

Clemens Petrasch

Dr. med.

Calcium-Dependent Protein Kinases' Involvement in the Regulation of the *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter

Fach: Infektiologie

Doktorvater: Prof. Dr. Michael Lanzer

Malaria is one of the deadliest infectious diseases worldwide and in 2015 alone has caused 429.000 casualties. Formerly proven drugs, like chloroquine and equally quinoline-based drugs have been the mainstay in the treatment of malaria for many decades, even heralding its eradication. However, their efficacy is compromised by resistance mechanisms. The major part of chloroquine resistance is attributed to the *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter. Polymorphisms convert this transporter into a drug carrier that expels chloroquine and other antimalarial drugs out of their site of action, the digestive vacuole. The transporter can be phosphorylated at three sites. Phosphorylation at threonine 416 is essential for trafficking and sorting it to its site of residence. Unpublished data of the lab of Prof. Dr. Lanzer shows that the kinase inhibitors H-89, ML-7 and W-7 have significant effect on chloroquine accumulation. These inhibitors common target is the myosin light chain kinase in human cells. Because there is no homolog in the parasite's genome, a BLAST-search was performed to identify homologous protein kinases in *P. falciparum*. The BLAST search revealed that the family of calcium-dependent protein kinases in *P. falciparum* is highly homologous to the human myosin light chain kinase.

The objective of this study was to clone suitable vectors to generate conditional knock-down mutants of calcium-dependent protein kinases using the CRISPR-Cas9 technology and the glucosamine inducible Ribozyme system that might link specific kinases to the function of PfCRT. Vectors for calcium-dependent protein kinases 4,5,6 and 7 were successfully cloned and for the first time a calcium-dependent protein kinase 4 mutant, tagged with a haemagglutinin tag and a functional glucosamine inducible ribozyme was generated. The mutant was further characterised. A conditional knock down of calcium-dependent protein kinase 4 to ~35% of original expression was achieved. However, a growth assay revealed, that parasite growth is already impaired in a wildtype control at a concentration of 2.5 mM glucosamine, which is necessary to achieve a significant downregulation of the target protein.

In IC₅₀ experiments, no change in susceptibility to chloroquine or quinine while the kinase was downregulated was observed. The uptake of chloroquine or quinine was as well not affected by the downregulation of calcium-dependent protein kinase 4. All in all, the observed findings suggest that calcium-dependent protein kinase 4 is not linked to the function of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter. However, no definite conclusion can be drawn from the gathered data and further studies, if feasible with conventional knock out experiments, are recommended in future research to elucidate the role of calcium-dependent protein kinases in the regulation of PfCRT. The identification of involved kinases would not only contribute to a better understanding of drug resistance, but enable the establishment of an entire new drug class in the treatment of malaria.

Malaria ist nach wie vor eine der tödlichsten Infektionskrankheiten weltweit. Allein im Jahr 2015 forderte diese Geißel der Menschheit ~429.000 Opfer. Noch vor wenigen Jahren ließen Chloroquin und auf dem Quinolinring basierende Antimalariamedikamente, die jahrzehntelang erfolgreich eingesetzt worden waren, die Eradikation dieser Krankheit greifbar nah erscheinen. Ihr großes Potential wurde jedoch durch das Aufkommen von Resistenzmechanismen drastisch geschmälert. Als molekularer Hauptfaktor für Resistenz gegen Chloroquin gilt der *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter. Polymorphismen in seiner DNS Sequenz verleihen diesem Transporter die Fähigkeit, Chloroquin und andere Antimalariamedikamente hochwirksam aus ihrem Wirkort, der Verdauungsvakuole auszuschleusen. An 3 verschiedenen Stellen kann der Transporter phosphoryliert werden. Erst seit wenigen Jahren ist bekannt, dass die Phosphorylierung an Position Threonin 416 essentiell für den intrazellulären Transport des *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporters zur Verdauungsvakuole ist. Unveröffentlichte Daten aus dem Labor von Prof. Dr. Lanzer zeigen, dass der Parasit unter Inkubation mit den Kinaseinhibitoren H-89, ML-7 und W-7 signifikant mehr Chloroquin akkumuliert, ein direkter Hinweis, dass die Funktion des *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporters gestört wird. Diese Inhibitoren hemmen die Funktion der Myosin-Leichtketten-Kinase in menschlichen Zellen. Dieses Protein existiert jedoch nicht im parasitären Proteom. Eine BLAST-Suche nach homologen Sequenzen der Myosin-Leichtketten-Kinase im parasitären Genom identifizierte die Familie der Calcium-abhängigen Protein-Kinasen als Homologe der Myosin-Leichtketten-Kinase. Das Ziel dieser Arbeit war die Klonierung von Vektoren zur Erzeugung von konditional induzierbaren Knock-down Mutanten der Calcium-abhängigen Protein Kinasen mittels des CRISPR/Cas9 Systems und des Glukosamin-induzierbaren

Ribozyms. Für die Kinasen 4,5,6 und 7 der Proteinfamilie wurden die nötigen pL6 Konstrukte fertiggestellt und für die Calcium-abhängige Protein Kinase 4 konnte das erste Mal ein erfolgreicher Mutant generiert werden, dessen Kinase einen Hämagglutinin-Tag auf Proteinebene und ein funktionelles Glukosamin-induzierbares Ribozym auf RNS Ebene aufweist. Die Mutante wurde folgend charakterisiert. Eine konditional induzierte Reduktion der Proteinexpression auf ~35% der Ausgangsexpression der Calcium-abhängigen Protein-Kinase 4 konnte erzielt werden. Durch einen Wachstumsassay konnte jedoch gezeigt werden, dass der als Kontrolle genutzte Wildtypstamm Dd2 bereits durch Zugabe von 2,5 mM Glukosamin, welche notwendig ist um eine signifikante Proteinexpression dieser Größenordnung zu erhalten, in seinem Wachstum gehemmt wird. In folgenden IC₅₀ Experimenten konnte keine signifikante Änderung der Chloroquin- oder Chinin-Sensibilität der Parasitenmutanten unter Reduktion der Proteinexpression gezeigt werden. Die Aufnahme von Chloroquin oder Chinin war unter Knock-down Konditionen ebenfalls nicht statistisch signifikant beeinflussbar. Die Zusammenschau aller Ergebnisse lässt den Schluss naheliegen, dass die Calcium-abhängige Protein-Kinase 4 nicht an der Regulation des *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporters beteiligt ist. Eine finale Aussage lässt sich mit der aktuell spärlichen Datenlage jedoch nicht treffen. Weitere Untersuchungen, vorzugsweise mit konventionellen Knock-out Experimenten sind von Nöten um die Frage bezüglich der Regulation des *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter durch Mitglieder der Familie der Calcium-abhängigen Protein-Kinasen endgültig zu klären. Die Identifikation der in diesen Prozess involvierten Kinasen würde nicht nur einen wichtigen Baustein im molekularen Verständnis zum weitreichendsten Resistenzmechanismus von *Plasmodium falciparum* bedeuten, sondern gleichzeitig neue Angriffspunkte für eine gänzlich neue Medikamentenklasse erschließen.