J., Carlson, M. (1992) A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science*, **257**, 680-682.
- Zheng, C.F., Guan, K.L. (1993) Cloning and characterization of two distinct human extracellular signalregulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *J Biol Chem*, **268**, 11435-11439.
- Zhong, L., Lu, H.G., Moreno, S.N. und Docampo, R. (1998) Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by *Trypanosoma cruzi* is linked to cell invasion. *FEMS Microbiol Lett*, **161**, 15-20.
- Zhou, C., Yang, Y. und Jong, A.Y. (1990) Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques*, **8**, 172-173.
- Zilberstein, D. und Shapira, M. (1994) The role of pH and temperature in the development of *Leishmania parasites*. *Annu Rev Microbiol*, **48**, 449-470.

9. Anhang

9.1 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

9.1.1 Vergleich der LmxMKK-Sequenz mit der von TbMEKg

In den beiden Aminosäuresequenzen identische Aminosäuren sind mit „I“ gekennzeichnet, ähnliche mit „:“. Die verschiedenen Mutationen die in LmxMKK eingefügt wurden, sind in der Sequenz farbig markiert.

```

LmxMKK:  1  MKNRPALALDAAVVEKFQODSKSYQINSNNSLQFRAFLFNEAGMYTKDGRELPSTVKKDD  60
          II I  :III   III I I :IIII :II II IIII II:II:I III::  :I I:I
TbMEKg:  1  MK-RKGIALDLVAVEKTQHDLQSYQIKNNNCLQLRAFLLNESGMFTTDGRKILGSVTKED  59

LmxMKK: 61  IDYSSKRNVGAGASGDVFFARLKNGTSIALMKRIPISSKAHRDEVDRELQVFMARGDASPYV  120
          II :I:I  :I IIII I IIIII:II :III III:II IIIIIIIII I :: :II:I
TbMEKg: 60  IDCTSRRIIGRGASGTVRFARLKDGTVPALKHIPITSKLHRDEVDRELSFFSSQSNSPFV  119

LmxMKK:121  MNNYGAFWDAEDDAIVIPMEWMPYTVKDLGLFWGGLNEALLKAVFFQVVSGLVYLHDVKR  180
          I I IIIII:I: IIIIIIIII II:II:  II I: I :I: :IIIIIIIIII II
TbMEKg:120  MKNLGAFWDSEEGAIVIPMEWMAYTLKDMSYFWEGIEETILRDIFFQVVSGLVYLHDTKR  179

LmxMKK:181  VLHRDLKPSNLLISETGHVKIADFGVSKLIQTLVVSSTYVGTMCFMAPERLEQGMYGFS  240
          I:IIIIIIIIII : I:III:IIIIIII:III IIIIIIIII IIIIIIIII :I III
TbMEKg:180  VIHRDLKPSNLLIRDDGYVKISDFGVSKLVQTLVVSSTYVGTMCFMAPERLEQTVYSFSS  239

LmxMKK:241  DVWSLGLTMIGAVTGKNPWAPPEEMNLYQLLGKMANGSAPTLPTSDAFSDDVKDFVKQCL  300
          I:IIIIII:I  IIIIIIIII:IIII:IIII:I :II:II  :I:: :II:I:II
TbMEKg:240  DIWSLGLTVIATVTGKNPWAPPDEMNLFQLLGKIAGETTPSLPEKPVYSEEARDFIKKCL  299

LmxMKK:301  ERDPDARPTCAELLQHQQFFDGIITTESAVAMVKMAVEQMTRLINNNAQKEKEVARSQESLE  360
          III II: IIII:I II:I I I II IIIIII II IIII:I:I ::: IIII :
TbMEKg:300  VRDPQERPSAAELLKHPFFEGCTEELAVKNVKMAVEHMTHLINNDAKKTEDLKRSQEDVA  359

LmxMKK:361  NDVKAQLDKM  370
          :I  :I:  :
TbMEKg:360  KEVNIKLEML  369

```

9.1.2 LmxMPK13

LmxMPK13 und deren flankierende Regionen

```

1  GCTTTCCGTTTTTCCCCCGTTTTTTTAAATCTCTCTCTCTCTCTCTGTTTTGTTCTTGCTTCGCAT  60
61  GGGCCCATGCCTTTTGGCCGCTCGAAGACAAAATATGTTGGCACCACGTCTGTGCGTTT  120
121  CCTGTGGTCTTTCACCAACGACAaCACCGCTCACAACCTCTGCACCGCCGACGCACGCATG  180
181  GAGTTCGAGAAACGAAAAGGCGCTATGGCGAGCATAACAAGAGAAGCGTACTCGGCCCTAC  240
241  GGACGTCTGAGGTGCAACGTGGAGGGTCATCTTGTGTGGTGCCATTGTTTTCAAGCGGCC  300
301  AGCGATCCGGCGTGAGACTTGACAACGGGACGGTGCATTCTCATGCAGTCTTGTGCGC  360
361  GCTGCCACTGGGCAGTTACGGCCTCGGCTTTGCCGCTCTCCGTCCGTGGCTCTCTGCACG  420
421  CCCCCTTTCTCAACCATCACTCTTCTGTCTTCTCGCTCTCTCGTTGTCTTTTCTGCGCT  480
481  CGTGGTTTTTTTTTACCCTTTCCAAAACCTGCGACTCACCACTCCTCACATCTCTGCGC  540
541  CCCCCCACCCACCCACACACCCCGAGAAACCGACGCGGACGTTATATATATATGTGAA  600
601  TCATCCTGGAATAGCATCGAGAGGCCCGAATAACAGATCGAATCCTCGCATCCTTCCCTG  660
661  TACGTGCCACACCCATTTTCTTGAGTGTCTGCGCTCTCTCTCTCGCTCTTACAGCT  720
721  ACTACCTTCTTTGTATTTTGTCCCACTAGCTTCCCCGACTTGGTTCGCTCTCTCTGCTCT  780
781  TCGTTCACCAACATCCACTGAGCTCAGCTTTTACGTTGGTTTCAGCACTCCACGTGGAG  840
841  AGCGCCAAAACCTTTATTTTTCGTCAGCTCGGTTTCTTTGCTCCACCCGTCTCTCCTACT  900
901  GTCTTACGCGACCCTGCTGCTGGCAGCTTGGGGGAGAGGTGGGGCTTTCGAGTGAGTCAC  960

```

961 ATGGCCGGTGGCACAGAAGCAACGATCGCACTCGCCGGTTGCTTTCTGCCAATGTTGTTTC 1020
1021 TCTCCTTCTTCTCGTGCATCTCTCTGTATTTCTTCTTGTGTTGAGCTGCTCCGCCGTGC 1080
1081 TGGTGGCGCTTCCCGTTTCTTCCCGCCTCGTGTTyCCCACCTTCTCATCAGTGGTGTGCGC 1140
1141 CGTGGGGACGCGCGATGCAGAAGTACCAAATCTTAGGCAAGAAGGGCGAGGGCACCTTCA 1200
M Q K Y Q I L G K K G E G T F S

1201 GCGAAGTGCTTCGTGCACAGGACATCAAGACGCAGCAGTTTGTAGCGATTAAGTGCATGA 1260
E V L R A Q D I K T Q Q F V A I K C M K

1261 AGAAGGCGTTCAAGTCCAAGGAGCAGGTAAACCGGCTTCGTGAGATTCAAGCGGTCCGGC 1320
K A F K S K E Q V N R L R E I Q A V R R

1321 GCCTGCAGCCACACCCGAACATTGTTGACCTGGTAGAGGTACTIONTTGACCGTAGCACTG 1380
L Q P H P N I V D L V E V L F D R S T G

1381 GCCGCCTCGCGCTTGTCTTGGAGTTAATGGATATGAGTCTCTACGAGCTCATTAAAGGGC 1440
R L A L V L E L M D M S L Y E L I K G R

1441 GGAAGCAGTACCTGGGCGAGGAGAAGGTGCGTTTCGTACATGTATCAGCTGCTGAAGGGGC 1500
K Q Y L G E E K V R S Y M Y Q L L K G L

1501 TCGACCACGCTCACCGCATCGGTGTCTTCCACCGGATATCAAACCGGAGAACCTTCTCA 1560
D H A H R I G V F H R D I K P E N L L I

1561 TCGACGCTGAGGGCCGTCTCAAATGCGGACTTCGGCTCTTGCAAGGGCGTCTACTCGA 1620
D A E G R L K I A D F G S C K G V Y S K

1621 AGTTGCCGCTCACAGAGTACATCTCCACGCGGTGGTACCGCGCCCCCGAGTGCCTGCTGA 1680
L P L T E Y I S T R W Y R A P E C L L T

1681 CGGATGGTTACTACAACACTACAAGATGGACTTGTGGAGCGCGGGGTGCGTCTTCTTCGAGA 1740
D G Y Y N Y K M D L W S A G C V F F E I

1741 TCATCGCCCTCTTCCCCCTCTTTCCCGGCAGCAACGAGCTGGACCAGGTGCACCGCATTC 1800
I A L F P L F P G S N E L D Q V H R I H

1801 ACAATGTTCTGGGCACTCCACCGACCGAGATTCTCGACCGCTTAAAAAAGTTCCGGCACGC 1860
N V L G T P P T E I L D R L K K F G T H

1861 ATATGGACTACGACTTCCCCAAAAGCAAGGCACCGGGCTCACGAAGCTGCTGCCCCACG 1920
M D Y D F P K K Q G T G L T K L L P H V

1921 TCTCCGCGGAGGCCTTAGACTTGATGAAGAAGCTGCTCACCTATGACGAGGAGCAGCGCT 1980
S A E A L D L M K K L L T Y D E E Q R C

1981 GCACCGCAAAGGAGGCACTGCGGCACCCGTACTIONTTAGCAAGCTGCGCGAGGCTGATAAGA 2040
T A K E A L R H P Y F S K L R E A D K R

2041 GGAGCCACCGCCTTAAGCACAGTGCCAGCGTCAGCAGACCGACAACCGTCACGGACGACG 2100
S H R L K H S A S V S R P T T V T D D V

2101 TGCACGCCTCGACGGGTCTCAGCAGCAGCCCTCGCAAAACCACGAACGGAATGCCCTCGC 2160
H A S T G L S S S P R K T T N G M P S L

2161 TGAACAGCACGCTGACGGCAAGCCGAAAGCTACCGGTGATTGACGGGAAGTCACCGACAA 2220
N S T L T A S R K L P V I D G K S P T K

2221 AGTCCTGCACCCTAGTCTCCAACCAAAGCACGCTGCACCAAGTGCACGGAGTGGTGGCGA 2280
S C T L V S N Q S T L H Q V H G V V A T

2281 CGTCCTTCTCAGGTGACGATCTAGTCGCCCGAAGCCTGCCAAAGCTGATATAGAGGTGTC 2340
S F S G D D L V A R S L P K L I *

```

2341 CACTGAAGTCACTGTCATGTGTGCGCTGGCCGTGTCTGGTACACTTTTTTTTTTGGGAGGG 2400
2401 GTGCCTGGGTGTATATGCCCATATCTGCACTTCGCTTTGACGACTTGTTCGTCCTTC 2460
2461 CCCTAACTCTGGCGCCCATGTCCCGTGAGCAGGCACTCTCGCGCTTCTCCACATCGGCT 2520
2521 TCCTTCTCCTGCACCCGACTTCTCTTCGTTGCTTTACATCGCCAGCTCAGACATCGACAA 2580
2581 GAGGTtGGGAGGCGGCCACGTCTGATGTATGCTTGTATCTCATCTGCCGGTATTGTGTT 2640
2641 GTGTGGAGAAAGCCGTTTTCTGAAGGAAAAGAGCTAGTGGGCCGCCGGAATGGTCCGA 2700
2701 GAAAACTCGACGCGGTGCTGCTGGGTGTGCGCGGAGTGAGACGAGCCCAGATACTACTCG 2760
2761 TCTTTGACCTTGAGGAAGGGGCGAGGACGTAgAAGAGGTGCGCGGGAGGGGCAAGTGAT 2820
2821 TGTCGGAGCCCGTTGTCCGCCCCCTTGCACTTTAGACTCTGTTTCATTGGTCCGTGTTA 2880
2881 GTCTGCGTCTGGTAGAGTTACGTTTTTTTTTCTGTGGGACCATAGCTGCCGTGTGGTGTC 2940
2941 TTCCTCTCTTGAATCCGTAGCGAAATGGAAGACGACACTCGCGCAGGAAACGGCTGCGG 3000
3001 CTTTGGCTAGATGGCGTCGTGTTCTTGAACGTGTGATAGCCGAGGGGAGACGAAACAAAA 3060
3061 ACAAAGGCGGGCCGCTGTTCTGCCGTGACTGTAGCGGTGCTCAGCCTTTGCTGAGACC 3120
3121 TCCCTTCTTAGTTACATGTGGGTGTTTCTTCTTTCCGTCGCGCCTTCTCTCTCTCTGTC 3180
3181 CGTCGTGCAGCGCACAGTACGCCTTTTCTTCCCAAGCACCTCTCTGTCGTTGCCCTTTC 3240
3241 GATGTCGTCTCCCTTTTCGCGCCGTGGCTGACACGTCTTTTCCATCGACGTCCGCAGTTC 3300
3301 ATGCGTGCATCCTGTGCGCTTTCTTTCCGTCGCCCTCCTCCTCTGCTGACGTTTCGGT 3360
3361 TAGGCGAGTGTGTGCATGCTCCAGAGAGCCTTCTGCATAGCAGGAAGGAGAGAGACAA 3420
3421 GTGGTTGTGGTTGGGG 3436

