

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Apotheker Christian Möskes
aus Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Thema

Plasmodium falciparum calciumabhängige Proteinkinase 1

(PfCDPK1):

Strukturelle und funktionelle Charakterisierung

Gutachter: Prof. Dr. Michael Lanzer

Prof. Dr. Heiner R. Schirmer

Die vorliegende Arbeit wurde am Hygiene-Institut, Abteilung Parasitologie der Universität Heidelberg und am Biochemiezentrum Heidelberg (BZH) der Universität Heidelberg in der Zeit von August 1999 bis Juni 2004 unter der Leitung von PD. Dr. Barbara Kappes durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht und befinden sich derzeit in Revision.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz besonders bei meiner Doktormutter PD Dr. Barbara Kappes bedanken, die mir während der ganzen Jahre eine ausgezeichnete Betreuerin war. Durch ihre fachliche Kompetenz, ihre Beharrlichkeit und ihre unstillbare Neugierde hat sie einen wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit. Sie hatte stets ein offenes Ohr für sowohl fachliche als auch persönliche Probleme und stand mir mit Rat und Tat zur Seite. Überhaupt konnte ich mir ihrer Unterstützung immer sicher sein. Sie verlor nie den menschlichen Faktor aus den Augen, weshalb sie mir nicht nur wissenschaftlich, sondern auch menschlich ein großes Vorbild geworden ist.

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei Prof. Dr. Heiner Schirmer, der mich während der ersten Monate meiner Arbeit so freundlich in seiner Arbeitsgruppe im BZH aufgenommen und die Finanzierung meiner Stelle gesichert hat. Ihm möchte ich auch danken, dass er sich bereit erklärt hat, meine Arbeit zu begutachten, sowie für die vielen hilfreichen Ratschläge und immer ein nettes Wort.

Herzlichen Dank auch an Prof. Dr. Michael Lanzer, der gerne bereit war, die Begutachtung meiner Arbeit zu übernehmen und es mir ermöglicht hat meine Arbeit in der Abteilung für Parasitologie durchzuführen.

Ein großes Dankeschön auch an Dr. Ivo Tews, der mich geduldig in die Welt der Proteinkristallisation eingewiesen hat. Danke für die tolle Betreuung und die vielen Kuchen, die mir die „abertausend“ Kristallisationsansätze im Kühlraum etwas versüßt haben.

Ein ganz großes Dankeschön auch an meine Mitdotorandin Kirsten Plückhahn für die tolle Kooperation im Labor, für das fleißige Korrekturlesen aber vor allem für die unzähligen netten Kaffeepausen, die es ermöglicht haben dem Laboralltag täglich für einige Minuten zu entfliehen.

Vielen Dank an Dr. Kathy Andrews für die gute Kooperation, für die unzähligen Pipetten und anderen Zellkulturutensilien, die ich mitbenutzen durfte sowie die Übernahme der Transfektion und Parasitenkultivierung einiger Experimente, die hier leider nicht erwähnt werden konnten.

Mein besonderer Dank gilt auch Nicole Klatt für die gute Betreuung meiner Parasiten, aber besonders für die vielen netten Gespräche und ihre große Hilfe in schweren Zeiten, durch die ich wieder auf die Beine gekommen bin.

Herzlichen Dank auch an Svenja Günther für die Hilfe bei der Transfektion und Mikroskopie sowie für die GFP-Kontrollen und an Martin Gengenbacher für die vielen hilfreichen Tipps im Labor.

Danke an alle Mitglieder der Arbeitsgruppen Lanzer und Matuschewski, die mir immer bereitwillig weitergeholfen haben, wenn ich mal wieder nicht weiter wusste. Danke für die vielen aufbauenden Worte, die Unterstützung im Laboralltag und all die vielen Zellkulturutensilien, Chemikalien und

Geräte, die ich mitbenutzen durfte. Danke vor allem an Jude für das GFP und die hilfreichen Ratschläge zur Transfektion sowie an Yvonne und Petra für ihre wertvolle Hilfe am konfokalen Mikroskop.

Ein Dankeschön auch an Dr. Petra Burghaus in Marburg für die Übernahme der Luciferase-Experimente mit meinen Transfektionskonstrukten und für den interessanten Laborexkurs in Marburg.

Danke auch an Prof. Dr. Irmgard Sinning, dass ich einen Großteil meiner Kristallisations- und Proteincharakterisierungsexperimente in ihrer Arbeitsgruppe durchführen durfte. Danke für all die Geräte, Säulen, Materialien und Chemikalien die ich mitbenutzen durfte. Ferner möchte ich allen Mitgliedern der AG Sinning, insbesondere Werner Schaller, für die gute Zusammenarbeit und das freundliche Exil im BZH danken.

Ich danke auch den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Schirmer, Krauth-Siegel und Brossmer vom BZH für die freundliche Aufnahme während meiner Zeit am BZH zu Anfang meiner Arbeit und für die Hilfe bei der Einarbeitung in den Laboralltag.

Dr. Tim Gilberger und Prof. Dr. Alan Cowman möchte ich für die Überlassung des pARL-1a+-Vektors danken, der die Transfektion meiner GFP-Konstrukte erst ermöglicht hat

Ich danke der DFG für die Finanzierung meiner Stelle, im Rahmen des Schwerpunktprogrammes „Voraussetzungen und molekulare Mechanismen der Persistenz von Parasiten im Wirt“ und zeitweise durch die Bereitstellung eines Stipendiums im Rahmen des Graduiertenkollegs „Pathogene Mikroorganismen: molekulare Mechanismen und Genome“

Ferner möchte ich der WHO für die Finanzierung des High Throughput Screenings an PfCDPK1 und für die Bereitstellung der SPECS- und Olivia-Substanzbibliotheken danken.

Ich danke auch Prof. Dr. Beck und Dr. Hassan Jooma von der Universität Gießen für die Bereitstellung der Herbizid-Substanzbibliothek zu unserer Testung.

Vielen Dank auch an Dr. Sylke Müller in Dundee für die vielen guten technischen Ratschläge.

Schließlich möchte ich ganz besonders meinen lieben Eltern Carl und Stefanie Möskes dafür danken, dass sie mir in meinem Leben alles ermöglicht haben, auch mein Studium und schließlich diese Arbeit, und dass ich mir Ihrer uneingeschränkten Unterstützung und Liebe in allen Lebenslagen immer sicher sein kann.

Abkürzungen

α	anti
A	Adenin oder Alanin
AA	Acrylamid
AB	Antibiotikum
ADP	Adenosindiphosphat
AGE	Agarosegelelektrophorese
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bead	Affi-Prep [®] Protein A Matrix (Bio-Rad)
bp	Basenpaare
β -ME	beta-Mercaptoethanol
BSA	Rinderserum-Albumin
BZH	Biochemiezentrum Heidelberg
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius, Cytosin oder Cystein
ca.	circa
CBD	Calcium-bindende Domäne
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CPMM	Canine Pancreatic Microsomal Membranes (Mikrosomale Membranen aus Hundepankreas)
Cys	Cystein
Δ	Delta, entspricht Deletion
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DHFR-TS	Dihydrofolatreduktase-Thimidylatsynthase
DimPim	Dimethyl-pimelinidat-dihydrochlorid
DLS	Dynamic Light Scattering, Dynamische Lichtstreuung
DM	Doppelmutante
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNAse	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonucleosid-Triphosphat
DRM	Detergenzien-resistente Membranen

DTL	Discovery Technologies Ltd.
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
el.	elektrisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Farad (Einheit der Kapazität eines el. Feldes)
Frakt.	Fraktion
<i>g</i>	Vielfaches der Edbeschleunigung
G	Glycin oder Guanin
GE	Gelelektrophorese
GFP	Green fluorescent proteine (grün fluoreszierendes Protein)
Gly	Glycin
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HASPB	hydrophilic acylated surface protein B (<i>Leishmania</i>)
Hkt	Hämatokrit
H ₂ O mp.	entionisiertes Wasser (Millipore)
lucSK	Luciferase kloniert in den Vektor pBSIISK+
IACH	Ionenaustausch-Chromatographie
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
iRBC	infizierte rote Blutkörperchen (infected Red Blood Cells)
K	Lysin
kb	Kilobasenpaare
KD	Katalytische Domäne
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
λ	Lambda, Wellenlänge
LB	Luria-Broth
μ	Mikro-, 10 ⁻⁶
M	Methionin oder Molar
mA	Milliampere
M _a	apparentes Molekulargewicht
MACS	Magnetische Zellsortierung (“magnetic activated cell sorter”)
mM	Millimolar
M _r	relatives Molekulargewicht
mRNA	Boten RNA („messenger RNA“)
MSP1	merozoite surface protein 1
n	Nano-, 10 ⁻⁹
NEB	New England Biolabs

nm	Nanometer (m^{-9})
N-Terminus	Amino-Terminus
Ω	Ohm, Einheit des el. Widerstandes
OD	Optische Dichte
OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei $\lambda=600$ nm
PÄ	Parasitenäquivalent
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAT	Palmitoyl-Acyltransferase
PBC	Polybasisches Cluster
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfCDPK	<i>Plasmodium falciparum</i> calciumabhängige Proteinkinase
PfCRT	<i>Plasmodium falciparum</i> Chloroquin-Resistenzgen
PfDHFR	<i>Plasmodium falciparum</i> Dihydrofolatreduktase
PfEMP-1	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PV	Parasitophore Vakuole
PVM	Membran der Parasitophoren Vakuole
R	Arginin
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS	Sodiumdodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat), Natriumlaurylsulfat
Ser	Serin
Site	Abkürzung für Restriktionsschnittstelle (Restriction site)
SK	pBS II SK (Plasmid-Vektor , Stratagene [®])
sog.	sogenannte, -r
<i>Src</i>	Onkogen des Rous-Sarkoma Virus
SSC	saline sodium-citrate
SV	Säulenvolumen
T	Threonin oder Thymin
τ	Tau, Zeitkonstante
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris/EDTA
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
TNF	Tumorn-Nekrose-Faktor

TS	Thymidylatsynthase
TNF	Tumorn-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T/T	Transkription/Translation
U	biochemische Einheit für die Enzymaktivität
ÜN	über Nacht
ÜNK	über Nacht Kultur
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V_{\max}	hier: spezifische Enzymaktivität
V	Volt oder Valin
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
WT	Wildtyp
x	mal, -fach
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	I
Inhaltsverzeichnis.....	V
Zusammenfassung.....	1
Summary	3
1 Einleitung	5
1.1 Allgemeines.....	5
1.2 Lebenszyklus und Biologie von <i>Plasmodium falciparum</i>	6
1.3 Das Krankheitsbild der Malaria.....	8
1.4 Therapie der Malaria tropica im Wandel.....	10
1.5 Calciumabhängige Proteinkinasen als Vermittler von Ca ²⁺ -induzierten Signaltransduktionswegen bei Pflanzen und Protozoen	12
1.5.1 Ca ²⁺ : Ein wichtiger intrazellulärer Botenstoff der Zelle.....	12
1.5.2 Calciumabhängige Proteinkinasen.....	13
1.5.3 <i>Plasmodium falciparum</i> calciumabhängige Proteinkinase 1 (PfCDPK1)	15
1.5.3.1 Aufbau und Enzymaktivität	17
1.5.3.2 Biologische Funktion.....	17
1.6 Modifikation von Proteinen durch N-terminale Acylierung.....	19
1.6.1 N-terminale Proteinmodifikation durch Myristylierung und Palmitoylierung	19
1.6.2 Das Zwei-Signal-Modell zur Membranverankerung myristylierter Proteine und der „myristoyl-electrostatic switch“ Mechanismus	21
1.6.3 Membrananker- und Zielgebungsmotive bei PfCDPK1	23
1.7 Proteintransport in eukaryontischen Zellen	23
1.8 Ziel dieser Arbeit.....	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Materialien	28
2.1.1 Laborausstattung.....	28
2.1.2 Chemikalien.....	31
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	33
2.1.4 Enzyme	33
2.1.5 Größenmarker für Elektrophorese	34
2.1.6 Nukleinsäuren.....	34
2.1.6.1 Oligonucleotide, Primer.....	34
2.1.6.2 Vektoren.....	36
2.1.7 Bakterienstämme	36
2.1.8 Antikörper	36

2.1.9 Puffer, Lösungen, Medien	36
2.2 Methoden.....	38
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	38
2.2.1.1 Medien und Lösungen für die Kultur von <i>E. coli</i>	38
2.2.1.2 Übernachtskulturen (ÜNK)	38
2.2.1.3 Herstellung einer Glycerol-Bakterienstocklösung	39
2.2.1.4 Alkohol-fällung von DNA	39
2.2.1.5 Agarosegelelektrophorese.....	39
2.2.1.6 Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegelelektrophorese	40
2.2.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
2.2.1.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> für Routineaufgaben: Minipräp	40
2.2.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mit hoher Reinheit	42
2.2.1.10 Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> : Maxi-Präp	42
2.2.1.11 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA mittels Absorptionsmessung	42
2.2.1.12 Restriktionsverdau von DNA.....	43
2.2.1.13 Ligation von DNA	43
2.2.1.14 Enzymatische DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
2.2.1.15 Austausch und Herausschneiden von Nucleotidbasen durch ortsspezifische Mutagenese	44
2.2.1.16 Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> für die Transformation	45
2.2.1.17 Hitzeschock-Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	46
2.2.1.18 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i>	46
2.2.1.19 Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> durch Elektroporation	47
2.2.2 Biochemische Methoden	47
2.2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	47
2.2.2.2 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen	48
2.2.2.3 Auftrennung von Proteingemischen mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS- PAGE).....	48
2.2.2.4 Färbung und Fixierung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliantblau.....	49
2.2.2.5 Dephosphorylierung von Protein mit λ -Phosphatase.....	49
2.2.2.6 TEV-Protease-Verdau	50
2.2.2.7 Trypsin/Chymotrypsin-Verdau	50
2.2.2.8 In vitro Transkription/Translation.....	50
2.2.2.9 In vitro Transkription/Translation unter Verwendung mikrosomaler Membranen.....	52
2.2.2.10 Kinaseassays zur Bestimmung der Enzymaktivität von PfCDPK1	53
2.2.2.11 Kinaseassays zur Ermittlung potentieller Inhibitoren von PfCDPK1	54
2.2.2.12 Bestimmung der IC ₅₀ eines Inhibitors.....	55
2.2.2.13 In vitro Transkription/Translation kombiniert mit Kinaseassay	55
2.2.2.14 Kristallisationsexperimente mit PfCDPK1	55
2.2.2.15 Analyse von Proteinlösungen mittels Dynamic Light Scattering	55
2.2.3 Proteinaufreinigung	56

2.2.3.1 Expression und Aufreinigung von PfCDPK1 und EKII für Enzymassays und Kristallisationsexperimente	56
2.2.3.1.1 Rekombinante Proteinexpression	57
2.2.3.1.2 Zellaufschluß.....	57
2.2.3.1.3 Nickel-Affinitätschromatographie.....	57
2.2.3.1.4 Aufarbeitung des Proteineluats	57
2.2.3.2 Expression und Aufreinigung rekombinanter PfCDPK1-Derivate für Kristallisationsexperimente sowie deren biochemische Charakterisierung.....	58
2.2.3.2.1 Rekombinante Proteinexpression.....	58
2.2.3.2.2 Zellaufschluß.....	59
2.2.3.2.3 Nickel-Affinitätschromatographie.....	59
2.2.3.2.4 Größenausschlußchromatographie/Gelchromatographie	60
2.2.3.2.5 Ionenaustauschchromatographie	61
2.2.4 Zellkultur	63
2.2.4.1 Kultivierung von <i>P. falciparum</i> in vitro.....	63
2.2.4.1.1 Aufbereitung von humanen Erythrocyten:	64
2.2.4.1.2 Aufbereitung von humanem Serum	64
2.2.4.2 Mikroskopische Darstellung von <i>P. falciparum</i> mittels Giemsa-Färbung.....	64
2.2.4.3 Bestimmung der Parasitämie	65
2.2.4.4 Synchronisation von <i>P. falciparum</i> -Kulturen mit Sorbitol	65
2.2.4.5 Einfrieren von Parasiten.....	65
2.2.4.6 Auftauen von Parasiten	66
2.2.5 Zellbiologische Methoden	66
2.2.5.1 Transfektion von <i>Plasmodium falciparum</i>	66
2.2.5.1.1 Stabile Transfektion zur Expression von GFP-Fusionsproteinen.....	67
2.2.5.1.2 Transiente Transfektion von <i>P. falciparum</i> zur Expression von Luciferase-Fusionsproteinen	68
2.2.5.2 Anreicherung von Trophozoiten und Schizonten durch Magnetelution	68
2.2.5.3 Prinzip der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie	69
2.2.5.4 Herstellung von Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern.....	70
2.2.5.5 Fraktionierte Saponinlyse von infizierten Erythrocyten	70
2.2.5.6 [³ H]Hypoxanthin Inkorporations Assay (IC ₅₀ -Bestimmung).....	71
2.2.5.7 Metabolische Markierung von PfCDPK1 mit [³ H]Myristat und [³ H]Palmitat in vivo	73
2.2.5.7.1 Metabolische Markierung	73
2.2.5.7.2 Parasitenpräparation nach metabolischer Markierung	73
2.2.6 Immunologische Methoden	74
2.2.6.1 Immunpräzipitation von PfCDPK1 im Anschluss an die metabolische Markierung mit [³ H]Myristat und [³ H]Palmitat.....	74
2.2.6.1.1 Kovalente Kopplung der Antikörper 2129a und 2979a an Protein A Beads (Affi-Prep [®] protein A matrix Bio-Rad) für die Immunpräzipitation.....	74

2.2.6.1.2 Immunpräzipitation von PfCDPK1	74
3 Ergebnisse	76
3.1 Identifikation spezifischer gegen PfCDPK1 gerichteter Inhibitoren	76
3.1.1 Gewinnung von rekombinanter PfCDPK1 für Enzymassays	76
3.1.2 Screening einer Herbizid-Datenbank.....	77
3.1.3 High Throughput Screen (HTS) gegen PfCDPK1.....	78
3.1.4 Testung der 436 SPECS-HTS-Hit Analoga.....	80
3.1.5 Testung der 283 Olivia-HTS-Hit Analoga.....	81
3.2 Biochemische Charakterisierung von PfCDPK1 zur Verbesserung der Kristallisationseigenschaften	82
3.2.1 Vorarbeiten: Expression und Kristallisationsexperimente mit PfCDPK1 WT und EKII in Stueber Nr. 9	82
3.2.2 Expression, Aufreinigung und biochemische Charakterisierung von D212A, einer katalytisch inaktiven Mutante von PfCDPK1	84
3.2.2.1 Expression und Aufreinigung	84
3.2.2.2 Untersuchung des Einflusses von Ca ²⁺ auf den Multimerisierungszustand von PfCDPK1-D212A.....	85
3.2.2.2.1 Analyse mittels Gelfiltration	85
3.2.2.2.2 Analyse mittels Dynamic Light Scattering	86
3.2.2.2.3 Verhalten von D212A nach Aufreinigung in Standardpuffer.....	86
3.2.2.2.4 Verhalten von D212A nach Aufreinigung in Ca ²⁺ -haltigem Puffer	88
3.2.2.2.5 Verhalten von D212A nach Aufreinigung in EGTA-haltigem Puffer.....	89
3.2.2.3 Proteolytischer Verdau von D212A.....	91
3.2.3 Untersuchungen mit den N-terminal verkürzten PfCDPK1 Mutanten N51 und N30.....	91
3.2.3.1 Klonierung der Expressionskonstrukte	92
3.2.3.2 Optimierung der Expressions- und Aufreinigungsbedingungen der N30- und N51- Expressionskonstrukte zur Gewinnung von rekombinantem Protein für Kristallisations- und Charakterisierungsexperimente	94
3.2.3.3 Kristallisationsansätze mit N51 und N30.....	97
3.2.4 Der Einfluss von Ca ²⁺ auf die Konformation und die apparente Größe von PfCDPK1	99
3.2.5 Charakterisierung der Autophosphorylierung von PfCDPK1 über Ionenaustauschchromatographie	102
3.3 Charakterisierung der Membranverankerung und Zielgebung von PfCDPK1	108
3.3.1 Einführung von Punktmutationen und Generierung von Deletionsmutationen in PfCDPK1	109
3.3.2 Metabolische Markierung von PfCDPK1 in vivo.....	110
3.3.2.1 Metabolische Markierung von PfCDPK1 mit [9,10,- ³ H]Myristat	110
3.3.2.2 Metabolische Markierung von PfCDPK1 mit [9,10,- ³ H]Palmitat	111
3.3.3 Untersuchungen zur Membranverankerung von PfCDPK1 mittels in vitro Transkription/Translation	112
3.3.3.1 Klonierung der Konstrukte für die in vitro Transkriptions-/ Translationsreaktionen	113
3.3.3.2 In vitro Transkription/Translation in Anwesenheit von [³⁵ S]Methionin	114

3.3.3.3 In vitro Transkription/Translation in Anwesenheit von [9,10- ³ H]Myristat	114
3.3.3.4 In vitro Transkription/Translation in Anwesenheit von [9,10- ³ H]Palmitat.....	116
3.3.3.5 In vitro Transkription/Translation in Anwesenheit von mikrosomalen Membranen	116
3.3.3.6 Der Einfluss von Autophosphorylierung auf die Membranbindung von PfCDPK1	119
3.3.4 Untersuchung der Lokalisation von PfCDPK1-Luciferase Fusionsproteinen mittels fraktionierter Saponinlyse.....	121
3.3.4.1 Klonierung der PfCDPK1-Luciferase Transfektionsplasmide.....	122
3.3.4.2 Membranfreisetzung der Luciferase-Fusionsproteine von PfCDPK1 und ihrer Mutanten durch fraktionierte Saponinlyse.....	125
3.3.5 Untersuchung der Lokalisation und Zielgebung von PfCDPK1-GFP Fusionsproteinen durch konfokale Laser-Scan-Mikroskopie	127
3.3.5.1 Herstellung und Transfektion der GFP-pHC I Konstrukte	128
3.3.5.1.1 Klonierung der GFP Transfektionskonstrukte in den Vektor pHC I.....	129
3.3.5.1.2 Transfektion der GFP-pHC I Konstrukte	130
3.3.5.2 Herstellung und Transfektion der GFP-pARL-1a+ Konstrukte	130
3.3.5.2.1 Klonierung der GFP Transfektionskonstrukte im Vektor pARL-1a+	131
3.3.5.2.2 Transfektion der GFP-pARL-1a+ Konstrukte.....	133
3.3.5.2.3 Mikroskopische Analyse der GFP exprimierenden Transfektionsklone	133
4 Diskussion	140
4.1 Identifikation spezifischer gegen PfCDPK1 gerichteter Inhibitoren	140
4.2 Biochemische Charakterisierung von PfCDPK1 zur Verbesserung der Kristallisationseigenschaften	142
4.3 Charakterisierung der Membranverankerung und Zielgebung von PfCDPK1	149
Literaturverzeichnis.....	157
Anhang	162
Sequenzen:.....	162
Vektoren	163

Zusammenfassung

Veränderungen der cytosolischen Konzentration von Ca^{2+} -Ionen spielen eine Schlüsselrolle bei der Signaltransduktion eukaryontischer Zellen. Ein Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration kann die Reaktion auf eine Vielzahl von Stimuli sein und ermöglicht es der Zelle sich veränderten Umweltbedingungen anzupassen. So konnte für *Plasmodium falciparum*, den Erreger der Malaria tropica, gezeigt werden, dass Calcium sowohl bei der Invasion der Erythrocyten als auch für die intraerythrocytäre Entwicklung der Parasiten essentiell ist. Als mögliche Zielproteine und Vermittler der Ca^{2+} -induzierten Signaltransduktion wurden unter anderem calciumabhängige Proteinkinasen (CDPKs) identifiziert.

CDPKs haben in Pflanzen und einigen Spezies der Protozoen, so auch in *P. falciparum*, eine Schlüsselfunktion bei der Vermittlung calciumabhängiger Phosphorylierungsereignisse inne. Sie sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt und ermöglichen es der Zelle, auf zahlreiche Umwelteinflüsse und Stress zu reagieren. CDPKs sind enge Verwandte der Calcium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (CaMPK) tierischer Zellen und Pilze. Sie unterscheiden sich aber von diesen durch die Kombination einer katalytischen Serin/Threonin-Proteinkinasedomäne und einer dem Calmodulin verwandten regulatorischen Ca^{2+} -bindenden Domäne in einem Protein. In *P. falciparum* konnten bisher fünf dem klassischen Typus zuzuordnende CDPKs identifiziert werden. Die *P. falciparum* calciumabhängige Proteinkinase 1 (PfCDPK1) scheint an der Invasion von Erythrocyten sowie an der Regulation von Membranbiogenese Prozessen beteiligt zu sein.

Die herausragende Bedeutung der CDPKs für die Funktion der Zelle und die Tatsache, dass sie nur in Pflanzen und einigen Protozoen wie *Plasmodium*, nicht aber in tierischen Zellen vorkommen, macht PfCDPK1 zu einem idealen Angriffsziel für die Entwicklung neuer Pharmaka gegen die Malaria tropica, die den Erreger spezifisch bekämpfen, den menschlichen Wirt dabei aber nicht schädigen.

Ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit richtete sich deshalb auf die Identifizierung eines spezifischen Inhibitors von PfCDPK1, der als Grundlage für die Entwicklung einer neuen pharmakophoren Leitstruktur dienen sollte. Dabei wurden zwei unterschiedliche Wege eingeschlagen. Zum einen wurden in einem High Throughput Screening sowie in eigenen Laborversuchen mehrere Substanzbanken auf mögliche Inhibitoren von PfCDPK1 untersucht. Zum anderen sollte durch die Kristallisation und anschließende Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von PfCDPK1 und der Bindungsverhältnisse im Molekül die Grundlage für ein molecular modelling eines spezifischen Inhibitors gelegt werden.

Die Kristallisation von Proteinen stellt hohe Anforderungen an die Reinheit und Homogenität eines Proteins in Lösung. Aus diesem Grunde wurde zunächst eine umfangreiche biochemische

Charakterisierung von PfCDPK1 durchgeführt, auf deren Grundlage ein Protokoll für die Expression und Aufreinigung geeigneter Expressionskonstrukte von PfCDPK1 entwickelt wurde. Rekombinantes Protein, das nach diesem Protokoll aufgereinigt war, bildete die Ausgangsbasis für zahlreiche Kristallisationsansätze.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit befasste sich mit den Membranverankerungs- und Zielgebungsmotiven von PfCDPK1. Die Kinase besitzt in ihrem N-Terminus drei Motive, über die eine Membrananheftung erfolgen kann: eine Konsensussequenz für eine Myristylierung, eine mögliche Palmitoylierungsstelle und ein Cluster basischer Aminosäuren. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl endogene als auch in vitro translatierte PfCDPK1 myristyliert wird. Darüber hinaus konnte in Membranbindungsstudien mit in vitro translaterter PfCDPK1 bzw. Mutanten mit veränderten Membranankermotiven die Membranbindungsfunktion der Myristylierung und des basischen Aminosäureclusters experimentell bestätigt werden. Die fraktionierte Saponinlyse transient transfizierter Parasiten, welche PfCDPK1 oder eine ihrer Mutanten exprimierten, untermauern diese Beobachtungen.

Schließlich sollte mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen der Einfluss der Membranankermotive auf die Lokalisation von PfCDPK1 im infizierten Erythrocyten untersucht werden. Hierzu wurde die N-terminale Signalsequenz von PfCDPK1 und ihrer Mutanten an GFP gekoppelt, die Konstrukte in *P. falciparum* transfiziert und die Lokalisation der GFP-Konstrukte mittels konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass für den Transport der Kinase in die parasitophore Vakuole und von ihr abgeleiteten Membransysteme alle drei Membranbindungsmotive erforderlich sind.

Summary

Changes in the cytosolic concentration of calcium ions (Ca^{2+}) play a key second messenger role in signal transduction of eukaryotic cells. A rise in the concentration of Ca^{2+} is a reaction to a multitude of different stimuli and enables the cell to respond to environmental changes. For *Plasmodium falciparum*, the causative agent of malaria tropica, it has been shown that Ca^{2+} is essential both for invasion of the red blood cell as well as for the intraerythrocytic development of the parasite. As a possible target and mediator of Ca^{2+} -induced signal transduction, calcium-dependent protein kinases (CDPKs) have been identified.

In plants and some protozoa, including *P. falciparum*, CDPKs are the key enzymes for calcium-dependent phosphorylation events. They are involved in multiple cellular processes and allow the cell to respond to a variety of biotic and abiotic stress stimuli. CDPKs are characterised by the presence of two functional domains within their polypeptide sequence: a serine/threonine protein kinase catalytic domain and a Ca^{2+} -binding regulatory domain similar to calmodulin. In *P. falciparum* five classical CDPKs have been identified. The *P. falciparum* calcium dependent protein kinase 1 (PfCDPK1) seems to play a role in red blood cell invasion and the regulation of membrane biogenesis.

The outstanding importance of CDPKs for cell function and the fact that they are only found in plants and some protozoal species, but are absent from multicellular organisms of the animal kingdom, makes PfCDPK1 an ideal target for the development of new drugs against malaria tropica, which could specifically combat the parasite without harming the human host.

Thus a main attention of this thesis was focussed on the identification of a specific inhibitor of PfCDPK1 which could serve as a lead structure for the development of a novel antimalarial drug. The first approach was based on conventional compound screening. Several compound libraries were screened for PfCDPK1 inhibitors. A major part of this was done in a high throughput screening campaign. The Screening of the derivatives of the hit compounds and the screening of a herbicide library was carried out in our lab. The second approach was based on the identification of a specific inhibitor by molecular modelling. Therefore efforts were made to crystallize PfCDPK1 to enable the elucidation of the 3-dimensional structure and the molecular binding conditions of PfCDPK1 by X-ray diffraction. The crystallization of proteins is rather complex and makes great demands on the purity and homogeneity of a protein in solution. Therefore a thorough biochemical characterisation of PfCDPK1 was carried out, on the basis of which a protocol for the expression and purification of suitable expression constructs was developed. Such recombinant proteins were then used for a multitude of sparse matrix crystal screens.

A further aspect of this work focused on the mechanisms involved in the membrane attachment and cellular targeting of PfCDPK1. The kinase contains three motifs for membrane binding at its N-terminus: a consensus sequence for myristoylation, a putative palmitoylation site and cluster of basic amino acids. Endogenous PfCDPK1 and the *in vitro* translated kinase were both shown to be myristoylated. To characterise the factors involved in membrane attachment, membrane-binding assays of *in vitro* translated PfCDPK1 and mutant proteins with changes in the membrane anchoring motifs were performed. The supposed membrane attachment function of the basic cluster was experimentally verified and shown to participate together with N-myristoylation in membrane anchoring of the kinase. In a further experiment, these findings could be confirmed for *in vivo* expressed PfCDPK1 and mutants by fractionated saponine lysis of transiently transfected parasites.

Finally the influence of the membrane-binding motifs on the localisation of PfCDPK1 within the infected red blood cell should be determined by using GFP fusion proteins carrying the N-terminal signal sequence of PfCDPK1 or its mutants. The constructs were transfected in *P. falciparum* and the localisation of the GFP fusion proteins within the infected erythrocyte was analysed by confocal laser scan microscopy. Using this approach it could be demonstrated, that all three membrane binding motifs are required for translocation of PfCDPK1 to the parasitophorous vacuole (PV) and other membranous structures derived from the PV.

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Die Malaria ist die häufigste Tropenkrankheit und eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten überhaupt. Nach Schätzungen der WHO erkranken an ihr weltweit jährlich zwischen 300-500 Millionen Menschen. Malaria tritt in über 90 Ländern, vornehmlich in tropischen und subtropischen Regionen, endemisch auf und bedroht etwa 40% der Weltbevölkerung. Ihr Name leitet sich aus dem Italienischen ab und steht in Zusammenhang mit der Vorstellung, die schlechte Luft in Sumpfgebieten (mal aria: schlechte Luft) sei der Auslöser der Krankheitssymptome.

Das Krankheitsbild der Malaria, die auch als Sumpf- oder Wechselfieber bezeichnet wird, umfasst mehrere fieberhafte Erkrankungen, die durch parasitische Einzeller der Gattung *Plasmodium* (Stamm *Alveolata*, Unterstamm *Apicomplexa*, Klasse *Haematozoa*, Ordnung *Haemosporida*, Familie *Plasmodiidae*) verursacht werden. Zwischenwirt und Überträger sind Moskitos der Gattung *Anopheles* (Stamm *Arthropoda*, Klasse *Insecta*, Ordnung *Diptera*, Unterordnung *Nematocera*, Familie *Culicidae*), welche in Sumpfgebieten ideale Verbreitungsbedingungen finden. Es gibt vier Arten von humanpathogenen *Plasmodien*: *Plasmodium falciparum*, der Erreger der Malaria tropica, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale*, die Erreger der Malaria tertiana, sowie *Plasmodium malariae*, der Erreger der Malaria quartana. Die gefährlichste und zugleich häufigste Form ist die Malaria tropica, die unbehandelt in ca. 30% der Fälle zum Tode führt. Intensive Bemühungen in der Mitte des letzten Jahrhunderts, die Krankheit durch Arzneimitteltherapie und Vektorkontrolle in den Griff zu bekommen, sind gescheitert. Durch Resistenzentwicklung gegenüber den gängigen Arzneimitteln und Insektiziden, durch die globale Klimaerwärmung, welche es dem Moskitovektor ermöglicht, neue Lebensräume zu erschließen, sowie durch massive Bevölkerungsbewegungen ist die Krankheit mittlerweile wieder auf dem Vormarsch. Nach Schätzungen der WHO sterben jährlich zwischen 1,5 und 2 Millionen Menschen an den Folgen der Malaria, 90% davon allein in Afrika im Gebiet südlich der Sahara. Am häufigsten betroffen sind kleine Kinder, die auch nach überlebter Krankheit oft schwere, dauerhafte neurologische Schädigungen davontragen, sowie Schwangere und ihre ungeborenen Babys (Bloland, 2001) (www.rbm.who.int, www.wehi.edu.au).

