

Daniel Herzenstiel
Dr. med.

Charakterisierung der calciumabhängigen Proteinkinasen PfCDPK4 und PfCDPK5 des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*

Geboren am 03.10.1976 in Wien, Österreich

3. Staatsexamen am 26.04.2005 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Heiner Schirmer

Die bedrohliche weltweite Zunahme der Malaria tropica und die Resistenzentwicklungen gegen die derzeit verfügbaren Antimalariamittel machen die Suche nach neuen Angriffspunkten für Wirkstoffe immer dringlicher. Hierbei erweisen sich die calciumabhängigen Proteinkinasen (PfCDPKs) von *Plasmodium falciparum* als ideale Angriffsziele, da sie bei der Umsetzung von intrazellulären Calciumsignalen in spezifische Zellantworten eine herausragende Stellung einnehmen. *Plasmodium falciparum* besitzt 6 PfCDPKs (PfCDPK1-6). Zwei dieser Kinasen sind nach dem heutigen Wissensstand für die Entwicklung der intraerythrozytären Stadien essentiell. Da dieser Kinasetypus beim Menschen nicht vorkommt, stellen die CDPKs ideale Zielproteine für die Entwicklung von neuen Antimalariamitteln dar, da von spezifische Inhibitoren geringe Nebenwirkungen zu erwarten sind. Zu Beginn des praktischen Teils der vorliegenden Arbeit waren von den hier untersuchten PfCDPK4 und PfCDPK5 nur die Gensequenzen und Microarray-Daten bekannt.

Zunächst wurden das offene Leseraster der PfCDPK5 und die cDNA der PfCDPK4 über PCR bzw. RT-PCR an genomischer DNA respektive mRNA amplifiziert. Nach Überprüfen der Sequenzen wurde das Gen bzw. die cDNA in Expressionsvektoren kloniert, in Expressionsstämme transformiert und in diesen die optimalen Bedingungen für die Herstellung von ausreichenden Mengen an löslicher rekombinanter PfCDPK4 bzw. PfCDPK5 ermittelt. Lösliches Protein konnte dabei nur in Form eines NusA-Fusionsprotein gewonnen werden. Für beide Kinasen ergab sich dabei eine maximale Ausbeute an löslichem Protein bei einer Expression im BL21-CodonPlus-RIL Bakterienstamm, einer Expressionszeit von 3 Stunden, einer Temperatur von 37°C und einer IPTG Konzentration für die Induktion von 0,04 mM für die PfCDPK4 und 0,1 mM für die PfCDPK5. Die Aufreinigung beider Proteine erfolgte über Affinitätschromatographie mit Ni-NTA als Säulenmatrix. Für die Aufreinigung der Fusionsproteine wurden folgende Bedingungen ermittelt: Die optimale Imidazol-Konzentration im Waschpuffer betrug für die PfCDPK4 10 mM und für die PfCDPK5 20 mM. Die Elution der Proteine erfolgte jeweils mit 100 mM Imidazol. Der Einsatz der Proteaseinhibitoren Benzamidin und PMSF steigerte die Ausbeute an Protein. Dennoch konnte durch die Zugabe eine Fragmentierung der Fusionsproteine nur geringfügig verringert werden. Beide Fusionsproteine erschienen - abgesehen von einer schwachen Proteinbande bei 130 kD, die der molekularen Masse der Fusionsproteine entspricht - vorwiegend in Form von Proteinfragmenten zwischen 72-90 kD. Um eine orientierende Bestimmung

der Kinaseaktivität durchführen zu können, wurde die Konzentration der aufgereinigten Fusionsproteinlösungen bestimmt, wobei diese für NusA_PfCDPK4 1,7 µg/µl und für NusA_PfCDPK5 2,05 µg/µl betrug. Dabei ist aber davon auszugehen, dass der NusA-Anteil des Proteins mit knapp 50 % zur Proteinbestimmung beiträgt und weitere nichtaktive Proteinfragmente den Anteil an Protein, der keine Kinaseaktivität besitzt, zusätzlich erhöhen.

Im Rahmen der durchgeführten Kinaseassays zeigten beide Kinasen die höchsten Phosphorylierungsraten bei der Umsetzung des Substrates Histon H1 in Gegenwart von Calcium, wobei unter diesen Bedingungen die errechnete spezifische Aktivität der PfCDPK4 3,6 nmol min⁻¹ mg⁻¹ und die spezifische Aktivität der PfCDPK5 48,3 nmol min⁻¹ mg⁻¹ beträgt. Zur Berechnung der relativen Aktivitäten beider Kinasen gegenüber anderen Substraten wurden die mit Histon H1 bestimmten Phosphorylierungsraten (gemessenen in Form des Einbaus von ³²P in Histon H1) als 100 % gesetzt, während die Phosphorylierungsraten der übrigen Substrate (jeweils unter Berücksichtigung der Rolle von Calcium) in prozentualer Relation zu denen von Histon H1 berechnet wurden. Das sich daraus ergebende substratspezifische Aktivitätsprofil zeigt, dass die relativen Aktivitäten der PfCDPK5 (Histon H1 = 100 %, Casein = 51,86 %, Myelin basic protein (MBP) 24,85 %) keinen grundsätzlichen Unterschied zur PfCDPK4 (Histon H1 = 100 %, Casein = 38,9 %, MBP 35,9 %) oder zur PfCDPK1 aufweisen. Die Calcium-unabhängige relative Aktivität der PfCDPK5 streut zwischen maximal 5,1 % (Histone H1) und 2,49 % (Casein), wohingegen diese bei der PfCDPK4 unabhängig von dem anwesenden Substrat sehr niedrig ist (Histon H1: 0,4 %, MBP 0,27 %). Es kann aus statistischen Gründen nicht beurteilt werden, ob die Kinasen ohne Substrat und ohne Calcium (PfCDPK4: 0,09 %; PfCDPK5: 0,03 %) inaktiv sind oder ob sie eine minimale Grundaktivität aufweisen. Während die relative Aktivität der PfCDPK4 ohne Substrat in der Gegenwart von Calcium mit 20,66 % sehr hoch ist, weist auch die PfCDPK5 unter diesen Bedingungen eine geringe relative Aktivität von etwa 3,6 % auf. Die Ursache für diese in Abwesenheit eines Substrates vorliegende Aktivität liegt vermutlich in der Fähigkeit der Kinasen zur Autophosphorylierung. Mittels Autoradiographie wurde nachgewiesen, dass sowohl die PfCDPK4 als auch die PfCDPK5 über eine Calcium-abhängige Autophosphorylierungsaktivität verfügen.

Mit den Kinaseassays ist erstmalig ein Funktionsnachweis ebenso wie eine Charakterisierung des calciumabhängigen Aktivitätsmusters der PfCDPK4 und der PfCDPK5 gelungen, wobei die spezifischen Aktivitäten beider Kinasen unter noch zu optimierenden Bedingungen vermutlich deutlich über den o.g. Werten liegen. Die in der vorliegenden Arbeit erstmalig etablierten Protokolle zur Synthese von ausreichend löslicher PfCDPK4 und PfCDPK5 können als Grundlage herangezogen werden, um mit dem erforderlichen Screening von Inhibitoren gegen beide Kinasen zu beginnen. Hierbei rückt insbesondere die PfCDPK5 (aufgrund ihres Expressionsmaximums in den erythrozytären Parasitenstadien) in die engere Auswahl von Zielproteinen für neue Medikamente gegen die Malaria tropica.