```

Sequenzvergleich von LmxMPK13 mit homologen Proteinen

Nachfolgend wird die Aminosäuresequenz von LmxMPK13 mit der homologer Proteine verglichen: eine putative Proteinkinase aus *L. major*, LmjMPK (Accession: AAZ14721), eine Proteinkinase aus *T. brucei* (Accession: EAN76910), dem Long Flagellar Protein LF4 aus *Chlamydomonas reinhardtii* (AAO86688) und einem hypothetischen Protein aus dem Einzeller *Paramecium tetraurelia* (CAK84722).

Die Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz von LmxMPK13. Identische Aminosäuren sind durch Punkte gekennzeichnet. Bindestriche wurden verwendet, wenn in einer anderen Sequenz zusätzliche Aminosäuren vorlagen. Die Kinase Domäne von LmxMPK13 befindet sich zwischen den beiden schwarzen Dreiecken. Mit dem roten Pfeil ist das hochkonservierte Lysin markiert, dessen Mutation zu einer Inaktivierung führt. Mit den blauen Pfeilen sind der Threonin- und der Tyrosinrest markiert, an denen LmxMPK13 von ihrem Aktivator phosphoryliert werden sollte. Gelb hinterlegt und mit römischen Ziffern bezeichnet wurden die 12 Kinasesubdomänen. Zahlen in Klammern stehen für die Anzahl weiterer Aminosäuren.

		1	▼		19
LmxMPK13:		MQKYQILGK		KGEGTFSEVL	
LmjMPK:		
TbMPK:	A....		
LF4:		.H..RLVA.		
PmHP:	MSLITKFIKI	WNIESFLFCQ	LIVKYKRTKN	Q.NQ.KLV..I
					I
	20		↓		69
LmxMPK13:	RAQDIKTQQF	VAIKCMKKAF	KSKEQVNR	EIQAVRRLQP	HPNIVDLVEV
LmjMPK:Y
TbMPK:	K...VE.KAYR.P.Q.P.I..
LF4:	K..C..NGKYNH.	D.LD...N..	...L...S.	.A..IK.L..
PmHP:	KS.SF..GNYNK.	T.I....H..	...L.KLS.	.EH.IK.I..
		II	III		IV

	70				119
LmxMPK13:	LFDRSTGRLA	LVLELMDMSL	YELIKGRKQY	LGEEKVRSYM	YQLKGLDHA
LmjMPK:
TbMPK:	M..KT.....	..F.....N.	..F.R..RHQ	.D.HC.MTL.	...F.A....
LF4:	.Y.QP.....	..F.....NI	...R..RH.	VA..RIKN..	...M.SM..M
PmHP:	.Y.EP.....	..F...EQN.	..H....R.P	.NPQ..K.F.S.I..A
		V		VIa	
	120			↓ ↓	169
LmxMPK13:	HRIGVFHRDI	KPENLLIDAE	GRLKIADFGS	CKGVYSKLPL	TEYISTRWYR
LmjMPK:H.....
TbMPK:	..K.I.....	..I.LRED	.T..L.....	.R.LHVSQ..	...V.....
LF4:	..N.I.....	..I..-MD	DC..L.....	.R.I...Q.Y
PmHP:	..N.I.....	..I.LNSD	-H..L.....	..I...H.Y
		VIb	VII		VIII
	170				219
LmxMPK13:	APECLLTGDY	YNYKMDLWSA	GCVFFEIIAL	FPLFPGSNEL	DQVHRIHNVL
LmjMPK:
TbMPK:S..	..TH.....	..A.....	T....TT.M	..I.K..D..
LF4:M.GVVS.T...	..ITK...I.
PmHP:DQ...GV	..M...T...	..NK...I.
			IX		X
	220				268
LmxMPK13:	GTPPTEILDR	LKKFGTHMDY	DFPKKQGTGL	TKLLPH-VSA	EALDLMKKLL
LmjMPK:E.	G.....-
TbMPK:VDV.NTAPIDY	Q.SE.K...V	AR...EGT.K	..I..IGR..
LF4:PDL.AK	M..RSA...F	N..K.E.S.V	A..I...-NP	.CV..IV...
PmHP:	...NPKVF..	FR.QA...EI	N..N.H...I	ER..QG-QTK	.CI..I.M..
	269		▼		317
LmxMPK13:	TYDEEQRCTA	KEALRHPYFS	KLR-EADKRS	HRLKHSASVS	RPTTVTDDVH
LmjMPK:A...	...-....K.I.A.
TbMPK:	Q...KE.V..K	P..GKERQER	..AMEYSTEK	AK.LEV.S.L
LF4:	M.NPDE.LS.	RQ.....R	D...-..E..Q	KA.LAPDVSN	HF.AMEA.KA
PmHP:	V..P.E.I..	QS.....E..R	E.Y-...ATQ	KRLQ.TLQNI	KISYHREQND
		XI			
	318				356
LmxMPK13:	AS-TGLSSSP	R--KTTNGMP	SL-----	NSTLTASRKL	PVIDGKSPTK
LmjMPK:	..-I..G...	..-.....	..-----
TbMPK:	PCL.RVVV.K	.GPM..ENR.	HVRLEDLSNA	.GRIS.QSV.	.KLQ.
LF4:	RQQQTV..TG	HEHP.SAGGD	GGAGTGAVGT	HDGSA.AAAA	AAALPSISGA
PmHP:	N.LERSQRID	EGKQMHQPNF	KKTQNYIYAKS	QKKSGLPSLQ	FDLKVESIYK
	357			392	
LmxMPK13:	SCTLVSNQST	LHQVHGCVAT	SFSGDDLVAR	SLPKLI	
LmjMPK:P....AA..	.A.....	
TbMPK:	
LF4:	RGHAGPEGGH	DNDMG.MD.S	GGG.GGGYG.	LPGLAAQSSM	ASVDGDEASL (194)
PmHP:	NTQHHSDDD	.DKQSSNKQM	MLPEIKKKKK	YD..I.YGKQ	QYQSSQAYQF (30)

9.1.3 LmxNOP

Nukleotidsequenz von *LmxNOP*

```

1 ATGCACCTTC GAGTGTACAT AGTCGACGGT AAGCGTGTCT ACACGCTAAA GAAGGTGGAC 60
61 CCGGAGGGCA AGCCGACCCT GTGCGCCCAC CCCGCCCGCT TCAGCCCAGA TGATAAGTTC 120
121 AGCCGCCACC GCGTCACCAT CAAGCGCCGG TTCAAGGTGC TGCCGTCGGA GCGTCGCCTG 180
181 CAGCCGCTGT AG 192

```

Vergleich der Aminosäuresequenz von LmxNOP mit der homologer Proteine

Die Aminosäuresequenz von LmxNOP wurde mit den Sequenzen homologer Proteine aus anderen Organismen verglichen. Die potentielle MAP Kinase Phosphorylierungsstelle S36 wurde durch einen Pfeil markiert. Bei den homologen Proteinen handelt es sich um LmjNOP aus *L. major* (Accession: CAJ08985), TbNOP aus *T. brucei* (Accession: EAN77893), BtNOP aus dem Rind (Accession: AAI03379) und HsNOP aus dem Menschen (Accession: AAH63023).

```

1                               ↓                               49
LmxNOP:  MHLRVYIVD- GKRVTYTLKKV DPEGKPTLCA HPARFSPDDK FSRHRVTIKR
LmjNOP:  .....M..- .....S. ....L.....
TbNOP:   ...Q..L..- ...Q.....M ..D.....S. ....Y.....
BtNOP:   .F.QY.LNEQ GE.....L ..L.QQ.CS. ....Y....I...K
HsNOP:   .F.QY.LNEQ GD.....F ..M.QQ.CS. ....Y....I...K

50                               63
LmxNOP:  RFKVLPSERR LQPL
LmjNOP:  .....
TbNOP:   ...A.A..K. PK..
BtNOP:   .....MTQQP RPV.
HsNOP:   .....MTQQP RPV.

```

9.1.4 LmxHP

Nukleotidsequenz von *LmxHP*

```

1 ATGAAGAAGA GCATTTCCCT CAAAGAATTC TCGACAACGC CGACGGTGTC CTACATGCTT 60
61 AGCAAGGACG GCCACAACGT CGCCGCCGCG GCGGATGCGC AGAACCGTTC TATTAACCCG 120
121 CCGCCACAGC CGCTTCGTGT GGAGCGTCCG AAGCAGCAGC ACCCCGTTCC AGATAGCGAT 180
181 GACACCATGT ACGAGATGGA GTAG 204

```

Vergleich der Aminosäuresequenz von LmxHP mit der homologer Proteine

Die Aminosäuresequenz von LmxHP wurde mit homologen Proteinen verglichen. Die potentielle MAP Kinase Phosphorylierungsstelle wurde mit einem Pfeil markiert. Bei den homologen Proteinen handelt es sich um LmjHP aus *L. major* (Accession: AAZ09710), TcHP aus *T. cruzi* (Accession: EAN83242) und TbHP aus *T. brucei* (Accession: AAX70524).

```

1                               ↓                               46
LmxHP:  MKKSISLKEF STTPTVSYML SKDGHNVAA- ---AADAQNR SINPPPQPLR
LmjHP:  .....S. .M.L.....
TcHP:   .....I.G- ---.L.CN.G N-.NA.R.AV
TbHP:   ....V..... R.....L.EV RGNNNSNL.G .V.G.RS.PP

47                               67
LmxHP:  VERPKQQHPV PDSDDT---- MYEME
LmjHP:  .....Q.. .....
TcHP:   SQAV.EEKMR .A.N.SRSDV .FD..
TbHP:   .FHKEEKP.Q S.NNSEL-DV ..D..