Über den humanitären Aspekt hinaus hat die Malaria auch enorme wirtschaftliche Auswirkungen auf die betroffenen Länder. Hohe Ausgaben für Behandlung und Prävention, niedrige Produktivitätsrate und Arbeitsausfälle infolge Krankheit und Tod sowie mangelnde Investitionsbereitschaft in Endemiegebieten behindern die Entwicklung der betroffenen Länder und zwingen sie in einen Teufelskreis der Armut (www.rbm.who.int: WHO, economic costs of malaria, 2004)

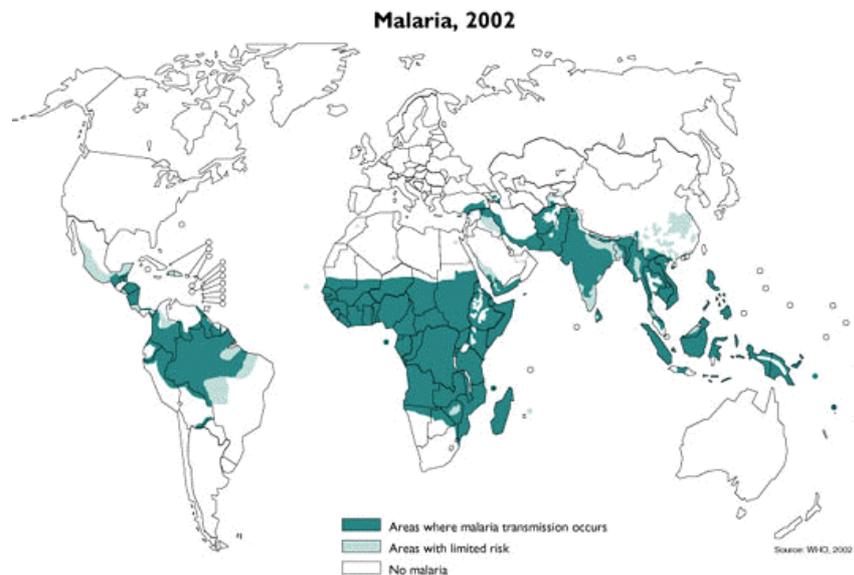


Abb. 1.1: Globale Verbreitung der Malaria (Quelle: WHO 2002)

1.2 Lebenszyklus und Biologie von *Plasmodium falciparum*

Der streng wirtsspezifische Lebenszyklus der humanpathogenen *Plasmodien* ist geprägt vom Wirtswechsel zwischen Mensch und *Anopheles*-Moskito. Während die geschlechtliche Entwicklung (Gamogonie) und Vermehrung in der Überträgermücke stattfindet, erfolgt die ungeschlechtliche Vermehrung (Schizogonie) zunächst in der Leber und dann im Blut des Menschen.

Sporozoitien gelangen bei der Blutmahlzeit der weiblichen *Anopheles*-Mücke über den Speichel in die menschliche Blutbahn, von wo aus sie innerhalb weniger Minuten die Leber erreichen und in die Hepatocyten eindringen. Dort wachsen sie unter vielfachen Teilungen zu Gewebeschizonten heran (exoerythrocytäre Schizogonie), welche die gesamte Leberzelle ausfüllen. Nach 6-9 Tagen kommt es zur Ruptur des Hepatocyten und zur Freisetzung von bis zu 40 000 Merozoiten, welche nun die Erythrocyten befallen und die erythrocytäre Schizogonie einleiten. Bei *P. ovale* und *P. vivax* entstehen parallel zur exoerythrocytären Schizogonie Wartestadien in der Leber, sog. Hypnozoiten, die sich erst nach Monaten weiterentwickeln. Damit kommt es zu einer zeitlichen Staffelung der Produktion von Lebermerozoiten, weshalb die Krankheit auch nach Monaten oder sogar Jahren erneut aufflammen kann. Die freigesetzten Merozoiten heften sich über spezifische Rezeptormoleküle an die Erythrocytenmembran an und dringen unter Ausbildung einer Invagination der Erythrocytenmembran in die Zelle ein. Die Parasiten befinden sich so im Innern einer dicht abschließenden Vakuole, der sog. parasitophoren Vakuole (PV), wo sie sich über Ring- und Trophozoitenstadium zum reifen Blutschizonten entwickeln. Dieser zerfällt schließlich in 12-16 Merozoiten, welche neue rote

Blutzellen befallen und so einen neuen erythrocytären Schizogoniezyklus einleiten. Dieser dauert bei *P. falciparum*, *P. ovale* und *P. vivax* 48 h, bei *P. malariae* 72 h. Während seiner intraerythrocytären Entwicklung metabolisiert der Parasit in seiner Nahrungsvakuole unter anderem das Hämoglobin der roten Blutzelle. Während der Globinanteil verwertet wird und dem Parasiten als Aminosäurequelle dient, wird das für den Parasiten toxische Häm zu dem unlöslichen, im Lichtmikroskop sichtbaren Malariapigment Hämozoin polymerisiert und in der Nahrungsvakuole eingelagert. Als Energielieferant dient vor allem Glucose, welche hauptsächlich zu Lactat (80%) sowie Formiat und Acetat abgebaut wird (Hausmann, 1996; Lucius, 1997; Mehlhorn, 1988; Mehlhorn und Piekarski, 1998).

Etwa drei Wochen nach Beginn der Blutschizogonie werden die ersten geschlechtlichen Vorläuferformen ausgebildet. Einige wenige Merozoiten durchlaufen keinen erneuten Schizogoniezyklus, sondern differenzieren sich zu weiblichen Makro- oder männlichen Mikrogametocyten. Werden diese bei einer Blutmahlzeit durch eine weibliche *Anopheles*-Mücke aufgenommen, reifen sie im Mitteldarm der Mücke zu Gameten heran. Die Makrogametocyten differenzieren sich zu kugelförmigen Makrogameten, während aus jedem Mikrogametocyten durch Exflagellation 4-8 begeißelte Mikrogameten entstehen. Bei der Befruchtung eines Makrogameten durch einen Mikrogameten entsteht eine bewegliche Zygote, der sog. Ookinet, welcher die Darmepithelzellen durchdringt und schließlich zwischen Basalmembran und Epithelzellen eine statische Oocyste ausbildet. In ihrem Innern entstehen zahlreiche fadenartige Sporozoiten, die nach Aufplatzen der Hülle über die Hämolymphe in die Speicheldrüse der Mücke einwandern (Sporogonie). Von dort aus können sie bei der nächsten Blutmahlzeit der Mücke erneut einen Menschen infizieren. Die Gamogonie im Moskito erfordert Temperaturen von mindestens 16°C, so dass die Malaria hauptsächlich in wärmeren Regionen der Erde auftritt (Hausmann, 1996; Lucius, 1997; Mehlhorn, 1988; Mehlhorn und Piekarski, 1998) (www.wehi.edu.au).

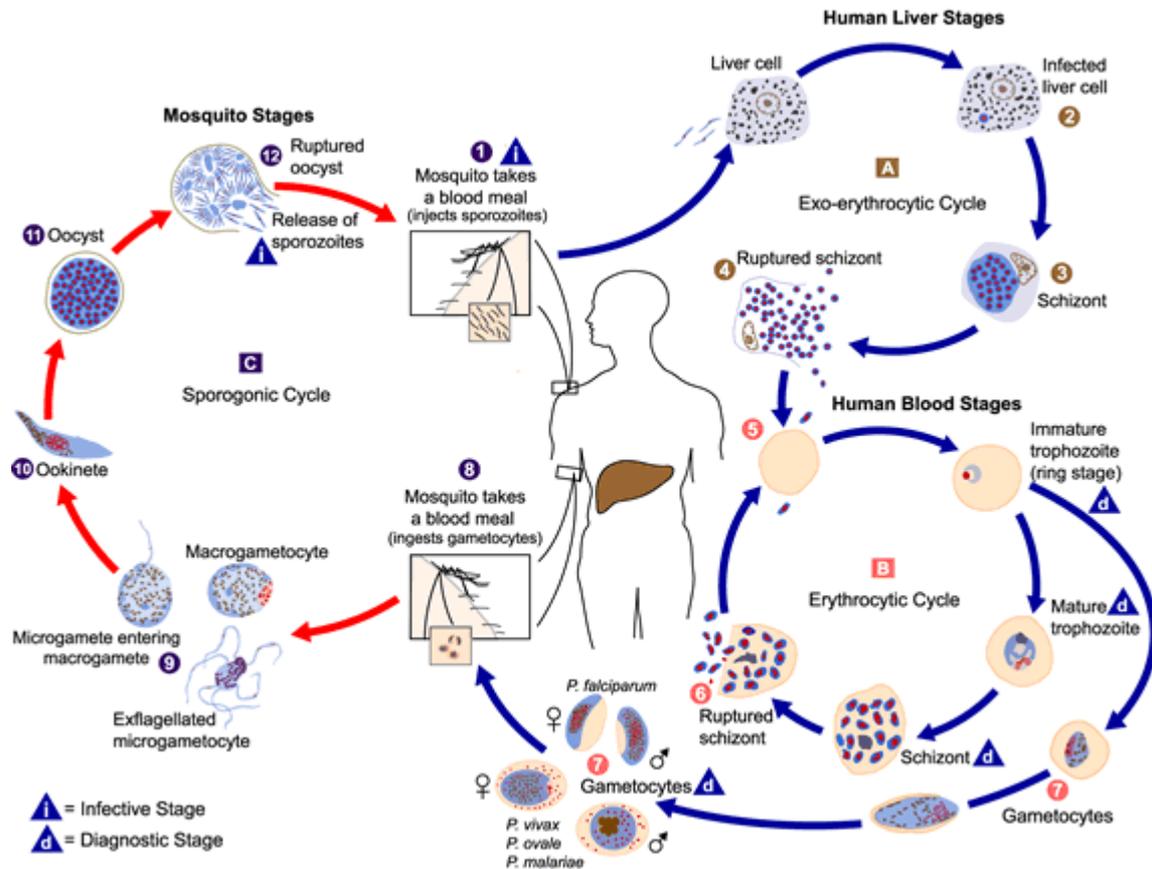


Abb. 1.2: Lebenszyklus der humanpathogenen Plasmodien

Der Lebenszyklus der humanpathogenen *Plasmodien* ist geprägt vom Wirtswechsel zwischen Mensch und *Anopheles*-Moskito. Während einer Blutmahlzeit injiziert die infizierte weibliche *Anopheles*-Mücke Sporozoiten in den menschlichen Wirt (1). Diese befallen Leberzellen (2) und reifen zu Gewebesporoziten (3), welche aufplatzen und Merozoiten freisetzen (4). Nach dieser anfänglichen Vermehrung in der Leber (exoerythrocytärer Zyklus) (A) durchlaufen die Parasiten multiple Vermehrungszyklen in den roten Blutzellen (erythrocytärer Zyklus) (B). Merozoiten befallen Erythrocyten (5) und reifen schließlich zu Schizonten, welche bei ihrer Ruptur Merozoiten freisetzen (6). Einige Merozoiten differenzieren zu geschlechtlichen Vorläuferformen, den Gametocyten (7). Die männlichen Mikrogametocyten und die weiblichen Makrogametocyten, die während einer Blutmahlzeit vom Moskito aufgenommen werden, entwickeln sich in deren Darm zu den Geschlechtsformen, den Gameten. (8, 9). Durch Befruchtung entstehen Zygoten (9), welche nach kurzer Zeit beweglich werden und eine längliche Form annehmen (10). Diese sog. Ookineten wandern durch das Darmepithel zur Basalmembran, wo sie sich zu Oozysten entwickeln (11). Diese platzen schließlich und setzen Sporozoiten frei (12), welche in die Speicheldrüsen wandern. Bei einem erneuten Blutmahl kann so wieder ein Mensch infiziert werden (verändert nach www.dpd.cdc.gov).

1.3 Das Krankheitsbild der Malaria

Zu Beginn einer Infektion treten nach einer Inkubationszeit von mindestens 7 Tagen erste unspezifische Symptome auf, die kaum von dem Beschwerdebild einer Grippe zu unterscheiden sind. Hierzu gehören Kopf- und Gliederschmerzen, Schüttelfrost, Schwindel, Schweißausbrüche, allgemeine Abgeschlagenheit, gastrointestinale Beschwerden (Übelkeit, Erbrechen, Durchfall) und vor allem deutliches Fieber. Bei den gutartigen Malariaformen kommt es später im Verlauf zu einer

Synchronisation der Parasitenreifung in den Erythrocyten und damit zu den charakteristischen Fieberschüben alle 48 (Malaria tertiana) bzw. alle 72 h (Malaria quartana). Das Fieber wird durch lösliche Malariatoxine ausgelöst, die bei der Ruptur der infizierten Erythrocyten freigesetzt werden und die Sekretion proinflammatorischer Cytokine wie TNF α und Interleukin (IL-1, IL-6) durch Makrophagen induzieren (Kwiatkowski et al., 1989; Playfair et al., 1990). Nach langandauernder Erkrankung kann man zusätzlich eine Vergrößerung der Milz und das Auftreten von Anämien beobachten. Bei der gefährlichsten Form der Malaria, der Malaria tropica, welche unbehandelt in etwa 30% der Fälle zum Tode führt, kommt es wesentlich seltener zu einer Synchronisation der Parasitenvermehrung. Die Fieberschübe treten daher unregelmäßig auf, wodurch die Gefahr einer Fehldiagnose steigt. Bleibt die Erkrankung unbehandelt, können sich innerhalb weniger Tage schwerwiegende, meist tödliche Komplikationen entwickeln. Man spricht dann von einer komplizierten Malaria tropica, Malaria maligna oder englisch: severe malaria.

Die zugrunde liegenden pathogenetischen Vorgänge sind multifaktoriell und komplex und betreffen meist mehrere Organe. Folgende Symptome bei nachgewiesener Infektion mit *P. falciparum* sprechen für einen schweren Verlauf der Malaria tropica: Hyperparasitämie (Parasitämie > 5%); schwere Anämie mit einem Hämatokrit (Hkt) von unter 20% oder rasch fallendem Hkt; Gerinnungsstörungen; Hypoglykämie; Lactacidose; renale, cardiovaskuläre oder pulmonale (Ödem) Dysfunktion; Bluthochdruck; Atemwegsbeschwerden; andauerndes starkes Fieber (> 40°C); makroskopische Hämoglobinurie (Schwarzwasserfieber) sowie starke Durchfälle und Erbrechen. Besonders gefürchtet ist die zerebrale Malaria (Gehirnmalaria), welche einhergeht mit Seh- und Koordinationsstörungen, Krampfanfällen, Verwirrtheit und Bewusstseinstörungen bis hin zum Koma infolge Beeinträchtigung des ZNS (Epstein J. E., 2000; Kayser, 2001) (Medicine –Worldwide: www.m-ww.de).

Die vergleichsweise hohe Pathogenität von *P. falciparum* gegenüber den übrigen humanpathogenen *Plasmodium*-Spezies hängt mit der Fähigkeit der reifen erythrocytären Entwicklungsstadien zusammen, über spezielle Oberflächenproteine in der Erythrocytenmembran an die Endothelien der Kapillaren binden zu können (Cytoadhäsion). Das sog. *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) wird durch den Parasiten exprimiert, zur Oberfläche der Erythrocytenmembran transportiert und dort in kleinen Verdichtungen der Membran, sog. Knobs, akkumuliert (Wickham et al., 2001). Über das PfEMP1 können die infizierten roten Blutzellen (iRBC) an verschiedene Rezeptoren von Endothelzellen, aber auch von nicht-infizierten Erythrocyten binden. Letzterer Vorgang wird auch als Rosetting bezeichnet. Die Cytoadhäsion verleiht dem Parasiten einen entscheidenden Überlebensvorteil. Zum einen können sich die Parasiten in der mikroaerophilen venösen Umgebung der Kapillaren besser entwickeln, zum anderen entgehen die adhären iRBC einer Elimination in der Milz, so dass hohe Parasitämien möglich sind. Infolge der Cytoadhäsion findet man bei Patienten, die an den Folgen einer komplizierten Malaria gestorben sind, viele sequestrierte iRBC in der Mikrovaskulatur lebenswichtiger Organe wie Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere und bei Schwangeren

in der Plazenta (Miller et al., 2002). Die Sequestrierung der iRBC führt zu einer eingeschränkten Mikrozirkulation des Blutes und infolge dessen zu Hypoxie und schwerwiegenden Stoffwechselfehlfunktionen. Durch unterschiedliche Ausprägung der Sequestrierung in den einzelnen Organen ist auch die Verschiedenartigkeit der Symptome zu erklären. So wird das Bild der zerebralen Malaria vorwiegend durch Sequestrierung von iRBC im Gehirn hervorgerufen, während z.B. bei der maternalen Malaria hauptsächlich die Plazenta betroffen ist. Die Blockade von Blutgefäßen und die daraus resultierende Hypoxie allein reicht jedoch meist nicht aus, um die Vielfalt der Symptome zu erklären. Es gibt deutliche Hinweise auf eine Beteiligung proinflammatorischer Cytokine, wie z.B. TNF α , IL-1, INF γ oder Lymphotoxin, welche unter dem Einfluss eines Malariatoxins (z.B. GPIs (Naik et al., 2000)) durch Zellen des Wirts freigesetzt werden. Sie lösen mannigfache immunpathologische Prozesse wie Plättchenaktivierung, Hochregulation von Oberflächenrezeptoren zur Bindung von iRBC oder die Expression der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS) aus, welche die Entstehung des pathologischen Bildes einer zerebralen Malaria begünstigen. Antiinflammatorische Cytokine wie IL-10 oder Transforming growth factor β (TGF β) scheinen dem entgegenzuwirken (Clark und Schofield, 2000; Hunt und Grau, 2003).

Von der komplizierten Malaria tropica sind vor allem Kinder, Frauen während der ersten Schwangerschaft und Menschen aus Malaria-freien Gebieten betroffen. Heranwachsende und Erwachsene in Malaria-Endemiegebieten entwickeln mit der Zeit eine Teilimmunität, die sie vor den schweren Formen der Malaria schützt. Diese Teilimmunität wird durch den ständigen Kontakt mit dem Erreger aufrecht erhalten und geht bei längerer Verweildauer in Malaria-freien Gebieten wieder verloren (Bloland, 2001).

1.4 Therapie der Malaria tropica im Wandel

Während das 4-Aminochinolinderivat Chloroquin jahrzehntelang das Standbein der Malariatherapie und -prophylaxe darstellte, ist man mittlerweile durch die globale Verbreitung Chloroquin-resistenter Parasitenstämme gezwungen, neue Wege einzuschlagen. Chloroquin interferiert mit der Polymerisation des beim Abbau von Hämoglobin in der Nahrungsvakuole des Parasiten entstehenden zelltoxischen Häms zu untoxischem, kristallinen Hämozoin. Die herausragende Stellung des Chloroquins begründet sich in seinen Eigenschaften, welche es zu einem idealen Therapeutikum auch in Entwicklungsländern machte: Der niedrige Preis (< 0,1 US\$ pro Behandlung), die hohe Wirksamkeit bei relativ guter Verträglichkeit, die lange Wirkdauer bei oraler Verabreichung, was eine bessere Compliance gewährleistet und eine kurze Behandlungsdauer. Gegen Ende der 50er Jahre tauchten jedoch erste Chloroquin-resistente *P. falciparum* Stämme in Südostasien und Südamerika auf. Mittlerweile ist Chloroquin-Resistenz in fast allen Malaria-Endemiegebieten weit verbreitet. Auch eine Resistenzentwicklung gegenüber anderen Malariatherapeutika wie Chinin, Sulfadoxin-

Pyrimethamin (Fansidar[®]), Amodiaquin, Atovaquon oder Mefloquin (Lariam[®]) ist auf dem Vormarsch (Bloland, 2001). Es sind also Strategien gefordert, um zum einen die Resistenzentwicklung in den Griff zu bekommen und zum anderen geeignete Nachfolger für Chloroquin zu finden. Da Antimalaria-Therapeutika hauptsächlich in Entwicklungsländern mit hoher Armutsrate benötigt werden, stellen hier die Kosten einen entscheidenden Faktor dar. Die Kosten für sowohl die Entwicklung als auch die Herstellung neuer Therapeutika müssen deshalb möglichst niedrig gehalten werden. So sind viele heute erhältliche Medikamente wie Malarone[®] oder die Artemisinderivate für viele Betroffene unerschwinglich. Um Kosten für die Entwicklung zu sparen, ist ein heute gängiger Weg die Optimierung von bereits verfügbaren Medikamenten. Neue Kombinationen bekannter Therapeutika nutzen synergistische oder additive Effekte zur Verbesserung der antiparasitären Wirkung und zur Verlangsamung der Resistenzentwicklung. Mittlerweile gibt es Empfehlungen der WHO zum Einsatz von Kombinationspräparaten aus Artemisin-Derivaten (Artesunat, Arthemeter oder Dihydroartemisin) und herkömmlichen Therapeutika (Artemisin-based Combination Therapies, ACT) in Gebieten mit multiresistenten *P. falciparum* Stämmen (WHO, Facts on ACTs: www.rbm.who.int). Auch gegen andere Krankheiten entwickelte Substanzen, wie z.B. Antifolate, gewisse Antibiotika oder Atovaquon (entwickelt gegen *Pneumocystis*), welches als Malarone[®] in Kombination mit Proguanil bereits erfolgreich eingesetzt wird, sowie Resistenzumkehrer wie Verapamil oder Methylenblau sind als Kombinationspartner wieder interessant. Methylenblau könnte ein besonders vielversprechender Kandidat sein. Zum einen interferiert es möglicherweise, ähnlich dem Chloroquin, mit der Hämolymerisation in der parasitären Nahrungsvakuole, zum anderen könnte es durch Hemmung der *P. falciparum* Glutathionreduktase die Parasiten für Chloroquin sensibilisieren (Schirmer et al., 2003). Da Methylenblau darüber hinaus auch bei Methämoglobinämie verabreicht wird, welche u.a. eine schwerwiegende Komplikation bei der schweren Malaria darstellt, könnte es bei der Vermeidung dieser Komplikation helfen. Für ein Kombinationspräparat aus Chloroquin und Methylenblau, welches derzeit unter dem Namen BlueCQ im Feldversuch in Burkina Faso, Westafrika, untersucht wird, würde zudem auch sein günstiger Preis sprechen.

Nichtsdestotrotz wird man auf lange Sicht nicht um die Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen neue Angriffsziele mit optimierter Pharmakokinetik und besserer Verträglichkeit umhin kommen. Vielversprechende Angriffspunkte sind hierbei u.a. der Apicoplast, eine den Chloroplasten ähnelnde Organelle, die Membranbiogenese des Parasiten, die Mitochondrien sowie cytoplasmatische Proteine, welche essentielle Stoffwechselwege des Parasiten kontrollieren (Rosenthal, 2003). Gegenstand intensiver Forschungsarbeit und vielversprechende Kandidaten sind z.B. die Enzyme des Shikimatwegs zur Generierung von Phenylpropanderivaten oder Enzyme, die an der Herstellung essentieller Vitamine, wie dem Vitamin B6 beteiligt sind (Fitzpatrick et al., 2001; McConkey et al., 2004; Kappes, unveröffentlicht).

1.5 Calciumabhängige Proteinkinasen als Vermittler von Ca^{2+} -induzierten Signaltransduktionswegen bei Pflanzen und Protozoen

1.5.1 Ca^{2+} : Ein wichtiger intrazellulärer Botenstoff der Zelle

In eukaryontischen Organismen kommt Ca^{2+} als sekundärem Botenstoff eine entscheidende Rolle bei der Übermittlung extrazellulärer Signale von der Zellmembran an intrazelluläre Rezeptormoleküle zu. Im allgemeinen sind Zellen bestrebt, die Konzentration an freiem Ca^{2+} im Cytosol möglichst niedrig zu halten (100 - 200 nM). Im Gegensatz dazu liegt die Konzentration an freiem Ca^{2+} im Extrazellulärraum ($\sim 10^{-3}$ M) sowie in intrazellulären Ca^{2+} -Speichern wie dem ER (hauptsächlich bei tierischen Zellen), den Mitochondrien oder Vakuolen (bei Pflanzen) deutlich höher. Hierdurch entsteht ein Konzentrationsgefälle zwischen dem Cytosol und dem Extrazellulärraum bzw. den intrazellulären Speichern. Externe Stimuli bewirken die vorübergehende Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen in der Cytoplasmamembran bzw. in der Membran der internen Speicher, wodurch es zu einem raschen und drastischen Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($\sim 10^{-5}$ M) und in deren Folge zur Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Prozesse kommt.

Um die Funktionsfähigkeit dieses Signalmechanismus zu gewährleisten, verfügt die Zelle über mehrere Transportsysteme, die den Spiegel an intrazellulärem Ca^{2+} gering halten. Ca^{2+} -ATPasen transportieren Ca^{2+} gegen einen Konzentrationsgradienten aktiv aus der Zelle bzw. in die intrazellulären Speicher. In manchen Zellen wird Ca^{2+} zusätzlich über ein $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -Antiportsystem unter Ausnutzung des Na^{+} -Gradienten aus der Zelle transportiert. Bei drohender Überladung der Zelle mit Ca^{2+} kann außerdem eine Ca^{2+} -Pumpe in der Mitochondrienmembran aktiviert werden, welche Ca^{2+} in die Mitochondrien einlagert. Schließlich wird freies Ca^{2+} von verschiedenen Molekülen der Zelle gebunden, so z.B. in großem Umfang von den negativ geladenen Phospholipiden der Plasmamembran. Der Influx von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum erfolgt hauptsächlich durch Liganden-regulierte Ca^{2+} -Kanäle, welche sich infolge Bindung eines externen Liganden, z.B. bestimmte Hormone oder ATP, öffnen. In Nervenzellen finden sich zusätzlich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle. Sie öffnen sich als Reaktion auf eine Depolarisation der Zelle (Alberts, 1995; Löffler und Petrides, 2003; Rudd, 1999).

Für die Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern gibt es zwei Möglichkeiten: Im ersten Fall wird Inositol-(1,4,5)-trisphosphat (IP₃) als zusätzlicher intrazellulärer Botenstoff benötigt. Die Bindung eines externen Signalmoleküls an seinen Rezeptor bewirkt unter Vermittlung eines trimeren G-Proteins die Aktivierung der Phospholipase C β , welche das Membranphospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in IP₃ und Diacylglycerol spaltet. IP₃ seinerseits bewirkt durch Bindung an IP₃-Rezeptoren, welche durch den Liganden IP₃ aktivierbare Ca^{2+} -Kanäle

darstellen, eine Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern. Zusätzlich existieren in der ER- bzw. Vakuolenmembran sogenannte Ryanodinrezeptoren, welche durch den Einstrom von Ca^{2+} direkt aktiviert werden. Auch der zelluläre Botenstoff cyclo-Adenosintriphosphat-Ribose (cADPR) kann diesen Kanal öffnen (Alberts, 1995; Löffler und Petrides, 2003; Rudd, 1999).

Die meisten Ca^{2+} -stimulierten Prozesse laufen über Phosphorylierungsreaktionen ab, welche von Vertretern der Superfamilie der calciumabhängigen Proteinkinasen (CDPK) katalysiert werden (Harmon et al., 2001). Hauptvertreter sind die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen, CaMKs, sowie die calciumabhängigen Proteinkinasen, CDPKs (calcium dependent protein kinase), die in der Literatur zum Teil auch als Proteinkinase mit einer Calmodulin verwandten Domäne (calmodulin-like domain protein kinase) bezeichnet werden (Harmon et al., 2001; Harmon et al., 2000). Während in tierischen Zellen die Ca^{2+} -induzierte Phosphorylierung meist ein Resultat des Zusammenspiels des Ca^{2+} -bindenden Proteins Calmodulin mit CaMKs ist, wird in pflanzlichen Zellen diese Aufgabe meist von CDPKs übernommen, welche die katalytische Aktivität der Kinase mit der regulatorischen Aktivität des Calmodulins in einem Molekül vereinen (Harmon et al., 2000).

1.5.2 Calciumabhängige Proteinkinasen

Calciumabhängige Proteinkinase (CDPKs) zeichnen sich durch eine charakteristische Proteinstruktur aus, in der eine aminoternale Serin/Threonin Proteinkinasedomäne mit einer carboxyterminalen Ca^{2+} -bindenden regulatorischen Domäne verbunden ist (Abb. 1.3). Letztere besitzt wie Calmodulin vier EF-Hand Calciumbindungsmotive und dient zur Aktivierung der katalytischen Kinasedomäne durch Ca^{2+} (Cheng et al., 2002; Harmon et al., 2001). Folglich sind CDPKs im Gegensatz zu CaMKs Calmodulin unabhängig und können so direkt durch die Bindung von Ca^{2+} aktiviert werden.

Das Verbindungsstück zwischen der Kinase- und der Ca^{2+} -bindenden Domäne enthält in einigen CDPKs ein Pseudosubstratmotiv, das als Autoinhibitor fungiert. In Abwesenheit von Ca^{2+} inhibiert es die Phosphorylierung und hält die CDPKs in einem Stadium geringer Aktivität (Harmon et al., 2000; Ludwig et al., 2004). Der Aminoterminus besteht aus einer hochvariablen Sequenz, welche bei manchen CDPKs Motive für die N-terminale Modifikation durch Myristat und Palmitat enthält, die als Membrananker fungieren können (Ellard-Ivey et al., 1999; Martin und Busconi, 2000; Rutschmann et al., 2002).

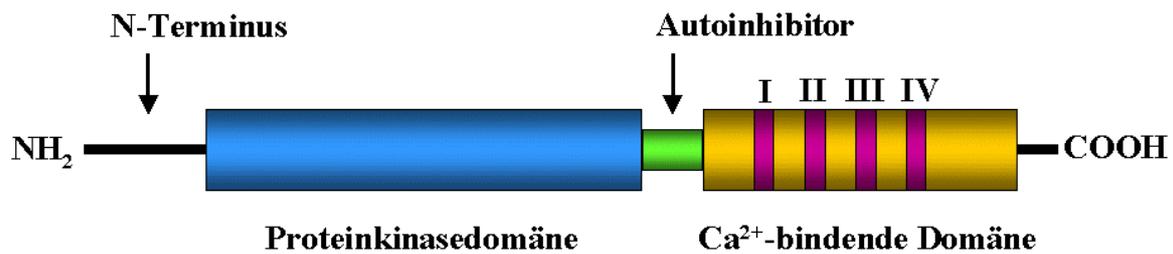


Abb. 1.3: Schematische Darstellung einer calciumabhängigen Proteinkinase (CDPK)

CDPKs setzen sich aus einer katalytischen Serin/Threonin Kinasedomäne und einer regulatorischen Calmodulin-ähnlichen Ca^{2+} -bindenden Domäne, welche vier EF-Hand Motive (I-IV) zur Bindung von Ca^{2+} enthält, zusammen. Verbunden sind die Domänen durch einen Linker, der ein potentielles Pseudosubstratmotiv trägt, welches in einigen Fällen als Autoinhibitor fungiert. Der N-Terminus ist hochvariabel.

CDPKs wurden bisher ausschließlich in Pflanzen und einigen Protozoen wie *Plasmodium*, *Paramecium*, *Toxoplasma* oder *Eimeria*, nicht jedoch in Pilzen und tierischen Organismen beschrieben (Dunn et al., 1996; Kieschnick et al., 2001; Kim et al., 1998; Zhao et al., 1993). CDPKs bilden Multigenfamilien, wobei allein in *Arabidopsis* über 40 CDPK Isoformen beschrieben wurden (Harmon et al., 2000). Die Fülle der CDPK Isoformen in *Arabidopsis* sowie die im Vergleich dazu geringe Anzahl an möglichen Genhomologen von CaMKs und Proteinkinase C (PKC) weisen darauf hin, dass die überwiegende Mehrheit der Signaltransduktionsschritte, für die eine calciumregulierte Proteinkinaseaktivität erforderlich ist, in Pflanzen über CDPKs erfolgt. Diese ermöglichen es dem Organismus, auf eine Vielzahl äußerer Reize und Stressfaktoren wie Kälte, Trockenheit, hohe Salzkonzentrationen, Wind oder Pathogene, aber auch auf Faktoren, die das normale Wachstum, die Differenzierung und die Regeneration der Pflanze steuern, wie z.B. Licht oder Hormone, zu reagieren (Ludwig et al., 2004). Anhand biochemischer Untersuchungen konnte eine Vielzahl von CDPK-Substraten identifiziert werden, die eine mögliche Rolle bei der Regulation der Genexpression, von Komponenten des Metabolismus und der Signalwege, des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes sowie der Dynamik des Cytoskeletts vermuten lassen (Harmon et al., 2000).

Ein einfaches Modell der Regulation von CDPKs durch Ca^{2+} ist von dem Mechanismus für die Aktivierung tierischer CaMK durch Calmodulin abgeleitet. Im Grundzustand, d.h. bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen unterbindet eine autoinhibitorische Sequenz im Verbindungsstück zwischen Kinase- und Ca^{2+} -bindender Domäne die Steigerung der Kinaseaktivität über ein bestimmtes Grundniveau hinaus. Die Tatsache, dass eine Peptidsequenz aus diesem Verbindungsstück die Aktivität von CDPKs kompetitiv zu einem Substrat hemmen kann, spricht für einen Pseudosubstratmechanismus (Harmon et al., 1994; Harper et al., 1994). Laut dieses Modells kommt es infolge der Bindung von Ca^{2+} zu einer Konformationsänderung, wodurch der Autoinhibitor aus seiner Position gedrängt wird und das katalytische Zentrum freigibt (Harmon et al., 2000).

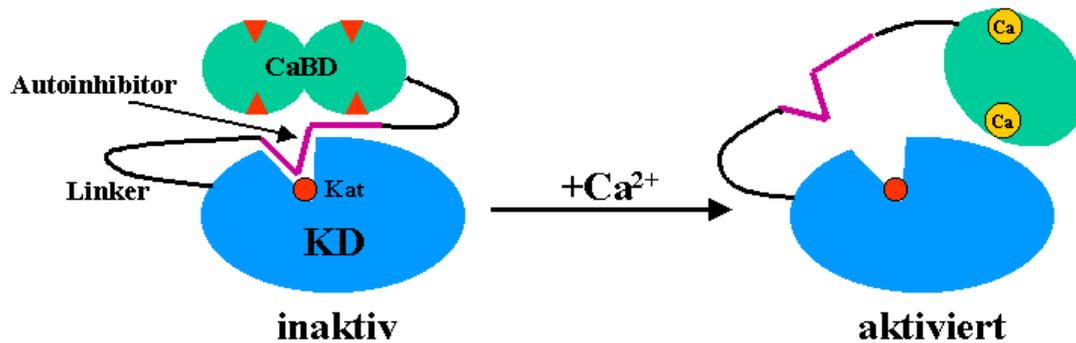


Abb. 1.4: Modell für die Regulation der CDPK Aktivität durch Ca^{2+}

Im Grundzustand wird die Kinaseaktivität der CDPK durch Interaktion einer autoinhibitorischen Pseudosubstratsequenz im Verbindungsstück (Linker) zwischen der katalytischen Kinasedomäne (KD) und der regulatorischen Ca^{2+} -bindenden Domäne (CaBD) mit dem katalytischen Zentrum (Kat) der Kinase unterdrückt. Durch die Bindung von Ca^{2+} kommt es zu einer Konformationsänderung der CaBD, infolge derer die autoinhibitorische Sequenz das katalytische Zentrum freigibt.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die CDPK-Isoformen einer Spezies sich in ihrer Affinität zu Ca^{2+} unterscheiden. Darüber hinaus kann die Calciumaffinität durch die Art des Proteinsubstrats beeinflusst werden. In Anwesenheit von Substrat kann die Empfindlichkeit für Ca^{2+} je nach Substrattyp um ein Vielfaches steigen (Lee et al., 1998). Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Calciumsensitivität der einzelnen CDPK-Isoformen so ausgelegt ist, dass diese auf spezifische Ca^{2+} -Signale, welche sich in Intensität, Dauer und Häufigkeit ihres Auftretens unterscheiden können, gezielt reagieren (McAinsh, 1998; Sanders et al., 1999). Eine weitere Regulation der CDPKs kann auf der Ebene der differentiellen Expression der Isoformen in bestimmten Wachstumsstadien der Pflanze oder des Protisten erfolgen (Hrabak et al., 2003).