```

9.1.5 LmxMPK14

LmxMPK14 und deren flankierende Regionen

1 GCCCCGGATCCACACTCTCTGCATCCCTAAATGTGGTCTTATGCGCGCCTGCGTCGCTGT 60
61 GTATGTCTGCGCCTATGCTTGTATGTCTCTTTTCGCGTTTGAGGAGAGAGGTAGGATTTA 120
121 AACAAAATGGGCGATGGGTCTTAGTGTCTCCTTGTGCGGAGAAGGGCCTTCTCCACGCATT 180
181 TTTTTGGTTTCGTTTCACTAGTACTCGTAGAATATCTGCCAGATAACAAGCGCAGGCAAA 240
241 GGAATGAAATAAATCTTGACTTCGGGTGTGTGCTACATCGGAGCATTGTGATACGACACG 300
301 TGGCCCCCTCCCTCCCCTCATCCCTGGAGGGTGTGTGTGCATGCAGGG.GAGAGTACACA 360
361 CCGACACACACGTGCATATGTGCGGCCGTAGTTCTCTTGTCACTGCGGGGGTTCGTAATAG 420
421 GAGGAGGTTCGGAGAAAATCTCATCTACCTTGATGACGTGACTTTCTTTGAGGTGCCGACC 480
481 AGTACAGGATGTACATCTGTGTATGTGTGCCGTGTTTCCGACGCCACGGGCGCACGAGGG 540
541 CAAGTGTGCTGGGCCTCTTTCCAGTGCTCTCGGCGCCGTGCTACTCTTTTACGATTCTC 600
601 TCGTTTGTGCTCTTTCGCGCCGTCCATGTCTCATCACCTGCCTCCTTCTCCTCTCTCCTC 660
661 TCCTTGTGTTGCTGTGCTGTGTGCACGTGCGCCAACGTATTTCGCACATCGTTTGTCTC 720
721 GCCACTTCACCTACCTTTTTCTGCCCATCTCCCACCCACCCACACACACGTCCAGCATGTA 780
781 TGTATGCGTTTCTCCCGTTTGTACTCCCCCGGACTGCCAGGGCATCGCTTGTGTCCT 840
841 CTCTCGCATTCCCTTTCCCTCCTTTACTTTATTTTAGACCTCTAGAGATATCACGCAGCG 900
901 ATGGACAAATATGAAATTCTCGCTCAAATCGGAGATGGCACGTTCCGGCTCCGTCGCAAA 960
M D K Y E I L A Q I G D G T F G S V A K

961 GCCGTGAGCAAGAAAACCGGCCAGCTTGTAGCCATCAAGAAGATGAAGCAGAAAATTTCTAC 1020
A V S K K T G Q L V A I K K M K Q K F Y

1021 ACCTGGGAGGAGTGCCTCAAGCTTCCCCGAGGTGGACGTTGTGCGGCGCATTACAGGCCAC 1080
T W E E C V K L P E V D V V R R I H G H

1081 CCCAACGTGGTGAAGCTGCGTGAGGTAATTCGAGAGAACAACGAGCTGTTCTTCGTCTTC 1140
P N V V K L R E V I R E N N E L F F V F

1141 GAGTACATGGACTGCGATTTGCTCGGCGTCATCAAAAAGGCCAAGCAGCAGGGCGGGCGG 1200
E Y M D C D L L G V I K K A K Q Q G G R

1201 CCAGCTAGTACACCCTCTACTGCACCGTTGATTCCGTACCCTCTTGTAAGAAGACTACATG 1260
P A S T P S T A P L I P Y P L V K N Y M

1261 CGCCAAATGCTGCAGGCACTCGTGTACATCCACAAACCGGGCTACTTCCACCGAGACATG 1320
R Q M L Q A L V Y I H K R G Y F H R D M

1321 AAGCCGAAAACCTTCTCATTCGGAAGAAGCGAGCGGCGACGAGGTGCTGAAGCTGGCA 1380
K P E N L L I R K E A S G D E V L K L A

1381 GACTTCGGACTCGTCAAGGAGATCCGTGCTCGCCCCCGTTACCGACTACGTGTGCGACG 1440
D F G L V K E I R A R P P F T D Y V S T

1441 CGGTGGTACCGCGCACAGAGCTGCTCCTGCAGGATCGCTTCTACGGCGCTGCGGTGGAT 1500
R W Y R A P E L L L Q D R F Y G A A V D

1501 GTGTGGGCTGCCGGGTGTATTATGGCGGAACTCATCACCATGCGGCCACTTTTTCCAGGC 1560
V W A A G C I M A E L I T M R P L F P G

1561 ACAAACGAGGTAGATCAGCTCTTCAAGATAATGTCCGGTCTTGGGTCCCCACTGAGGAG 1620
T N E V D Q L F K I M S V L G S P T E E

1620 GTGTGGGCGCGTGGACTTCGCTTGGCCAAAAAATCCGCTACGTCTTTCCTAAAGTAGCC 1680
V W A G G L R L A K K I R Y V F P K V A

1681 GGCTCCGGCCTTGCTCAAGCGCTGCCGTGCGACATCCCGTTGCCGGCGCTGGACTTGCTG 1740
G S G L A Q A L P S H I P L P A L D L L

1741 CGTCAGATGCTCGTCTACGACCCGAAAGTGAGACTGACGGCGGAGCAATGCCTGCAGCAC 1800
R Q M L V Y D P K V R L T A E Q C L Q H

1801 CCGTTCTTCAACGTCGGCATTGACGAGTGCAACGCTCCATCCGCTGCCGCTCTGGACCAG 1860
P F F N V G I D E C N A P S A A A L D Q

1861 CTGGCGGTCATGGCAAAGCGGATGCTGCCAGGGTCGAAAACAGCACCGCCCGCGCTGAAG 1920
L A V M A K R M L P G S K T A P P A L K

1921 AGCCCCACCATGGACCAGGTGGCGGGCTAAAGGCGGCTAGGGCCTCCACCGACGCATCG 1980
S P T M D Q V A A L K A A R A S T D A S

1981 CTCTCGGACACCTCGTCACGCAAGTTCTACCTGCTCGGCCCCCTAAAGGACCCCTCCCTG 2040
L S D T S S R K F Y L L G P L K D P S L

2041 TCGTTGCCAAAGCTCCCTGTTGCGTTGTCCACCTCGCCAGCGTCCCTTGACACGCTGCCG 2100
S L P K L P V A L S T S P A S L D T L P

2101 AACATTTTCGTCACCTCTGCGTGGGCGGGGCTCTCTCACCAGCGGGGATACCAGTGCTC 2160
N I S S P L R G R G A L S P A G I P V L

2161 GCCAATGGCCACCAGGGCCCCAGCCTGACGACGACACTGGCTAAGGGAAAGCGCCGCTCG 2220
A N G H Q G P S L T T T L A K G K R R S

2221 CAGGAAACAGCAGACAACCTTGCTTGCGAAGAAGCTAGGAGCCTTGAAAAACGTCCCGACG 2280
Q E T A D N L L A K K L G A L K N V P T

2281 GGAAAAGGGAAACTGCCGGTGTCTTACGCACTGCCGGCTGCCAGCGCTGTGCACTCACCT 2340
G K G K L P V S Y A L P A A S A V H S P

2341 AGAGCGGCACCCAACCTGAAGGTCTCCGCATCCGTGGCAAGGCCATACCCCTGGCGCCC 2400
R A A P N L K V S A S V A R P Y P L A P

2401 ACCGCCAACAATCGCGACGCCGTGGCGTCCCCGCGGCCATAACCCATAACAAGGAAGCC 2460
T A N N R D A V A S P R R H N P Y K E A

2461 AAGACTACTTCTCCGACGGCGGGCTCCGCGGGCGGCAAGGTAGAGATTGACTTGACGAG 2520
K T T S P T A A S A A A K V E I D L D E

2521 CTCATGGAGGAGTTTTCGCTCGGAGATGACTTCCATGGGGGTGCTGGCGCAGCGACACGGC 2580
L M E E F A S E M T S M G V L A Q R H G

2581 TCGGGGGCTCGGCGGAATTGAAAAGCGAAAGCTACGTTTCCAGCCAGCGCTTCCGCCC 2640
S G A S A E L K S E S Y V S Q P A L P P

2641 GATCCTGTGGCGACGCTGCTGAACAACAGCCGGTATAGAAGGAAATCGGCCACGAGCGCC 2700
D P V A T L L N N S R Y R R K S A T S A

2701 GACCCACCGTTGAAGAGGAACAACCTCGCCTCGCACCACACCAGCTGGATGCAAGGAAA 2760
D P P L K R N N S P R T T H Q L D A R K

2761 GTGGACGATGTTGCCTCAAAGAGTGACCTTCCTCGAATAGACTCCTCGGCCCCGAAAGGA 2820
V D D V A S K S D L P R I D S S A P K G

2821 ATGTCACCATCGCTGAAGGCGCTGCTAGCAAAGCACAAGACGAGTGGTCTGGCGTTCCCG 2880
M S P S L K A L L A K H K T S G L A F P

2881 TAGCCGAGCCGGCTTCCGTTTCTCTTCATGGTCTGCTTTTTCGCTTTTTGTTCTGTGGTGT 2940
*

2941 GGTAAGTACTGGTGGTGGGAAAGAGCATGGGTGAGTGTTAGCGTGGGCTGACCGCCAATA 3000

3001 ACAACTACAGTAGAACTGTCGGCTGCAGGTTCCTTACGTACGTTCCACTTGCTCCCTTCAG 3060

3061 GCCTCCTCAACGAGTACCTCTACTCCCCCTTCTCCTTTTCCCTCCACGATTTTATTGCTCT 3120

3121 CACCGTGTTTATTAGCTTCTCCTTGTCTTCTTCTTCTCCTCGCTTCGGTGTGTTGGATCAAGGACC 3180

3181 CACAGACAAAAATCTTTCTATATGTAAATGAATCTGACGCACCTTTTCTGCGTTCTTTG 3240

3241 TCTCCCTCTCGTATTCTCCTGTTTCTTTCTCCTCCTCGCTCACTCTCCGTGTTTCTCT 3300


```

151                                     ↓ ↓                                     198
LmxMPK14: --ASGDEVLK LADFGLVKEI RARPPFTDYV STRWYRAPEL LLQDRFYGAA
LmxMPK9:  --....-LV. V.....A... .S.....E.. ..... V.HSTH.NSP
TbPK:     PST.AQ.IV. ....Y..... .....C.SSP
AtPK:     -----II. I.....AR.V NSS...E... .....V ..SYV.TSK
CrMPK7:   --S-----I. I.....AR.. .S...Y.... .....V .RSPY.N.P
OsPK:     -----LI. I.....AR.. SSE..Y.E... .....V ..ASV.NS.
HsMAK:    --CM.P.LV. I.....AR.L .SQ..Y.... .....V .RSSV.SSP
HsICK:    --CM.P.LV. I.....AR.. .SK..Y.... .....V .RSTN.SSP
                                     VII                               VII

```

```

199                                     248
LmxMPK14: VDVAAGCIM AELITMRPLF PGTNEVDQLF KIMSVLGSPT EEVWAGGLRL
LmxMPK9:  ..I..CAV.F ...YLC.... ...S.S.... ..C.....A PN..DE.YQ.
TbPK:     ..I..V...I ..M..T.... A.S.....LH ...A.....N .S..PN.MV.
AtPK:     ..M..M.A.. ..LSL..I. ..AS.A.EIY ..C..I.T.. ..T.LE..N.
CrMPK7:   I.LF.M.A.. ..YML.... ..N.A.EIY ..C.IM.R.. QQ..PE..K.
OsPK:     ..M..M.A.I ..FSL.... ..S..A.EIY ..C.I..T.N QRT..E..Q.
HsMAK:    I....VGS.. ..YML.... ..S...EI. ..CQ...T.K KSD.PE.YQ.
HsICK:    I....V.... ..VY.L.... ..ASEI.TI. ..CQ...T.K KTD.PE.YQ.
                                     IX                               X

```

```

249                                     298
LmxMPK14: AKKIRYVFPK VAGSGLAQAL PSHIPLPALD LLRQMLVYDP KVRLTAEQCL
LmxMPK9:  .RRMNM.R.T .PTP.RHI. TT-A.LA.V. .MA...RFN. AE.P..T...
TbPK:     .....N..S IN.V..ERVM .P.V.PH.M. .MK...N... .R.P..Q...
AtPK:     .NT.N.Q..Q LP.SP.SSLM ..-ASED.IN .IERLCSW.. SS.P..AEV.
CrMPK7:   .ATMNF.R.Q F.PTP.NKII TNAC.-E.I. .MT.LCHW.. NK.P..V.A.
OsPK:     .AS..FQ..Q SGSIH.SEVV ..-ASED.IS .ISWLCSW.. QR.P..VEV.
HsMAK:    .SSMNF.R.Q CVPIN.KTLI .-NASNE.IQ .MTE..NW.. .K.P..S.A.
HsICK:    SSAMNFRW.Q CVPNN.KTLI .-NASSE.VQ ...D..QW.. .K.P..S.A.
                                     XI

```

```

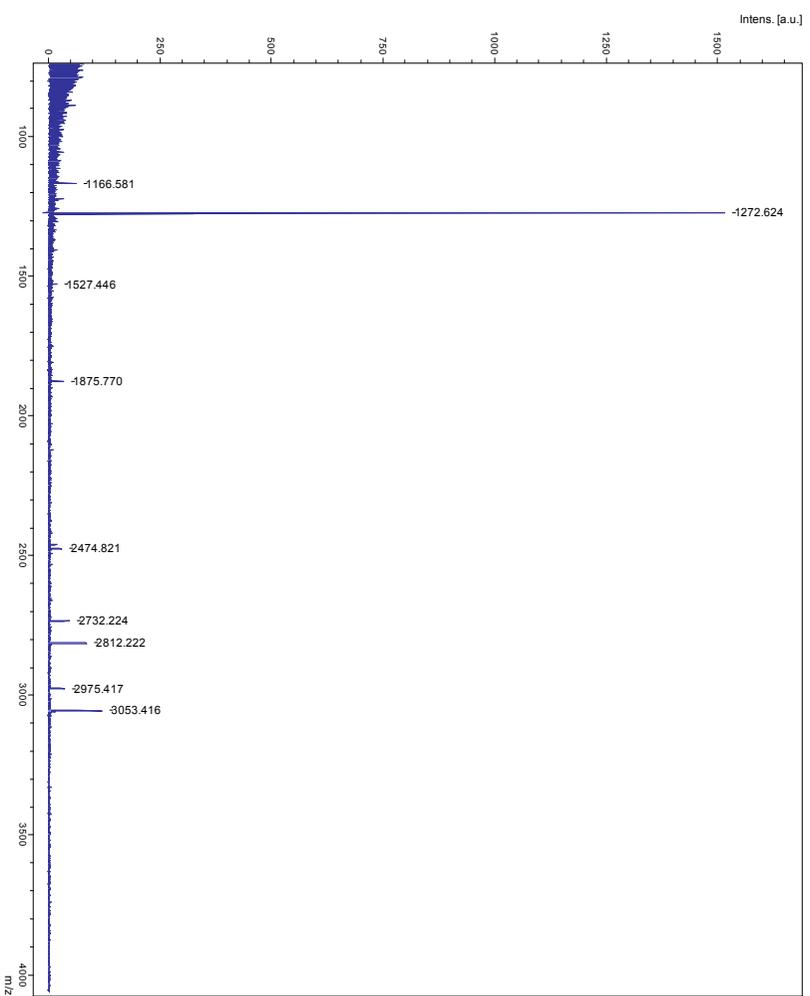
299 ▼                                     345
LmxMPK14 : QHPFFNVGID ECNAPSAAAL DQLAVMAKRM LPGSKTAPPA LKSPTMD (315)
LmxMPK9  : ..Y. (118)
TbPK :    ...Y....V. .E.FAPTNPV K.M.EAL.KH TS.PQS..SG AVV.NSD (238)
AtPK :    ..... (181)
CrMPK7 :   ...Y.A..VR PALPV.NSPM SID (301)
OsPK :    .....
HsMAK :    K..Y.Q.-- QVLG..SNH. ESKQSLN.QL Q. (314)
HsICK :    RY.Y.Q.. (345)

```

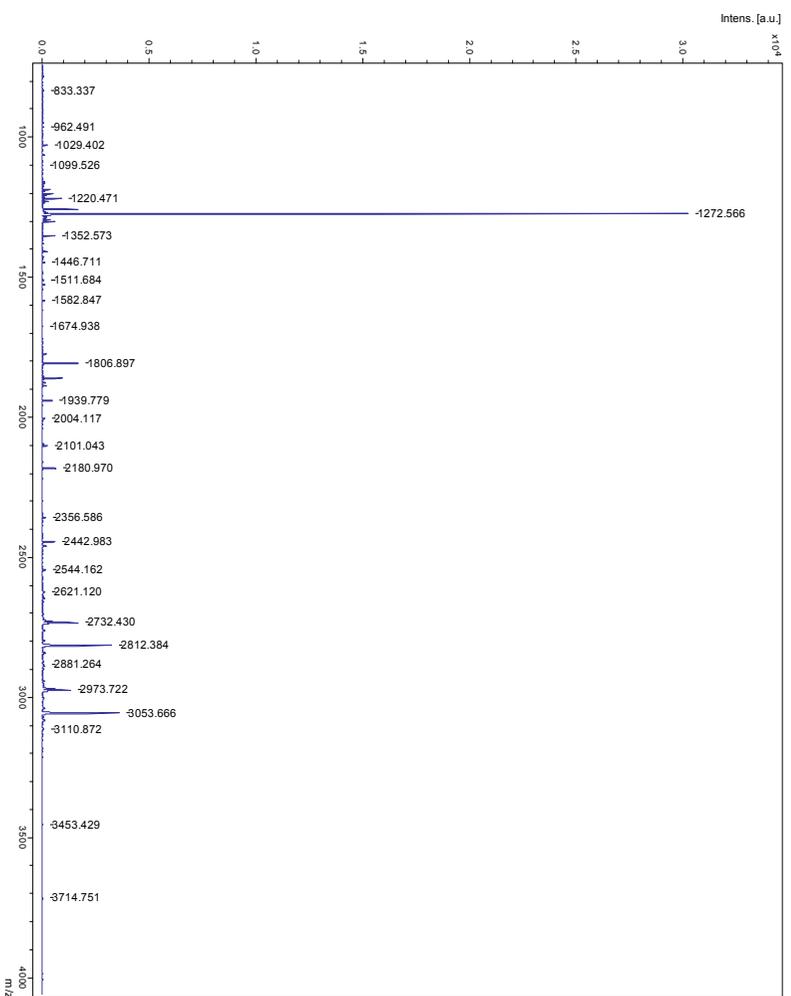
9.2 MS- und MS/MS-Spektren

9.2.1 LmxMPK13-Wt

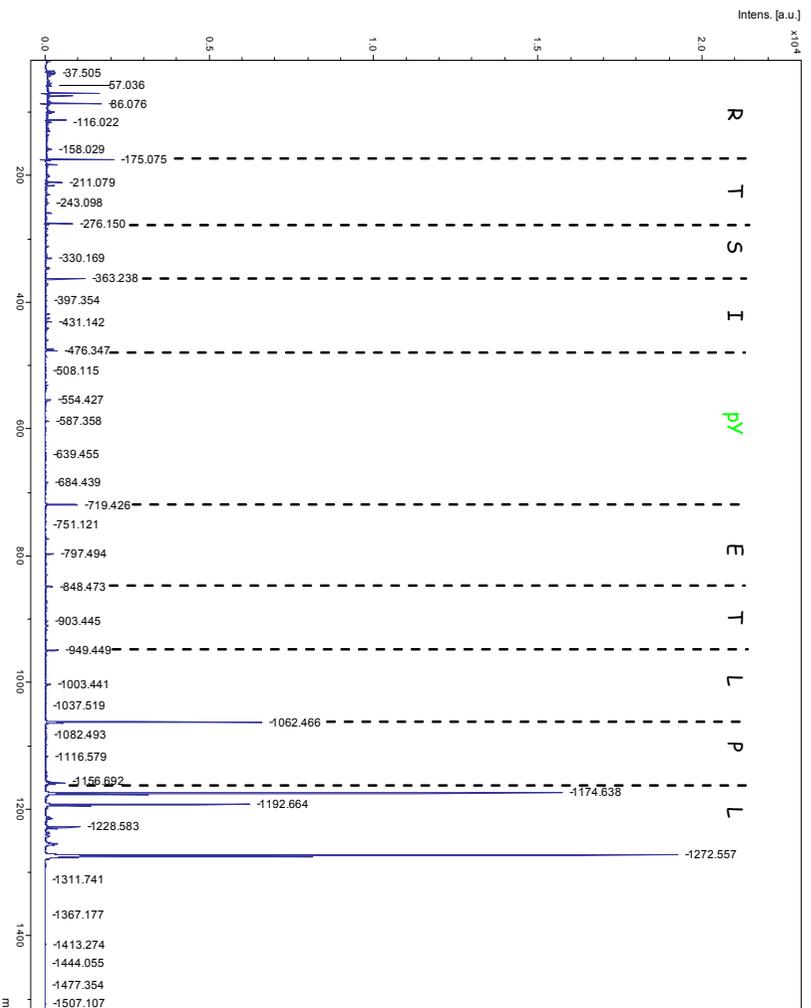
Erster Durchlauf



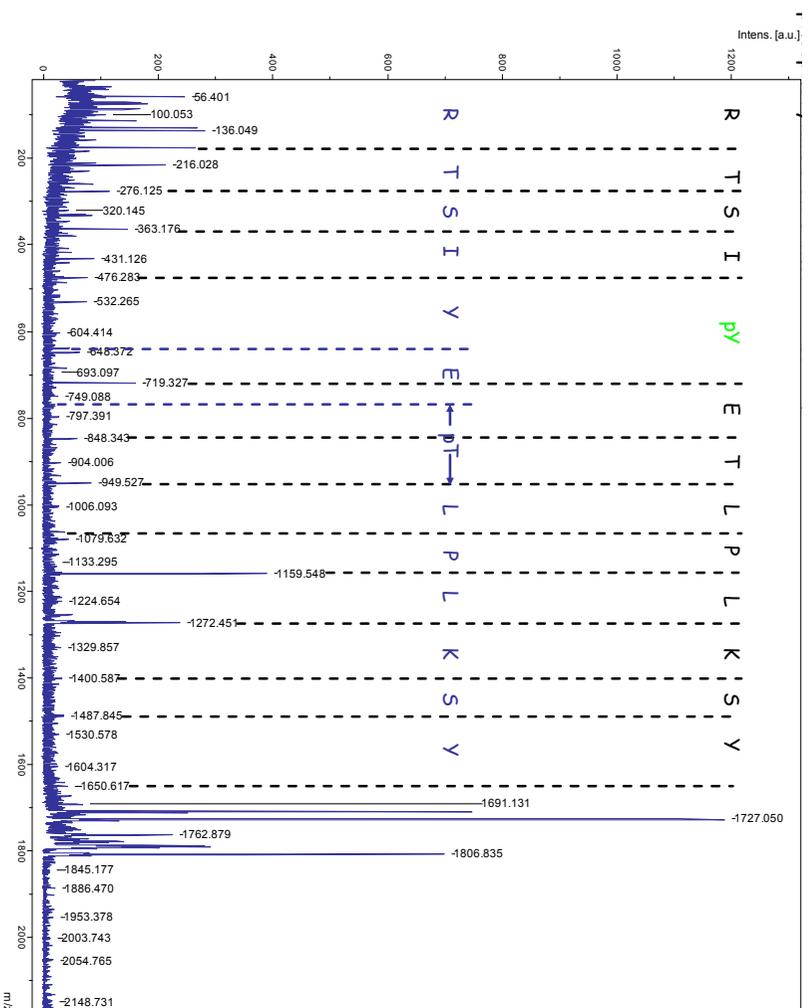
Zweiter Durchlauf



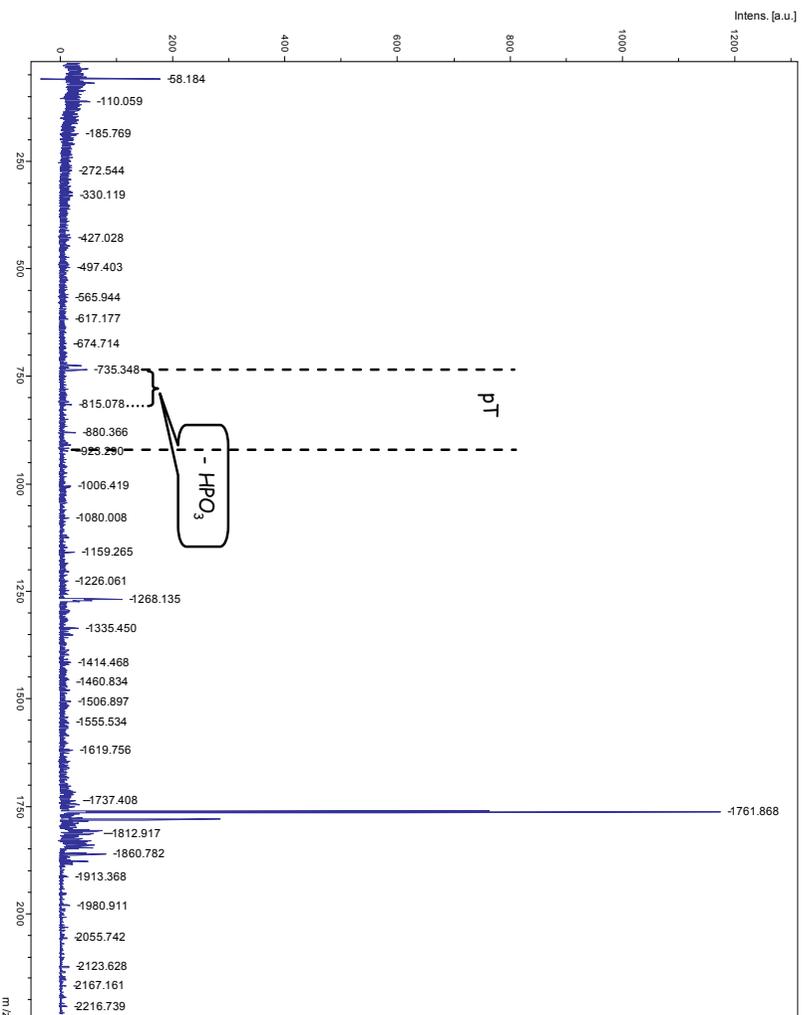
MS/MS 1272,555; Mascot score 76 für LmxMMPK13¹⁵⁷LPLTEPYISTR¹⁶⁶