1.5.3 *Plasmodium falciparum* calciumabhängige Proteinkinase 1 (PfCDPK1)

Ca^{2+} nimmt auch bei *Plasmodium* eine herausragende Stellung bei der Vermittlung einer Vielzahl von zellulären Ereignissen ein (Garcia, 1999). Für *P. falciparum* konnte gezeigt werden, dass Calcium sowohl bei der Invasion der Erythrocyten als auch für die intraerythrocytäre Entwicklung der Parasiten essentiell ist (Tanabe, 1990; Vial et al., 1982; Wasserman et al., 1982; Wasserman und Chaparro, 1996). Infizierte Erythrocyten akkumulieren Ca^{2+} zu Konzentrationen, die bis zu 20-fach höher als in uninfizierten Erythrocyten liegen (Kramer und Ginsburg, 1991; Tanabe et al., 1982). Calcium wird im Parasiten im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und acidischen Vesikeln sequestriert, wodurch die Konzentration an freiem Ca^{2+} im nanomolaren Bereich gehalten wird (Garcia, 1999). Als mögliche

Zielproteine wurden Calmodulin, Calcineurin und CDPKs identifiziert (Garcia, 1999; Kappes et al., 1999). Die Tatsache, dass es bei *P. falciparum* bisher keine gesicherten Hinweise auf die Existenz von Genhomologen der CaMKs oder Proteinkinase C gibt, spricht dafür, dass in *Plasmodium*, ähnlich wie bei Pflanzen, die Signaltransduktionsschritte, die eine calciumregulierte Proteinkinaseaktivität erfordern, unter Vermittlung der CDPKs erfolgen..

In *P. falciparum* konnten bisher fünf dem klassischen Prototypus der CDPKs entsprechende calciumabhängige Proteinkinasen (PfCDPK1-5) und eine CDPK-verwandte Kinase identifiziert werden (Bilker, 2004; Farber et al., 1997; Li et al., 2000; Zhao et al., 1993).

	Genort (Chromosom)	Protein- Größe	Expression		N-terminale Membranbin- dungsmotive
			asexuell	sexuell	
PfCDPK1	2	524 AS	++	+	MGC-Polybasisches Cluster (PBC)-
PfCDPK2	6	513 AS	+	+	MG-PBC-
PfCDPK3	3	562 AS	+	++	MNDLII-
PfCDPK4	7	528 AS	+	+	MG-PBC-
PfCDPK5	13	568 AS	++	+	MKETE-

Tab. 1.1: Zusammenstellung der fünf dem klassischen Prototypus entsprechenden calciumabhängigen Proteinkinase von *Plasmodium falciparum* (PfCDPKs)

Die Expression der einzelnen Kinasen während der verschiedenen Entwicklungsphasen des Parasiten erfolgt mit unterschiedlicher Ausprägung: ++: starke Expression, + geringe Expression (Quelle: Microarray Daten: www.plasmodb.org).

Die unterschiedliche Expression der einzelnen PfCDPK-Vertreter während der jeweiligen Stadien des parasitären Lebenszyklusses, lässt auf eine differenzierte Aufgabenverteilung der einzelnen Isoformen schließen. Die Expression von PfCDPK3 erfolgt hauptsächlich während der sexuellen Blutstadien des Parasiten, den Gametocyten, sowie in Merozoiten und Sporozoiten. PfCDPK5 wird in allen Blutstadien, besonders stark aber in Schizonten und Merozoiten exprimiert. PfCDPK2 findet sich sowohl in Blutstadien, wie auch in Gametocyten und Sporozoiten (Microarray-Daten: www.plasmodb.org). Für PfCDPK4 konnte eine Schlüsselfunktion bei der Zellzyklusprogression in Mikrogametocyten und damit für die Entstehung von männlichen Gameten nachgewiesen werden (Bilker, 2004). Die Expression von PfCDPK1 erfolgt ebenfalls stadienspezifisch. In der frühen und späten Phase der intraerythrocytären Entwicklung der Parasiten, also im Ring- und Schizontenstadium, wird die Kinase in wesentlich größerem Umfang exprimiert als während des Trophozoitenstadiums (Zhao et al., 1994a).

1.5.3.1 Aufbau und Enzymaktivität

PfCDPK1 codiert für ein Protein mit einer Länge von 524 AS und einem Molekulargewicht von 62 kDa. Wie alle CDPKs besitzt *PfCDPK1* eine regulatorische Ca^{2+} -bindende Domäne mit vier EF-Hand Motiven (I-IV) und eine katalytische Serin/Threonin-Kinasedomäne. Letztere besitzt Homologien zu anderen Serin/Threonin-Proteinkinase Unterfamilien wie den CaMKs und CDPKs. (Zhao et al., 1993).

Die K_m - und V_{max} -Werte des rekombinanten Enzyms für $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP}$ betragen $26 \mu\text{M}$ bzw. $70 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ für Casein und $34 \mu\text{M}$ bzw. $143 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ für Histon H1 als Substrat (Zhao et al., 1994a). Die durchschnittliche Calciumdissoziationskonstante (K_d) von *PfCDPK1* beträgt $80 \mu\text{M}$ (Zhao et al., 1994b) und liegt damit deutlich über der durchschnittlichen K_d von Calmodulin ($4 \mu\text{M}$). Wie bereits erwähnt, steigt jedoch mit zunehmender Reifung des Parasiten im Erythrocyten die Konzentration an freiem Ca^{2+} um den Faktor 10-20. Die geringe Affinität von *PfCDPK1* gegenüber Ca^{2+} scheint daher eine Anpassung an die Verhältnisse im infizierten Erythrocyten zu sein (Kramer und Ginsburg, 1991; Tanabe et al., 1982).

Für eine vollständige Aktivierung von *PfCDPK1* ist die Bindung von zwei Ca^{2+} -Ionen erforderlich. Die Aktivierung geht einher mit einer Konformationsänderung, welche nach Bindung von zwei Ca^{2+} -Ionen zu 85% abgeschlossen ist (Zhao et al., 1994b). Mutationsanalysen des rekombinanten Enzyms ergaben, dass eine intakte Ca^{2+} -Bindungsstelle II essentiell für die Aktivierung des Enzyms durch Ca^{2+} ist, während eine Eliminierung der Ca^{2+} -Bindungsstelle III die Aktivierung des Enzyms kaum beeinflusst. Die Bedeutung der einzelnen Ca^{2+} -Bindungsstellen für die Ca^{2+} -induzierte Enzymaktivierung von *PfCDPK1* nimmt in folgender Reihe zu: III < IV < I < II (Zhao et al., 1994b). Zusätzlich konnte ein stimulierender Effekt auf die Kinaseaktivität in Anwesenheit des Phospholipids Phosphatidylserin beobachtet werden (Zhao et al., 1994a).

Als ein Erkennungsmotiv für die Phosphorylierung wurde folgende Abfolge der Aminosäuresequenz bestimmt: K/RXXXS/T, wobei X eine beliebige AS darstellt (Kappes, unveröffentlichte Ergebnisse). Bei pflanzlichen CDPKs wird die Enzymaktivität über ein autoinhibitorisches Pseudosubstratmotiv im Verbindungsstück zwischen Kinase- und Ca^{2+} -bindender Domäne reguliert. Obwohl *PfCDPK1* in diesem Bereich eine hohe Homologie zu den pflanzlichen CDPKs aufweist und über ein potentielles Pseudosubstratmotiv in dieser Region verfügt, konnte mit entsprechenden Peptiden keine Hemmung der Enzymaktivität erzielt werden (Kappes, unveröffentlichte Ergebnisse). Diesen Untersuchungen zufolge scheint *PfCDPK1* nicht über ein Pseudosubstratmechanismus reguliert zu werden.

1.5.3.2 Biologische Funktion

Vieles deutet auf eine Beteiligung von *PfCDPK1* an Membranbiogenese Prozessen hin. Abb. 1.5 zeigt Immuno-Gold-elektronenmikroskopische Untersuchungen an Schnitten von infizierten Erythrocyten. *PfCDPK1* ist hauptsächlich in Bereichen des Parasiten anzutreffen, in denen aktive

Membranbiogeneseprozesse ablaufen. Während des Trophozoiten- und Schizontenstadiums findet man das Enzym vor allem in der parasitophoren Vakuole (PV), an der Membran der PV (PVM), auf der Oberfläche der Cytoplasmamembran des Parasiten sowie in den Membransystemen, welche ihren Ursprung in der PV nehmen. Es sind dies das tubovesikuläre System (engl.: tubovesicular network), zu welchem auch die sog. Maurer's Clefts zählen, welches sich ausgehend von der PV durch das Cytoplasma des Wirtserythrocyten erstreckt, und intraparasitäre Vakuolen (Möskes et al, in Revision). Im Segmenter Stadium wurde PfCDPK1 vor allem in Bereichen nachgewiesen, in denen die Merozoitenmembran ausgebildet wird, sowie auf der Oberfläche unreifer Merozoiten. (Kappes unveröffentlichte Ergebnisse).

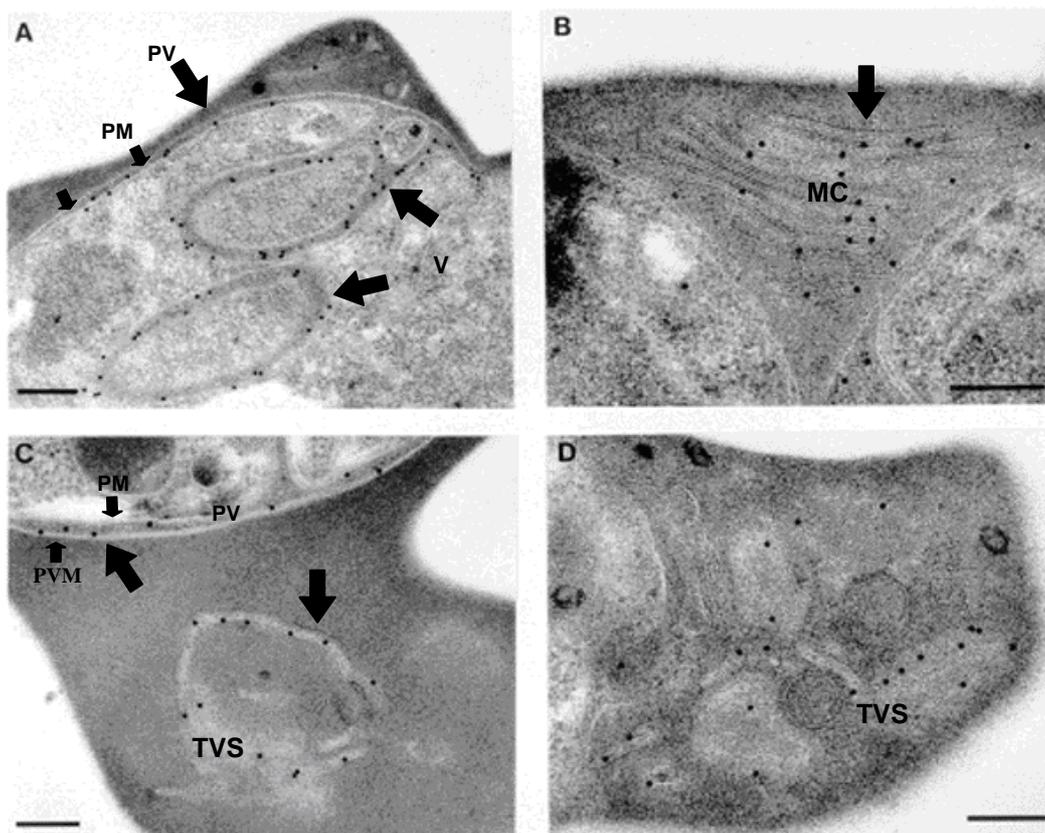


Abb. 1.5: Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Lokalisation von PfCDPK1 im infizierten Erythrocyten

Schnitte an Blutstadien von *P. falciparum* wurden unter dem Elektronenmikroskop auf die Lokalisation von PfCDPK1 hin untersucht. PfCDPK1 wurde mittels eines spezifischen Antikörpers und Gold-markiertem Protein A sichtbar gemacht (schwarze Punkte).

Bild A: PfCDPK1 ist in der parasitophoren Vakuole (PV) sowie an der Oberfläche der parasitären Plasmamembran (PM) und intrazellulärer Vakuolen (V) zu sehen.

Bild B, C, D: Schnitte von Erythrocyten, die mit zwei Schizonten bzw. einem Schizonten und einem Trophozoiten infiziert sind und eine Markierung von PfCDPK1 in tubovesikulären System (TVS) zeigen. Die Membranstruktur in Bild B ist auch als Maurer's Clefts (MC) bekannt. Bild C zeigt PfCDPK1 assoziiert mit der Membran der parasitophoren Vakuole (PVM). Die Größenbalken im Bild entsprechen 200 nm (Möskes et al, in Revision).

Neben einer Beteiligung an Membranbiogeneseprozessen spricht auch vieles für eine Rolle von PfCDPK1 bei der Invasion von Erythrocyten durch Merozoiten. In Segmentern und isolierten Merozoiten colokalisiert PfCDPK1 mit MSP1, dem Hauptoberflächenantigen der Merozoiten. Auf isolierten Merozoiten konnte PfCDPK1 durch Jodierung markiert werden, was für eine Lokalisation der Kinase an der Oberfläche des Merozoiten spricht (Kappes, unveröffentlichte Ergebnisse). Die rekombinante Proteinkinase erkennt Proteine des erythrocytären Cytoskeletts (β -Spektrin, Bande 4.1 und Bande 4.9) als Substrate und wird in Gegenwart von Erythrocyten aktiviert. Schließlich konnte PfCDPK1 im Ringstadium in der Membranfraktion von infizierten Erythrocyten nachgewiesen werden (Zhao et al., 1994a). Diese Ergebnisse legen eine Beteiligung von PfCDPK1 an einem der späteren Invasionsschritte nahe.

1.6 Modifikation von Proteinen durch N-terminale Acylierung

Die N-terminale Modifikation von Proteinen durch kovalente Bindung der gesättigten Fettsäuren Myristinsäure ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{12}\text{-COOH}$; Myristylierung) und Palmitinsäure ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{14}\text{-COOH}$; Palmylierung) stellt eine Möglichkeit dar, um Proteine an Membranen zu binden. Die langen lipophilen Seitengruppen der Fettsäuren tauchen dabei in die Phospholipid-Doppelschicht der Membran ein und verankern das Protein durch hydrophobe Wechselwirkungen. Es existieren doppelt palmylierte, einfach myristylierte und sowohl myristylierte als auch palmylierte Proteine. Der Myristatrest dirigiert das Protein zur Membran, ist aber für eine stabile Verankerung des Proteins nicht ausreichend. Erst durch die zusätzliche Palmylierung oder ein weiteres Signal wird eine stabile Bindung gewährleistet (Resh, 1999). Die Palmylierung kann darüber hinaus auch Zielgebungsfunktionen einnehmen. Es gibt zahlreiche Hinweise auf eine duale Acylierung durch Myristat und Palmitat bei CDPKs. Auch PfCDPK1 besitzt entsprechende Erkennungsmotive.

1.6.1 N-terminale Proteinmodifikation durch Myristylierung und Palmylierung

Proteine, die myristyliert werden sollen, besitzen an ihrem Aminoende die Aminosäuresequenz Met-Gly-. Die N-terminale Myristylierung ist ein cotranslationaler Prozess, bei dem zunächst das terminale Met durch eine Methionin-Aminopeptidase hydrolysiert wird. Eine N-Myristyltransferase überträgt dann einen Myristatrest aus Myristyl-CoA auf die α -Aminogruppe des nun endständigen Glycins. Nicht alle Proteine mit endständigem Glycin werden jedoch myristyliert. Die Erkennung eines Proteins durch die N-Myristyltransferase hängt auch von den nachfolgenden AS ab. Generell tritt ein Ser oder Thr in Position 6 und Lys oder Arg in Position 7 und/oder 8 bevorzugt auf.

Für die Palmytylierung wurden sowohl enzymatische als auch nicht-enzymatische Mechanismen beschrieben (Resh, 1999). Der Ort der Palmytylierung kann variieren, weshalb man palmytylierte Proteine in vier Gruppen einteilt. Typ I umfasst Transmembranproteine, welche an einem oder mehreren Cysteinresten benachbart zur oder in der Transmembrandomäne palmytyliert sind. Typ II Proteine besitzen C-terminal einen Farnesyl-Anker, welcher Voraussetzung für die anschließende Palmytylierung ebenfalls C-terminaler Cysteine ist. Typ III Proteine werden an mehreren Stellen palmytyliert. Die Palmytylierung kann N-terminal oder an anderen Stellen des Proteins erfolgen. Gruppe IV schließlich umfasst Proteine, die sowohl myristyliert als auch palmytyliert werden, wobei die Palmytylierung die vorherige Myristylierung des Proteins erfordert (Bijlmakers und Marsh, 2003; Resh, 1999). Dabei wurde auch die Palmytylierung mehrerer Cysteine gleichzeitig beschrieben (Veit et al., 2003).

Die Palmytylierung der Proteine der Gruppe IV erfolgt posttranslational durch Übertragung eines Palmytyl-Restes aus Palmytyl-CoA auf eine Cystein-Seitengruppe durch eine Palmytyl-Transferase (PAT) unter Bildung eines Thioesters. Der Ort der Palmytylierung ist variabel. Bei zweifach acylierten Proteinen erfolgt sie jedoch an Cysteinresten in der unmittelbaren Umgebung des zuvor myristylierten aminoterminalen Glycins. Bevorzugter Ort des Cysteins ist hierbei die Position 3 beginnend mit dem Met. Sowohl Myristylierung als auch Palmytylierung können einer dynamischen Regulation unterliegen. Während der Myristatrest durch einen sog. myristoyl-switch eingeklappt werden kann, kann Palmitat durch Thioesterasen wieder entfernt werden (Resh, 1996; Resh, 1999).

Neben ihrer Funktion bei der Membranverankerung von Proteinen fällt der N-terminalen Acylierung auch eine Rolle bei der Zielgebung von Proteinen in der Zelle zu. So dirigiert der Myristatrest das Protein zu Membranen, wo es durch die Aktivität einer PAT palmytyliert und dadurch fest in der Membran verankert wird. Dabei entscheidet der Ort, an welchem die spezifische PAT zu finden ist, auch über die Lokalisation des Proteins. So findet man palmytylierte Proteine sowie PATs sowohl in der Plasmamembran als auch in vielen anderen intrazellulären Membranen wie der Membran des ERs, des Golgi-Apparates oder der Vesikel und Vakuolen (Bijlmakers und Marsh, 2003; Veit et al., 2001). Zusätzlich kann eine Palmytylierung die Lokalisation myristylierter Proteine zu spezifischen Plasmamembran-Mikrodomänen, welche auch als lipid rafts (engl. für Floß) oder Detergenzien-resistente Membranen (engl.: detergent resistant membranes) bezeichnet werden, vermitteln (Bijlmakers und Marsh, 2003; Resh, 1999). Dies sind spezialisierte Bereiche innerhalb der Membran, welche sich durch eine relative Resistenz gegenüber der Extraktion mit kalten, nicht-ionischen Detergenzien wie Triton-X 100 sowie die Anwesenheit hoher Konzentrationen an Glykosphingolipiden, Cholesterol und Proteinen mit GPI-Anker auszeichnen. Eine spezielle Form dieser membranösen Mikrodomänen stellen die sog. Caveolae dar, 50-70 nm große Mikroinvaginationen der Plasmamembran, die ihren Namen von dem Protein Caveolin herleiten, welches dort angereichert wird. Lipid rafts und Caveolae enthalten eine Vielzahl an myristylierten und

palmitylierten sowie zweifach palmitylierten Proteinen. Am Beispiel von T-Zellen konnte gezeigt werden, dass viele kritische Komponenten der Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion in solchen lipid rafts zu finden sind, was eine Funktion der rafts bei der Koordination der Signalübertragungsprozesse nahe legt (Resh, 1999; Zhang et al., 1998).

1.6.2 Das Zwei-Signal-Modell zur Membranverankerung myristylierter Proteine und der „myristoyl-electrostatic switch“ Mechanismus

Biophysikalische Studien haben ergeben, dass die Bindungsenergie, die durch den Myristatrest bereitgestellt wird, relativ schwach ist und nicht ausreicht, um ein Protein stabil an eine Membran zu binden (Peitzsch und McLaughlin, 1993). Ein zusätzliches Signal ist daher notwendig, um das Protein dauerhaft in der Membran zu verankern (Zwei-Signal-Modell). Zum einen kann dies, wie bereits beschrieben, durch einen Palmitatrest erfolgen, zum anderen durch eine Ansammlung basischer AS, einem sog. polybasischen Cluster (PBC), welcher elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Phospholipiden der Membran ausbildet. Für die Src-Tyrosinkinase konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit sowohl hydrophober als auch elektrostatischer Bindungskräfte zu einem synergistischen Effekt führt, welcher die Membranbindungskraft um das 3000-fache steigert (Resh, 1999).

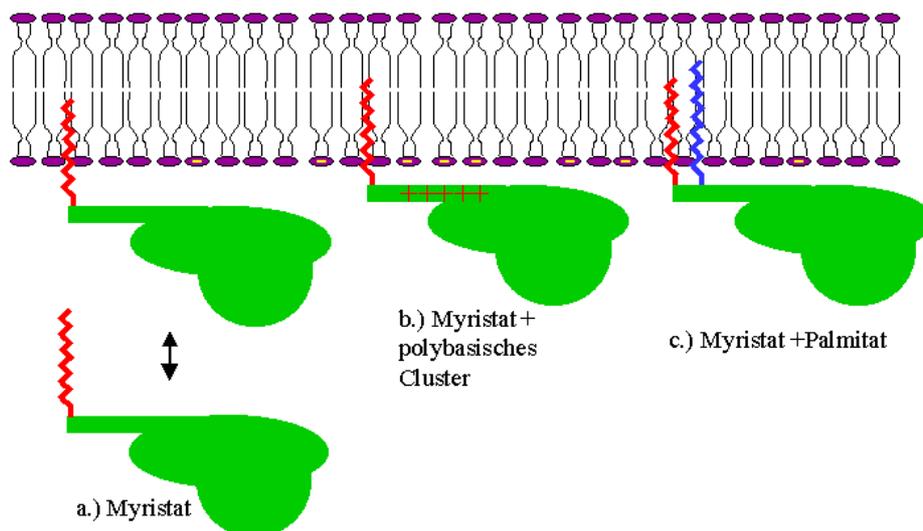


Abb. 1.6: Zwei-Signal-Modell zur Membranverankerung von myristylierten Proteinen

a.) N-terminale Myristylierung allein ist nicht ausreichend für die stabile Membranverankerung eines Proteins. Es ist ein zweites Signal erforderlich, welches entweder b.) eine Ansammlung basischer AS (polybasisches Cluster, +), die mit den negativ geladenen Phospholipiden der Membran (-) elektrostatische Wechselwirkungen eingehen, oder c.) ein Palmitatrest (blau) sein kann.

Einige Vertreter der Gruppe myristylierter Proteine mit PBC wie z.B. das myristylierte alaninreiche C Kinase Substrat (eng.: myristoylated alanine-rich C kinase protein, MARCKS) enthalten im basischen Cluster die phosphorylierbaren AS Serin und Threonin. Durch die Phosphorylierung dieser AS werden negative Ladungen in das PBC eingeführt, was zur Destabilisierung der Bindung mit den ebenfalls negativ geladenen Phospholipiden der Membran durch elektrostatische Abstoßung führt. Für MARCKS konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Serinresten im basischen Cluster durch Proteinkinase C (PKC) die elektrostatische Anziehung vermindert, was letztendlich zur Dissoziation des Proteins von der Membran führt (McLaughlin und Aderem, 1995). Dieser Vorgang ist reversibel. Durch Dephosphorylierung kann die Membranbindung wieder hergestellt werden. Aus diesem Grunde spricht man in diesem Zusammenhang vom „myristoyl-electrostatic switch“ Mechanismus (Resh, 1999).

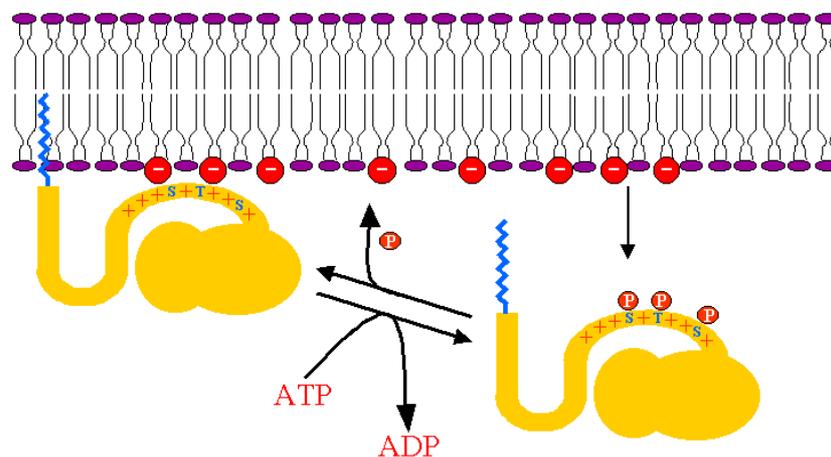


Abb. 1.7: Schematisierte Darstellung des myristoyl-electrostatic switch Mechanismus

Myristylierte Proteine dieses Typs wie z. B. das myristylierte alaninreiche C-Kinase Substrat (MARCKS) werden sowohl durch lipophile als auch elektrostatische Wechselwirkungen an eine Membran gebunden. Der Myristatanker (blau) taucht in die Lipiddoppelschicht, während eine Ansammlung basischer AS in einem definierten Teil des Proteins (basischer Cluster) elektrostatische Wechselwirkungen mit den sauren Kopfgruppen von Membranlipiden eingeht. Durch Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten im basischen Cluster werden negative Ladungen eingeführt, welche diese Wechselwirkungen soweit schwächen, dass das Protein von der Membran dissoziiert. Durch Dephosphorylierung ist dieser Prozess umkehrbar.

Die Palmitoylierung ist unter physiologischen Bedingungen durch die Aktivität bestimmter Thioesterasen ebenfalls reversibel, so dass der Zelle die Möglichkeit gegeben ist, die Membranlokalisation der Proteine mit einer Myristylierungsstelle und einem zusätzlichen Signal im Rahmen dieser Mechanismen zu steuern.

1.6.3 Membrananker- und Zielgebungsmotive bei PfCDPK1

Zellfraktionierungsexperimente zur Untersuchung der zellulären Verteilung von PfCDPK1 ergaben, dass PfCDPK1 sowohl in der Membran- und Organellfraktion des Parasiten als auch während des Ringstadiums in der Membranfraktion von infizierten Erythrocyten zu finden ist (Zhao et al., 1994a). Im Cytosol der Parasiten hingegen konnte PfCDPK1 nur in geringem Ausmaß nachgewiesen werden (Möskes et al., in Revision). Als Motive für die Membranverankerung weist PfCDPK1 neben einem Motiv für eine N-terminale Myristylierung (Gly in Position 2) sowohl ein Cys in Position 3, welches als Palmytylierungssignal dienen kann, als auch ein polybasisches Cluster von Aminosäuren auf. Darüber hinaus enthält das PBC phosphorylierbare AS (Ser, Thr), was für einen myristoyl-electrostatic switch Mechanismus und somit eine reversible Membranheftung spricht.

MGCSQSSNVKDFKTRRSKFNT-

Abb. 1.8: N-terminale Sequenz von PfCDPK1

Die potentiellen Membranbindungsmotive sind farbig hervorgehoben: rot: Glycin in Position 2 als Myristylierungsstelle; grün: Cystein in Position 3 als Palmytylierungssignal; blau: Ansammlung basischer AS (K, R) in unmittelbarer Nähe der Acylierungsstellen; unterstrichen: phosphorylierbare AS (Thr, Ser) im PBC.

Bemerkenswert ist, dass die Sequenz von PfCDPK1 neben der Myristylierungsstelle nicht, wie es das klassische Zwei-Signal-Modell vorgibt, nur ein, sondern gleich zwei zusätzliche Motive zur Membranverankerung aufweist. Dies ist sozusagen „ein Signal zuviel“ für eine reine Membranverankerungsfunktion. Im Verlauf der intraerythrocytären Entwicklung wurde PfCDPK1 in extrazellulären Kompartimenten des Parasiten, nämlich der parasitophoren Vakuole und dem tubovesikulären System, nachgewiesen. Das Fehlen einer klassischen Signalsequenz für den Transport der Kinase in diese Kompartimente legt die Vermutung nahe, dass die Kombination dieser 3 Signale nicht allein der Membranverankerung, sondern vielmehr auch der Zielfindung von PfCDPK1 in der Zelle dient.

1.7 Proteintransport in eukaryontischen Zellen

Eukaryontische Zellen zeichnen sich durch eine Unterteilung in mehrere funktionell unterscheidbare, membranumschlossene Kompartimente aus. Jedes dieser Kompartimente oder Organellen besitzt dabei seinen eigenen, charakteristischen Satz an Enzymen und anderen spezialisierten Molekülen, die es ihm ermöglichen, seinen spezifischen Aufgaben nachzukommen. Darüber hinaus steht die Zelle in engem Kontakt mit ihrer äußeren Umgebung. Ein Großteil der Kommunikation erfolgt dabei über die Sekretion bestimmter Botenstoffe oder anderer Effektoren in den Extrazellularraum oder durch den

Kontakt mit spezifischen Oberflächenstrukturen der Plasmamembran. Gleichzeitig können auch Stoffe der Umgebung ins Zellinnere aufgenommen werden, wo sie auf vielfältige Weise prozessiert werden.

Zur Erfüllung ihrer spezifischen Aufgaben und zur Aufrechterhaltung der Komplexität ihrer inneren Strukturen benötigt die Zelle daher ein komplexes Verteilungssystem, welches es ihr ermöglicht, spezifische Substanzen zu den einzelnen Kompartimenten oder an die Oberfläche der Plasmamembran, bzw. in den Extrazellulärraum zu befördern. In diesem Zusammenhang soll besonders auf den intrazellulären Transport von Proteinen eingegangen werden.

Proteine, die für den Zellkern, die Mitochondrien, Plastide oder Peroxysomen bestimmt sind, werden über bestimmte Signalpeptide in ihrer Aminosäuresequenz zu ihrer spezifischen Destination geleitet. Fehlt eine derartige Signalsequenz, verbleiben die Proteine im Cytosol.

Die Mehrzahl der neu synthetisierten membrangebundenen oder sekretorischen Proteine hingegen wird über den klassischen sekretorischen Weg (classical secretory pathway) an ihren Bestimmungsort transportiert.

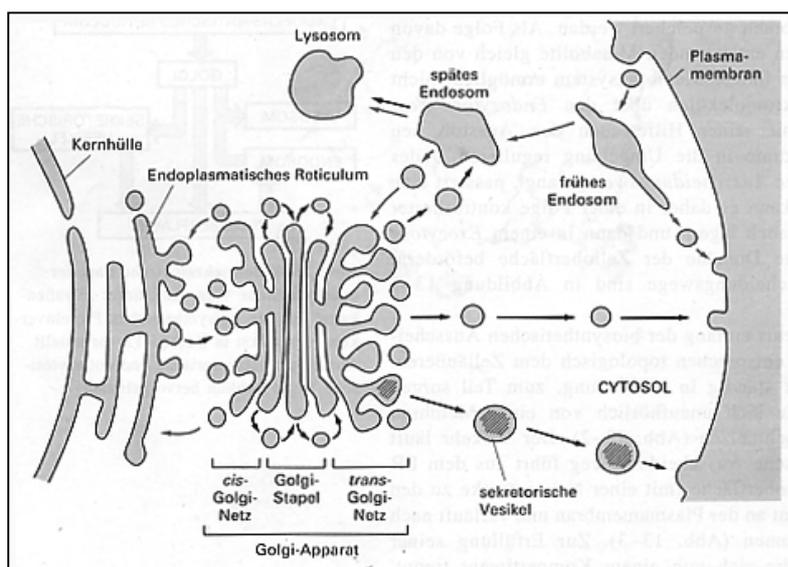


Abb. 1.9: Schematische Darstellung der Kompartimente, welche am klassischen sekretorischen Weg des Proteintransportes teilnehmen

Proteine, die über den sekretorischen Weg transportiert werden sollen, werden aufgrund einer Signalsequenz cotranslational in das Lumen des ER transloziert. Der Weitertransport erfolgt über Vesikel zum Golgi-Apparat, der von *cis*- zum *trans*-Ende durchlaufen wird. Von dort erfolgt der Transport, direkt oder über sekretorische Vesikel, zur Plasmamembran oder über Endosomen zu den Lysosomen. (Verändert nach Alberts et al, 1995)

Aufgrund einer N-terminalen Signalsequenz, die charakteristischerweise einen Bereich von 5-10 hydrophoben AS einschließt, wird das Protein cotranslational in das Lumen des ER transloziert. Falls die Proteine kein Signal für den Verbleib im ER enthalten (C-terminale Sequenz von vier spezifischen AS), werden sie durch vesikulären Transport zum Golgi-Apparat, den sie vom *cis*-Golgi-Netz bis zum *trans*-Golgi-Netz durchlaufen, weitertransportiert. Sofern die Proteine nicht für den Verbleib im Golgi bestimmt sind, erfolgt von hier aus, ebenfalls über Vesikel, die Verteilung und der Transport zu weiteren spezialisierten Organellen wie Lysosomen, Endosomen oder sekretorischen Vesikeln, oder direkt zur Plasmamembran bzw. Zelloberfläche (Alberts, 1995; Löffler und Petrides, 2003).

In den letzten Jahren mehrten sich Anzeichen, die für die Existenz alternativer Transportwege für sekretorische Proteine sprechen. Diese sind: 1.) Das Fehlen einer konventionellen Signalsequenz für den klassischen sekretorischen Weg in Proteinen, die sezerniert werden; 2.) die Abwesenheit dieser Peptiden in klassischen sekretorischen Organellen wie ER oder Golgi und 3.) die Resistenz dieser Exportprozesse gegenüber Brefeldin A, einem Inhibitor der klassischen ER/Golgi-abhängigen Proteinsekretion (Nickel, 2003).

Bisher wurden vier unterschiedliche Typen der unkonventionellen Proteinsekretion, die auch als nicht-klassischer Proteinexport (nonclassical protein export) oder ER/Golgi-unabhängige Proteinsekretion bezeichnet wird, beschrieben. Bei einem dieser Wege erfolgt der Transport über intrazelluläre Vesikel, die aller Wahrscheinlichkeit nach ein endosomales Unterkompartiment darstellen. Andere Proteine erreichen den Extrazellulärraum über eine direkte Translokation über die Plasmamembran. Für wiederum andere Proteine wird ein „flip-flop“-Mechanismus postuliert. Der letzte vorgeschlagene Weg beinhaltet die Bildung von Exosomen, Vesikel, die sich an der äußeren Oberfläche einer Zelle bilden, ein Prozess, der auch als „membrane blebbing“ bekannt ist (Nickel, 2003).

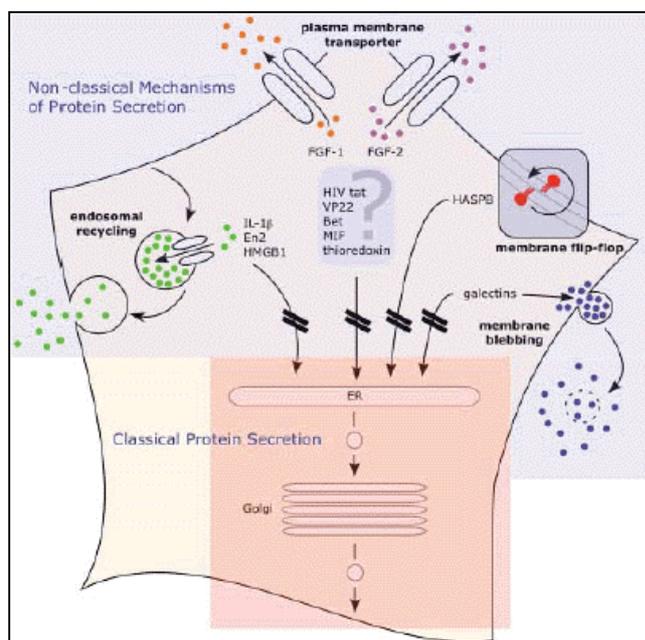


Abb. 1.10: Beispiele für die unkonventionelle Proteinsekretion

Es können mindestens vier verschiedene Typen des nicht-klassischen Proteinexports unterschieden werden. Bei IL-1b, En2 (engrailed homeoprotein 2) und HMGB1 (high mobility group chromatin binding protein) erfolgt der Transport über intrazelluläre Vesikel, die aller Wahrscheinlichkeit nach endosomale Unterkompartimente darstellen. FGF-1 und FGF-2 (Fibroblast growth factor) erreichen den Extrazellulärraum über eine direkte Translokation über die Plasmamembran. Für HASPB wird ein „flip-flop“-Mechanismus postuliert. Für Galektine wird ein Weg vorgeschlagen, der die Bildung von Exosomen beinhaltet. Dies sind Vesikel, die sich an der äußeren Oberfläche einer Zelle bilden. Dieser Prozess ist auch unter dem Begriff „membrane-blebbing“ bekannt (verändert nach Nickel, 2003).

Die Motive, welche dafür verantwortlich sind, dass ein Protein einen dieser nicht-klassischen Wege einschlägt, sind bisher weitgehend unbekannt. Eine Ausnahme bildet dabei das HASPB (hydrophilic acylated surface protein B) aus *Leishmania*. HASPB ist wie PfCDPK1 ein doppelt acyliertes Protein und wird nur in infektiösen Stadien des Parasiten auf der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert. Es wird an freien Ribosomen des Cytoplasmas synthetisiert und durch N-terminale Myristylierung und Palmytylierung (an einem Cystein in Position 5) in der Plasmamembran verankert. Zusätzliche Strukturen, welche sich im Bereich der AS 11-18 befinden, bewirken dann wahrscheinlich in einer Art

flip-flop-Mechanismus die Translokation des Proteins auf die Außenseite der Membran. Die Maschinerie für diesen Export-Mechanismus konnte noch nicht identifiziert werden, jedoch spricht die Tatsache, dass dieser Transport auch in Säugerzellen beobachtet wurde, für die Existenz eines konservierten Exportweges in niederen und höheren Eukaryonten (Denny et al., 2000; Nickel, 2003).

Besondere Herausforderung hinsichtlich des Proteintransports stellen sich den *Plasmodien*. Im Verlauf ihrer intraerythrocytären Entwicklung modifizieren sie ihre Wirtszelle durch den Export eigener Proteine in das Cytosol oder die Membran des Erythrocyten. Da rote Blutkörperchen über keine Maschinerie zum Transport von Proteinen mehr verfügen, ist der Parasit gezwungen, seine eigene Infrastruktur zu importieren. In letzter Zeit mehren sich die Hinweise, dass die sog. Maurer's Clefts, membranöse Strukturen parasitären Ursprungs im Cytosol des Wirts-Erythrocyten, eine entscheidende Rolle beim Export von Proteinen in die Wirtszelle einnehmen (Przyborski et al., 2003). Dies erfordert zusätzliche Signale, welche die Zielgebung dieser Exportproteine über die Cytoplasmamembran des Parasiten hinaus gewährleisten. Der Parasit scheint hierbei sein eigenes System des Proteintransports kreiert zu haben, indem er klassische mit neuen Elementen des Proteintransports seinen Anforderungen gemäß kombiniert.

1.8 Ziel dieser Arbeit

In Eukaryonten kommt calciuminduzierten Signaltransduktionswegen eine entscheidende Rolle bei der Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen zu. In Pflanzen und einigen Protozoen nehmen calciumabhängige Proteinkinasen (CDPKs) eine Schlüsselfunktion bei der Übermittlung calciumabhängiger Phosphorylierungsereignisse ein. Ihnen fallen weitreichende Aufgaben bei der Regulation von Wachstums-, Differenzierungs- und Regenerationsprozessen zu, die es dem Organismus ermöglichen, auf eine Vielzahl äußerer Faktoren (z.B. Licht, Hormone, Stress) zu reagieren. In *P. falciparum* wurden fünf klassische CDPKs identifiziert (PfCDPK1-5). PfCDPK1 wird während der erythrocytären Entwicklungsstadien des Parasiten, welche für die Ausbildung des Krankheitsbildes der Malaria tropica verantwortlich sind, exprimiert. Zudem gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von PfCDPK1 an der Invasion von Erythrocyten sowie an der Regulation von Membranbiogeneseprozessen.

Die herausragende Bedeutung calciumabhängiger Signaltransduktionswege und die Tatsache, dass CDPKs in tierischen Zellen, so auch beim Menschen, nicht anzutreffen sind, machen PfCDPK1 zu einem idealen Ziel für die Entwicklung neuer Pharmaka gegen die Malaria tropica und somit zum Zielprotein unserer Untersuchungen.

Da über die genaue Funktion von PfCDPK1 bisher nur spekuliert werden kann, sollten durch die Charakterisierung der Membranverankerung und Identifizierung möglicher Zielgebungssignale neue

Erkenntnisse über eine Beteiligung von PfCDPK1 an spezifischen Aufgaben während der intraerythrocytären Entwicklung des Parasiten gewonnen werden.

Darüber hinaus sollte durch die Identifizierung eines spezifischen Inhibitors von PfCDPK1 die Voraussetzungen für eine umfassende funktionelle Analysen der Kinase geschaffen werden. So sollte solch ein Inhibitor einerseits für Untersuchungen eingesetzt werden, die klären sollten, ob es sich bei *PfCDPK1* tatsächlich um ein essentielles Gen handelt und andererseits als Werkzeug für eine weiterreichende zellbiologische Charakterisierung von PfCDPK1 dienen. Unter anderem sollte hierdurch die Funktion von PfCDPK1 während der Invasion des Erythrocyten durch die Merozoiten untersucht werden.

Eine weitere Zielsetzung war es, über einen spezifischen Inhibitor eine pharmakophore Leitstruktur zu ermitteln, die den Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Pharmaka gegen die Malaria bilden könnte.

Diesem Zweck diene auch ein weiterer Ansatz, der die Strukturaufklärung von PfCDPK1 zum Ziel hatte. Mit Hilfe der dreidimensionalen Struktur wären Rückschlüsse auf molekularer Ebene auf die Interaktion der Proteinkinasedomänen mit der regulatorischen Ca^{2+} -bindenden Domäne in Gegenwart und Abwesenheit von Ca^{2+} möglich. Darüber hinaus wäre die dreidimensionale Struktur eines Kinase-Inhibitor Komplexes sehr hilfreich, um den genauen Wirkmechanismus eines Inhibitors aufzuklären und diesen weiter zu optimieren. Daher war die Kristallisation von PfCDPK1 ein erklärtes Ziel dieser Arbeit. Mit Hilfe der Proteinkristalle sollte die Aufklärung der Struktur von PfCDPK durch Röntgen-Strukturanalyse ermöglicht werden.

Da die Kristallisation von Kinasen aufgrund der in ihrer Struktur begründeten Flexibilität erfahrungsgemäß schwierig ist, sollten dabei unterschiedliche strukturstabilisierende Maßnahmen und Modifikationen zum Einsatz kommen. Eine umfangreiche biochemische Charakterisierung von PfCDPK1 sollte zudem die Voraussetzungen für die Entwicklung eines Expressions- und Aufreinigungsprotokolls für PfCDPK1 schaffen, welches es ermöglicht, rekombinantes Protein herzustellen, das den hohen Reinheits- und Homogenitätsansprüchen der Kristallisation von Proteinen genügt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborausstattung

Analytische Waage	Sartorius GmbH, Göttingen
Autoklav	Systemec, Wettenberg
Brutschränke:	
B5060 EC/CO ₂	Heraeus Instruments, Hanau
Cell Star Inkubator, Cytoperm2	Heraeus Instruments, Hanau
Hera cell	Heraeus Instruments, Hanau
Cell Harvester Filtermate	Packard (Perkin Elmer)
Chromatographie-Apparatur für analyt. Gelelektrophorese und Ionenaustauschchromatographie: ÄKTA™-Purifier (BZH)	Amersham biotec, Freiburg
Chromatographieeinheit I für Ni-Affinitätschromatographie (BZH):	Amersham Pharmacia Biotec, Uppsala, Schweden
Pump-P-50	
REC 102	
Gradifrac	
LKB Control Unit UV-1	
LKB Optical Unit UV-1	
Chromatographieeinheit II für präp. Gelfiltration (BZH):	Amersham Pharmacia Biotec, Uppsala, Schweden
LKB Pump P-500	
LKB Programmer GP-250 plus	
LKB Uvicord SII	
FRAC-100	
Computer-Software:	
Adobe Photoshop®5.0	Adobe Systems Inc, USA
Acrobat 6.0 Standard	Adobe Systems Inc, USA
EndNote 6.0	ISI Research Soft, CA, USA
MS Word 98	Microsoft Corporation, CA, USA
MS Excel	Microsoft Corporation, CA USA
MS Powerpoint	Microsoft Corporation, CA USA
Unicorn™ Control System (für ÄKTA™-Purifier) (BZH)	Amersham biotec, Freiburg
Photoimpact 7	Ulead Systems Corp. USA
Drucker:	
Laserjet 1200 series PCL6	Hewlett Packard
Deskjet 840 c	Hewlett Packard
Dynamic light scattering DynaPro (BZH)	ProteinSolutions ltd, England

Eismaschine AF 30	Scotsman
Elektrophoreseapparaturen	Biozentrum Basel, Werkstatt
Elektrophoreseapparaturen Sub-Cell GT Wide Mini (Agarose-Gele)	Bio-Rad, München
Elektrophoreseapparatur Mini-PROTEAN [®] 3 Cell SDS-PAGE (BZH)	Bio-Rad, München
Elektrophoreseapparaturen Perfect Blue (SDS-PAGE)	Peq-Lab, Erlangen
Elektroporator Gene Pulser II	Bio-Rad, München
Expositionskassette	Okamoto
Filmentwicklungsmaschine Hyperprocessor	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Feinwaage SBC 32	Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Feinwaage	Sartorius GmbH, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100M	Zeiss, Jena
Folienschweißer	Rötel
Gasbrenner Gasprofi 1 micro	WLD-TEC
Gefrierschränke	Liebherr, Bosch
Gefrierschrank -80°C, UF85-300S	Heraeus GmbH, Hanau
Gel-Fotoausdruck digit store duo	INTAS
Gelpumpe Minipuls 2	Gilson
Geltrockner Gel Dryer 583	Bio-Rad, München
GS Gene Linker [™] UV Chamber	Bio-Rad, München
Heizblock Dri-Block DB 3A	Techne, Cambridge, UK
Heizblock Dri-Block DB 1	Techne, Cambridge, UK
Konfokales Laserscanning Mikroskop LSM 510	Zeiss, Jena
Kühleinheit für ÄKTA [™] -Purifier Unichromat 1500 (BZH)	UniEquip GmbH, Martinsried
Kühlschränke	Liebherr, Bosch
Kühlzentrifugen Sorvall RC 5B, RC 5C	DuPont, Bad Homburg
Lichtmikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems, Wetzlar
Lichtmikroskop AxioLab	Zeiss, Jena
MACS-Gerät	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührer	Bachofer, Reutlingen
Magnetrührer MR 3001 (BZH)	Heidolph
Mikrowellenherd Micromat	AEG
Netzgerät Power Supply Power Pac 300	Bio-Rad, München
PCR-Maschinen:	
Robocycler Gradient 96	Stratagene, Heidelberg
T gradient Thermocycler	Biometra, Göttingen
Progene	Techne, Cambridge, UK
pH-Meter pH 537	WTW, Weilheim
pH-Meter Meter Lab PHM 210 (BZH)	Radiometer Kopenhagen
Photometer V-550 (BZH)	Jasco, Groß-Umstadt
Photometer SmartSpec [®] 3000 (BZH)	Bio-Rad, München

Pipetman Gilson P10, P20, P200, P1000	Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe Pipetus-akku	Hirschmann Labortechnik, Eberstadt
Pipettierhilfe pipetus® standard	Hirschmann Labortechnik, Eberstadt
Powerstation Power Pac 300	Bio-Rad, München
Quarzküvetten Suprasil	Hellma
Rotoren SS-34, GS-3, GSA, SM24	DuPont Instruments, Bad Homburg
Schüttelinkubator (37°C)	New Brunswick Scientific Co.Inc.
Schüttelinkubator Pilot Shake (37°C)	System Kühner, Schweiz
Schüttler GFL 3017	System Kühner, Schweiz
Schüttler ISF-1W (BZH)	System Kühner, Schweiz
Sonifier® B-12	Branson Sonic Power Company, USA
Sonifier® 250 (BZH)	Branson Sonic Power Company, USA
Speed Vac Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg
Spectrophotometer Ultrospect III	Amersham Pharmacia, Freiburg
Sterile Werkbank: Herasafe	Heraeus Instruments, Hanau
SterilGARD ClassII TypeA/B 3	The Baker Company, USA
Stickstofftank BT40	L'air Liquide
Scintillation Counter LS 6000IC	Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus GmbH, Hanau
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich Zentrifugen,
Tischzentrifuge Mikro 22R (gekühlt)	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Tischzentrifuge 5417 R (gekühlt)	Eppendorf AG, Hamburg
Ultrazentrifuge Optima® MAX (BZH)	Beckman Coulter
Ultrazentrifuge RCM 120 GX	Sorvall
Ultrazentrifuge Discovery 100 (BZH)	Sorvall
UZ-Rotor Ti 100 (BZH)	Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA
UZ-Rotor T 647,5 (BZH)	Sorvall
Vacuum Pumpe Hydro Tech für Geltrockner	Bio-Rad, München
Videosystem CS1	Cybertech, Berlin
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad Thermomix 1420	B.Braun
Wasserbad (-100°C)	GFL
Zentrifuge J2-MC	Beckman Coulter
Zentrifuge Avanti J-25 (BZH)	Beckman Coulter
Zentrifuge RC5BPlus	Sorvall
Zentrifuge Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Multifuge 3S-R (BZH)	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge RC 12BP (BZH)	Sorvall
Zentrifuge Rotanta/RR	Hettich, Tuttlingen

2.1.2 Chemikalien

Alle hier nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck, Sigma, Riedl de Haen, Serva, J.T. Baker, Gerbu, Fluka, Grüssing und AppliChem über die Chemikalienausgabe des Theoretikums der medizinischen Fakultät Heidelberg bezogen.

Acrylamid ultra pure	BRL Bethesda Research
Affi-Prep Protein A Matrix	Bio-Rad, München
Agarose Seakem LE	Cambrex BioScience, USA
Albumax II	Invitrogen, Karlsruhe
ϵ -Amino- β -Capronsäure	Fluka, Buchs
Ammoniumpersulfat	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
ADP	Sigma, Taufkirchen
AMP-PNP	Sigma, Taufkirchen
ATP (Adenosintriphosphat)	Sigma, Taufkirchen
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$	Amersham, Freiburg
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Augsburg/ Becton Dickinson Frankreich
Bacto-Pepton	Difco Laboratories, Augsburg/ Becton Dickinson Frankreich
Bisacrylamid	Bio-Rad, München
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Fluka, Buchs
BSA	Boehringer, Mannheim
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Canine Pancreatic Microsomal Membranes	Promega, Mannheim
Casein	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliantblau R-250	Fluka, Buchs
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
dNTP-Kit	PeqLab, Erlangen; NEB, Schwalbach
EDTA	Roth, Karlsruhe/Fluka, Buchs
EGTA	Sigma, Taufkirchen
Emulsifier SAFE	Packard, Niederlande
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Gentamicin (50 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Giemsa (0,4%, w/v)	Sigma, Taufkirchen
D-(+)-Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin (wasserfrei)	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Guanidinthiocyanat	Sigma, Taufkirchen

Guanidinhydrochlorid	Fluka Chemie AG, Buchs
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Augsburg
HEPES	Merck, Darmstadt
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche
Hypoxanthin	ccPro, Neustadt
[G- ³ H]Hypoxanthin	New England Nuclear, Boston, USA
Imidazol	Fluka, Buchs
IPTG	PeqLab, Erlangen
Kaliumhydroxid	Ferak, Berlin
Kristallisationskit Wizard 1+II	Emerald Biosciences, USA
LB (premixed) (BZH)	Q-Biogene, F-Illkirch Graffenstadt
Leupeptin-Hemisulfat	BioMol, Hamburg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
[³⁵ S]Methionin	Amersham, Freiburg
MOPS	BDH, Poole UK
[9,10- ³ H]Myristat	New England Nuclear, Boston, USA
NAMP-100 Amplify	Amersham Biosciences, Freiburg
Natriumacetat	Ferak Berlin/Merck, Darmstadt
Natriumacid	Ferak, Berlin
Natriumhydrogencarbonat	J. T. Baker, Holland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden,
[9,10- ³ H]Palmitat	New England Nuclear
PBS Tabletten	Biochrom, Berlin/Invitrogen, Karlsruhe
Pepstatin A	BioMol, Hamburg
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Merck, Darmstadt
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
RPMI 1640-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Saponin	Serva, Heidelberg
SDS	Merck, Darmstadt/Fluka, Buchs
D-Sorbitol	AppliChem, Darmstadt
Staurosporine	Sigma, Taufkirchen
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Serva, Heidelberg
TNT [®] Quick Coupled Transcription/Translation System	Quiagen,
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Fluka, Buchs
Tween20	Merck, Darmstadt
WR99210	Jakobus Pharmaceutical co. Inc, Princeton, NJ, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie	Roth, Karlsruhe
Cryogefäße	NALGENE®
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Dispensertips	Labotec, Labot-Technik, Göttingen
Einmalröhrchen, Polystyren- 6,0/38 mm	Greiner Bio-one, Frickenhausen; Falcon
Einmalröhrchen, Polypropylen- 12/75 mm	Greiner Bio-one, Frickenhausen; Falcon
Frischhaltefolie Saran	Roth, Karlsruhe
UniFilter GF/CO	Packard
Handschuhe	Unigloves GmbH, Troisdorf
	Peha-Soft puderfrei, Beiersdorf
Kanülen (div. Größen) Sterican	B. Braun Medical AG, Schweiz
Kimwipes lite 200	Kimberly Clark
Küvetten 1x (1 ml)	Sarstedt
MACS-Säulen CS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schell, Dassel
Objektträger	Marienfeld
Parafilm	American International Can™, Chicago, USA
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner bio-one, Frickenhausen
Petrischalen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner, Nürtingen /Steinbrenner, Heidelberg
Proteinkonzentrationsröhrchen:	Millipore
Amicon Ultra 30000	
Amicon Centricon YM-30	
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml)	Sarstedt
Safe lock (2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Saran-Folie	Roth, Karlsruhe
Serologische Pipetten (1, 2, 5, 10 und 25 ml)	Corning incorporation, Bodenheim
Spritzen (1, 5, 10, 20 ml)	Bectan Dickinson
Sterilfilter (0,22 µm)	Schleicher&Schuell, Einbeck
Sterilfilter Millex GV	Millipore
Sterilfiltrationseinheiten	Corning incorporation, Bodenheim
24-Well Plate MD3-11 XRL-Plate	Molecular Dimensions ltd.
Whatman™ 3MM paper	Firma Whatman Paper Company
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Renner, Dannstadt-Schauernheim, Corning incorporation, Bodenheim

2.1.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase: CIP (10 U/µl)	NEBiolabs, Schwalbach; Boehringer Mannheim
Chymotrypsin (sequencing grade)	Roche, Mannheim
DNase (10 U/µl)	Pharmacia
Dpn I (100 U/µl)	Roche, Mannheim
Ligase: Rapid Ligation Kit	Roche, Mannheim

Lysozym vom Huhn	Merck, Darmstadt
<i>Pfu</i> -DNA Polymerase	Stratagene, Heidelberg
λ -Phosphatase	Sigma., Taufkirchen
Restriktionsenzyme	Roche, Mannheim; NEBiolabs, Schwalbach
RNase	Quiagen, Hilden; Applichem, Darmstadt
<i>Taq</i> -DNA Polymerase	Promega, Mannheim
<i>TEV</i> -Protease	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin (sequencing grade)	Roche, Mannheim

2.1.5 Größenmarker für Elektrophorese

1 kb DNA Ladder	NEBiolabs, Schwalbach
100 bp DNA-Ladder	NEBiolabs, Schwalbach
peqGold IV Proteinmarker IV	PeqLab, Erlangen
Prestained Protein Marker	NEBiolabs, Schwalbach
Prestained Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas
Protein Ladder 10-200 kDA	MBI Fermentas
Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas
peqGold IV Proteinmarker IV	PeqLab, Erlangen

2.1.6 Nukleinsäuren

Oligonukleotide („Primer“) für die Sequenzierungen und „Primer“ für die PCR wurden bezogen von Invitrogen, Karlsruhe.

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma GATC, Konstanz durchgeführt: Single-Read-Sequenzierung mit Standardprimern oder Kundenprimern.

2.1.6.1 Oligonucleotide, Primer

Mutageneseprimer:

Die für die Mutagenese verantwortlichen Codons sind unterstrichen, die auszutauschenden Basen sind fettgedruckt

<i>PfCDPK_VG2.fwd</i>	AGAACTAGTGGATCCATGG <u>GTGT</u> GTTTCACAAAGTTCAAA CGTGAAAGATTTC
<i>PfCDPK_VG2.rev</i>	GAAATCTTTCACGTTTGAAC <u>TTTGTGAACAC</u> ACCATGG ATCCACTAGTTCT
<i>PfCDPK_AC3.fwd</i>	ACTAGTGGATCCATGGGGG <u>GCTT</u> CACAAAGTTCAAACG TGAAAGATTTC
<i>PfCDPK_AC3.rev</i>	GAAATCTTTCACGTTTGAAC <u>TTTGTGAAG</u> CCCCCATGG ATCCACTAGT
<i>PfCDPK1_VG2AC3DM.fwd</i>	AGAACTAGTGGATCCATGG <u>GTGGCTT</u> CACAAAGTTCAA ACGTGAAAGATTTC
<i>PfCDPK1_VG2AC3DM.rev</i>	GAAATCTTTCACGTTTGAAC <u>TTTGTGAAGCC</u> ACCATGG ATCCACTAGTTCT

<i>Δ10-20.fwd</i>	GGGTGTTACAAAGTTCAAACGTG_AATGGAAATAATT ATGGGAAAAGT
<i>Δ10-20.rev</i>	ACTTTTCCCATAATTATTTCCATT_CACGTTTGAAC TTT GTGAACACCC
<i>ValΔ_Primer.fwd</i>	AGAAGTAGTGGATCCATGG <u>TGT</u> GTTACAAAGTTCAA A C
<i>ValΔ_Primer.rev</i>	GTTTGAAC TTTGTGAACAC <u>ACC</u> ATGGATCCACTAGTTC T
<i>AlaΔ_Primer.fwd</i>	ACTAGTGGATCCATGGGG <u>GCT</u> TACAAAGTTCAAACG TG
<i>AlaΔ_Primer.rev</i>	CACGTTTGAAC TTTGTGA <u>AGC</u> CCCCATGGATCCACTAG T
<i>DMA_Primer.fwd</i>	AGAAGTAGTGGATCCATGG <u>TGGC</u> TACAAAGTTCAA ACGTG
<i>DMA_Primer.rev</i>	CACGTTTGAAC TTTGTGA <u>AGCC</u> ACCATGGATCCACTAG TTCT

Primer zur Klonierung der Luciferase/GFP-Klone:

<i>Luc_sense</i>	TATATAGGATCCATGCATGAAGACGCCAAAAACATA
<i>Luc_antisense</i>	TCGCCGCTCGAGTTACAATTTGG
<i>BamH!_antisense</i>	TCGCCGGGATCCTTTGTATAGTTCATCCATGC
<i>XhoI_sense</i>	TATATACTCGAGATGAGTAAAGGAGAAGAAC
<i>GFP_5end</i>	TATATAGGATCCATGAGTAAAGGAGAAGAAC
<i>GFP_3end</i>	TCGCCGCTCGAGTTATTTGTATAGTTCATCC
<i>PfCDPK1_leader_seq.fwd</i>	GGCCGCTCTAGACTCGAG
<i>PfCDPK1_leader_seq.rev</i>	GCGCGCGGATCCTTTTTTTTCTAACATACATACCTGGG

Primer zur Klonierung der Konstrukte für die Kristallisation:

<i>PfCDPK1_30GNNK_NcoI.fwd</i>	GGGCCCTCGAGCCATGGGTAATAATAAAAATTCGGAG GACC
<i>PfCDPK1_30GNNK_NdeI.fwd</i>	GGGCCCTCGAGCATATGGGTAATAATAAAAATTCGGA GGACC
<i>PfCDPK1_51GKIG_NcoI.fwd</i>	GGGCCCTCGAGCCATGGGGAAGATAGGGGAGTCC
<i>PfCDPK1_51GKIG_NdeI.fwd</i>	GGGCCCTCGAGCATATGGGGAAGATAGGGGAGTCC
<i>PfCDPK1_nostop_XhoI.rev</i>	GAAGAACTCGAGTGAAGATTTATTATCACAAATTTGT GC
<i>T3.seq</i>	AATTAACCCTCACTAAAGGG
<i>T7.seq</i>	GTAATACGACTCACTATAGGGC
<i>PfCDPK1_fus_B.rev</i>	TTATATATTTCTTCATGTATTTGGGACTTCTTTATAACC TTAATAGCC
<i>PfCDPK1_fus_C.rev</i>	AGGTTATAAGAAGTCCCAAATACATGAAGAAATATA TAATGAGATATCATTATTAATC

Kontrollprimer:

<i>85DHFR.fwd</i>	GCGACGTTTTTCGATATTTATGCC
<i>P2DHFR.rev</i>	GGAAAATATGTTAAAACAAG

2.1.6.2 Vektoren

pARL-1a+	Alan Cowman und Tim Gilberger WEHI
pBSKS+	Stratagene, USA
pBS II SK+	Stratagene, USA
pET-21 a+	Novagene, Madison, WI USA
pETM-11	G. Stier, EMBL Heidelberg
pGEM-3Z	Promega, Madison, WI USA
pHC I	Alan Cowman, WEHI Melbourne
pDS56/RBSII, 6 x His (Stueber Nr. 9)	Stammsammlung B. Kappes

2.1.7 Bakterienstämme

XL-1Blue	Stratagene, USA
BL 21 (DE 3)	Stratagene, USA
BL21 (DE3) pLysS	Stratagene, USA
BL21-CodonPlus-RIL	Stratagene, USA
SG 13009	Stammsammlung B. Kappes

2.1.8 Antikörper

α -PfcDPK1 2129a	B. Kappes
α -PfcDPK1 2979a	B. Kappes

2.1.9 Puffer, Lösungen, Medien

Alle hier nicht aufgeführten Puffer, Lösungen und Medien sind unter der Methode, bei der sie eingesetzt wurden, beschrieben.

PBS-Puffer (Phosphate buffered saline)	SSC-Puffer (Saline Sodium Citrate)
137,0 mM NaCl	7,5 mM NaCl
2,7 mM KCl	0,25 mM Na Citrat pH 7,0
1,5 mM KH ₂ PO ₄	
8,1 mM Na ₂ HPO ₄	
pH 7,4	

TE-Puffer (Tris-EDTA)	TAE-Puffer (Tris Acetat EDTA)
10 mM Tris/HCl pH 7,6 1 mM EDTA	40 mM Tris/Acetat pH 8,0 1 mM EDTA
2YT-Medium	TAE-Ladepuffer
1,6% Bacto-Trypton 1% Hefeextrakt 0,5% NaCl	5 x TAE 50% (v/v) Glycerin 0,001% (w/v) Bromphenolblau
Ringer Lösung	
122,5 mM NaCl 5,4 mM KCl 1,2 mM CaCl ₂ 0,8 mM MgCl ₂	5,5 mM D-Glucose 10 mM HEPES 1 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Medien und Lösungen für die Kultur von *E. coli*

Kulturbedien:

LB-Medium	1% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl
SOB-Medium	2% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 0,05% NaCl
LB-Agarplatten	LB-Medium + 1,5% Bacto-Agar (w/v)

Antibiotika-Stocklösungen:

Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O mp steril ⇒ Endkonzentration in LB-Medium: 50 µg/ml ⇒ Endkonzentration LB-Agar: 100 µg/ml
Kanamycin	25 mg/ml in H ₂ O mp steril ⇒ Endkonzentration LB-Medium: 30 µg/ml ⇒ Endkonzentration LB-Agar: 30 µg/ml

2.2.1.2 Übernachtskulturen (ÜNK)

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA für die Klonierung muss eine ausreichende Menge an Bakterien gewonnen werden, welche dieses Plasmid tragen. Hierzu wird steriles LB-Medium, welches das für die Selektion des Plasmids erforderliche Antibiotikum enthält (Ampicillin 50µg/ml oder Kanamycin 30 µg/ml), mit einer zuvor ausgeglühten Impföse aus Platin/Iridium mit dem gewünschten Bakterienklon, z.B. aus Glycerolstocks oder von Agarplatten, angeimpft. In einem beheizbaren Schüttler werden die Kulturen bei 37°C und 200 - 250 rpm 14 - 16 h, meist über Nacht (ÜN),

inkubiert. Die Bakterien werden dann entweder sofort weiterverwendet oder zunächst abzentrifugiert und das Pellet bei -20°C gelagert.

2.2.1.3 Herstellung einer Glycerol-Bakterienstocklösung

Von einer Übernachtskultur oder von einer Selektionsagar-Platte werden 5 ml LB-Medium mit dem für die Selektion benötigten Antibiotikum angeimpft und ÜN bei 37°C im Schüttler (220 - 250 rpm) inkubiert. Am nächsten Morgen wird durch Zugabe von 1,25 ml sterilem Glycerol (99%) der Glycerolanteil der Kultur auf 20% eingestellt und der Ansatz als Aliquots zu je 1,5 ml bei -80°C eingefroren. Die Glycerolstocks sind so mehr als 2 Jahre haltbar.

2.2.1.4 Alkoholfällung von DNA

Bei der Alkoholfällung macht man sich zu Nutze, dass gelöste DNA, nachdem die Lösung mit einem einfach geladenem Salz versetzt wurde, durch Zugabe von Alkohol spontan ausfällt. Diese Methode wird benutzt, um z.B. DNA anzureichern, umzupuffern oder DNA Lösungen zu reinigen, da Salze und andere wasserlösliche Substanzen gelöst bleiben und nicht ausfallen.

Die DNA-Lösung wird zunächst mit 1/10 an 3 M Na-Acetat pH 4,8 versetzt, gemischt und das 2,5 fache Volumen an 100% Ethanol (-20°C) zugesetzt. Zur Verbesserung der Präzipitation wird zunächst mind. 30 min bei -80°C inkubiert und 10 min auf höchster Stufe (14000 rpm) bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird 1 x mit 200 μl 70% Ethanol gewaschen, 10 min bei 30°C im Vakuum-Rotationsverdampfer getrocknet und im gewünschten Puffer aufgenommen.

2.2.1.5 Agarosegelelektrophorese

Zur Präparation und Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,8-1,5% TAE-Agarosegele verwendet. Hierzu wird die Agarose zunächst in kaltem TAE-Puffer resuspendiert und unter Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 55°C wird 1 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid zugegeben und der Agar in einen Gelschlitten gegossen, dessen Enden mit Autoklavierband zugeklebt sind. Die Aushärtezeit beträgt mindestens 20 min. Für den Gellauf wird das Gel in der Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer überschichtet und die mit TAE-Ladepuffer versetzten DNA-Proben, welche aufgrund des Glycerolanteils schwerer als der Laufpuffer sind, in die Geltaschen pipettiert. Die angelegte Spannung liegt, abhängig von der Gelgröße, zwischen 75 und 120 Volt. Je nach Anforderung an die Trennleistung, Gelgröße bzw. Agarosekonzentration beträgt die Laufzeit zwischen 0,5 und 2 h. Um eine Diffusion der DNA-Banden zu vermeiden, werden die Gele gleich im Anschluß auf einer UV-Lichtplatte (260-300 nm) analysiert und photographiert. Hierbei wird das Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert, zur Fluoreszenz angeregt, so dass die DNA sichtbar wird.