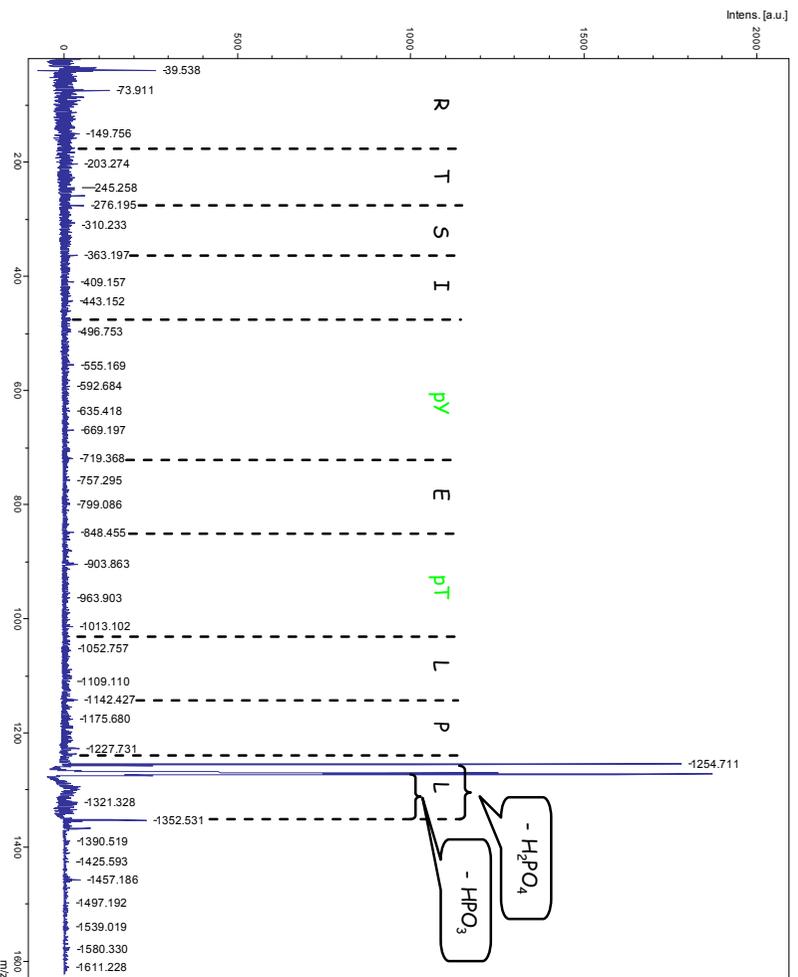
MS/MS 1806,812; Mascot score 63 für LmxMMPK13¹⁵²GVYSKLPLPTEPYISTR¹⁶⁶ – einfach phosphoryliert entweder an T160 oder an Y162



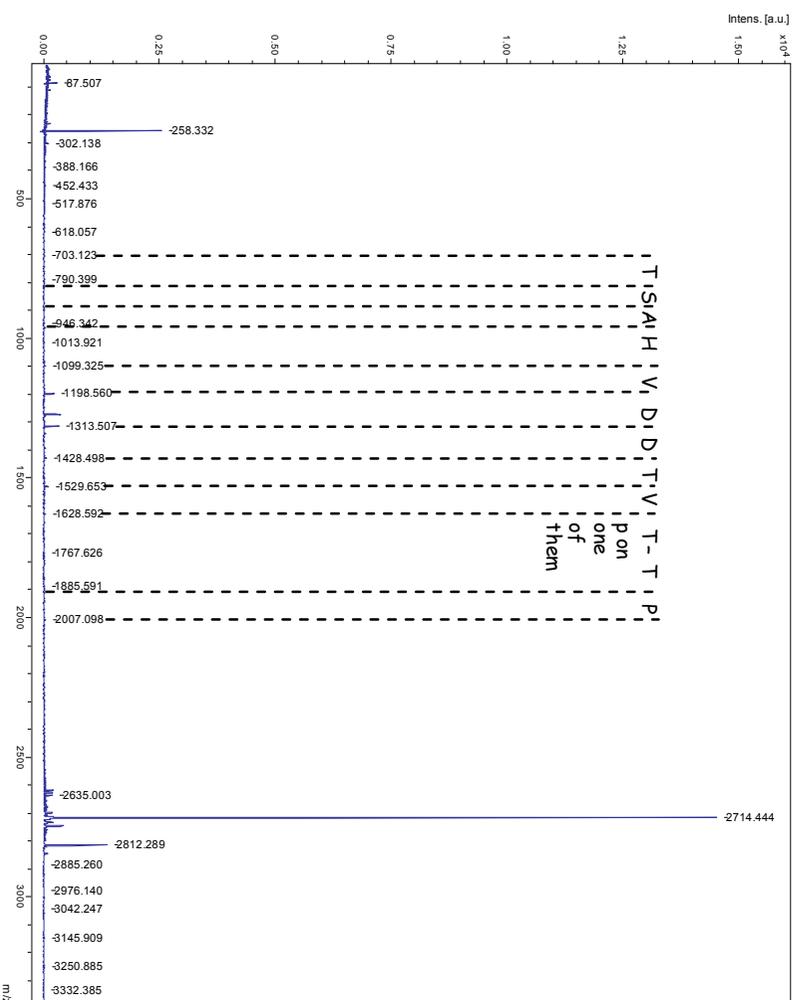
MS/MS 1859,610; LmxMPK13³²⁸ KTTNGMPSLNSTLTASR³⁴⁴, einfach phosphoryliert, entweder an T329 oder T330



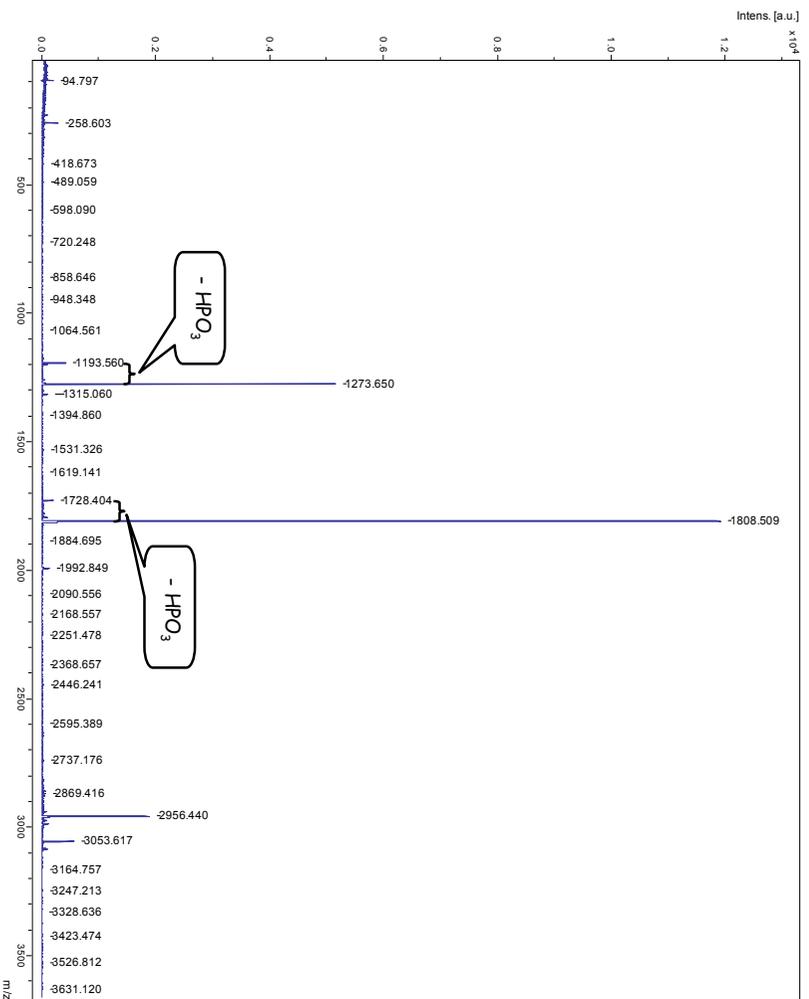
MS/MS 1352,508; LmxMPK13¹⁵⁷ LPpTEpYSTR¹⁶⁶, doppelt phosphoryliert



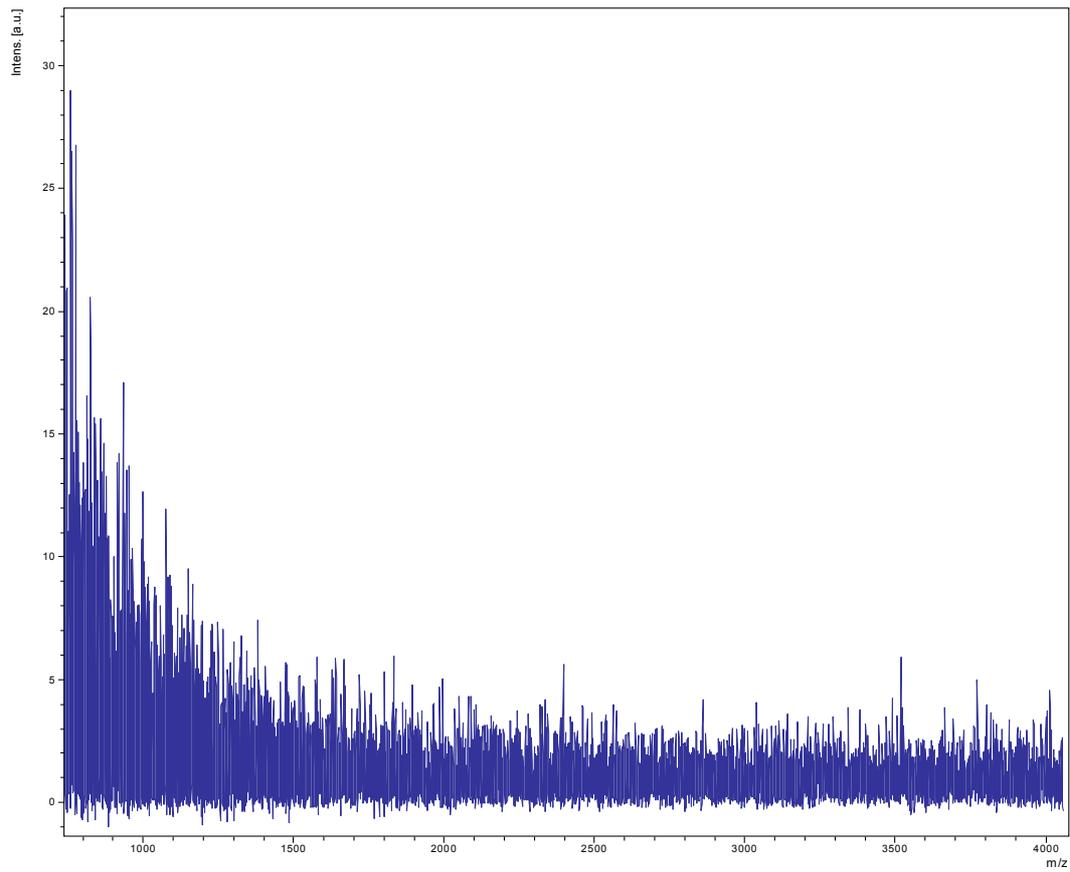
MS/MS 2812,268; Mascot score 16 für LmXMPK13 ³⁰²H₂HSASVSRPTVTDDVHASTGLSSPPR³²⁷, 2 Phosphorylierungen, eine davon an T310 oder T311



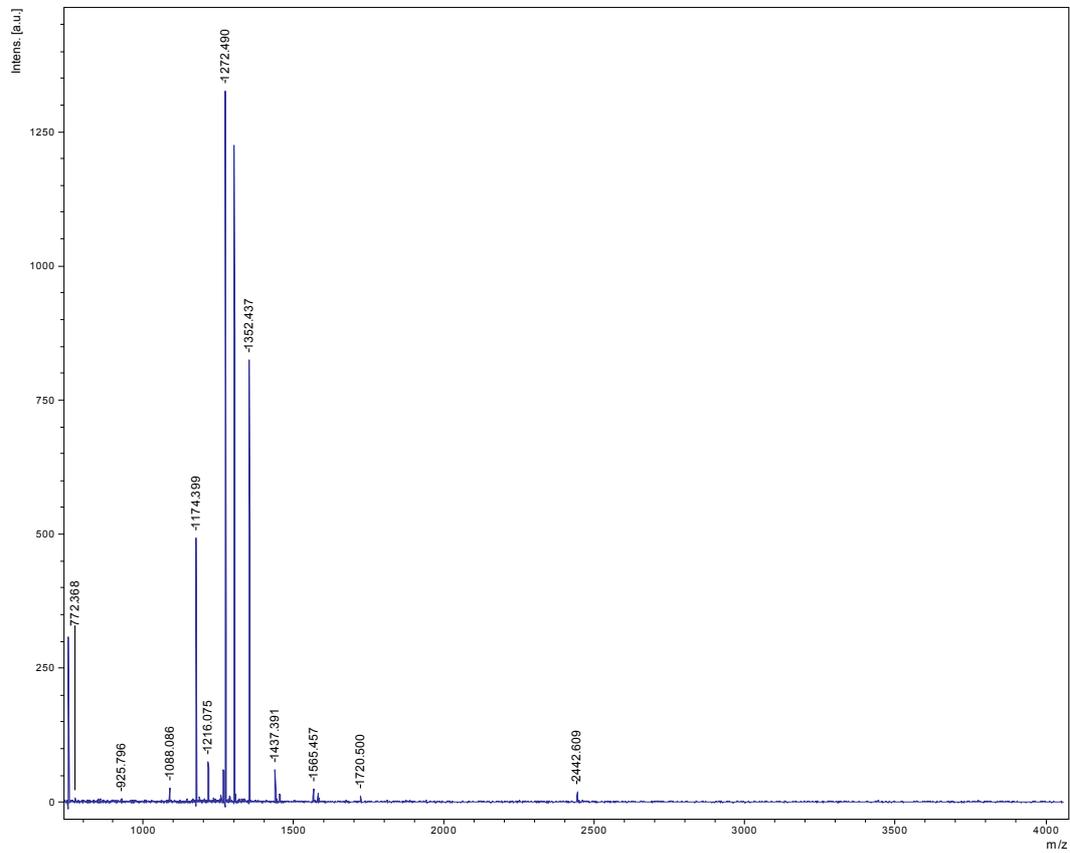
MS/MS 3053,562; ³⁰⁰LKHSASVSRPTVTDDVHASTGLSSPPR³²⁷ doppelt phosphoryliert

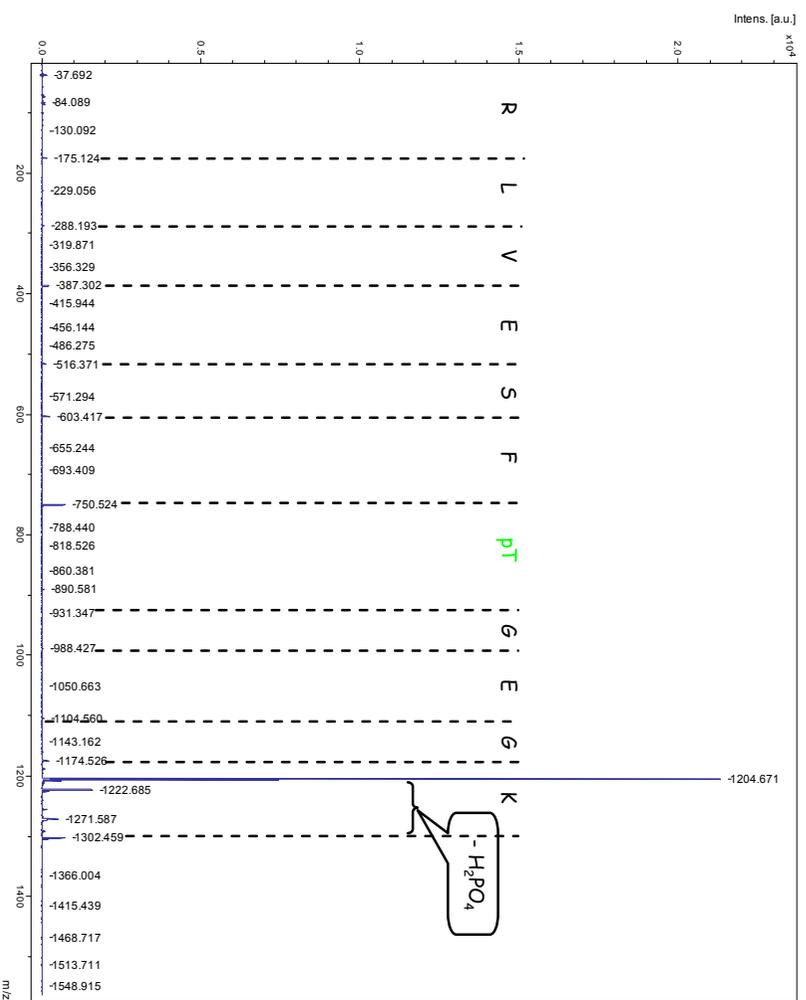
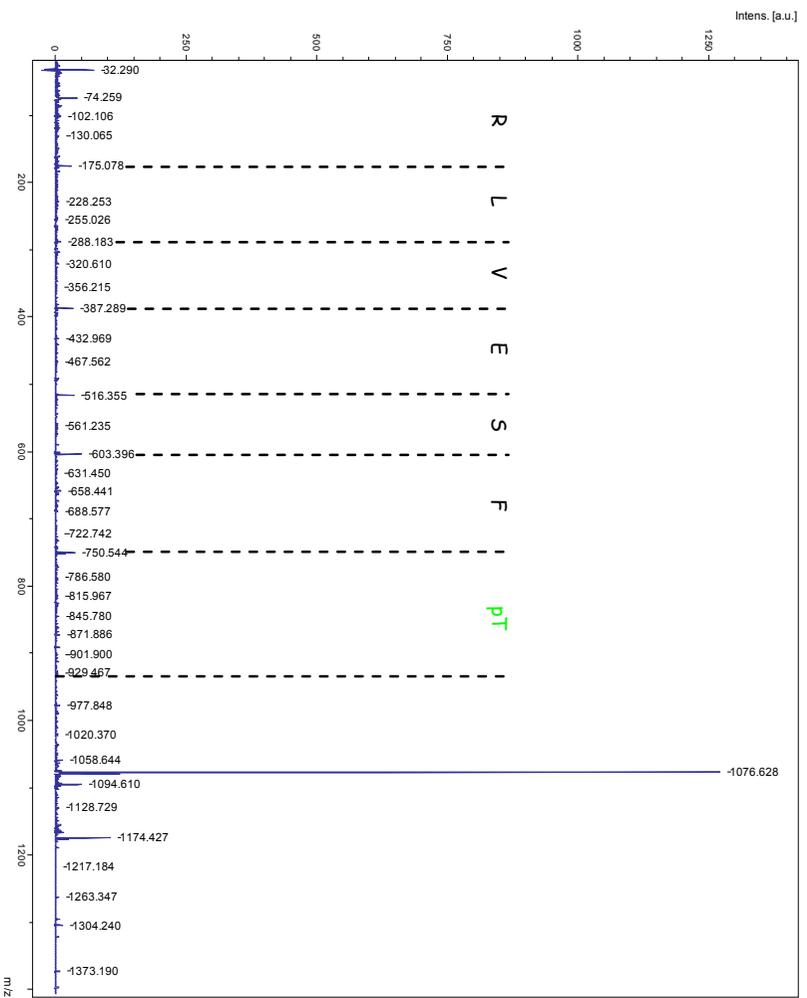


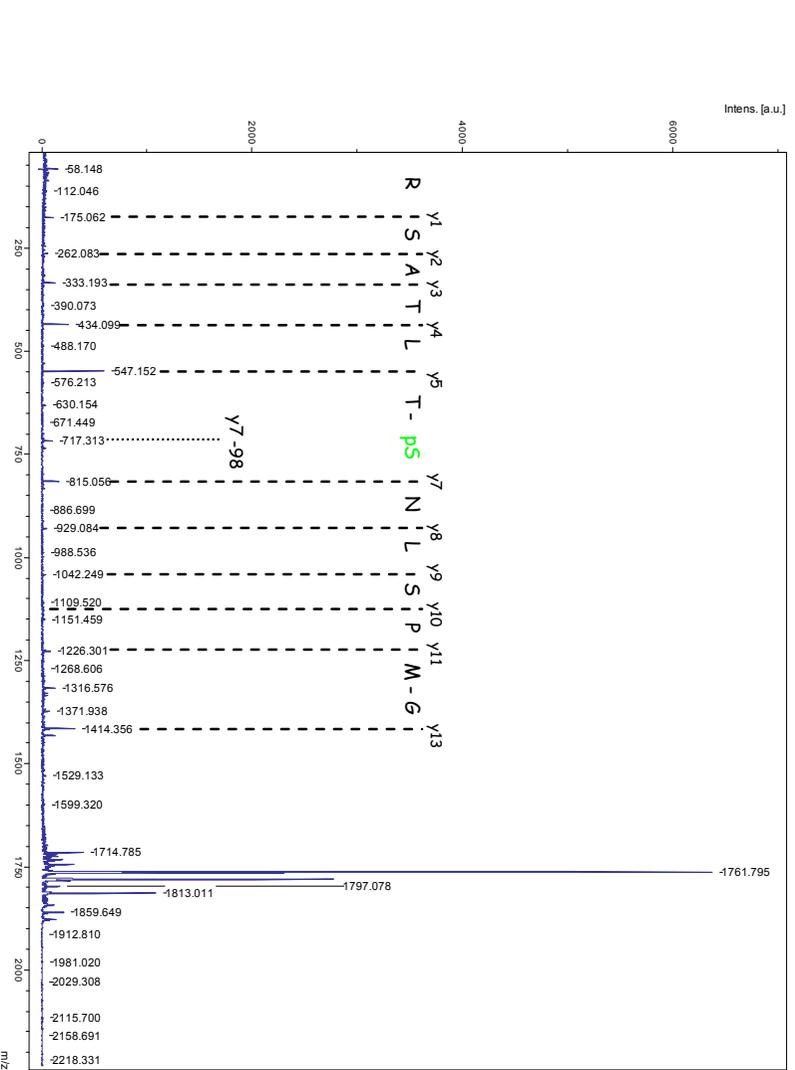
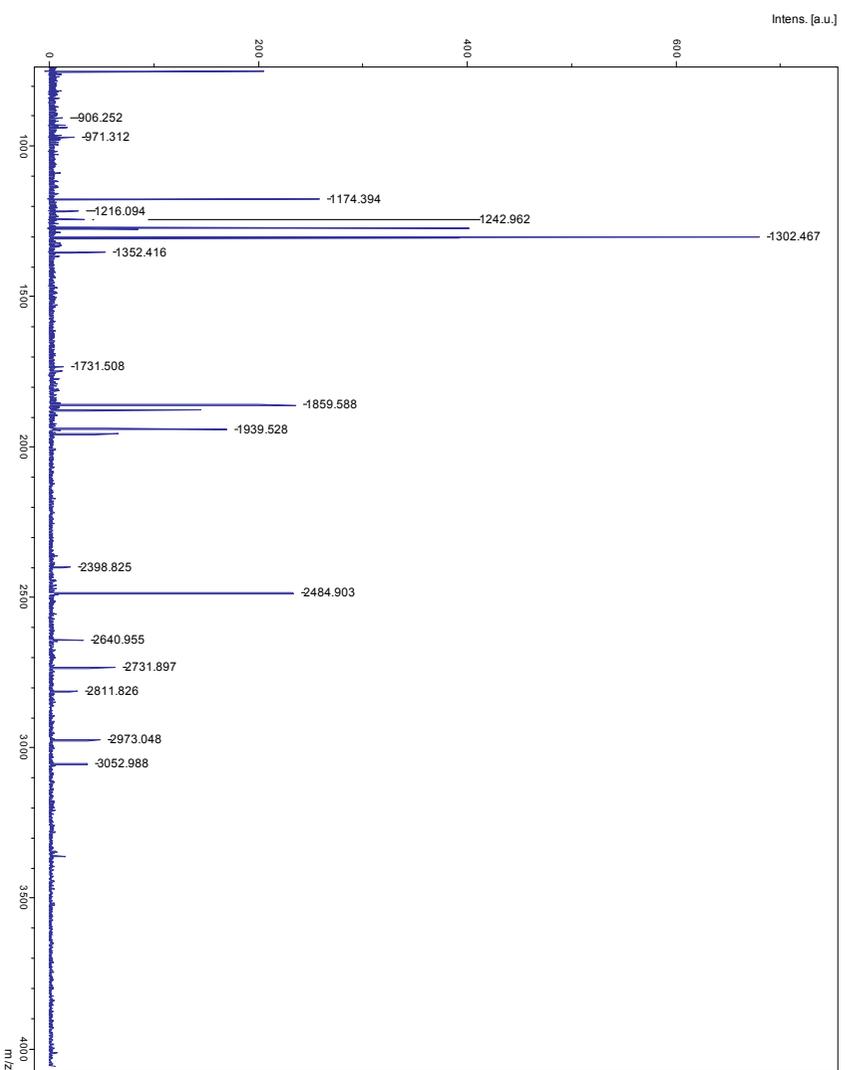
9.2.2 LmxMPK13-KM