2.2.1.6 Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegelelektrophorese

Die Ermittlung des DNA-Gehaltes einer Lösung erfolgt visuell mittels Agarosegelelektrophorese (AGE). Hierzu wird eine definierte Menge DNA-Lösung auf einem Gel aufgetrennt und die Intensität der erhaltenen Bande mit den Banden eines Markers mit bekannter DNA-Konzentration verglichen. Die zum Vergleich herangezogene Markerbande sollte dabei ungefähr in derselben Höhe laufen, so dass die DNA in etwa dieselbe Größe hat.

2.2.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten, welche durch AGE aufgetrennt wurden, werden die DNA-Banden mit Hilfe eines Skalpellens nach der Elektrophorese aus dem Gel herausgeschnitten. Um Schäden oder Mutationen (z.B. Strangbrüche oder Bildung von Basendimeren) an der DNA durch die UV-Strahlung zu minimieren, wird die Zeit beim Fotografieren so kurz wie möglich gehalten. Die Excision der Banden erfolgt, sofern die Banden gut sichtbar sind, unter Verwendung einer Hand-UV-Lampe, welche auch energieärmere UV-Strahlung ($\lambda = 350 \text{ nm}$) emittieren kann.

Für die folgende Extraktion der DNA wird das QIAQUICK Gel Extraction Kit von QIAGEN verwendet. Dieses macht sich die Tatsache zu Nutze, dass DNA in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen an eine Membran aus Silicagel bindet. Das verwendete Guanidin Thiocyanat besitzt als chaotropes Salz zusätzlich die Fähigkeit, die Agarose des Gels aufzulösen, was auch durch die Inkubationstemperatur von 50°C unterstützt wird. Der optimale pH für die Bindung der DNA liegt bei 7,5, auf keinen Fall höher, da sonst die Bindungsaffinität drastisch abnimmt. Mit einem ethanolhaltigen Waschpuffer werden Verunreinigungen wie Salze, Enzyme, Agarose oder Ethidiumbromid entfernt. Die Eluierung erfolgt mit einem basischen Puffer (pH 8,5) mit geringer Salzkonzentration. Bei der Durchführung wird den Anweisungen des Herstellers Folge geleistet. Bei geringen DNA-Mengen erweist es sich als vorteilhaft, die an die Säule gebundene DNA mit nur $30 \mu\text{l}$ Elution-Buffer (anstelle der geforderten $50 \mu\text{l}$) nach einer Einwirkzeit von mind. 1 min zu eluieren. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration des Gelextrakts werden $3 \mu\text{l}$ des Eluats auf einem Agarosegel analysiert.

2.2.1.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* für Routineaufgaben: Minipräp

Für die routinemäßige Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen für Anwendungen, bei denen keine hohen Ansprüche an die Reinheit der Isolate gestellt werden, wie z.B. das Screenen nach gewünschten Klonen, wird das Verfahren der alkalischen Lyse in Kombination mit einer Phenol/Chloroform Extraktion, auch kurz als Minipräp bezeichnet, angewendet (Sambrook, 1989). Hierbei werden die Bakterienzellen zunächst durch Einwirken von Lysozym sowie NaOH und SDS lysiert und die DNA denaturiert. Durch anschließende Neutralisation mit 3 M Na-Acetat pH 4,8 fallen

neben SDS auch bakterielle Zellbestandteile wie Lipide, Proteine und chromosomale DNA aus. Die Plasmid-DNA bleibt in Lösung, da sie beim Neutralisieren wieder hybridisieren kann während die chromosomale DNA aufgrund ihrer Größe einzelsträngig bleibt. Durch anschließende Extraktion mit einem Gemisch aus Phenol/Chloroform entfernt man Reste von Protein aus der Lösung. Lypophile Bestandteile wie denaturierte Proteine gehen in die untere organische Phase über, bzw. sammeln sich in der Interphase, während die Plasmid-DNA in der wässrigen Phase bleibt. Eine weitere Reinigung erfolgt durch Alkoholfällung.

In der Regel werden 1,5 ml, bei schlecht exprimierenden Klonen auch bis zu 4 ml, Bakteriensuspension aus einer ÜNK 1 min bei 12000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl frisch zubereitetem Lysepuffer durch Vortexen resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT setzt man 200 µl Denaturierungspuffer zu und mischt vorsichtig durch 6-8 maliges invertieren der Reaktionsgefäße. Auf Eis wird genau 5 min inkubiert, dann mit 150 µl Neutralisationspuffer neutralisiert und durch sehr sanftes Vortexen der invertierten Reaktionsgefäße (zur Vermeidung von Strangbrüche durch Scherung) gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wird das Präzipitat, welches hauptsächlich aus Proteinen, Lipiden und bakterieller DNA besteht, auf höchster Stufe bei 4°C für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wird sorgfältig abgenommen, in 400 µl eines 1:1 Gemisches aus Chloroform und Phenol gegeben und gründlich gevortext. Durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 14000 rpm wird die Phasentrennung beschleunigt. Die obere wässrige Phase wird abgenommen und zur Fällung der DNA in 1 ml Ethanol 100% gegeben, ohne dabei etwas von dem Präzipitat, das sich in der Regel in der Interphase sammelt, mitzunehmen. Zur Erreichung einer möglichst vollständigen Präzipitation, inkubiert man nach dem Mischen für 30 min bei -80°C. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm für 5 min wird das Plasmidpellet 2 mal mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und 10 min in einem Vakuum-Rotationsverdampfer (Speedvac) bei 30°C getrocknet. Das DNA-Pellet wird in 50 µl TE-Puffer gelöst.

Lösungen für die Minipräp-Bereitung:

Lysepuffer	Denaturierungspuffer	Neutralisationspuffer
50 mM Glucose 10 mM EDTA 25 mM Tris/HCl, pH 7,5 4 mg/ml Lysozym vom Huhn (frisch dazugeben)	0,2 M NaOH 1% SDS	3 M Na-Acetat, pH 4.8 (eingestellt mit Eisessig)

2.2.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit hoher Reinheit

Werden besonders hohe Anforderungen an die Reinheit der Plasmide gestellt, wie z.B. bei Sequenzierungsaufträgen oder für die ortsspezifische Mutagenese, wird die DNA mit Hilfe des High Pure Plasmid Isolation Kits von Roche extrahiert. Das Prinzip des Kits beruht ebenfalls auf der alkalischen Lyse von Bakterienzellen. Plasmid-DNA wird freigesetzt, während die chromosomale DNA in einem Präzipitat aus Zellwandtrümmern und Protein eingeschlossen bleibt. In Anwesenheit hoher Konzentrationen eines chaotropen Salzes bindet die gelöste Plasmid-DNA spezifisch an die Glasfasermatrix der Trennsäulchen. Bei dem anschließenden Waschschriff wird die DNA von Salz, Protein und anderen Verunreinigungen befreit und schließlich mit Nidrigsalz-Puffer oder Wasser eluiert. Das Eluat ist im Gegensatz zur Phenol/Chloroform Extraktion frei von RNA. Bei der Durchführung wird den Anweisungen des Herstellers Folge geleistet. Für die Extraktion werden Bakterien aus 4 ml ÜNK eingesetzt.

2.2.1.10 Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli*: Maxi-Präp

Für die Bereitstellung großer Mengen an Plasmid-DNA wie sie beispielsweise für die Transfektion von Parasitenkulturen erforderlich sind, wird das QIAGEN Plasmid Maxi Kit von QIAGEN verwendet. Es beruht auf demselben Prinzip wie das High Pure Plasmid Isolation Kit von Roche, ist jedoch, abhängig vom verwendeten Vektor, für ein Volumen zwischen 100 und 500 ml Bakterienkultur ausgelegt. Auch hier wird nach den Anweisungen des Herstellers verfahren.

2.2.1.11 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA mittels Absorptionsmessung

Die DNA-Basen absorbieren Licht unterschiedlicher Wellenlänge mit einem Absorptionsmaximum im UV-Bereich von 260 nm. Dies macht man sich für die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA-Präparationen zunutze (Sambrook, 1989). Um die Konzentration einer DNA-Lösung zu bestimmen, misst man die Absorption dieser Lösung bei 260 nm (OD_{260}). Die Konzentration einer Lösung mit doppelsträngiger DNA berechnet sich dann wie folgt:

$$(OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g/ml}) / 1000 = \text{DNA-Konzentration (in } \mu\text{g/ml)}.$$

Um Anhaltspunkte über die Reinheit der DNA-Lösung zu erhalten, wird zusätzlich die Absorption bei 280 nm ermittelt. Das Verhältnis der Werten bei 260 nm und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) sollte zwischen 1,8-2,0 liegen. Durch Verunreinigung der Probe mit Protein oder Phenol kann dieser Wert deutlich niedrigere Werte annehmen. Eine korrekte Quantifizierung der Probe ist dann nicht möglich.

2.2.1.12 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, die DNA sequenzspezifisch schneiden, wobei 5'- bzw. 3'-Überhänge oder doppelsträngige DNA-Enden entstehen. Die Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen dient u.a. der Analyse von Plasmiden und im präparativem Maßstab zur Gewinnung von DNA-Fragmenten zur Klonierung neuer DNA-Konstrukte. Die Einheit der Restriktionsenzyme beträgt ein Unit [U]. Ein Unit entspricht in der Regel der Menge an Enzym, die nötig ist, um 1 µg DNA (meist DNA des Phagen λ) bei 37°C in 1 h (bei optimalen Bedingungen) in einem 50 µl Ansatz vollständig zu verdauen. Üblicherweise setzt man die Enzyme aber im Überschuss ein. Verdaut wird für zwei Stunden bei 37°C in einem für das jeweilige Enzym optimalen Puffer. Die verschiedenen Puffer werden von den Herstellern mitgeliefert und nach deren Angaben eingesetzt. Bei einem Doppelverdau, also einem Verdau bei dem zwei Restriktionsenzyme gleichzeitig verwendet werden, muss darauf geachtet werden, dass ein optimaler Puffer für beide Enzyme verwendet wird, d.h. die Aktivität beider Enzyme im jeweiligen Puffer einen vollständigen Verdau zulassen. Ansonsten muss in 2 Schritten verdaut werden, wobei der Puffer nach dem ersten Restriktionverdau durch Alkoholfällung ausgetauscht wird. Enthält die DNA Lösung RNA, wird zu dem Verdau zusätzlich RNase A gegeben (1 µl einer 10 mg/ml Stocklösung), um diese zu entfernen. Die Restriktionsfragmente werden mittels AGE aufgetrennt und gereinigt.

2.2.1.13 Ligation von DNA

Das Enzym DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert in Anwesenheit von ATP die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA. Sie ermöglicht so die Verknüpfung beliebiger DNA-Fragmente z.B. bei der Klonierung eines Gens in einen Vektor. Ligasereaktionen werden hier ausschließlich unter Verwendung des Rapid DNA Ligation Kits von Roche durchgeführt.

Bei der Klonierung von DNA-Fragmenten in einen Vektor werden Insert und Vektor zunächst mit denselben Restriktionsenzymen verdaut. Dadurch wird zum einen der Vektor linearisiert und zum anderen passende Verknüpfungsstellen zwischen beiden DNA Strängen geschaffen. Um eine Religation des Vektors zu vermeiden, wird die für die Ligation wichtige Phosphatgruppe am 5'-Ende des Vektors während des Restriktionsverdaus durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase entfernt. Hierzu gibt man während der letzten halben Stunde des 2 stündigen Restriktionsverdaus 0,5 µl CIP (calf intestine alkaline phosphatase, 10 U/µl) zu 20 µl Restriktionsansatz. Für die Ligation werden Insert und linearisierter Vektor im Massenverhältnis 4:1 gemischt, wobei die Gesamt-DNA-Menge ungefähr 150 ng betragen sollte. Bei geringen DNA-Ausbeuten kann sie auch darunter liegen, jedoch sinkt dadurch die Effizienz bei nachfolgenden Transformationen. Zur Angleichung des Volumens an die Erfordernisse des Rapid Ligation Kits wird das Gemisch zunächst einer Alkoholfällung unterzogen und das erhaltene getrocknete Pellet in 10 µl 1 x Dilution-Buffer (Roche Rapid Ligation Kit Lösung 2)

gelöst. Anschließend werden 10 µl Ligation-Buffer 2 x (Lösung 1) und 1 µl T4-DNA Ligase-Mix (Lösung 3) zugesetzt und gemischt. Die Inkubationszeit für die Ligasereaktion beträgt 5-10 min bei RT. Die Reaktionslösung kann dann direkt zur Transformation von Bakterien eingesetzt werden.

2.2.1.14 Enzymatische DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In der Polymerase-Kettenreaktion wird DNA mit Hilfe spezifischer Primer *in vitro* vervielfältigt (Saiki et al., 1985). Für analytische PCR-Reaktionen wird *Taq* DNA-Polymerase verwendet. Zur Amplifikation codierender Genabschnitte, die für Klonierungen eingesetzt werden, wird ein 1:1 Gemisch aus *Taq*- und *Pfu* DNA Polymerase eingesetzt. Die *Pfu*-Polymerase verfügt im Gegensatz zu *Taq* über eine sog. proof-reading Funktion, d.h. sie erkennt falsch platzierte Nucleotide und ersetzt sie durch die richtige Base, so dass Fehler bei der Transkription verhindert werden. Polymerasen, Puffer und DNA werden entsprechend den Angaben der Hersteller nach Standardprotokollen eingesetzt.

2.2.1.15 Austausch und Herausschneiden von Nucleotidbasen durch ortsspezifische Mutagenese

Die *in vitro* ortsspezifische Mutagenese oder site-directed mutagenesis (Gilberger et al., 1997; Papworth, 1996) ist ein Verfahren bei dem einzelne oder mehrere Nucleotidbasen gezielt ausgetauscht oder eine kurze Nucleotidsequenz aus der DNA herausgeschnitten werden kann.

Das Reaktionsgemisch besteht aus ringförmiger doppelsträngiger Template DNA und zwei, zueinander komplementären, synthetischen Oligonucleotiden, welche die gewünschte Mutation enthalten. Mit Hilfe von *Pfu* DNA-Polymerase, welche sich durch eine 12-fach niedrigere Fehlerquote als herkömmliche DNA-Polymerasen auszeichnet, werden die Primer während der Temperaturzyklen entlang des komplementären DNA-Stranges verlängert. Aufgrund des speziellen Primerdesigns ist nur die Amplifikation des ursprünglichen Elternstranges möglich. Zwar binden die Primer auch an die Tochterstränge, doch erlaubt die von den Primern vorgegebene Richtung nur eine Amplifikation der Elternstränge. Im Anschluss an die Temperaturzyklen werden die Elternstränge durch Behandlung mit der Endonuklease *Dpn* I entfernt (*Dpn* I: 0,5 U/µl; Inkubationszeit 2 h bei 37°C), so dass ausschließlich die Tochterstränge, welche die gewünschte Mutation enthalten für die nun folgende Transformation in *E. coli* verwendet werden. DNA, welche aus *E. coli* isoliert wird, ist in der Regel durch die Aktivität des Enzyms DNA-Adenin-Methyltransferase (*dam*) methyliert und kann so durch die Endonuclease *Dpn* I, welche spezifisch methylierte und teilmethylierte DNA schneidet, verdaut werden. Die Tochterstränge enthalten keine Methylierungsmuster und werden somit nicht angegriffen. Das PCR-Produkt wird durch Alkohol-fällung gereinigt und in *E. coli* transformiert. Hierbei erfolgt der Ringschluß des Plasmids zwischen Primer und Plasmidende durch bakterielle Ligasen.

Reaktionsbedingungen:

Template DNA: <i>PfCDPK1</i> in pBSKS+	50 ng
Primer fwd/rev	je 100 ng
MgCl ₂	1 mM
<i>Pfu</i> -Puffer (Stratagene)	1 x
<i>Pfu</i> -DNA Polymerase	2,5 U
dNTP-Mix	2 mM
Reaktionsvolumen	50 µl

Temperaturzyklen:

Vorwärmzeit	95°C	30 sec	einmalig
Denaturierung	95°C	45 sec	28 Zyklen
Anlagerung	50°C	60 sec	
Verlängerung	72°C	10 min (~2 min/kb)	
Nachlaufzeit	72°C	7 min	einmalig
Reaktionsende	4°C		

2.2.1.16 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* für die Transformation

Die chemische Behandlung mit CaCl₂ kombiniert mit einer kurzzeitigen Erwärmung (Hitzeschockbehandlung) induziert in prokaryontischen Zellen einen vorübergehenden Zustand der Kompetenz, d.h. die Bakterien werden kurzzeitig in die Lage versetzt, DNA aus der umgebenden Lösung aufzunehmen (Cohen et al., 1972; Cosloy und Oishi, 1973; Hanahan, 1983). Als chemisch kompetente Zellen werden Bakterien bezeichnet, die nach der Behandlung mit CaCl₂ in der Lage sind, DNA während einer Hitzeschockbehandlung aufzunehmen. Sie werden meist als Glycerolstocks bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt. Die im Zuge dieser Arbeit verwendeten Bakterienzellen werden nach einem Protokoll von Hanahan kompetent gemacht. 5 ml steriles SOB-Medium, das 10 mM MgCl₂ enthält, wird mit dem Bakterienstamm XL-1 blue aus einem Glycerolstock angeimpft und ÜN bei 37°C und 220 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen werden 50 ml SOB-Medium + 10 mM MgCl₂ mit je 350 µl dieser ÜNK angeimpft und bei 37°C im Schüttler (220 rpm) bis zu einer OD₅₇₈ von 0,3 - 0,4 (ca. 1,5-2 h) inkubiert. Die Bakteriensuspension wird nun in vorgekühlte 50 ml Plastikröhrchen überführt, pelletiert (10 min, 2400 rpm, 4°C; Heraeuszentr.) und das Pellet in 15 ml sterilem, eiskalten Tbf I Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h auf Eis wird erneut zentrifugiert (2000 rpm, 10 min, 4°C). Das Pellet wird in 900 µl Tbf II unter vorsichtigem Schwenken in Eiswasser langsam resuspendiert (5-10 min). Die Bakteriensuspension wird in Aliquots zu 220 µl

schockgefroren, indem sie in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert wird, welche vorher in einem Metallblock auf -80°C vorgekühlt wurden. Die kompetenten Zellen werden bei -80°C aufbewahrt.

Lösungen zur Herstellung kompetenter Zellen:

Tbf I-Puffer	Tbf II-Puffer
30 mM Kaliumacetat pH 5,8 (Essigsäure)	10 mM MOPS pH 7,0 (NaOH)
50 mM MnCl_2	75 mM CaCl_2
100 mM KCl	10 mM KCl
15% Glycerol	15% Glycerol
⇒steril filtriert, dunkel lagern bei 4°C	⇒steril filtriert

2.2.1.17 Hitzeschock-Transformation kompetenter *E. coli*

Mit Ausnahme der Expressionsklone werden zur Transformation von Plasmiden ausschließlich Bakterien des Stammes XL-1 blue (Stratagene) verwendet. Für routinemäßige Klonierungen mit den Vektoren pBS II SK und pBSKS+ werden selbst hergestellte kompetente Bakterien verwendet (siehe 2.2.1.16). Für schwierigere Transformationen, z.B. bei großen Vektoren oder Konstrukten, kommen gekaufte XL-1 blue Competent Cells (Stratagene) zum Einsatz, da die Transformationseffizienz der selbst hergestellten kompetenten Bakterien nicht ausreicht.

Bei der Transformation wird weitgehend nach den Anweisungen von Stratagene für XL-1 blue Competent Cells verfahren. Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut, je 100 μl davon in vorgekühlte 15 ml Plastikröhrchen pipettiert und mit 1,7 μl (1,42 M) $\beta\text{-ME}/100 \mu\text{l}$ versetzt. Unter gelegentlichem leichtem Schütteln wird erst 10 min auf Eis inkubiert, dann 2–10 ng Plasmid oder 2-10 μl Ligasereaktion, entsprechend etwa 10-50 ng Plasmid, zugegeben und auf Eis erneut 30 min inkubiert. Anschließend werden die Proben Hitzeschock behandelt, indem das Röhrchen mit den Zellen 45 sec im Wasserbad auf 42°C erhitzt und anschließend 2 min auf Eis gehalten wird. Damit sich die Zellen regenerieren können, werden nun 900 μl SOB-Medium (42°C) zu den Zellen gegeben und eine Stunde bei 250 rpm im Schüttler bei 37°C inkubiert. Durch Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm (Herauszentrifuge) werden die Zellen pelletiert. 800 μl des Überstandes werden abgenommen und die Bakterien resuspendiert. 10-200 μl der resuspendierten Bakterien werden dann mit einem sterilen Drigalskispatel auf Agarplatten, die das zur Selektion erforderliche Antibiotikum enthalten, ausplattiert und ÜN bei 37°C im Inkubator aufbewahrt.

2.2.1.18 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

100 ml LB-Medium werden mit 1 ml einer ÜNK des zu transformierenden Stammes angeimpft und die Bakterien bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD_{600} von 0,6 inkubiert. Alle folgenden Schritte

werden auf Eis ausgeführt. Die Kultur wird 5 min bei 4000 rpm (Beckmann Z.) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wird 2 x mit je 10% Glycerol gewaschen. Die Bakterien werden dann in 250 µl 10% Glycerol resuspendiert und in Aliquots von 40 µl abgefüllt. Die Zellen können direkt zur Transformation verwendet oder bei -70°C gelagert werden.

2.2.1.19 Transformation elektrokompetenter *E. coli* durch Elektroporation

Beim Verfahren der Elektroporation werden salzfrei gewaschene Bakterien zusammen mit der zu transformierenden DNA in einer Küvette, die an zwei gegenüberliegenden Seiten mit dünnen Plattenelektroden ausgekleidet ist, einem Feld hoher elektrischer Konduktivität ausgesetzt. Bei der anschließenden Entladung des Kondensators entsteht ein elektrischer Puls, welcher bewirkt, dass DNA in die Zellen aufgenommen wird.

Zur Transformation werden 40 µl elektrokompetente Zellen mit ca. 10 ng DNA (in maximal 5 µl TE) versetzt und in die eisgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgt in einem GENE-PULSER™ (Bio-Rad) durch Entladung eines Potentials von 2500 V über einen Widerstand von 200 Ω (Kapazität: 25 µF). Nach der Elektroporation mit der Zeitkonstante von $\tau = 4,5 - 4,8$ werden die Zellen sofort in 1 ml LB oder SOB aufgenommen und zur Regeneration 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Der Transformationsansatz wird in Aliquots zu 100 µl auf dem entsprechenden Selektivmedium ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Bei der Bindung von Coomassie Brilliantblau G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe von 465 nm auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung (Bradford, 1976).

Die Färbelösung (5 x; Bio-Rad) wird bei jeder Bestimmung frisch im Verhältnis 1:5 mit H_2O bidest. verdünnt. Nach Zugabe der Färbelösung zur Proteinlösung wird gut gemischt, 5 min stehen gelassen, damit sich die Färbung vollständig ausbilden kann, und vor der Messung wieder gemischt. Die Absorption der Probe sollte dabei im Bereich zwischen 0,1 und 1 liegen, ansonsten wird entsprechend verdünnt. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe von Rinderserum-Albumin (BSA; 0, 50, 100, 200, 300, 400 µg/ml in Wasser) wird eine Eichgerade erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration der Probe ermittelt wird.

2.2.2.2 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Zur Aufkonzentrierung von PfCDPK1 werden bei Mengen bis 6 ml Centricon YM-30 Centrifugal Filters (Millipore), bei größeren Mengen Amicon Ultra-30 PLTK Centrifugal Filter Units verwendet. Bei der Anwendung wird den Anweisungen des Herstellers Folge geleistet.

2.2.2.3 Auftrennung von Proteingemischen mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Polyacrylamidgele für die Elektrophorese bestehen aus Ketten von polymerisiertem Acrylamid, welche durch bifunktionelle Reagenzien wie N,N-Methylenbisacrylamid quervernetzt werden. In einer radikalischen Polymerisationsreaktion entsteht so ein dreidimensionales Netzwerk, dessen Eigenschaften sowie Porengröße abhängig ist von der Konzentration an Acrylamid bzw. Quervernetzer.

Die Elektrophorese macht sich die Tatsache zu Nutze, dass geladene Teilchen im elektrischen Feld in Richtung ihres entgegengesetzten Pols wandern. Üblicherweise werden die Proteine vor der Elektrophorese in Anwesenheit eines reduzierenden Agens wie β -ME oder DTT und Hitze (2-5 min bei 100°C) mit dem anionischen Detergens SDS beladen. Durch dieses bekommt das Protein eine einheitliche negative Ladung, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel nunmehr abhängig ist von der Größe des Proteins bzw. der Porengröße des Gels.

In der Regel bestehen SDS-Polyacrylamidgele aus zwei Abschnitten: dem großporigen Sammelgel (5% Acrylamid, pH 6,8) und dem engporigen Trenngel (6-15% Acrylamid, pH 8,8). Durch die spezielle Komposition des Probenpuffers wandert das Proteingemisch im Sammelgel als dünner Stapel zwischen dem Leition Chlorid und dem bei pH 6,8 schwach geladenen Folgeion Glycin. So erreicht eine konzentrierte, dünne Proteinbande das Trenngel, bei dessen hohem pH das Glycin stärker geladen ist und das Protein überholt. Ohne das treibende Folgeion wird nun die Wanderungsgeschwindigkeit der SDS-beladenen Proteine, bedingt durch den Siebeffekt des Gels, allein durch deren Größe bestimmt (Laemmli, 1970; Sambrook, 1989).

Puffer- und Gelzusammensetzungen für die SDS-PAGE:

Tris-Glycin Elektrophoresepuffer	1 x SDS Probenpuffer
25 mM Tris	50 mM Tris/HCl (pH 6,8)
250 mM Glycin (Elektrophoresegrad, pH 8,3)	1% β -ME
0,1% SDS	2% SDS (Elektrophoresegrad)
	0,1% Bromphenolblau
	10% Glycerol

Trenngel	5% Sammelgel
6-15% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	5% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
375 mM Tris (pH 8,8)	125 mM Tris/HCl (pH 6,8)
0,1% SDS	0,1% SDS
0,1% Ammoniumpersulfat	0,1% Ammoniumpersulfat
0,04-0,08% TEMED	0,1% TEMED

2.2.2.4 Färbung und Fixierung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliantblau

Im Anschluß an die Elektrophorese wird das Gel zur Fixierung und gleichzeitigen Färbung der Proteinbanden 10 min bis 1 h unter leichtem Schwenken in einer Coomassie-Färbelösung belassen. Um das Gel um die Banden herum wieder zu entfärben, wird es mehrere Stunden in Entfärbelösung sanft geschwenkt bis die Banden deutlich sichtbar sind (Sambrook, 1989). Zur Beschleunigung des Entfärbeprozesses wird die Lösung mehrmals gewechselt oder Papiertücher, welche die überschüssige Farbe aufnehmen können, in die Entfärbelösung gelegt.

Coomassie-Färbelösung	Entfärbelösung
0,25% (m/v) Coomassie Brilliantblau R-250 gelöst in 45% Methanol 45% H ₂ O bidest. 10% Eisessig	30% Methanol 10% Eisessig 60% H ₂ O bidest.

2.2.2.5 Dephosphorylierung von Protein mit λ -Phosphatase

Phosphatasen spalten freie Phosphatgruppen in Biomolekülen wie DNA oder Proteinen. Im vorliegenden Fall wird die λ -Phosphatase (400 U/ μ l; NEB) eingesetzt, um Phosphatgruppen in PfCDPK1, die auf eine Autophosphorylierung der Kinase während ihrer Expression in *E. coli* zurückzuführen sind, zu entfernen. λ -Phosphatase wird verwendet, da sie sich im Gegensatz zur alkalischen Phosphatase in ihrem Molekulargewicht (ca. 20 kDa) deutlich von PfCDPK1 unterscheidet und es so zu keiner Verwechslung bei der anschließenden Auftrennung durch Gelfiltration kommen kann. Vor der Dephosphorylierung wird die Proteinkonzentration auf ungefähr 1 mg/ml eingestellt und mit einem in der Vorschrift empfohlenen Puffer umdialysiert (50 mM Tris pH 7,5 / 50 mM NaCl / 10% Glycerol / 0,7 mM β -ME / 0,1 mM EDTA). Nach Zugabe von 2 mM MnCl₂ und 800 U/ml λ -Phosphatase wird 3-16 h bei 30°C inkubiert.

2.2.2.6 TEV-Protease-Verdau

Die *TEV*-Protease (aus dem Tobacco Etch Virus) erkennt eine sogenannte *TEV*-Site bestehend aus der Aminosäure (AS)-Sequenz Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly, welche sie zwischen den AS Gln und Gly spaltet. Viele neuartige Vektoren (hier pETM-11) enthalten zwischen dem His-tag und der multiplen Klonierungsstelle eine derartige *TEV*-Site, die es möglich macht, den His-tag im Anschluß an die Aufreinigung durch Verdau mit *TEV*-Protease wieder vom Protein abzuspalten. Im vorliegenden Fall wird rekombinante *TEV*-Protease (Invitrogen) verwendet.

Zu 100 µg Protein werden ca. 1 µg *TEV*-Protease gegeben. Der Verdau erfolgt in der Regel über 24-48 h bei 4°C. Vor dem Verdau wird der Puffer durch Dialyse bei 4°C in *TEV*-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0 / 0,5 mM EDTA / 1 mM DTT) gewechselt.

Soll das Protein im Anschluß an den *TEV*-Verdau für Kristallisationsansätze verwendet werden, wird es zunächst ÜN in Puffer A (siehe Ni-Affinitätschromatographie) umdialysiert und anschließend mit einer adäquaten Menge Ni-NTA Matrix versetzt. Während unverdautes Protein, His-tags sowie die *TEV*-Protease, die ebenfalls einen His-tag besitzt, an die Matrix binden, bleibt das verdaute Protein ohne His-tag im Überstand und kann weiterverwendet werden.

2.2.2.7 Trypsin/Chymotrypsin-Verdau

Chymotrypsin (Chy) und Trypsin sind Verdauungsenzyme im Dünndarm von Säugetieren. Sie spalten Peptidbindungen selektiv hinter aromatischen AS (Chy) bzw. den basischen AS Arginin und Lysin (Trypsin). Der Verdau eines Proteins mit einer der beiden Proteasen ergibt oft ein charakteristisches Schnittmuster, welches Rückschlüsse auf einzelne Domänen, sowie frei liegende Proteinketten gestattet.

Die Stocklösungen der Proteasen besitzen eine Konzentration von 0,1 µg/µl. Trypsin wird in 100 mM Tris/HCl pH 8,5, Chymotrypsin in 100 mM Tris/HCl pH 7,8 / 10 mM CaCl₂ gelöst. Für den Verdau werden ca. 20 µg Protein in einer Verdünnungsreihe (1:25; 1:50; 1:100; 1:250; 1: 500; 1:1000) mit unterschiedlichen Mengen an Trypsin oder Chymotrypsin (lyophilisiert, sequencing grade, Roche) versetzt und 2,5 h bei 37° (Trypsin) bzw. 25°C (Chy) inkubiert. Die Analyse erfolgt über SDS-PAGE.

2.2.2.8 In vitro Transkription/Translation

Die in vitro Transkription/Translation (T/T) stellt eine einfache und schnelle Möglichkeit dar, Gensequenzen in ihre Aminosäuresequenz zu übersetzen und zu analysieren. Das hier verwendete TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation System von Promega ist geeignet für die in vitro Translation eukaryontischer DNA Sequenzen.

Für die Transkription benötigt man zirkuläre Plasmid-DNA oder ein PCR-Fragment, welche den Promotor für die T7 RNA-Polymerase vor der Gensequenz, die transkribiert bzw. translatiert werden

soll, enthalten. Im vorliegenden Fall wurden die gewünschten Genabschnitte in den Vektor pGEM-3Z von Promega kloniert, welcher den T7-Promotor enthält. Das TNT[®]-Master Mix besteht aus Retikulocytenlysate vom Kaninchen, Reaktionspuffer, T7 RNA-Polymerase, den benötigten Aminosäuren sowie einem RNase-Inhibitor. Die Geninformation wird zunächst in RNA transkribiert, welche dann in die entsprechende Proteinsequenz übersetzt wird. Zur Markierung des translatierten Polypeptides wird in unserem Falle L-[³⁵S]Methionin (1000 Ci/mmol), [9,10(n)-³H]Myristat (47 Ci/mmol) oder [9,10(n)-³H]Palmitat (60 Ci/mmol) verwendet. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgt mittels SDS-PAGE und Fluorographie.

Bei der Handhabung der Proben wird weitgehend den Anweisungen von Promega Folge geleistet. Zusätzlich erweist es sich als vorteilhaft für die Ausbeute der Reaktion, dem Reaktionsgemisch etwas T7 TNT[®] PCR Enhancer zuzufügen, obwohl kein PCR-Produkt als Template eingesetzt wird. Bei Verwendung von [9,10(n)-³H]Palmitat zur Markierung werden zusätzlich mikrosomale Membranen (canine pancreatic microsomal membranes, CPMM) zugesetzt, da sie eventuell Palmityl-Acyltransferasen enthalten, welche im TNT[®]-Master Mix nicht vorhanden sind. Als Kontrolle wird eine Reaktion ohne DNA-Template durchgeführt.

Das Gemisch wird 90 min bei 30°C im Heizblock inkubiert. Anschließend werden 5 µl der Reaktion mit 11 µl H₂O mp (entionisiertes Wasser; Millipore), sowie 4 µl 5 x Ladepuffer (bei Markierung mit [9,10(n)-³H]Palmitat ohne DTT und β-ME) versetzt und 2 min bei 100°C (10 min bei 70°C bei [9,10(n)-³H]Palmitat) im Heizblock gekocht. Die Proben werden auf einem 8%-igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und gefärbt. Nach dem Entfärben wird das Gel für die Fluorographie 30 min in Amplify geschwenkt. Mit den getrockneten Gelen der [³⁵S]Methionin markierten Proben wird ein Kodak X-Omat AR-5 Film für 2-4 h, mit den Gelen der [³H]Myristat bzw. [³H]Palmitat markierten Proben ein Hyperfilm-MP (Amersham) für 2-4 Wochen exponiert.

Reaktionsgemisch:

	[³⁵ S]Methionin	[³ H]Myristat	[³ H]Palmitat
TNT[®] Quick Master Mix	16 µl	16 µl	20 µl
Plasmid DNA (0,5 µg/ml)	0,8 µl	0,8 µl	0,8 µl
[³⁵S]Methionin	1,7 µl (17 µCi)	-	-
[³H]Myristat bzw. [³H]Palmitat	-	20 µl (20 µCi) LM verdampft	20 µl (100 µCi) LM verdampft
T7 TNT[®] PCR Enhancer	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
CPMM	-	-	1,4 µl
H₂O (DEPC behandelt)	-	1,7 µl	1,3 µl

1 x Ladepuffer	
50 mM Tris/HCl pH 6,8	100 mM DTT (frisch hinzugeben)
0,1% Bromphenolblau	10% Glycerol
2% SDS	

2.2.2.9 In vitro Transkription/Translation unter Verwendung mikrosomaler Membranen

Um die Fähigkeit eines Proteines an Membranen zu binden zu untersuchen, kann die in vitro T/T-Reaktion auch in Anwesenheit mikrosomaler Membranen erfolgen. Um negative Interaktionen mit dem TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation System zu vermeiden, werden Canine Pancreatic Microsomal Membranes von Promega (CPMM) verwendet, welche sich durch ihre hohe Reinheit und die Abwesenheit endogener, membrangebundener Ribosomen und RNA auszeichnen.

Protein mit einer Membranverankerungsstelle sollten an die mikrosomalen Membranen binden können und nach der Ultrazentrifugation in der Membranfraktion zu finden sein. In der Regel steigt der Anteil an membrangebundenem Protein mit der Menge an eingesetzter Membran, jedoch wirken sich diese ab einer bestimmten Konzentration negativ auf die Ausbeute des Translationsproduktes aus. Die optimale Menge an CPMM muss deshalb empirisch ermittelt werden.

Nach der Inkubation werden die Proben in 1 ml Polycarbonat-Ultrazentrifugenröhrchen überführt und die Membranen 1 h bei 100000 x g und 4°C in der Ultrazentrifuge pelletiert. Der Überstand wird abgenommen und getrennt gesammelt, während das Pellet 2 mal mit 100 µl PBS gewaschen wird. Zwischen den Waschschrinen wird 15 min bei 100000 x g und 4°C abzentrifugiert. Mit dem Überstand wird verfahren wie unter 2.2.2.8 beschrieben. Das Pellet wird in 25 µl 1 x Ladepuffer (siehe 2.2.2.8) aufgenommen und 2 min bei 100°C gekocht. Die Analyse erfolgt durch SDS-PAGE und Fluorographie. Zur Quantifizierung der Reaktionsprodukte werden die markierten Banden auf dem getrockneten Gel erst markiert, dann ausgeschnitten und in ein Szintillationsgefäß mit 3 ml Szintillationslösung überführt. Die Aktivität in counts per minute (cpm) wird mit Hilfe eines Szintillationszählers ermittelt.

Reaktionsgemisch:

	Probe	Kontrolle
TNT® Quick Master Mix	20 µl	20 µl
Plasmid DNA (0,5 µg/ml)	0,4 µl	-
[³⁵S]Methionin	1,7 µl (17 µCi)	1,7 µl
T7 TNT® PCR Enhancer	1,5 µl	1,5 µl
CPMM	1,4 µl	1,4 µl
H₂O (DEPC behandelt)	-	0,4 µl

2.2.2.10 Kinaseassays zur Bestimmung der Enzymaktivität von PfCDPK1

Zur Ermittlung der Kinaseaktivität von PfCDPK1 und zur Identifikation spezifischer Inhibitoren von PfCDPK1 werden Kinaseassays durchgeführt, welcher auf dem Einbau von radioaktivem Phosphat in ein Substratmolekül basieren. Durch die Aktivität von PfCDPK1 werden radioaktiv markierte Phosphatreste aus [γ -³²P]ATP auf Serin-/Threoninseitenketten im Substratmolekül, hier Casein, übertragen (Zhao et al., 1994). Das Ausmaß des Einbaus wird über die Ermittlung der Strahlungsaktivität im Proteinsubstrat mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt.

Um eine maximale Enzymaktivität zu gewährleisten, ist es erforderlich, das Enzym bei -80°C zu lagern und aliquotierte Mengen zu verwenden, um häufiges Auftauen und Einfrieren zu vermeiden. Die einzelnen Reaktionsbestandteile werden, abzüglich des ATP-Gemisches, zunächst auf Eis vorpipettiert. Die Kinasereaktion wird durch Zugabe eines ATP / [γ -³²P]ATP-Gemisches gestartet, bei 30°C in der Regel 30 min inkubiert und durch Zugabe von 5 µl 1,5 M H₃PO₄ (entspricht einer Endkonzentration 167 mM) abgestoppt. Beim Arbeiten mit mehreren Proben ist darauf zu achten, dass die Inkubationszeiten für jede einzelne Probe exakt eingehalten werden. Die Assays werden deshalb zeitversetzt im Abstand von 15 oder 30 sec gestartet bzw. abgestoppt. 25 µl der Assays werden auf runde, ausgestanzte P-81 Phosphocelluloseplättchen (Durchmesser 1,8 cm) pipettiert und 30 min an der Luft getrocknet. Dabei bindet das Casein an die Phosphocellulosematrix. Durch fünfmaliges Waschen in 150 mM H₃PO₄ für 10 min, wird nicht eingebautes [γ -³²P]ATP entfernt. Nach erneutem Trocknen unter IR-Bestrahlung (30 min) werden die Phosphocelluloseplättchen in 10 ml Szintillationsgefäße überführt, mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit überschichtet und die Anzahl der Zerfälle pro Minute (counts per minute, cpm) in einem Szintillationszähler bestimmt. Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität dient 1 µl des ATP-Startgemisches, dessen Aktivität parallel bestimmt wird.

Assaybedingungen:

	Assay	Negativkontrolle
Kinase-Assay-Puffer (KAB)	KAB (+) 1 x	KAB (-) 1 x
Casein	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml
CaCl₂	1 mM	-
DTT	1 mM	1 mM
PfCDPK1	~50 ng	~50 ng
ATP	87,5 μM	87,5 μM
[γ-³²P]ATP	1-2 μCi	1-2μCi
Reaktionsvolumen	40 μl	40 μl

Pufferzusammensetzung:

Kinase Assay Puffer: KAB (+)	KAB (-) für Negativkontrolle
20 mM Tris/HCl pH 7,4	20 mM Tris/HCl pH 7,4
10 mM MgCl ₂	10 mM MgCl ₂
H ₂ O mp.	H ₂ O mp.
	100 μM EGTA

2.2.2.11 Kinaseassays zur Ermittlung potentieller Inhibitoren von PfCDPK1

Eine Anwendung der Kinaseassays ist es, chemische Substanzen auf ihre inhibitorischen Eigenschaften bezüglich der Enzymaktivität von PfCDPK1 zu untersuchen.

Hierzu wird dem Assay die zu untersuchende Substanz in einer Konzentration von 10 μM beigemischt und die Ergebnisse mit den Werten einer Positivkontrolle ohne potentiellen Inhibitor verglichen. Um die Bedingungen möglichst konstant zu halten, wird die Vorinkubationszeit, also die Zeit während der Enzym und Inhibitor zwar schon in Kontakt sind, aber noch kein ATP für die Reaktion zur Verfügung steht, ebenfalls konstant bei 10 min gehalten. Die meisten der zu testenden Substanzen wurden aufgrund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit in DMSO gelöst. Um die negative Auswirkungen von DMSO auf die Kinaseaktivität zu minimieren, wird die maximale DMSO-Konzentration im Assay auf 0,5% begrenzt. Bei der Positivkontrolle werden dann dem Assay entsprechende DMSO-Mengen zugesetzt. Zur Berechnung der prozentualen Inhibition werden die Ergebnisse der Szintillationszählung von Assay (cpm_I) und Positivkontrolle (cpm_{K+}) unter Abzug der Negativkontrolle (cpm_{K-}) zueinander ins Verhältnis gesetzt:

$$\% \text{Inhibition} = [1 - (\text{cpm}_I - \text{cpm}_{K-}) / (\text{cpm}_{K+} - \text{cpm}_{K-})] \times 100$$

2.2.2.12 Bestimmung der IC₅₀ eines Inhibitors

Die IC₅₀ ist definiert als diejenige Konzentration eines Inhibitors, welche zu einer halbmaximalen Hemmung der Enzymaktivität führt.

Hierzu werden Kinaseassays in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des Inhibitors durchgeführt. In der Regel erfolgt dies in doppelter oder dreifacher Ausführung. Zur Vereinfachung der Auswertung wird meist in Zehnerpotenzschritten verdünnt (100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM). Zur Bestimmung der IC₅₀ wird die Inhibitorkonzentration in halblogarithmischem Maßstab gegen die ermittelte Aktivität aufgetragen und der IC₅₀-Wert aus der Kurve abgelesen.

2.2.2.13 In vitro Transkription/Translation kombiniert mit Kinaseassay

Im Anschluß an die in vitro Transkription/Translation in Anwesenheit von CPMM (Abschn. 2.2.2.5) wird das durch Ultrazentrifugation erhaltene Membranpellet in Kinase-Assay-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM MgCl₂) resuspendiert. Es wird 1 mM DTT und 10 mM CaCl₂ bzw. 100 µM EGTA für die Kontrolle zugesetzt und die Kinasereaktion durch Zugabe von 88 µM ATP gestartet. Das Reaktionsvolumen beträgt 25 µl. Der Reaktionsansatz wird 30 min bei 30°C inkubiert und durch Überführen auf Eis gestoppt. Nach Zentrifugation bei 100000 x g für 1 h wird die Probe in eine Pellet- und eine Überstandfraktion geteilt, welche getrennt voneinander analysiert werden.

2.2.2.14 Kristallisationsexperimente mit PfCDPK1

Im Zuge dieser Arbeit kommt die Methode des hängenden Tropfens (hanging drop) zur Anwendung. Hierzu werden die Aussparungen einer 24-Well Mikrotiterplatte mit 0,5-1 ml Reservoirlösung, bestehend aus Puffer, Präzipitans und event. Salz, gefüllt. Auf ein silanisiertes rundes Deckgläschen (Durchmesser 2 cm) wird 1 µl Proteinlösung (ca. 15-20 mg/ml), welche zur Entfernung von Verunreinigungen zuvor 45 min bei 45000 rpm (Ultrazentrifuge Optima[®]MAX, Beckmann Coulter) zentrifugiert wurde, getropft und mit 1 µl Reservoirlösung gemischt. Das Deckglas wird mit dem Tropfen nach unten hängend auf den Rand der Aussparung der Mikrotiterplatte, welcher vorher mit Silikonfett bestrichen wurde, aufgesetzt, so dass ein luftdichter Raum entsteht. Die Kristallansätze werden bei konstanter Temperatur (hier 4°C oder 20°C) erschütterungsfrei gelagert und regelmäßig unter dem Mikroskop auf Kristalle untersucht. Bis zur Entstehung von Kristallen können wenige Tage bis mehrere Monate vergehen.

2.2.2.15 Analyse von Proteinlösungen mittels Dynamic Light Scattering

Die Methode des Dynamic Light Scatterings (DLS: Dynamische Lichtstreuung) macht sich die Eigenschaft einiger Makromoleküle, wie z.B. auch Proteine in Lösung zu Nutze, einfallende Lichtstrahlen zu streuen. Durch die relative Bewegung der gelösten Teilchen zueinander entstehen

Fluktuationen in der Intensität des Streulichtes, deren Dauer abhängig von der Größe der Moleküle ist. Mit Hilfe von Computern können diese gemessenen Fluktuationen in der Intensität zur Berechnung der apparenten Größe der Moleküle, ausgedrückt in Radius und theoretischem Molekulargewicht, herangezogen werden.

Da die Methode sehr empfindlich auf Verunreinigungen wie Staub oder Proteinaggregate reagiert, wird die Proteinlösungen kurz vor der Messung 45 min bei 45000 rpm (Ultrazentrifuge Optima[®]MAX, Beckmann Coulter) zentrifugiert. Die Küvette wird sehr gründlich gereinigt und mehrmals zunächst mit H₂O bidest., dann mit Gelfiltrations-Puffer (GF-Puffer) gespült. Erst wenn die Messung der Küvette mit Puffer keine Anzeichen auf Staubpartikel mehr liefert, werden 16 µl Proteinlösung in die Küvette gegeben und vermessen. Da der Grad der Lichtstreuung temperaturabhängig ist, wird die Lösung während der Messung temperiert. Der Einfluss des Lösungsmittels wird durch Eingabe der Lösungsmittelparameter von der Computersoftware korrigiert. Für die Messungen kommt ein Dynamic light scattering DyynaPro Gerät (ProteinSolutions ltd) zum Einsatz.

2.2.3 Proteinaufreinigung

2.2.3.1 Expression und Aufreinigung von PfCDPK1 und EKII für Enzymassays und Kristallisationsexperimente

Es handelt sich hierbei um das erste Protokoll, das für die Aufreinigung von PfCDPK1 und der Mutante EKII in Stueber No. 9 angewendet wird.

Zur spezifischen Aufreinigung des rekombinanten Proteins bedient man sich des Verfahrens der Nickel-Affinitätschromatographie. Dieses Verfahren dient zur Aufreinigung von Proteinen mit einem sogenannten His₆-tag, einer Sequenz von 6 Histidinen in Folge. Der His-tag wird im Normalfall entweder am N-Terminus oder am C-Terminus eines Proteins angefügt, z.B. durch Klonierung der betreffenden Gensequenz in spezielle Vektoren (z.B. pETM-11 oder pET-21a+), die den His-tag bereit im Anschluß an ihre Multiklonierungsstelle enthalten. Alternativ kann er aber auch in das Protein inseriert werden, wenn er in einem frei zugänglichen Bereich an der Oberfläche liegt. Der His-tag bindet spezifisch und mit hoher Affinität an Nickelatome, welche an die Agarosematrix des Säulenmaterials gebunden sind. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, rekombinante Proteine einfach und spezifisch von den übrigen Zellproteinen abzutrennen. Die organische Base Imidazol konkurriert mit dem His-tag um die Bindungsstellen am Nickelatom. So wird Imidazol in niedrigen Konzentrationen (10 - 20 mM) dazu verwendet, unspezifische Bindungsstellen abzusättigen bzw. unspezifische Bindung zu reduzieren und in hohen Konzentrationen, um das rekombinante Protein durch kompetitive Verdrängung wieder von der Säule zu eluieren.

2.2.3.1.1 Rekombinante Proteinexpression

500 ml 2YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin sowie 25 µg/ml Kanamycin werden mit 8 ml einer ÜNK des Expressionsklons angeimpft. Die Kultur wird bei 37°C im Schüttler (200 rpm) bis zu einer OD_{600nm} von etwa 0,8 inkubiert. Dann wird die Proteinexpression durch Zugabe von 400 µM IPTG induziert und die Bakterien weitere 8 h inkubiert. Anschließend wird die Bakteriensuspension bei 4000 rpm für 30 min bei 4°C abzentrifugiert (Beckmann J-6B) und das Pellet bei -70°C gelagert.

2.2.3.1.2 Zellaufschluß

Zur Proteinaufreinigung wird das Pellet in 25 ml Lysepuffer, welcher die Proteaseinhibitoren Pepstatin (0,7 µg/ml), Leupeptin (0,5 µg/ml) und PMSF (120 µg/ml) enthält, resuspendiert. Zur Lyse der bakteriellen Zellwände wird 1 mg/ml Lysozym zugesetzt und bei 4°C langsam gelöst. Nach Zugabe von 2,4 µg/ml DNase wird auf Eis 3 x 30 sec sonifiziert (Branson Sonifier 250; Output control 6,5; duty cycle: constant). Dabei brechen die Zellwände auf, so dass alle löslichen Proteine freigesetzt werden. Die festen Zellbestandteile werden bei 18000 rpm (Sorvall SS34) und 4°C 20 min abzentrifugiert.

2.2.3.1.3 Nickel-Affinitätschromatographie

Durch Zugabe von 5 M NaCl wird die Kochsalzkonzentration auf 300 mM erhöht. Im Anschluß wird das Lysat 1:1 mit Puffer A₃₀₀ + 40 mM Imidazol verdünnt, um es auf eine Imidazolkonzentration von 20 mM einzustellen. Die Lösung wird langsam (Flussrate 1,5 ml/5 min) bei 4°C auf eine Säule mit 2 ml Ni-NTA Agarose, welche mit 10 Säulenvolumen (SV) A₃₀₀ + 20 mM Imidazol äquilibriert wurde, geladen. Gewaschen wird zunächst mit 30 SV Puffer A₃₀₀ + 20 mM Imidazol, dann mit 30 SV Puffer A₃₀₀ + 30 mM Imidazol (Flussrate 1 ml/min). Das Protein wird nun mit A₃₀₀ + 100 mM Imidazol eluiert und in 2 ml Fraktionen gesammelt. Die Analyse der Fraktionen erfolgt mittels SDS-PAGE (8% AA) und die proteinreichsten Fraktionen werden gepoolt.

2.2.3.1.4 Aufarbeitung des Proteineluats

Soll das Protein für Kinaseassays eingesetzt werden, wird das Protein zunächst in 50 mM Tris pH 7,5 / 1 mM EDTA / 5 mM β-ME umdialysiert. Hierdurch wird das Imidazol und das NaCl entfernt, welche die Kinasereaktion hemmen. Zur Stabilisierung des Proteins wird 5 mM DTT zugesetzt sowie 20% Glycerol um Schäden beim Einfrieren zu vermeiden. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford, werden Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Da die Kinase rasch ihre Aktivität verliert, ist darauf zu achten, während der Proteinaufreinigung möglichst schnell zu arbeiten und lange Pausen zu vermeiden. Außerdem werden alle Schritte auf Eis durchgeführt.

Für Kristallisationsexperimente konzentriert man das Protein zunächst auf eine Konzentration von 15-20 mg/ml auf. Das in der Lösung enthaltene Imidazol wird durch Dialyse in 50 mM HEPES pH 7,5 /

300 mM NaCl / 1 mM EDTA / 5 mM β -ME in Knopfdialysezellen entfernt. Gleichzeitig wird der Tris-Puffer gegen HEPES ausgetauscht und das in der Lösung enthaltene Ca^{2+} durch Einführung von EDTA komplexiert, so dass die Kinase in ihrer inaktiven Form vorliegt. Schließlich gibt man im Anschluß an die Dialyse noch 10 mM DTT zur Stabilisierung des Proteins hinzu.

Pufferzusammensetzungen:

	Lysepuffer	A ₃₀₀ -Puffer
Tris/HCl	50 mM pH 7,6	50 mM pH 7,0
NaCl	150 mM	300 mM
β -ME	5 mM	5 mM
Imidazol	-	20-100 mM
Glycerol	10%	-

2.2.3.2 Expression und Aufreinigung rekombinanter PfCDPK1-Derivate für Kristallisationsexperimente sowie deren biochemische Charakterisierung

Es handelt sich hierbei um das Protokoll, wie es für die Aufreinigung der Mutanten N51-D212A und N51-WT in pET-21a(+) bzw. pETM-11 etabliert wurde. Die Gründe, die zur Entwicklung dieses Protokolls führten, sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

2.2.3.2.1 Rekombinante Proteinexpression

Für die Expression der Konstrukte wurde der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) gewählt. Er zeichnet sich durch die Abwesenheit bestimmter Proteasen aus und ermöglicht die Expression von T7-RNA-Polymerase abhängigen Expressionssystemen bei hoher Proteinausbeute. BL21 (DE3) pLysS Zellen besitzen zusätzlich das Lys Plasmid, welches verhindert, dass das rekombinante Protein bereits vor der Induktion exprimiert wird. So können auch toxische Proteine exprimiert werden. Bei BL21-CodonPlus-RIL Zellen ermöglichen zusätzliche Kopien seltener tRNAs im RIL-Plasmid die Translation von Genen, deren Expression in konventionellen *E. coli*-Zellen nicht möglich ist.

Tests mit den 3 beschriebenen Bakterienstämmen zeigten, dass die Ausbeute an löslichem Protein bei Verwendung der BL21 (DE3) Zellen am größten war, weshalb in der Folge ausschließlich dieser Stamm zum Einsatz kamen.

Durch Elektroporation werden elektrokompente BL-21 (DE3) Zellen mit dem entsprechenden Expressionskonstrukt transformiert und auf LB-Antibiotika-Agarplatten (LB-AB-Agar) selektioniert. Eine Bakterienkolonie wird ausgewählt und zum Animpfen einer Vorkultur (LB-Medium, Kanamycin

50 µg/ml für pETM-11 oder Ampicillin 50 µg/ml für pET-21a+) verwendet, welche 8 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Vorkultur wird auf mehreren LB-AB-Agarplatten ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Von je einer Agarplatte werden die Bakterienzellen in etwas LB-Medium + AB resuspendiert. Diese Kultur wird zum Animpfen einer 800 ml Kultur verwendet (Zusammensetzung siehe Vorkultur). Im Schüttler wird diese bei 37°C und 250 rpm solange inkubiert, bis die OD₆₀₀ einen Wert von 0,6 erreicht (in der Regel nach ca. 2 h). Dann wird die Expression durch Zugabe von 400 µM IPTG induziert und die Bakterien ÜN (18-20 h) bei 18°C weiter inkubiert. Die Zellen werden bei 4000 rpm für 20 min (Sorvall RC 12BP-Zentrifuge) geerntet und das Medium verworfen. Das Pellet wird in 40 ml PBS resuspendiert und in ein 50 ml Plastikröhrchen überführt. Die Zellen werden 20 min bei 4300 rpm und 4°C abzentrifugiert (Heraeus-Zentrifuge), der Überstand verworfen und die Pellets bei -80°C eingefroren.

2.2.3.2.2 Zellaufschluß

Die eingefrorenen Bakterienpellets (3-7 g) werden vorsichtig mit einer Pipette in 40 ml eiskaltem Puffer A, welchem 1 Tablette Proteaseinhibitor-Cocktail (Complete EDTA-free; Merck) oder alternativ 1 mM PMSF, und 2,7 mM β-ME zugesetzt wurde, resuspendiert und anschließend auf Eis 4 mal 2 min mit kurzen Ultraschallimpulsen (Branson Sonifier 250, Makro Tip, Output Control 7, Duty Cycle 60) behandelt. Da sich die Proben dabei stark erwärmen, werden sie zwischen den einzelnen Sonifizierungen 2 min auf Eis gekühlt. Alternativ hierzu kann auch ein Cell-Disruptor (12000-15000 kPa) verwendet werden. Durch diese Behandlung brechen die Zellwände der Bakterien auf und das im Cytosol enthaltene Protein wird freigesetzt. Das Bakterienlysat sollte nun relativ dünnflüssig sein. Durch Ultrazentrifugation bei 40000 rpm (Ultrazentrifuge Discovery 100, UZ-Rotor T 647,5, Sorvall) für 1 h bei 4°C werden die unlöslichen Zellbestandteile abgetrennt. Der proteinhaltige Überstand wird vorsichtig abgenommen und bei 4°C weiterverwendet.

2.2.3.2.3 Nickel-Affinitätschromatographie

Der Überstand des Zellaufschlusses wird zunächst mit Hilfe einer elektrischen Pumpe mit einer Flussgeschwindigkeit von ungefähr 1 ml/min auf eine Säule mit 5 ml gepackten Ni-NTA Beads (Qiagen) geladen, welche zuvor mit Puffer A äquilibriert wurde. Zur Entfernung von nicht gebundenem Protein und sonstigen Verunreinigungen wird mit 10-20 SV Puffer A gewaschen (2 ml/min). Um unspezifisch an die Matrix gebundenes Protein zu entfernen, wird mit Puffer A gewaschen, dem steigende Mengen an Puffer B, welcher zusätzlich 500 mM Imidazol enthält, beigemischt werden. Imidazol konkurriert dabei mit den Proteinen um die Bindungsstellen an der Gelmatrix, so dass schwächer gebundenes Protein kompetitiv verdrängt wird. In der Regel wird in drei Stufen gewaschen: 8%, 12% und 16% Puffer B (entsprechend 49,2 mM, 68,8 mM und 88,4 mM Imidazol). Im Durchfluss enthaltenes Protein wird durch Absorptionsmessung detektiert und durch

einen Schreiber dargestellt. Erst wenn der Durchfluss weitgehend frei von Protein ist, wird die Imidazolkonzentration erhöht bzw. die Elution gestartet. Letztere erfolgt bei 100% Puffer B (500 mM Imidazol). Das Eluat wird in 4 ml Fraktionen gesammelt, die proteinreichsten Fraktionen werden gepoolt und weiterverarbeitet oder gebunden an Ni-NTA Matrix maximal 3 Wochen bei 4°C gelagert. Zur Kontrolle der Affinitätsreinigung werden an entscheidenden Schritten Proben entnommen, welche mittels SDS-PAGE analysiert werden.

Pufferzusammensetzung:

Puffer A	Puffer B
50 mM Tris pH 7,4	50 mM Tris pH 7,4
500 mM NaCl	500 mM NaCl
10 mM Imidazol	500 mM Imidazol
10% Glycerol	10% Glycerol
0,7 mM β -ME	0,7 mM β -ME

2.2.3.2.4 Größenausschlußchromatographie/Gelchromatographie

Bei der Größenausschlußchromatographie oder Gelchromatographie werden gelöste Moleküle aufgrund von Größenunterschieden beim Durchgang durch eine Gelmatrix mit definierter Porengröße aufgetrennt. Als Trennmatrix, welche sich durch chemische und physikalische Stabilität sowie das Fehlen adsorptiver Eigenschaften auszeichnet, dienen polymere Gele deren Porengröße gut einstellbar sind. Sephadex z.B. besteht aus quervernetztem Dextran. Das hier verwendete Superdex ist ein sogenanntes zusammengesetztes oder composite Gel, welches durch kovalente Bindung von Dextransketten an eine hochgradig quervernetzte Agarosegelmatrix entsteht. Im Gegensatz zu anderen flüssigchromatographischen Methoden wie z.B. der Ionenaustauschchromatographie treten die Probenmoleküle bei der Gelfiltration nicht in direkte Wechselwirkung mit einer stationären Phase. Die Trennung beruht vielmehr auf der Fähigkeit der Probenmoleküle aufgrund ihrer geringen Größe in die Poren der Gelmatrix einzudringen und in der stationären Phase zu verweilen. Kleine Moleküle können in die Poren penetrieren, werden so zeitweise aus dem Eluentenstrom entfernt und bewegen sich innerhalb der Poren nur durch ihre Diffusionsgeschwindigkeit fort. Je kleiner ein Molekül ist, desto tiefer kann es in die Pore eindringen und desto länger ist seine Aufenthaltsdauer in der stationären Phase. Große Moleküle können nicht in die Poren eindringen, werden mit dem Eluentenstrom mitgerissen und treten so zuerst aus der Säule aus (Rücker, 1992).

Dem Einsatz der Gelchromatographie liegt im vorliegenden Fall die Absicht zugrunde, multimeres Protein, sowie Proteinaggregate und –komplexe abzutrennen, um reines, monomeres Protein für die

Kristallisation bzw. Proteincharakterisierung zu erhalten. Für präparative Aufgaben wurde eine HiLoad® 26/60 Säule mit Superdex® 200 prep grade Gelmatrix verwendet, für analytische Aufgaben die kleinere Superdex® 200 HR 10/30 Säule (beide Amersham Pharmacia Biotech). Beide sind für eine Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 10 000 bis 600 000 Da geeignet.

Vor der Gelchromatographie wird dem Eluat der Affinitätschromatographie zunächst EGTA bis zu einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt, um vorhandenes Ca²⁺ zu komplexieren. Anschließend wird das Eluat ÜN in Gelfiltrationspuffer (GF-Puffer + Ca²⁺) bei 4°C umdialysiert. Hierbei wird das Imidazol entfernt und das Glycerol, welches durch seine Viskosität den Druck in der GF-Säule zu stark ansteigen lassen würde, reduziert. Um die Löslichkeit des Proteins zu gewährleisten und einer möglichen Proteinaggregation entgegen zu wirken, wird gleichzeitig die NaCl-Konzentration auf 1 M erhöht. Ca²⁺ wird wieder eingeführt wobei der gleichzeitige Zusatz von äquimolaren Mengen an EGTA verhindert, dass die Ca²⁺ Konzentration soweit ansteigt, dass es zur Aktivierung der Kinase kommt. Alternativ hierzu kann die Dialyse auch ohne vorherige EGTA-Zugabe gegen GF-Puffer + EGTA erfolgen. Um eine scharfe Auftrennung zu erhalten, wird das Dialysat vor dem Laden auf die Gelfiltrationssäule noch auf ein Volumen von 0,1-4 ml konzentriert. Die Probe wird vor dem Säulenlauf filtriert (Porenweite 0,22 µm), um eine Verstopfung der Säule zu verhindern und dann mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die mit 1 SV GF-Puffer äquilibrierte Säule geladen. Es werden Fraktionen zu 4 ml gesammelt.

Pufferzusammensetzung:

Gelfiltrationspuffer + EGTA	Gelfiltrationspuffer +Ca²⁺
20 mM Tris pH 7,4	20 mM Tris pH 7,4
1 M NaCl	1 M NaCl
10 mM EGTA	2 mM EGTA
2% Glycerol	2 mM CaCl ₂
0,7 mM β-ME	2% Glycerol
	0,7 mM β-ME

2.2.3.2.5 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie nutzt Unterschiede in den Ladungszuständen von Biomolekülen, z.B. Proteinen, zu deren Auftrennung aus. Man unterscheidet zwischen Anionen- und Kationenaustauschern. Die stationäre Phase besteht aus einer unlöslichen Matrix (z.B. SOURCE: Polystyren/Divinylbenzen), die als funktionelle Gruppen meist Sulfonsäure- (Kationenaustauscher, z.B. Methylsulfonat bei RESOURCE™ S) oder Ammoniumgruppen (Anionenaustauscher, z.B.

quartäres Ammonium, RESOURCETM Q) trägt. Probenmoleküle mit einer negativen Nettoladung adsorbieren reversibel an Anionenaustauscher, solche mit einer positiven Nettoladung an Kationenaustauscher. Die Interaktion ist ein dynamisches Gleichgewicht, welches durch den pH-Wert und die Ionenstärke bzw. die Salzkonzentration der mobilen Phase beeinflusst wird. Hohe Konzentrationen eines Salzes verdrängen die geladenen Teilchen kompetitiv von ihren Bindungsstellen, während Änderungen des pH-Wertes zu einer Verschiebung des Nettoladungszustandes eines amphiphilen Teilchens und so zu veränderten Bindungseigenschaften führen. So erfolgt die Desorption der Proben entweder durch Reduzierung der Nettoladung des Moleküls mittels pH-Verschiebung oder durch Erhöhung der Salzkonzentration. Für die Elutionsreihenfolge gilt, dass die Teilchen mit der geringsten Nettoladung zuerst eluieren (Rücker, 1992).

Da die Bindungsstärke an die Säule abhängig ist von der Ladung des Probenmoleküls, sollte der pH-Wert der mobilen Phase speziell bei Proteinen, je nach Austauschertyp, mindestens eine pH-Einheit über oder unter dem isoelektrischen Punkt (IP) des Proteins liegen, um eine ausreichende Adsorption zu gewährleisten. Die Elution erfolgt meistens über einen variierbaren Konzentrationsgradienten eines neutralen Salzes (NaCl oder KCl). Durch Abflachung des Gradienten kann die Trennschärfe erhöht werden. Für die folgenden Untersuchungen kam ausschließlich eine RESOURCETM S, 1 ml Kationenaustauschersäule von Amersham Biosciences zum Einsatz, welche über einen ÄKTATM-Purifier (Amersham Pharmacia) betrieben wurde.

Um eine Bindung der Probe an die stationäre Phase zu ermöglichen, ist es notwendig, vor der Ionenaustauschchromatographie die Salzkonzentration auf ein Minimum zu reduzieren und den optimalen pH-Wert einzustellen. Die Proben werden deshalb, falls nicht anders beschrieben, ÜN in MES A-Puffer umdialysiert. Da die Auflösung unabhängig vom Probenvolumen ist, kann die gefilterte Probe ohne Aufkonzentrierung direkt auf die Säule geladen werden (Ladegeschwindigkeit: 0,5 ml/min). Die Elution erfolgt mit Hilfe eines variierbaren Gradienten unter Zumischen von MES B-Puffer, welcher 1 M NaCl enthält. Es werden Fraktionen zu 1 ml gesammelt.

Pufferzusammensetzung

Puffer MES A	Puffer MES B
50 mM MES pH 6,0	50 mM MES pH 6,0
20 mM NaCl	1 M NaCl
10% Glycerol	10% Glycerol
0,7 mM β -ME	0,7 mM β -ME

2.2.4 Zellkultur

2.2.4.1 Kultivierung von *P. falciparum* in vitro

Unter geeigneten Bedingungen ist es möglich die erythrocytären Parasitenstadien von *P. falciparum* in Petri-Schalen kontinuierlich in Kultur zu halten (Trager und Jensen, 1976). Sie werden in der Regel in Petri-Schalen für Gewebekultur mit 10 cm Durchmesser kultiviert. Je Schale werden 10 ml Parasitenmedium und 0,5 ml Erythrocyten der Blutgruppe A⁺ verwendet, so dass der Hämatokrit ungefähr 5% beträgt. Werden größere Mengen Parasiten benötigt, verwendet man Petri-Schalen mit 25 cm Durchmesser und setzt entsprechend mehr Medium ein (30 ml Medium, 1,5 ml Erythrocyten). Die Kultivierung erfolgt im Inkubator bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit, 3% CO₂ und 5% O₂.

Alle zwei bis drei Tage wird die Parasitämie mittels Blutaussstrich kontrolliert und das Medium gewechselt bzw. die Kulturen verdünnt. Beim Mediumwechsel wird das überstehende Medium über den sedimentierten infizierten Erythrocyten vorsichtig abgenommen und durch 10 ml neues Medium ersetzt. Dabei werden die Erythrocyten mit Hilfe der Pipette im neuen Medium resuspendiert. Die Parasitämie der Kulturen sollte unter normalen Bedingungen 5-10% nicht übersteigen, da die Parasiten toxische Abbauprodukte in das Medium abgeben, welche in hohen Konzentrationen das normale Wachstum der Parasiten stören oder gar zu deren Absterben führen können. Bei entsprechend häufigem Mediumwechsel (mind. 2 x täglich) und reduziertem Hkt (2%) können jedoch auch kurzzeitig Parasitämien von 20-25% oder höher erreicht werden (Schlichtherle, 2000).