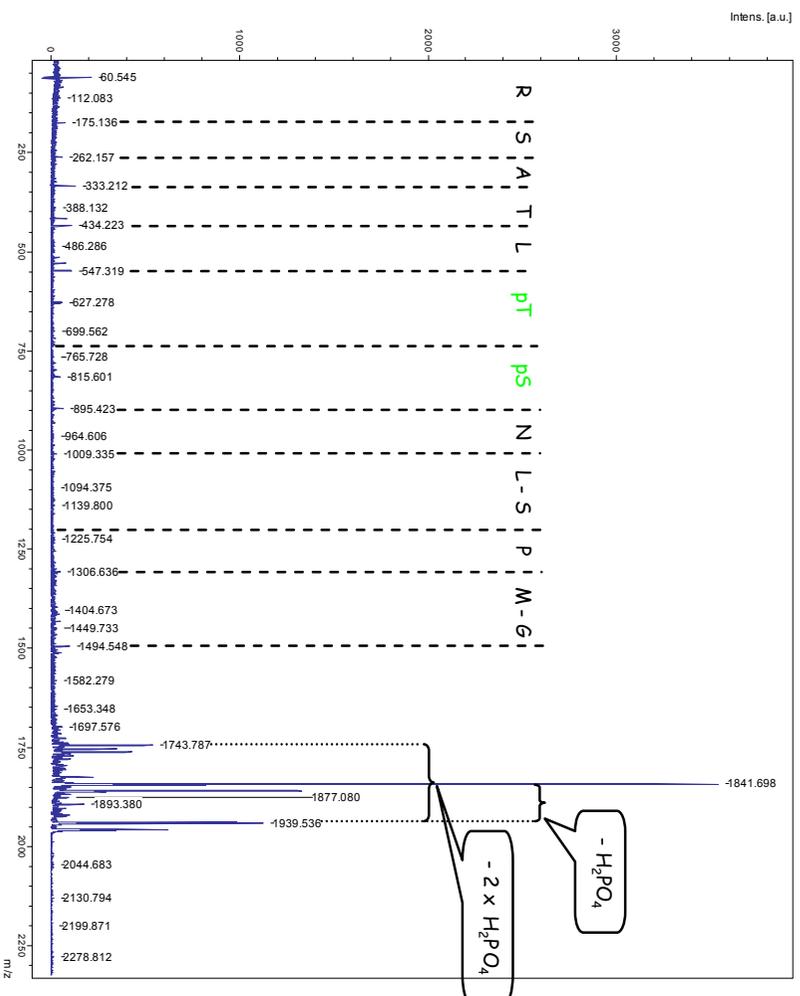


9.2.3 LmxMPK13-Wt mit LmxPK4 coexprimiert

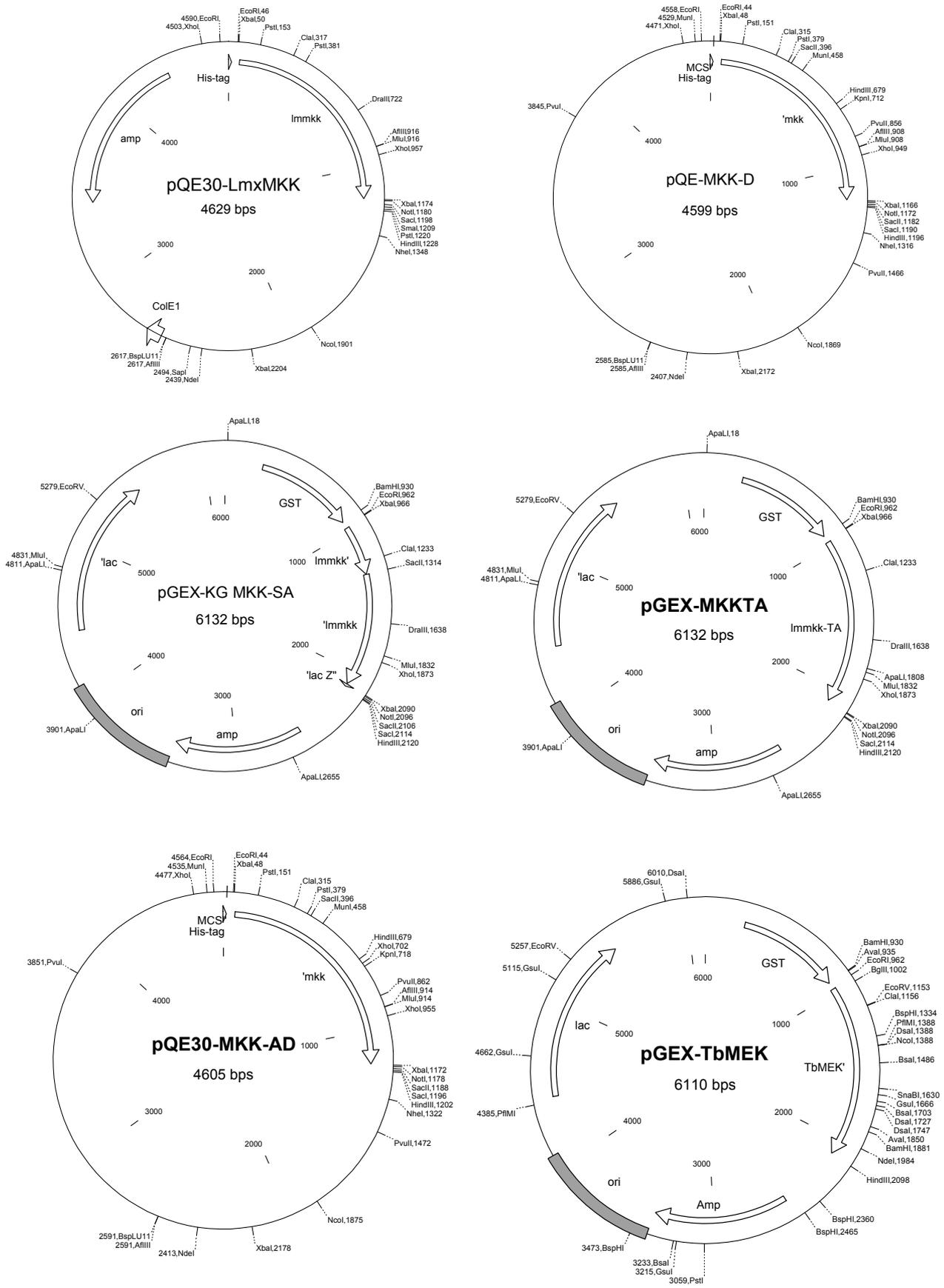


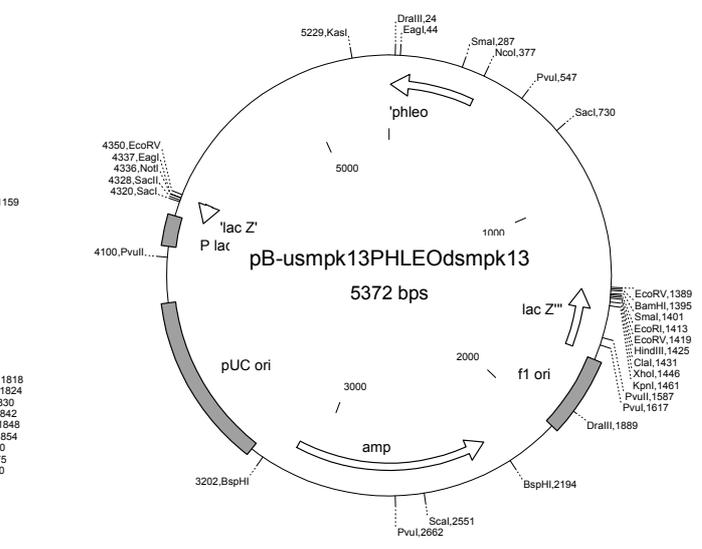
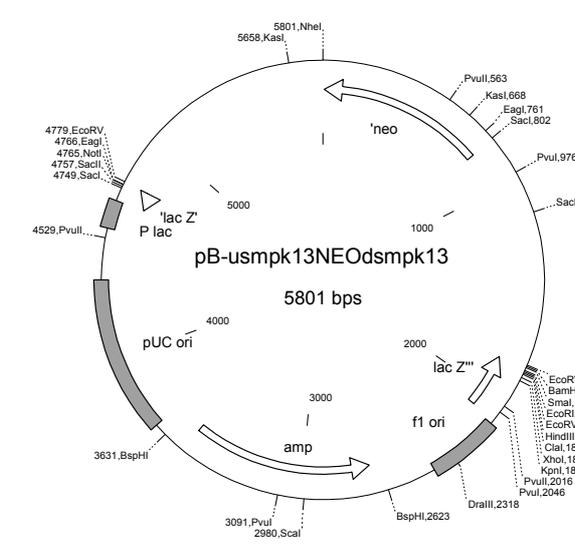
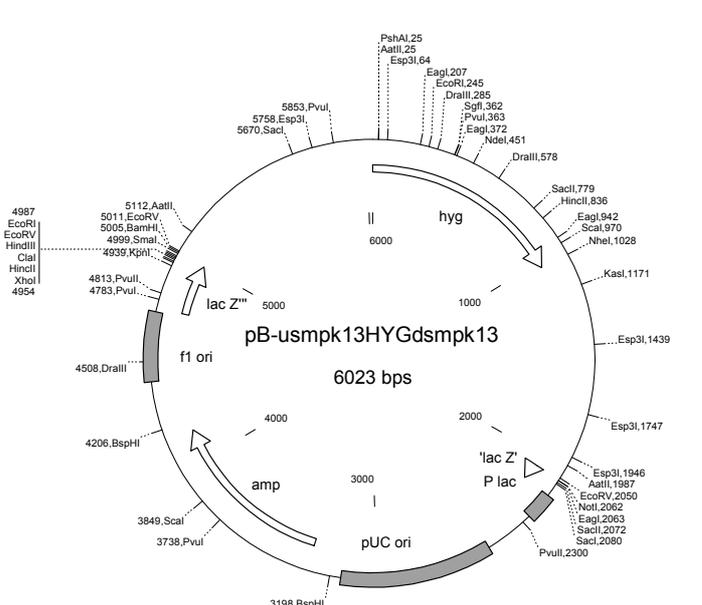
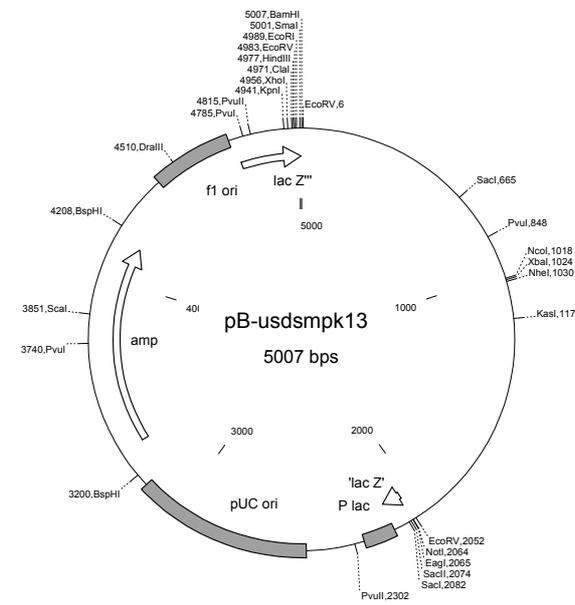
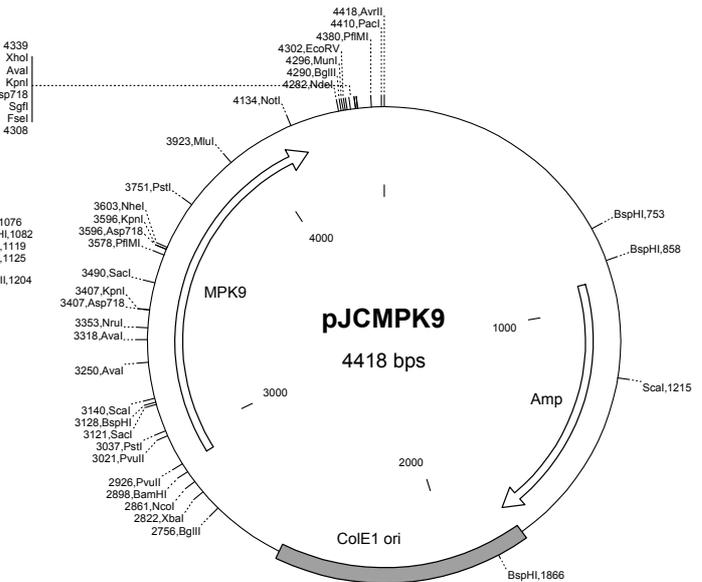
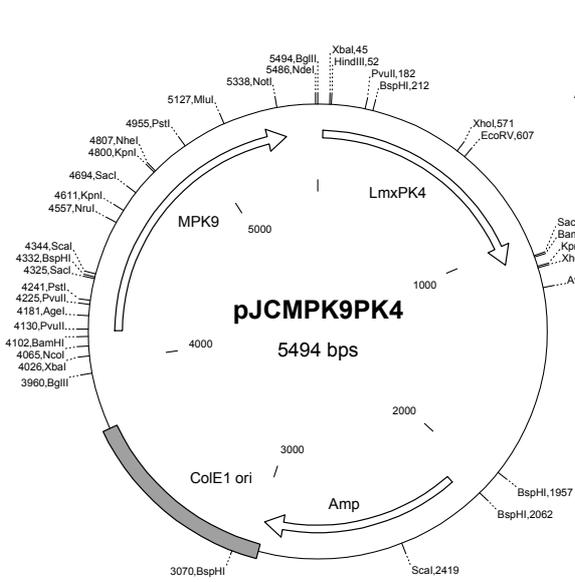
MS/MS 1302,456; Mascot score 58 für LmxMMPK13¹⁰KGEGPTFSEVLR²⁰MS/MS 1174,395; Mascot score 43 für LmxMMPK13¹¹GEGPTFSEVLR²⁰

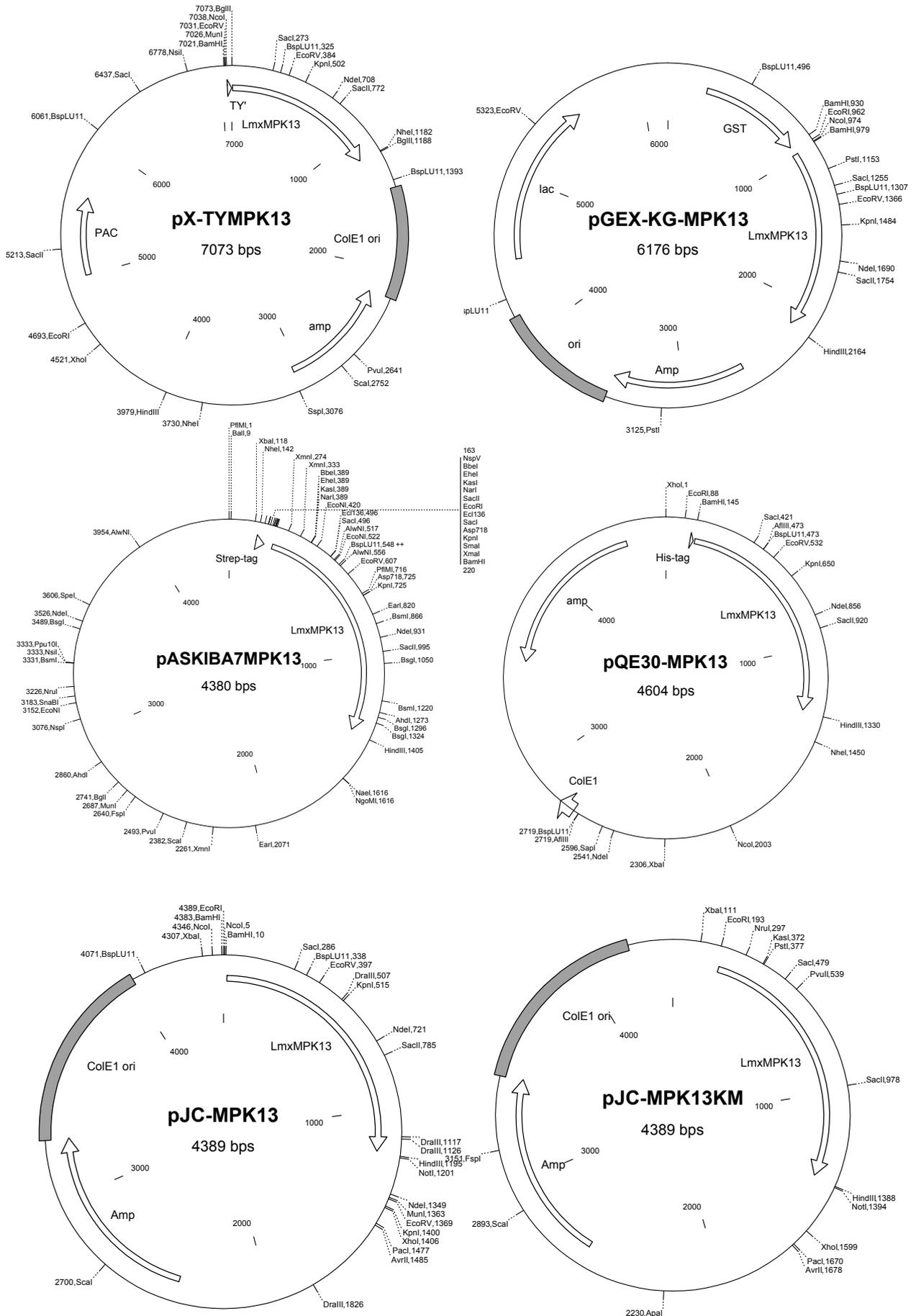
9.2.4 LmxMPK13-KM mit LmxPK4 coexprimiert

MS/MS 1939,529; LmXMPK13³²⁸KTTNGMPSLNpsPTLTASR³⁴⁴

9.3 Plasmidkarten







Danksagung

An erster Stelle möchte ich Dr. Martin Wiese für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Bernhard-Nocht-Institut durchzuführen danken, ebenso für die Themenstellung, die Betreuung der Arbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Bei Prof. Dr. Ulrich Hahn bedanke ich mich für die Übernahme der Betreuung und die Tätigkeit als Gutachter.

Dr. Eric Vassella und Sabine Morrand von der Universität Bern danke ich für die Zusammenarbeit bei dem TbMEKg-Projekt. Heidi Rosenqvist von der Süddänischen Universität in Odense möchte ich für MS/MS-Analysen danken und Frau Christel Schmetz vom BNI für die elektronenmikroskopische Untersuchung der Leishmanien.

Dr. Jeremy Mottram von der Glasgow University stellte freundlicherweise rekombinante, aktive LmxCRK3/Cyc6 zur Verfügung und Dr. Joachim Clos vom BNI den Expressionsvektor pJCduet.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern aus Labor 3 für die freundliche Zusammenarbeit und die tolle Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonderer Dank geht dabei an Anne MacDonald für die viele Unterstützung vor allem in der Endphase meiner Arbeit, Maja für die tolle Zusammenarbeit bei den „Flagellenprojekten“ sowie Mona und Nadja für die vielen hilfreichen Diskussionen. Zu Dank verpflichtet bin ich auch Daniela Kuhn für viele praktische Tipps zu Beginn meiner Arbeit und den fleißigen TA-Schülern Verena, Nadine, Claudia, Jan und Valea.