Um *P. falciparum* kontinuierlich in Kultur zu halten, müssen die Kulturen regelmäßig verdünnt werden. Zur Verdünnung beimpft man eine neue Petri-Schale, welche frisches Medium und Erythrocyten enthält, mit der gewünschten Menge an infizierten Erythrocyten (iRBC: infected Red Blood Cells) der Ausgangsplatte. Ein Hämatokrit von 5% sollte dabei beibehalten werden.

Da die Parasiten, insbesondere Transfektanden, oft empfindlich auf Temperaturschwankungen reagieren, werden Nährmedien und sonstige Lösungen, welche zur Kultur gegeben werden, grundsätzlich vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C temperiert. Außerdem werden die Kulturschalen beim Arbeiten unter der Sterilbank auf einer auf 37°C temperierten Heizplatte gelagert.

Verwendete Plasmodium falciparum-Stämme:

3D7	Niederlande (Rosario, 1981)
HB3	Honduras, Chloroquin sensitiv

Medium zur Kultivierung von *P. falciparum* (Kulturmedium):

RPMI 1640 mit 25 mM HEPES, L-Glutamin, NaHCO₃

10% humanes Serum (A⁺)

10 mM Hypoxanthin

4 µg/ml Gentamicin

2.2.4.1.1 Aufbereitung von humanen Erythrocyten:

Das Erythrocytenkonzentrat stammt von Spendern der Blutgruppe A, Rh⁺. Es wird in ein 50 ml Plastikröhrchen unter sterilen Bedingungen aliquotiert, mit 10 ml RPMI 1640 überschichtet und bei 2300 rpm (Heraeuszentrifuge) für 4 min zentrifugiert. Bei 300 rpm wird die Bremse der Zentrifuge ausgeschaltet, um eine Verwirbelung des Blutes zu vermeiden. Die Erythrocyten können 2-3 Wochen verwendet werden. Humanes Blutplasma und Erythrocytenkonzentrat (leukocytenarm) wurden vom Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes Heidelberg bezogen.

2.2.4.1.2 Aufbereitung von humanem Serum

Humanes Serum (A⁺) wird aus Blutplasmaspenden der Blutbank gewonnen, indem die Gerinnungsfaktoren entzogen werden. Um Qualitätsunterschiede auszugleichen wird das Plasma verschiedener Spender unter sterilen Bedingungen zusammengeführt und anschließend in 50 ml Plastikröhrchen abgefüllt. Pro 50 ml Plasma werden 800 µl 1 M CaCl₂ (sterilfiltriert) zugegeben. Das Plasma wird 30 min bei 37°C und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wird das über Nacht geronnene Fibrin durch Abklopfen an der Tischkante von der Gefäßwand abgelöst und das Plasma bei 4000 rpm (3362 x g) 30 min abzentrifugiert. Bei 56°C wird das Serum 30 min hitzeinaktiviert und ohne den Überstand abzunehmen bei -20°C gelagert.

2.2.4.2 Mikroskopische Darstellung von *P. falciparum* mittels Giemsa-Färbung

Zur Bestimmung der Parasitämie einer Kultur und zur Unterscheidung der einzelnen Parasitenstadien wird ein Blutaussstrich gemacht, der anschließend einer Giemsa-Färbung unterzogen wird. Giemsa ist ein Farbstoffgemisch aus Eosin, Methylenblau, Methylenazur und Methylenviolett, das die Erythrocyten rötlich, die Parasiten blau und deren Zellkerne blau-schwarz färbt. Für den Ausstrich werden sedimentierte Erythrocyten mit einer Pipette vom Boden der Petri-Schale abgenommen, auf einen Objektträger übertragen und mit Hilfe eines zweiten Objektträgers ausgestrichen. Der Ausstrich wird zunächst an der Luft getrocknet, 1 min in 99% Methanol fixiert, wieder an der Luft getrocknet und in einer frisch angesetzten Giemsa-Färbelösung (1:10 in VE Wasser) für 5-20 min gefärbt. Die

gefärbten Ausstriche werden vorsichtig mit VE-Wasser abgespült, trocken getupft und bei 100-facher Vergrößerung mit einem Öl-Immersionsobjektiv unter dem Lichtmikroskop betrachtet.

2.2.4.3 Bestimmung der Parasitämie

Die Parasitämie gibt die prozentuale Anzahl von mit *P. falciparum* infizierten Erythrocyten an. Zur Bestimmung der Parasitämie wird auf einem Giemsa gefärbten Ausstrich ein Bereich des Objektträgers mit einlagiger Schicht Erythrocyten ausgewählt. Für die Routinebestimmung wird in einem Sichtfeld die Anzahl der Erythrocyten und der Parasiten ausgezählt. In neun angrenzenden Sichtfeldern wird nun nur noch die Anzahl der Parasiten bestimmt. Mehrfachinfektionen werden einfach gezählt. Die Parasitämie berechnet sich wie folgt:

$$(\text{Anzahl Parasiten} / (\text{Anzahl Erythrocyten} \times \text{Anzahl Felder})) \times 100 = \text{Parasitämie} \%$$

2.2.4.4 Synchronisation von *P. falciparum*-Kulturen mit Sorbitol

Die kontinuierliche Kultivierung von *P. falciparum* führt zu einem asynchronen Wachstum der Parasiten. Für einige Versuche ist es deshalb notwendig, die Parasiten zu synchronisieren. Sorbitol kann in das tubulovesikuläre System (TVS) reifer Parasiten eindringen, während dies bei jüngeren Stadien (Ringe) noch nicht möglich ist (Lambros und Vanderberg, 1979).

Eine asynchrone Kultur wird abzentrifugiert (758 x g, 2 min, RT) und das Medium abgenommen. Das Erythrocyten-Pellet wird in 9 Volumen (z.B. 4,5 ml auf 0,5 ml Erythrocyten) 5 % D-Sorbitol-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wird die Kultur bei 758 x g für 2 min abzentrifugiert, das Pellet in vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert und in eine frische Petri-Schale überführt. Dabei platzen alle späten Parasitenstadien aufgrund des osmotischen Schocks, der beim Mediumwechsel von Sorbitol zu RPMI 1640 stattfindet (Lambros und Vanderberg, 1979). Um den Parasitenverlust durch die Sorbitolisierung gering zu halten ist es daher von Vorteil, Kulturen mit einem hohen Anteil an Ringstadien zu verwenden. Um Parasiten vollständig zu synchronisieren kann die Synchronisation nach 4-6 h wiederholt werden, da dann zuvor reifere Ringstadien, die nun schon Trophozoiten sind, ebenfalls erfaßt werden.

2.2.4.5 Einfrieren von Parasiten

Das Einfrieren der Parasiten ist nur im Ringstadium möglich. Um nach dem Auftauen ein schnelles Anwachsen der Parasiten zu erreichen, sollte die Parasitämie der Ringstadien nicht unter 3% liegen. Infizierte Erythrocyten einer 10 cm Schale werden bei RT für 2 min bei 758 x g abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wird das Volumen des Sediments bestimmt und das gleiche Volumen an sterilfiltrierter Einfrier-Lösung (28% Glycerol, 3% Sorbitol, 0,65% NaCl) zugegeben und gemischt. Die Suspension wird in 1,5 ml Cryoröhrchen transferiert und in einem

Gefriergemisch aus 99% Ethanol und Trockeneis für 15 min eingefroren. Die Parasiten werden mindestens einen Tag bei -80°C gelagert, bevor sie in einem Flüssigstickstofftank bei -196°C deponiert werden.

2.2.4.6 Auftauen von Parasiten

Die Cryoröhrchen mit den gewünschten Parasiten aus dem Flüssigstickstofftank werden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Das Blut wird sofort in ein 15 ml Plastikröhrchen überführt. Pro 1 ml Blut werden 0,2 ml 12% NaCl unter ständigem Schütteln tropfenweise zugeben und die Parasiten für 5 min inkubiert. Nun wird das 9-fache Volumen an 1,6% NaCl langsam und unter ständigem Schütteln zugegeben. Die Parasiten werden bei RT und $758 \times g$ 2 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Ein dünner Flüssigkeitsfilm sollte auf dem Sediment verbleiben, in dem das Pellet durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert wird. Das 9-fache Volumen 0,9% NaCl / 0,2% Dextrose wird mit 1-2 Tropfen pro Sekunde unter ständigem Schütteln zugegeben. Die Zellen werden erneut 2 min lang bei RT und $758 \times g$ zentrifugiert und der Überstand anschließend abgenommen. Das Sediment wird mit 13 ml RPMI 1640 (37°C) gewaschen, in 13 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium resuspendiert und auf eine Petri-Schale zusammen mit 0,5 ml Erythrocyten gegeben. Man sollte die Parasiten zwei Tage im Inkubator lassen, ohne das Medium zu wechseln, am 3. Tag das Medium wechseln oder bei Bedarf die Kultur verdünnen. Alle benötigten Salzlösungen werden sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt. Vor Gebrauch werden sie auf 37°C vorgewärmt.

2.2.5 Zellbiologische Methoden

2.2.5.1 Transfektion von *Plasmodium falciparum*

Die Transfektion von *P. falciparum* hat während der letzten Jahre große Fortschritte erfahren. Die Anzahl immer effektiverer Vektoren sowohl für die stabile als auch die transiente Transfektion wächst ständig (Chahaun et al., 2002).

In der Regel erfolgt die Transfektion von *P. falciparum* durch Elektroporation einer Kultur von iRBC mit Plasmid-DNA bei der die DNA in den Parasiten eingeschleust wird (de Koning-Ward et al., 2000; Waters et al., 1997). Aber auch die spontane Aufnahme von Plasmid-DNA aus dem Erythrocyten durch *P. falciparum* wurde beschrieben (Deitsch et al., 2001). Abhängig vom Selektionsverfahren kann das transfizierte Konstrukt in die DNA des Parasiten integriert oder extrachromosomal als Episom repliziert werden.

2.2.5.1.1 Stabile Transfektion zur Expression von GFP-Fusionsproteinen

Die Transfektion erfolgt durch Elektroporation einer Erythrocytenkultur von Ringstadium-Parasiten des Stammes 3D7 mit Plasmid-DNA. Um eine möglichst homogene Parasitenpopulation zu erhalten, ist es vorteilhaft, die Parasiten 2 Tage vor der Transfektion zu synchronisieren. Zur Transfektion sollte die Parasitämie 1,5% an Ringstadien betragen. Gegebenenfalls werden die Kulturen deshalb vor der Transfektion entsprechend verdünnt. 10 ml resuspendierte Erythrocytenkultur werden bei 758 x g für 2 min abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Währenddessen gibt man zu 150 µg des Transfektionsplasmids, welche in 30 µl TE-Puffer gelöst sind, 370 µl Cytomix und mischt gut. 200 µl der konzentrierten iRBC werden zu dem Plasmid-Cytomix gegeben, vorsichtig gemischt und alles in eine Elektroporationsküvette (0,2 cm) pipettiert. Die Elektroporation wird bei 0,310 kV und 950 µF bei hoher Kapazität durchgeführt (Bio Rad, Gene Pulser® II). Die Zeitkonstante sollte zwischen 7 und 12 ms liegen. Die Probe wird sofort in vorbereitete Petri-Schalen mit 0,3 ml Erythrocyten und 10 ml Transfektionsmedium überführt und die Parasiten für 24 h inkubiert. Am ersten Tag nach der Transfektion wird das Medium gewechselt und zur Kontrolle der Parasitämie ein Giemsa-Ausstrich angefertigt. Liegt die Parasitämie über 5% wird die Kultur 1:1 verdünnt. Von Tag 2 bis Tag 10 nach der Transfektion wird täglich das Transfektionsmedium gewechselt und zur Selektion die Droge WR99210 bzw. Pyrimethamin in einer Endkonzentration von 5 nM bzw. 0,2 µM zugegeben. Das Absterben der Parasiten wird anhand von Giemsa-Ausstrichen verfolgt. Bei Bedarf können frische Erythrocyten zugegeben werden. Ab dem elften Tag nach der Transfektion können die Kulturen geteilt werden. Das Medium wird nun nur noch alle 3-4 Tage gewechselt. Transfektanden sollten spätestens bis zum vierzigsten Tag nach der Transfektion im Giemsa-Ausstrich zu beobachten sein.

Medien und Lösungen zur Transfektion:

Transfektionsmedium:	Cytomix:
500 ml RPMI 1640, 25 mM HEPES, L-Glutamin (Invitrogen)	120 mM KCl
10 ml Hypoxanthin (10 mM)	0,15 mM CaCl ₂
200 µl Gentamycin (50 mg/ml)	10 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,6
25 ml humanes Serum (A ⁺)	25 mM HEPES pH 7,6
25 ml Albumax (5% in RPMI 1640, sterilfiltriert)	2 mM EGTA
	5 mM MgCl ₂
	sterilfiltrieren, bei 4°C lagern
WR99210-Stock	WR99210-Gebrauchslösung
10 mM WR99210 in 20-100% DMSO	20 µM in RPMI 1640
bei -20°C lagern	sterilfiltrieren, maximal 2 Wochen bei 4°C lagern.

2.2.5.1.2 Transiente Transfektion von *P. falciparum* zur Expression von Luciferase-Fusionsproteinen

Kultur und Transfektion erfolgte im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Petra Burghaus im FB Biologie/Zoologie, Abt. Parasitologie an der Philipps-Universität Marburg. Bei der Wiedergabe der Methoden wird deshalb Bezug genommen auf die Angaben von Petra Burghaus. Die transiente Transfektion in den *P. falciparum* Stamm FCBR erfolgte nach (Burghaus und Lingelbach, 2001; Deitsch et al., 2001) in zwei Schritten. Zunächst werden nicht infizierte Erythrocyten durch Elektroporation mit Plasmid-DNA beladen. Die eigentliche Transfektion der Parasiten erfolgt anschließend ohne äußeres Zutun durch spontane Aufnahme der Plasmid-DNA durch den Parasiten.

Erythrocytenkonzentrat (Blutgruppe A⁺) wird mit Hilfe einer Sephacell R-500 Säule (Baxter Health Care) von Leukocyten befreit und 3 mal mit RPMI 1640 (Invitrogen) gewaschen. 300 µl Erythrocyten werden in 5 ml Cytomix gewaschen und mit 75 µg gelöster Plasmid-DNA auf 400 µl aufgefüllt. In einer eisgekühlten 0,2 cm Küvette werden die Zellen dann mit Hilfe eines Bio-Rad Gene Pulsers bei 0,31 kV und 960 µF elektroporiert. Die so mit DNA beladenen Erythrocyten werden mit Kulturmedium gewaschen und sofort weiterverwendet oder maximal 48 h bei 4°C aufbewahrt. Die Transfektion in *Plasmodium falciparum* erfolgt durch die Zugabe von 0,5 ml Standard-Parasitenkultur (Stamm FCBR) zu 4,5 ml Kulturmedium mit einem Hkt von 5% an DNA-beladenen Erythrocyten (Deitsch et al., 2001).

2.2.5.2 Anreicherung von Trophozoiten und Schizonten durch Magnetelution

Malariaparasiten verstoffwechseln das Hämoglobin der Erythrocyten, wobei unlösliche, oxidierte Häm-Produkte entstehen, die als Hämozoïn polymerisieren. Aufgrund der paramagnetischen Eigenschaften des Hämozoïn, lassen sich Trophozoiten und Schizonten mittels magnetischer Separation von nicht-infizierten Erythrocyten und Parasiten im Ringstadium trennen (Uhlemann et al., 2000). Mit dieser Methode erhält man bei großen Säulen Parasitämien später Stadien von 85 – 95%, bei kleinen Säulen, wie der hier verwendeten, bis 70%. Dies hat den Vorteil, dass z.B. bei mikroskopischen Untersuchungen mehr Parasiten als in normalen Kulturen mit einer Parasitämie von maximal 10% im Sichtfeld zu sehen sind. Für mikroskopische Untersuchungen ist die Anreicherung mit kleinen Säulen ausreichend.

Die magnetischen Trennsäulen (MACS LS Separation Columns von Miltenyi Biotec) werden nach Angaben des Herstellers in den Magneten (Vario MACS, Miltenyi Biotec) eingespannt, wodurch in der Säulenmatrix ein starkes Magnetfeld erzeugt wird. Die Säule wird zunächst mit 10 ml frisch angesetztem Säulenpuffer (1 x PBS, 2 mM EDTA, 0,5% BSA) gespült und 10 min äquilibriert. BSA deckt dabei unspezifische Bindungsstellen in der Säule ab. Anschließend werden 10 ml Parasitenkultur mit einem Anteil später Blutstadien von mindesten 5% direkt auf die Säule

aufgetragen. Da der Aufenthalt im Magnetfeld der Säule Stress für die Parasiten bedeutet, sollte zügig geladen werden. Die Säule wird so lange mit Säulenpuffer gewaschen, bis der Durchfluss klar ist und keine Erythrocyten mehr sichtbar sind. Durch Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld, lösen sich die infizierten Erythrocyten von der Säulenmatrix und können mit 10 ml Säulenpuffer eluiert werden. Das Eluat wird 2 min bei $758 \times g$ zentrifugiert und der überstehende Puffer abgenommen.

Für die Betrachtung unter dem konfokalen Mikroskop wird das Pellet in 20-30 μl Ringer-Lösung resuspendiert, 5-10 μl einer 5 μM Hoechst 33342 Lösung (in PBS) zugegeben und für mind. 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

2.2.5.3 Prinzip der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie

Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie, bei der das gesamte Objektfeld gleichmäßig beleuchtet wird, wird bei der konfokalen Mikroskopie nur ein kleiner Teil der Probe mit dem Licht eines fokussierten Laserstrahls, der sich über die Probe bewegt, angeregt. Signale der einzelnen Punkte werden von einer Videokamera registriert und als Bild zusammengesetzt. Das Streulicht aus benachbarten und nicht in der Fokusebene liegenden Bereichen wird so unterdrückt.

Durch eine Linse wird das Laserlicht in die Beleuchtungsblende gelenkt. Danach wird es über einen dichromatischen Spiegel (Hauptfarbteiler) und über mehrere bewegliche Spiegel (Scanoptik) durch das Objektiv auf die Probe fokussiert. Dort trifft es auf Fluorochrome, die angeregt werden und Licht emittieren. Das abgestrahlte Fluoreszenzlicht größerer Wellenlänge wird durch die Objektivlinse wieder gebündelt, passiert den dichromatischen Spiegel und kann durch nachgeschaltete Filter in verschiedene Wellenlängen unterteilt werden. Durch eine kleine regulierbare Lochblende (Pinhole) fällt das emittierte Licht auf einen Lichtdetektor (Photomultiplier), der das Lichtsignal in ein analoges elektrisches Signal umwandelt. Durch die Lochblende wird Licht, das außerhalb der Fokusebene emittiert wird, abgeschirmt. Betrachtet wird so immer nur ein Punkt und durch das Abrastern (Scannen) der Probe wird das Bild zusammengesetzt.

Zur Untersuchung von Parasiten werden ein Argon-Laser (488 nm, Leistung auf 40%) und ein UV-Laser (364 nm, Leistung auf 70%) verwendet. Durch den Argon Laser wird GFP angeregt und leuchtet grün. Der UV-Laser macht die DNA sichtbar, die zuvor mit Hoechst 33342 angefärbt wurde. Hoechst 33342 ist ein Farbstoff, der durch Membranen diffundiert, sich in die kleine Furche der DNA einlagert und durch UV Bestrahlung blau fluoresziert.

Die verwendeten Filtersätze entsprechen:

Hauptfarbenteiler UV/488 nm

Nebenfarbenteiler 490 nm

Langpassfilter (Grün-Kanal) 505 nm

Langpassfilter (Blau-Kanal) 385 nm

Bandpassfilter (Durchlicht-Kanal) 530 nm-600 nm

Die Parasiten werden mit einem konfokales Laserscanning Mikroskop LSM 510 (Zeiss, Jena) und dem Objektiv C-Apochromat 63 x /1.2 (water corrected) untersucht. Die Auflösung der digitalen Bilder beträgt 512 x 512 Pixel.

2.2.5.4 Herstellung von Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern

Erythrocyten haften auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern, was die mikroskopische Untersuchung vereinfacht, da die Erythrocyten sich nicht mehr bewegen und aus dem Sichtfeld diffundieren können. Zur Herstellung werden die Objektträger zunächst mit Ethanol gesäubert und anschließend mit Aqua bidest. gewaschen. Die sauberen Objektträger werden für mindestens 20 Minuten in einer 0,01% Poly-L-Lysin Lösung inkubiert und anschließend wieder mit Aqua bidest. gewaschen. Über Nacht werden die Objektträger bei RT in einer Petri-Schale getrocknet.

2.2.5.5 Fraktionierte Saponinlyse von infizierten Erythrocyten

Die Experimente wurden als Kooperation von Petra Burghaus in Marburg durchgeführt. Es wird deshalb Bezug genommen auf die Angaben von Petra Burghaus sowie (Burghaus und Lingelbach, 2001). Für die fraktionierte Saponinlyse von infizierten Erythrocyten (iRBC) werden in der Regel Parasitenkulturen mit einem Trophozoitenanteil von 10-15% verwendet. Mit einem Gelafundin-Gradienten werden die Trophozoitenstadien auf > 60% angereichert. Diese iRBC werde in eiskaltem PBS gewaschen und auf einen Hämatokrit von 50% verdünnt. Der prozentuale Anteil der iRBC wird durch Zählung unter dem Lichtmikroskop bestimmt. $2-3 \times 10^8$ Parasitenäquivalente (PÄ), das entspricht in etwa 90-120 μ l mit 45-60 μ l iRBC, werden in 2 ml Eppendorf safe lock Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Saponinlyse (Saponin (grade pure, Serva) von einer frisch angesetzten 1,5%-igen Stammlösung) erfolgt auf Eis. Hierzu wird das Saponin zu einer Endkonzentration von 0,15 bis 0,8% zugegeben, die Parasiten werden vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Bei niedrigen Saponinkonzentrationen (0,1%) wird nur die Erythrocytenmembran und die PVM lysiert, während bei steigenden Saponinkonzentrationen auch die Plasmamembran des Parasiten lysiert wird. Dem Lysat wird ein Volumenteil PBS zugefügt. Das gesamte Gemisch wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Das hat den Vorteil, dass die Pellets kompakter werden und beim Waschen nicht mitgerissen werden. Es folgt eine Zentrifugation bei $4000 \times g$ für 2 min bei 4°C . Der Überstand wird abgenommen, mit 25 x Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche; Best. Nr.: 1836153) versetzt und nochmals bei $12000 \times g$ für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur Analyse eingefroren. Das Pellet wird 2-3 mal mit kaltem PBS gewaschen und bei -20°C eingefroren. Zur Weiterverarbeitung für die Bestimmung der Luciferaseaktivität wird es zunächst in Lysepuffer (Luciferase Kit, Promega) mit Proteaseinhibitor-Cocktail aufgetaut, gevortext und bei RT für 15 min inkubiert. Anschließend wird 15 min bei $12000 \times g$ zentrifugiert und der

Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Bis zur Bestimmung der Luciferaseaktivität bleiben die Proben auf Eis.

Soll statt dessen eine Analyse mittels Western-Blot erfolgen, werden die Pellets direkt in SDS-PAGE-Puffer aufgetaut und entsprechend dem Elektrophoreseprotokoll weiterverarbeitet.

2.2.5.6 [³H]Hypoxanthin Inkorporations Assay (IC₅₀-Bestimmung)

Ein Maß für das Wachstum einer Parasitenzelle ist seine Replikations- sowie Transkriptionstätigkeit. In beiden Fällen werden Nucleotide benötigt, welche im Falle der Purinbasen dem sog. salvage pathway entstammen. Die Basen Adenin, Guanin und Hypoxanthin werden hier wiederverwertet und in die entsprechenden Mononucleotide umgewandelt, welche zur Synthese von DNA und RNA dienen. Folglich können anhand des Einbaus von [³H]Hypoxanthin in die parasitären Nucleinsäuren Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität des Parasiten gezogen werden. Mit Hilfe des [³H]Hypoxanthin Inkorporations Assays kann so die hemmende Wirkung von Substanzen auf das Wachstum von *P. falciparum* quantifiziert werden. Dazu werden nicht synchronisierte Parasitenkulturen in Hypoxanthin freiem RPMI-1640 Medium (Hypo⁻-Medium) in Gegenwart von seriellen Verdünnungen der Testsubstanzen inkubiert. Nach 72 h erfolgt die Zugabe von ³H-markiertem Hypoxanthin. Anhand der Inkorporationsrate des markierten Hypoxanthins in die parasitären Nucleinsäuren kann dann die Konzentration eines Inhibitors bei der die halbmaximale Hemmung des Parasitenwachstums erfolgt (IC₅₀), bestimmt werden. Wenn es die Löslichkeit der Substanzen erlaubt, werden sie als 10 mM DMSO-Stocklösungen angesetzt und bei -20°C gelagert. Vor Beginn eines Assays werden die Substanzen 1:25 in Hypo⁻-Medium verdünnt, so dass ihre Konzentration 400 µM beträgt. Durch einen Ausstrich wird die Parasitämie einer HB3 Parasitenkultur bestimmt und soweit verdünnt, dass sie 0,5% bei einem Hämatokrit von 2% beträgt. Dabei wird das normale Kulturmedium möglichst vollständig gegen Hypo⁻-Medium ausgetauscht. Dann wird eine Mikrotiterplatte (96 Kammern) bestückt (siehe Pipettierschema Abb.2.1). Pro Kammer werden zunächst 100 µl Hypo⁻-Medium vorgelegt, dann 100 µl der Stocklösungen (400 µM) der Testsubstanzen in die Reihe B der Platte pipettiert, so dass die Konzentration der Substanzen dort 200 µM beträgt. Von Reihe B ausgehend wird nun eine serielle Verdünnung im Verhältnis 1:1 durchgeführt. Mit Hilfe einer Multipipette werden 100 µl aus Reihe B in Reihe C transferiert und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gemischt. Ebenso wird mit Reihe C-H verfahren, so dass der Verdünnungsfaktor zur nachfolgenden Reihe jeweils 2 beträgt. Bei der letzten Verdünnung (Reihe H) werden nach dem Mischen 100 µl verworfen. Im Anschluß werden in die Kammern 100 µl der vorbereiteten Parasitenkultur pipettiert. Durch diese weitere Verdünnung im Verhältnis 1:1 beträgt die höchste Endkonzentration der Substanzen im Test 100 µM (in Reihe B). Reihe A fungiert als Kontrollreihe. Die ersten 6 Kammern dienen als Positivkontrolle für den Einbau des markierten Hypoxanthins. Ihnen wird lediglich 100 µl Parasitenkultur (0,5% Parasitämie, 2% Hkt) zugesetzt. In

den letzten sechs Spalten (A7-A12) werden jeweils 100 µl nicht infizierte Erythrocyten (2% Hkt) zum Hypo⁻-Medium gegeben. Später werden A7-A9 mit [³H]Hypoxanthin behandelt (Erythrocyten-Kontrolle), A10-A12 hingegen nicht (Kaltkontrolle). Die Kaltkontrolle ist wichtig, um später bei der Auswertung das Grundrauschen berechnen zu können.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Einbaukontrolle						Erythrozyten Kontrolle			Kaltkontrolle		
B	100 µM	}										
C	50 µM											
D	25 µM											
E	12,5 µM		Konzentrationen der Testsubstanzen			----->						
F	6,25 µM											
G	3,125 µM											
H	1,563 µM											

Abb. 2.1: Pipettierschema der Mikrotiterplatte

Die Parasiten werden zunächst für 72 h in Gegenwart der Inhibitoren inkubiert. Dann werden vorsichtig, ohne die abgesetzten Erythrocyten aufzuwirbeln, 100 µl des Mediums aus den Kammern abgezogen und verworfen. Anschließend werden 100 µl des [³H]Hypoxanthins in Hypo⁻-Medium dazugegeben. Die Kaltkontrollen sind hiervon ausgenommen. Zuvor wird das [³H]Hypoxanthin soweit mit Hypo⁻-Medium verdünnt, dass die Aktivität der 100 µl 1,5 µCi entspricht. Dabei muss beachtet werden, dass [³H]Hypoxanthin durch Dekomposition monatlich 1% seiner Aktivität verliert und somit die Aktivität der Ausgangslösung schwindet. Die Platten werden für weitere 24 Stunden inkubiert, anschließend werden die Erythrocyten geerntet, d.h. sie werden mit Hilfe eines Packard Filtermate Cell Harvesters auf einen Glasfaser-Filter (UniFilter GF/CTM(Packard)) transferiert. Dieser Filter wird zunächst in die Apparatur eingelegt und dreimal mit Aqua bidest. gewaschen. Anschließend werden die Erythrocyten durch Absaugen und fünfmaliges Waschen auf den Filter transferiert. Nach weiteren vier- bis fünf Waschgängen wird der Filter über Nacht bei RT getrocknet. Auf den trockenen Filter werden 25 µl Szintillationslösung je Kammer pipettiert. Der Filter wird auf der Ober- und Unterseite mit einer Folie abgeklebt und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgt graphisch. Der Logarithmus der Inhibitorkonzentration wird gegen die Aktivität in % aufgetragen. Man erhält ein sigmoidales Schaubild, aus dem der Wert der Konzentration für einen Rückgang der Aktivität auf 50% (IC₅₀) abgelesen wird.

2.2.5.7 Metabolische Markierung von PfCDPK1 mit [³H]Myristat und [³H]Palmitat in vivo

2.2.5.7.1 Metabolische Markierung

Für die metabolische Markierung von PfCDPK1 werden synchrone Parasitenkulturen des Stammes HB3 im Trophozitenstadium mit einer Parasitämie von 9-10% eingesetzt. [³H]Myristat (1 Ci/ml) bzw. [³H]Palmitat (5 Ci/ml) werden in einer Konzentration von 200 µCi/ml (bzw. 750 mCi/ml [³H]Palmitat in einem zweiten Experiment) eingesetzt. Die benötigte Menge an radioaktiven Fettsäuren wird zunächst in eine Petri-Schalen überführt und mit geöffnetem Deckel solange unter dem Abzug aufbewahrt, bis das zelltoxische Lösungsmittel Ethanol verdampft ist. Von 10 ml Parasitenkultur (Hkt: 5%) wird das Medium abgenommen, die iRBC in 5 ml auf 37° C vorgewärmtem Kulturmedium (siehe Abschn. 2.2.4.1) resuspendiert und auf die vorbereiteten Petri-Schalen überführt. Die metabolische Markierung erfolgt während einer 4 stündigen Inkubationsphase bei 37°C im Brutschrank.

2.2.5.7.2 Parasitenpräparation nach metabolischer Markierung

Im Anschluß an die metabolische Markierung wird die Kultur nach Zugabe von 5 ml PBS in ein 50 ml Plastikröhrchen überführt, 5 min bei 2000 rpm (Heraeuszentrifuge) und 4°C zentrifugiert und das Blutpellet 2 mal in 50 ml PBS gewaschen. Nach Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wird das Pellet in 15 ml Lysepuffer (1 x SSC, 0,02% Saponin) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Hierdurch werden die Erythrocyten lysiert und die Parasiten freigesetzt (Suetterlin BW, 1991). Die Parasiten werden bei 3000 rpm (Heraeuszentrifuge) und 4°C für 15 min abzentrifugiert und das Pellet 2 mal in 50 ml SSC gewaschen. Die Lyse der Parasiten erfolgt dann durch das Aufnehmen des Pellets in 1 ml RIPA-Puffer (Pufferzusammensetzungen siehe 2.2.6.1.2) und Inkubation auf Eis für 15 min. Das Lysat wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 2 mal für 15 min bei 13000 rpm (Tischzentrifuge Eppendorf) und 4°C zentrifugiert. Nach jedem Zentrifugationsschritt wird der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Er kann dann z.B. für die Immunpräzipitation verwendet werden.

Es handelt sich hierbei um ein abgewandeltes Protokoll der Parasitenisolation, da die einzelnen Waschschritte mit PBS oder SSC mit wesentlich größerem Volumen als unter Standardbedingungen durchgeführt werden, um die nicht in die Parasiten inkorporierte Radioaktivität möglichst vollständig zu entfernen.

2.2.6 Immunologische Methoden

2.2.6.1 Immunpräzipitation von PfCDPK1 im Anschluss an die metabolische Markierung mit [³H]Myristat und [³H]Palmitat

2.2.6.1.1 Kovalente Kopplung der Antikörper 2129a und 2979a an Protein A Beads (Affi-Prep[®] protein A matrix Bio-Rad) für die Immunpräzipitation

Die Konzentrationsbestimmung der Antikörperlösungen ergab 0,9 µg/µl für den Antikörper (AK) 2129a und 0,25 µg/µl für AK 2979a. 111 µl (100 µg) des AK 2129a werden an 50 µl Protein A Beads und 150 µl (37,5 µg) des AK 2979a an 37,5 µl Protein A Beads gekoppelt. Die Rohbeads werden zunächst 2 mal mit 1 ml PBS gewaschen, kurz abzentrifugiert und mit dem AK vereinigt. Bei RT wird 1 h im rotierenden Rad inkubiert, anschließend nacheinander 3 mal mit je 1 ml PBS, 2 mal mit je 1 ml Coupling-Puffer und 1 mal mit 1 ml DimPim-Puffer gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift wird kurz bei 6000 - 7000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Schließlich werden die Beads in 1 ml DimPim-Puffer aufgenommen und ÜN bei 4°C im rotierenden Rad inkubiert. Am Morgen wird 3 mal mit 1 ml Coupling-Puffer, dann 3 mal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen und das Pellet schließlich in 500 µl (2129a) bzw. 375 µl (2979a) Waschpuffer aufgenommen, was einer 10%-igen Lösung entspricht. Für die Immunpräzipitation werden 0,5 µg/µl, entsprechend 10 µl, Rohbeads eingesetzt.