Besonderer Dank geht an Christian und meine Eltern, die immer an mich glaubten und mich geduldig unterstützten.

Lebenslauf

Anne Scholz

Geboren am 05. Februar 1981 in Hoyerswerda

Schulische Laufbahn

1992-1999 Konrad-Zuse-Gymnasium in Hoyerswerda

1999 Abiturnote 1,9

Hochschullaufbahn

1999-2003 Studium Chemieingenieurwesen an der FH Lausitz/Senftenberg

Diplomnote 1,4

Praktische Tätigkeiten

2001-2002 Praktikum am Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie in Berlin

Thema: Entwicklung einer Methode zum Nachweis abspaltbarer Signalpeptide bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren

2002 Praktikum am MPI für Biochemie in Martinsried

Thema: Optimierung eines Handspotters für DNA-Microarrays

03-11/2003 Diplomarbeit am Bernhard-Nocht-Institut bei Dr. Martin Wiese

Thema: Charakterisierung eines MAP Kinase Kinase Homologs aus *Leishmania mexicana*

12/2003-01/2008 Doktorarbeit am Bernhard-Nocht-Institut bei Dr. Martin Wiese

Thema: Interagierende Proteinkinasen in *Leishmania mexicana*, die an der Regulation der Flagellenlänge beteiligt sind

Kongressreisen und Vorträge

09/2005 Vortrag beim "Molecular Parasitology Meeting" in Woods Hole/USA,

11/2005 Einladung zu einem Vortrag an der FH Lausitz im Rahmen der Wissenschaftstage

02/2006 Vortrag beim Treffen der Deutschen Parasitologischen Gesellschaft in Wien/Österreich

08/2006 Posterpräsentation beim „International Congress of Parasitology“ in Glasgow/Schottland, unterstützt durch die Deutsche Forschungsgesellschaft

11/2007 Einladung zu einem Vortrag an der FH Lausitz im Rahmen der Wissenschaftstage