2.2.6.1.2 Immunpräzipitation von PfCDPK1

Je 250 µl Parasitenlysate (Gewinnung siehe 2.2.5.7.2) werden mit 10 µl der affinitätsgereinigten und an Protein A Beads (Affi-Prep[®] protein A matrix Bio-Rad) gekoppelten Antikörper 2979a bzw. 2129a versetzt und mit 240 µl RIPA-Puffer auf 500 µl aufgefüllt. Die Proben werden für 2 h bei 4°C auf einem rotierenden Rad inkubiert. Anschließend werden die Beads 5 mal mit 500 µl RIPA-Puffer gewaschen und dazwischen je 3-5 sec bei 6000 - 7000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) abzentrifugiert. Der Überstand wird auf 100 µl abgezogen, kurz zentrifugiert und dann auf 20-30 µl abgezogen, ohne Beads mitzunehmen. Die Beads werden in 5 µl 5 x Ladepuffer (LB) aufgenommen und 5 min (1,5 min bei Palmitat-Proben) bei 95°C gekocht. Der LB für die [³H]Palmitat Proben darf dabei kein DTT oder β-ME enthalten, da sonst die labile Thioesterbindung zwischen Palmitat und Cystein gespalten werden kann. Die Proben werden mittels SDS-PAGE auf einem 8% Gel aufgetrennt. Zur Kontrolle werden zusätzlich 3 µl markiertes Parasitenlysate aufgetragen. Nach dem Gellauf wird eine Hälfte des [³H]Palmitatgels 2 mal 30 min in 1 M Hydroxylamin/HCl pH 7,5 und die andere, identische Hälfte des Gels 2 mal 30 min in 1 M Tris/HCl pH 7,5 gewaschen. Die Hydroxylaminbehandlung spaltet die Thioesterbindung des Palmitats, welches aus dem Gel diffundiert. Im Tris-behandelten Protein bleibt diese erhalten, so dass zwischen einer Palmitoylierung über eine Thioesterbindung oder eine Amidbindung differenziert werden kann. Die Gele werden 3

mal 5 min in bidestilliertem Wasser gewaschen und, wie auch das mit Myristat markierte Gel zuvor, mit Coomassie gefärbt. Die Auswertung erfolgt mittels Fluorographie.

Pufferzusammensetzungen:

Coupling-Puffer:	Waschpuffer:
0,1 M Borsäure	0,1 M Borsäure
0,1 M Borax	0,1 M Borax
Borax vorlegen und mit Borsäure auf pH 9,0 titrieren.	Borsäure vorlegen und mit Borax auf pH 8,0 titrieren.
DimPim-Puffer:	
50 mg Dimethyl-pimelimidat-dihydrochlorid gelöst in 5 ml Coupling-Puffer	
RIPA-Lysepuffer:	
50 mM Tris pH 7,8 (4°C)	1% Triton X-100
150 mM NaCl	frisch dazugeben:
5 mM EDTA	1 mM DTT
50 mM NaF	1 mM PMSF
0,5% Desoxycholat	1 µg/ml Leupeptin
0,1 % SDS	1 µg/ml Pepstatin

3 Ergebnisse

3.1 Identifikation spezifischer gegen PfCDPK1 gerichteter Inhibitoren

Hauptziel dieses Teilprojektes war es in erster Linie, spezifische Inhibitoren von PfCDPK1 zu identifizieren, die möglicherweise als Leitstrukturen für die Entwicklung eines neuartigen Wirkstoffes zur Bekämpfung der Malaria tropica fungieren könnten. Darüber hinaus stellen spezifische Inhibitoren ein wertvolle Werkzeuge für die funktionelle Analyse eines Enzyms dar. So könnten sie z.B. bei der Untersuchung, ob es sich bei PfCDPK1 um ein essentielles Gen handelt oder für die Klärung gewisser zellbiologischer Fragestellungen, etwa nach der Funktion von PfCDPK1 bei der Invasion, eingesetzt werden. Auch kann sich ein spezifischer Inhibitor als Struktur stabilisierendes Agens bei der Kristallisation von Proteinen als sehr wertvoll erweisen.

Wie bereits erwähnt, stellt die in ihrer Struktur begründete extreme Flexibilität von Proteinkinasen ein großes Problem für die Kristallisation dar. Sie ist einer der Hauptgründe, weshalb die Kristallisation vieler Proteinkinasen bisher nur durch die Zugabe von spezifischen Inhibitoren oder inhibitorischen Peptiden gelang, welche eine spezifische Konfiguration des jeweiligen Enzyms stabilisieren.

In der Folge wurden mehrere Substanzbibliotheken auf mögliche spezifische Inhibitoren von PfCDPK1 getestet. Ein durch die WHO finanziertes High Throughput Screening (HTS), welches die Testung von über 19000 Substanzen umfasste, wurde von einer Vertragsfirma (Discovery Technologies Ltd. (DTL), Allschwil, Schweiz) durchgeführt. Alle weiteren beschriebenen Suchreihen wie z.B. das Screening der HTS-Analoga wurden von mir hier in Heidelberg ausgeführt. Die IC_{50} -Bestimmung der HTS-Analoga auf das Parasitenwachstum wurde von der Firma Tibotec vorgenommen.

3.1.1 Gewinnung von rekombinanter PfCDPK1 für Enzymassays

Zur Expression wurde ein Konstrukt verwendet, das die cDNA von PfCDPK1 im Stueber Vektor Nr. 9 (pDS56/RBS II, 6 x His) enthielt. Die Bakterienpellets aus zwei 500 ml Expressionsansätzen wurden gemäß Protokoll aufgereinigt und zum Einfrieren bei -80°C mit 20% Glycerol versetzt. Eine Gehaltsbestimmung nach Bradford ergab eine Konzentration von 620 ng/ μl bzw. 560 ng/ μl bei einer Ausbeute von 6,2 bzw. 11,2 mg Protein/500 ml Kultur. Die spezifische Aktivität der Proteinproben wurde anhand von Kinaseassays ermittelt, in denen Casein als exogenes Substrat verwendet wurde (Tab. 3.1). Die Proteinlösungen wurde in Aliquots zu 500 μl bei -80°C eingefroren. Sie dienen in der Folge zur Durchführung der Kinaseassays. Mehrere Aliquots der Aufreinigung Nr. 2 wurden zur Durchführung des HTS an DTL geschickt.

Aufreinigung	spezifische Aktivität (Substrat: Casein) [nmol/min/mg]	Konzentration [µg/ml]	Ausbeute [mg]
Nr. 1	352	620	6,2
Nr. 2	279	560	11,2

Tab. 3.1: Eigenschaften der für das Screening eingesetzten rekombinanten PfCDPK1

3.1.2 Screening einer Herbizid-Datenbank

Eine unserer Strategien zur Identifizierung eines spezifischen Inhibitors von PfCDPK1 basierte auf der Tatsache, dass CDPKs in Pflanzen und einigen Protozoen, nicht jedoch in mehrzelligen tierischen Organismen vorkommen. Es wäre also denkbar, dass pflanzliche CDPKs auch der Angriffspunkt bestimmter Herbizide sind, deren Wirkung auf einer Blockade der Kinasen beruht. Herbizide, die die Aktivität pflanzlicher CDPKs inhibieren, könnten aufgrund ihrer Strukturverwandtschaft auch eine Wirksamkeit gegenüber PfCDPK1 aufweisen. Aus diesem Grunde wurde eine Herbizid-Bank, welche über 350 Substanzen umfasst, auf ihre Wirksamkeit gegenüber PfCDPK1 getestet. Diese Herbizid-Bank wurde uns großzügigerweise von Prof. Beck und Dr. Jooma (Institut für Biochemie, Medizinische Fakultät der Universität Gießen) zur Verfügung gestellt.

Die Substanzen wurden zunächst bei einer Konzentration von 10 µM auf einen möglichen inhibitorischen Effekt gegenüber PfCDPK1 getestet. Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen wurde ein sogenannter "cut off" erstellt, d.h. Substanzen, die bei einer Konzentration von 10 µM eine Inhibition der Kinaseaktivität mindestens 50% bewirkten, wurden weiterverfolgt. Sie wurden erneut, nun aber in dreifacher Ausführung getestet, um die Daten zu verifizieren. Die Auswertung der Daten erbrachte sieben Substanzen, welche die geforderten Kriterien erfüllten. In zwei Fällen konnte das Ergebnis der ersten Testung bei der Wiederholung der Kinaseassays nicht reproduziert werden. Von der Substanz, welche mit fast 86% die höchste Inhibition erzielte (Substanz Nr. 250 (interner Code), wurde zusätzlich die IC₅₀, also die inhibitorische Konzentration, die zu einer 50% Reduktion der Enzymaktivität führt, ermittelt. Die Ergebnisse der fünf besten Substanzen sind in Tabelle 3.1 zusammengefaßt. Aus Gründen des Patentschutzes werden Namen und Strukturformeln der Substanzen hier nicht gezeigt. Die Substanzen 134, 135 und 315 sind chemisch eng verwandt. Zu den Substanzen 250 und 330 besteht keine Strukturverwandtschaft.

Herbizid (interner Code)	%Inhibition	IC ₅₀ gegen PfCDPK1
134	71	-
135	57,8	-
250	85,8	1,9 μ M
315	50,9	-
330	56,4	-

Tab. 3.2: Ergebnis des Substanzscreenings der Herbizid-Datenbank

Die fünf Substanzen mit der höchsten Inhibition der Kinaseaktivität sind dargestellt

3.1.3 High Throughput Screen (HTS) gegen PfCDPK1

Die Möglichkeiten eines "normalen" Labors sind begrenzt und erlauben im Normalfall keinen automatisierten Durchsatz einer hohen Substanzanzahl. Unter den in Heidelberg gegebenen Bedingungen können so z.B. pro Tag maximal 66 Substanzen in Singulets und 36 in Dupletts gegen PfCDPK1 getestet werden. In der pharmazeutischen Industrie bzw. in den auf HTS spezialisierten Firmen werden, um das Screening unter einem vertretbarem Zeit- und Geldaufwand durchführen zu können, Roboter eingesetzt. Durch diese Automatisierung ist die Testung mehrerer tausend Substanzen pro Tag möglich.

Ein solcher sogenannter High Throughput Screen (HTS) wurde von Discovery Technologies Ltd. (Allschwil, Schweiz) mit einer Substanzbibliothek bestehend aus 19442 Substanzen mit PfCDPK1 durchgeführt. 19163 dieser Substanzen wurden aufgrund ihrer hohen Diversität ausgesucht. 279 der Substanzen enthielten Pharmakophore, bei denen bereits eine inhibitorische Aktivität gegenüber anderen Proteinkinasen beschrieben wurden. Das HTS selbst wurde von der WHO finanziert. Um die Bedingungen des Kinaseassays an die Erfordernisse der HTS-Apparatur anzupassen, wurden die Bedingungen leicht abgewandelt. Für das HTS wurden die Substanzen in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt. Substanzen, die unter diesen Bedingungen eine inhibitorische Aktivität von $> 45\%$ aufwiesen, in unserem Fall traf dies für 252 zu, wurden erneut getestet. Von den so validierten Substanzen wurde dann die IC₅₀ ermittelt.

Als Hit (Treffer), also ein erfolgreich identifizierter Inhibitor, wurden diejenigen Substanzen eingestuft, welche eine IC₅₀ von $\leq 10 \mu$ M aufwiesen. Dies traf auf insgesamt sieben Substanzen zu, wobei allein drei Hits der Gruppe der 279 Substanzen mit bekanntem Proteinkinase-Pharmakophor entstammten.

Zur Verifizierung der Daten wurde die IC₅₀ dieser Substanzen nochmals hier in Heidelberg in unserem Labor bestimmt. Um die Wirkung der Hitsubstanzen auf den lebenden Parasiten zu bestimmen, wurden die Substanzen zusätzlich in einem [³H]Hypoxanthin-Inkorporations-Assay auf ihre das Wachstum von *P. falciparum* hemmende Wirkung untersucht. Hierzu wurde die IC₅₀ der Substanzen ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 zusammengestellt.

Substanz (interner Code)	IC ₅₀ gegen PfCDPK1 HTS	IC ₅₀ gegen PfCDPK1 Labor	IC ₅₀ gegen <i>P.</i> <i>falciparum</i>
Hit S1	8,73 µM	22 µM	65 µM
Hit S2	2,88 µM	21 µM	12 µM
Hit S3	10,67 µM	> 50 µM	21 µM
Hit S4	6,48 µM	9 µM	24 µM
Hit M1	3,15 µM	10 µM	25 µM
Hit M2	1,67 µM	2,8 µM	40 µM
Hit M3	1,71 µM	4,7 µM	22 µM

Tab. 3.3: Ergebnis des HTS-Screenings

Die sieben Substanzen mit der besten inhibitorischen Wirkung sind dargestellt. Die Substanzen wurden unter Laborbedingungen erneut gegen PfCDPK1 getestet. Ebenso wurde ihre IC₅₀ auf *P. falciparum* bestimmt.

Die hier in Heidelberg bestimmten IC₅₀ Werte der Substanzen gegenüber PfCDPK1 lagen meist deutlich höher als die von DTL ermittelten Werte. Neben den leicht abweichenden Assaybedingungen - so wurde bei DTL [γ -³³P]ATP anstelle von [γ -³²P]ATP eingesetzt – liegt der Hauptgrund für diese hohen Abweichungen in der für die Datenauswertung verwendeten Software begründet. So ergab die Auswertung unserer Daten mit Hilfe des Auswertungsprogrammes von DLS IC₅₀-Werte, die in der Größenordnung der HTS-Ergebnisse lagen. Die IC₅₀-Werte der Substanzen gegenüber *P. falciparum* fielen ebenfalls deutlich höher aus. Da der lebende Parasit ein komplexes Gebilde darstellt, im in vitro Kinaseassay hingegen sehr vereinfachte Verhältnisse herrschen, sind die Werte nicht direkt vergleichbar. Faktoren wie Permeabilitätsbarrieren, Transporter oder metabolisierende Enzyme haben im Parasiten einen zusätzlichen Einfluss auf die Wirkung einer Substanz.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ausbeute des HTS mit vier Hits unter 19163 Substanzen (die 279 speziell ausgewählten Kinaseinhibitoren wurden hier nicht berücksichtigt), was einer Erfolgsquote von 0,02% entspricht, deutlich hinter den erwarteten Erfahrungswerten von 0,1-0,5% Treffern zurückblieb. DTL begründete dies mit der vergleichsweise niedrigen Anzahl getesteter Substanzen, welche im Industriemaßstab in der Regel bei über 100000 liegt. Im Gegensatz dazu betrug

die Erfolgsquote bei den speziell aufgrund ihrer Kinase-inhibierenden Eigenschaften ausgewählten 279 zusätzlichen Substanzen mit drei Treffern 1,07%, was deutlich über dem Durchschnitt liegt.

Aufgrund patentrechtlicher Bestimmungen können die genauen Strukturformeln hier nicht gezeigt werden. Auffallend war jedoch, dass drei der Hitsubstanzen als Grundgerüst eine Indol-2-on Struktur aufwiesen. Unter den 279 speziell ausgewählten Kinase-Inhibitor-Pharmakophoren war diese Struktur die einzig aktive gegenüber PfCDPK1.

Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden 436 Analoga dieser Hitsubstanzen in der Substanz-Bibliothek der Firma SPECS sowie 283 Analoga in der Substanz-Bibliothek der Firma Olivia ermittelt und der WHO zur Testung zur Verfügung gestellt. Diese Substanzen wurden einerseits auf ihre Wirksamkeit gegenüber PfCDPK1 hin untersucht, andererseits wurden ihre inhibitorischen Effekte auf das Wachstum von *P. falciparum*, *Trypanosoma brucei* und *Trypanosoma cruzi* bestimmt. Die Kinaseassays wurden in Heidelberg durchgeführt. Die Firma Tibotec übernahm die Testung der Substanzen auf die Parasitenkulturen.

3.1.4 Testung der 436 SPECS-HTS-Hit Analoga

Die Substanzen wurden in Dupletts bei einer Konzentration von 10 μM getestet. Bei einer Inhibition der PfCDPK1 Kinaseaktivität von $> 70\%$, wurde die IC_{50} der betreffenden Substanz ermittelt. Insgesamt erfüllten 10 Substanzen diese cut off Bedingungen. Parallel erfolgte die IC_{50} -Bestimmung der Substanzen an Kulturen von *P. falciparum*, *Trypanosoma brucei* und *Trypanosoma cruzi* durch Tibotec. Die Daten sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Aus Gründen des Patentschutzes wurde abermals auf eine genaue Bezeichnung sowie Strukturformeln verzichtet. Bemerkenswert ist jedoch, dass alle ermittelten Hitsubstanzen der Gruppe der Indol-2-one entstammen, obwohl fünf strukturell unterschiedliche Typen von Inhibitoren getestet wurden.

Es ist anzumerken, dass lediglich drei Substanzen (22167, 22143, 22135) auch gegen *P. falciparum* eine $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$ aufwiesen. Bei Zweien (22167, 22143) liegt sie im selben Größenbereich wie bei PfCDPK1, während in den übrigen Fällen die IC_{50} der Kinase meist deutlich niedriger liegt.

Im Test gegen *P. falciparum* wurden von Tibotec 36 Substanzen mit einer $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$ gefunden. Die Tatsache, dass diese Substanzen aber meist nur geringe Aktivität gegenüber PfCDPK1 zeigten, legt den Schluss nahe, dass hier andere Mechanismen des Parasiten inhibiert werden.

Substanz (Tibotec-Code)	% Inhibition von PfCDPK1 bei 10 μ M	IC ₅₀ gegen PfCDPK1 [μ M]	IC ₅₀ auf <i>P. falciparum</i> (Tibotec) [μ M]
22155	96,9	2,6	> 32
22167	96,3	10,9	9,08
22134	94,9	2,9	10,32
22156	94,6	3,7	13,4
22142	94,1	3,2	13,2
22143	92,1	3,4	3,9
22135	90,8	2,8	8,8
22511	87,8	3	15,2
22158	84,1	10,3	12,8
22138	71,8	12,8	> 32

Tab. 3.4: Ergebnis der Testung der HTS-Hit Analoga von SPECS

Die besten 10 Substanzen mit einer Inhibition von PfCDPK1 von >70% bei 10 μ M sind dargestellt. Zusätzlich enthält die Tabelle die Ergebnisse der IC₅₀-Bestimmung gegen PfCDPK1 und *P. falciparum*.

3.1.5 Testung der 283 Olivia-HTS-Hit Analoga

Die Substanzen wurden auch hier in Dupletts bei einer Konzentration von 10 μ M getestet. Parallel hierzu wurden wiederum die IC₅₀-Werte der Substanzen auf das Wachstum von *P. falciparum*, *Trypanosoma brucei* und *Trypanosoma cruzi* von Tibotec bestimmt.

Die Auswertung der Ergebnisse ergab eine maximale Inhibition der Kinaseaktivität von PfCDPK1 von 48,6%. Lediglich 12 Substanzen wiesen bei der verwendeten Konzentration einen inhibitorischen Effekt von über 40% auf. Folglich wurde auf eine IC₅₀-Bestimmung verzichtet. Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten von Tibotec überein, welche für *P. falciparum* meist IC₅₀-Werte von über 32 μ M erhielten. Nur drei Substanzen inhibierten das Parasitenwachstum mit einer IC₅₀ < 10 μ M. Diese Substanzen zeigten jedoch keinen vergleichbaren Effekt auf PfCDPK1. Aufgrund der enttäuschenden Ergebnisse wird hier auf eine ausführliche Darstellung der Daten in Form einer Tabelle verzichtet.

3.2 Biochemische Charakterisierung von PfCDPK1 zur Verbesserung der Kristallisationseigenschaften

Zielsetzung dieses Teilprojektes war es, monodisperses Protein für Kristallisationsexperimente in ausreichenden Mengen herzustellen. Da für eine Kristallisation erfahrungsgemäß große Mengen an löslichem Protein benötigt werden - in der Regel sind Proteinkonzentrationen von mindestens 10 mg/ml, besser 20 mg/ml erforderlich -, mußte die Expression und Aufreinigung von PfCDPK1 soweit optimiert werden, dass diese Proteinmengen unter vertretbarem Material- und Arbeitsaufwand und in ausreichender Qualität zu gewinnen waren.

Die Kristallisation selbst wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Sehr wichtig ist eine einheitliche, lösliche Proteinpopulation, die es ermöglicht, dass die einzelnen Proteine sich in derselben Weise orientieren und aneinander lagern können. Flexible Elemente, uneinheitliche Proteinmodifikationen und/oder -konformationen, sowie Proteinaggregate unterschiedlicher Größe stehen dieser geordneten Anlagerung im Wege. Durch Optimierung der Expressionsklone und eine sorgfältige Überprüfung der einzelnen Aufreinigungsschritte und -bedingungen wurde versucht, eine möglichst homogene, aus Monomeren bestehende Proteinlösung für die Kristallisation herzustellen.

Im folgenden sind die unterschiedlichen Strategien dargelegt, die verfolgt wurden um eine Kristallisation von PfCDPK1 Wildtyp- und Mutantenproteinen zu erreichen. Verbunden damit war eine umfangreiche biochemische Charakterisierung der Kinase, welche Rückschlüsse auf deren strukturelle Organisation zulässt.

Der Großteil dieses Teilprojektes wurde in Kooperation mit Dr. Ivo Tews am Biochemizentrum Heidelberg (BZH) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Irmgard Sinning durchgeführt. Die unter 3.2.2.2 und 3.2.2.3 beschriebenen Experimente wurden unter meiner oder Dr. Tews' Aufsicht von Lars Meyer durchgeführt.

Die unter 3.2.1 beschriebenen Vorarbeiten wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Heiner Schirmer ebenfalls am BZH durchgeführt.

3.2.1 Vorarbeiten: Expression und Kristallisationsexperimente mit PfCDPK1 WT und EKII in Stueber Nr. 9

Als Ausgangsmaterial für die Optimierung der Expression und zur Herstellung einer homogenen Proteinpopulation wurden cDNA Konstrukte von PfCDPK1 und der katalytisch inaktiven EKII Mutante verwendet. Beide Konstrukte befanden sich im Expressionsvektor Stueber Nr. 9 (pDS56/RBS II, 6 x His) und codieren für einen N-terminalen His-tag, welcher die Aufreinigung der rekombinanten Proteine mittels Affinitätschromatographie auf Ni-NTA Matrix ermöglicht (Zhao et al., 1994a; Zhao et al., 1993).

In der EKII Mutante wurde die Glutaminsäure an Position 12 des Calcium-bindenden Loops II, welche 2 Liganden für die Koordination der Calciums bereit stellt, durch ein Lysin ersetzt, wodurch diese Calciumbindungsstelle nicht mehr in der Lage ist Calcium zu binden (Zhao et al., 1994b). Da die Calcium-Bindungsstelle II entscheidend für die Aktivierung der Kinase durch Calcium ist, führt der Verlust der Calciumbindung zu einer katalytisch inaktiven Form des Enzyms. Diese katalytisch inaktive Mutante wurde eingesetzt, weil während der Expression von PfCDPK1 in *E. coli* eine Autophosphorylierung des Enzyms erfolgt. Diese tritt an unterschiedlichen Stellen auf, so dass keine homogene Wildtyp-Population, eine der Grundvoraussetzungen für eine erfolgreiche Kristallisation, aufgereinigt werden kann (siehe weiterführenden Analysen zur Autophosphorylierung von PfCDPK1 in Abschnitt 3.3.5).

Des Weiteren führten auch die folgenden Überlegungen zur Verwendung der EKII Mutante. Die Bindung von Calcium an PfCDPK1 führt zu einer Konformationsänderung des Enzyms, die es dem Substrat ermöglicht an das aktive Zentrum der Kinase zu binden (Zhao et al., 1994b). Unser Arbeitsmodell postuliert, dass nach Calciumbindung das Verbindungsstück zwischen katalytischer und regulatorischer Domäne, welches bei CDPKS von Pflanzen ein Pseudosubstratmotiv enthält (Harmon et al., 1994), aus seiner Position vor der Substratbindungsstelle herausklappt und diese damit frei gibt. Es fungiert somit als eine Art Gelenk, welches es der katalytischen Kinasedomäne und der regulatorischen Calcium-bindenden Domäne ermöglicht, sich ohne Änderung ihrer Sekundärstruktur gegeneinander zu verschieben. Dies verleiht dem Protein einen hohen Grad an Flexibilität, was einem Kristallisationsprozess abträglich ist. Durch die Mutation der Calciumbindungsstelle II wird eine Aktivierung der Kinase durch Calcium unterbunden und die Mutante auch bei Calciumkonzentrationen, die die Wildtypkinase voll aktivieren, in einer kompakteren, inaktiven Konformation fixiert (Zhao et al., 1994b).

Die Expression und Aufreinigung von PfCDPK1 und EKII erfolgte wie unter Methoden beschrieben. Die Ausbeute an löslichem Protein war mit ca. 10 mg Protein pro Liter Bakterienkultur zufriedenstellend. Jedoch sprach die relativ niedrige Imidazolkonzentration von 40 mM bzw. 30 mM mit der PfCDPK1 bzw. EKII bereits von der Ni-NTA Säule eluiert wurde, für eine nicht optimale Bindung an die Gelmatrix, da in der Regel die Elution von Protein mit His-tag erst ab einer Imidazolkonzentration von 140 mM erwartet wird. Obwohl eine Vielzahl von Kristallisationsansätzen mit dem rekombinanten Protein angesetzt wurden, wurden keine Proteinkristalle erhalten.

In der Folge wurden deshalb Anstrengungen unternommen, um zum einen durch eine Optimierung der Expressionssysteme und der Methoden zur Proteinaufreinigung die Reinheit und Homogenität der Proteinlösung zu verbessern und zum anderen durch den Einsatz modifizierter Klone von PfCDPK1, den Anteil an flexiblen Strukturen in der Proteinsequenz, die zu einer Behinderung der Kristallisation führen könnten, zu reduzieren.

3.2.2 Expression, Aufreinigung und biochemische Charakterisierung von D212A, einer katalytisch inaktiven Mutante von PfCDPK1

Für weitere Kristallisationsversuche, sowie eine genauere Charakterisierung der Kinase, wurde die katalytisch inaktive PfCDPK1 Mutante D212A eingesetzt. Im Gegensatz zu EKII erfolgte hier die Mutation, die zu einer Inaktivierung der Kinase führt, im katalytischen Zentrum durch den Austausch der für die Chelierung von Mg^{2+} benötigten Asparaginsäure im konservierten DFG-Motiv gegen Alanin. Dem Einsatz der D212A Mutante lag die Überlegung zugrunde, dass die in der EKII Mutante durch Alanin ersetzte Glutaminsäure in der Calciumbindungsstelle II in der inaktiven, also nicht durch Calcium aktivierten Form des Enzyms struktur-stabilisierende Eigenschaften besitzen könnte. Ferner gestattet der Einsatz der D212A Mutante durch Variation der Ca^{2+} -Konzentration bzw. durch Zusatz von EGTA, welches Ca^{2+} cheliert, eine genauere Untersuchung des Einflusses von Calcium auf die Eigenschaften der Kinase.

3.2.2.1 Expression und Aufreinigung

Zur Expression wurde zunächst ein Konstrukt verwendet, das wie die oben beschriebenen Expressionskonstrukte, die cDNA von PfCDPK1 mit der beschriebenen Mutation im Stueber Vektor Nr.9 (pDS56/RBS II, 6 x His) enthielt (Mangold und Kappes, unveröffentlicht). Das so hergestellte rekombinante Protein wies jedoch, wie die mit demselben Expressionssystem erzeugten WT-PfCDPK1 und EKII Proteine, eine zu schwache Bindung an die Ni-NTA Matrix auf, was einen relativ hohen Anteil an Verunreinigungen zur Folge hatte. Daher wurde D212A zunächst in einen anderen Expressionsvektor (pETM-11; G. Stier, EMBL Heidelberg) umkloniert, bei dem der Abstand zwischen dem His-tag und der Startamino-säure mit 18 AS relativ groß ist, wodurch eine festere Bindung an die Ni-NTA Matrix erreicht werden sollte. Mit dem pETM-11-System wird ein His-tag am N-Terminus des rekombinanten Proteins eingeführt. pETM-11 enthält außerdem zwischen dem His-tag und dem für das rekombinante Protein codierenden Gen eine Erkennungssequenz der *Tobacco Etch Virus (TEV)*-Protease, die es ermöglicht, den His-tag im Anschluss an die Affinitätsreinigung abzuspalten. Zur Herstellung des pETM-11-D212A Expressionskonstruktes wurde D212A im Stueber Vektor Nr. 9 zunächst mit Nsi I/PpuM I verdaut und mit dem 1275 bp großen Fragment, welches die Mutation trägt, ein entsprechendes Fragment in PfCDPK1 in pBSKS+ ersetzt. Dieses Konstrukt wurde dann mit Nco I/Xho I verdaut und das resultierende 1,6 kb Fragment in pETM-11 kloniert.



Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Expressionskonstruktes der D212A Mutante in pETM-11

Die Klonierung erfolgte über *Nco I*/*Xho I*. Am 5'-Ende enthält das Konstrukt einen His-tag (6-His) gefolgt von einer Erkennungssequenz für die *TEV*-Protease (*TEV*), durch welche der His-tag abgetrennt werden kann.

Tests mit den Expressionsstämmen BL21 (DE3), BL21-CodonPlus-RIL, BL 21 (DE3) pLysS, und SG 13009 zeigten, dass die Ausbeute an löslichem Protein bei Verwendung des BL21 (DE3) Stammes am höchsten war. Expression und Aufreinigung der Proteine erfolgte unter leicht abgewandelten Bedingungen (siehe Methodenteil). Um multimere Proteinkomplexe abzutrennen, wurde an die Affinitätschromatographie, ein Gelfiltrationsschritt angeschlossen. Zur Optimierung der Gelfiltrationsbedingungen wurden zunächst Untersuchungen zum Einfluss von Ca^{2+} auf die Multimerisierung der D212A-Mutante vorgenommen

3.2.2.2 Untersuchung des Einflusses von Ca^{2+} auf den Multimerisierungszustand von PfCDPK1-D212A

Wie bereits erwähnt führt die Aktivierung von PfCDPK1 durch Ca^{2+} zu einer Konformationsänderung der Kinase (Zhao et al., 1994b). Diese kann wiederum das Verhalten des Proteins in Lösung, z.B. seine Tendenz zu aggregieren oder Multimere auszubilden, beeinflussen. Es wurden daher drei verschiedene Pufferbedingungen für die Affinitätschromatographie und Gelfiltration (GF) untersucht. Die Puffer unterschieden sich nur durch den Zusatz von 20 mM CaCl_2 oder 20 mM EGTA, welches in den Puffern in Spuren vorhandenes Calcium cheliert. Die Homogenität des aufgereinigten Proteins wurde mittels GF und Dynamic Light Scattering (DSL) analysiert. Das Experiment wurde von Lars Meier unter Aufsicht von Dr. Ivo Tews durchgeführt, weshalb hier auf seine Ergebnisse Bezug genommen wird.

3.2.2.2.1 Analyse mittels Gelfiltration

Bei der GF werden Moleküle aufgrund ihrer apparenten Größe aufgetrennt. Multimere oder Proteinaggregate sind bei entsprechender Trennleistung der Säule deshalb leicht von monomerem Protein zu unterscheiden.

Zunächst erfolgte die Lyse und Aufreinigung von je 5 g Zellpellets, wobei drei verschiedene Pufferbedingungen zum Einsatz kamen: Standardpuffer, Standardpuffer + 20 mM CaCl_2 oder

Standardpuffer + 20 mM EGTA. Vor der Ni-Affinitätsreinigung wurde allerdings das EGTA durch Dialyse entfernt, da dieses auch das Nickel der Gelmatrix chelieren kann, und nachher den Eluatfraktionen wieder zugesetzt. Die auf 500 μ l aufkonzentrierten Eluate (ca. 10-15 mg Protein) wurden mit 1,5 ml Gelfiltrationspuffer bzw. GF-Puffer + 20 mM Ca^{2+} oder GF-Puffer + 20 mM EGTA verdünnt und auf eine Sephadex 200 Säule 26/60 (Amersham Pharmacia) geladen.

Die Größenabschätzung der eluierten Proteine erfolgte anhand einer Eichgeraden, welche mittels definierter Größenmarker für die verwendete Säule erstellt wurde. Durch lineare Regression wurde für die Geradengleichung folgende Funktion ermittelt, welche Ausgang für die Berechnung des Molekulargewichtes (M_r) war:

$\log M_r = 4,17 - 0,0122 (V_e/V_o)$. Das Totvolumen V_o lag bei allen Messungen relativ konstant bei 115 ml.

3.2.2.2 Analyse mittels Dynamic Light Scattering

Moleküle in Lösung, deren Polarisierbarkeit sich von ihrer Umgebung unterscheidet, besitzen die Fähigkeit einen einfallenden Lichtstrahl zu streuen. Hierzu zählen auch Proteine. Die Methode des Dynamic Light Scatterings (DLS: Dynamische Lichtstreuung) misst die Fluktuationen der Intensität des gestreuten Lichtes, wie sie beim Durchgang eines Lichtstrahls durch eine Lösung durch die relative Bewegung der Teilchen zueinander auftreten. Kleine Moleküle bewegen sich schneller als große, so dass die Dauer der Fluktuation mit der Teilchengröße ansteigt. Es können so Rückschlüsse auf die apparente Größe der gelösten Moleküle, angegeben als Molekülradius R , gezogen werden. Das daraus errechnete relative Molekulargewicht M_r beruht auf Erfahrungswerten und ist nicht als absolut zu sehen. Der Anteil an polydisperssem Protein (%Pd) berechnet sich aus der relativen Breite des erhaltenen Signals und ist ein Maß für das Vorhandensein multimerer Formen. Die Methode ist sehr empfindlich, so dass auch minimale Verunreinigungen, z.B. durch Staubpartikel oder Aggregate das Ergebnis verfälschen können. Aus diesem Grund wurden die Proteinlösungen vor der Messung 20 min bei 4°C und 40000 rpm (Beckmann Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Untersucht wurden die Monomerenfraktionen der Gelfiltrate aus den oben beschriebenen Aufreinigungen.

3.2.2.3 Verhalten von D212A nach Aufreinigung in Standardpuffer

Das Elutionsprofil der Gelfiltration bei der Aufreinigung mit Standardpuffer zeigt 3 Spitzen (Peaks). Das anhand einer Eichgeraden ermittelte apparente Molekulargewicht der einzelnen Peakfraktionen und die Elutionsreihenfolge spricht für die folgende Zuordnung (siehe Abb. 3.2 a.) : Peak 1 ($V_e = 134$ ml; $M_r = 207$ kDa; Fraktion 1-10) entspricht dem multimerem Protein, Peak 2 ($V_e = 194$ ml; $M_r = 96,1$ kDa; Fraktion 20-27) dem dimeren Protein und Peak 3 ($V_e = 224$ ml; $M_r = 40,6$ kDa; Fraktionen 30-35) dem Monomer. Die Diskrepanz zwischen dem M_r des Monomers (40,6 kDa) und dem tatsächlichen M_r von PfCDPK1-D212A (60 kDa) liegt in der Tatsache begründet, dass mit der GF nur

das apparente, also das durch sein Verhalten in der Säulenmatrix bestimmte Molekulargewicht, nicht aber das tatsächliche M_r ermittelt werden kann. Auffallend ist der hohe Anteil an multimerem Protein (Peak 1), der weit über dem des monomeren (Peak 3) bzw. dimeren (Peak 2) Proteins liegt.

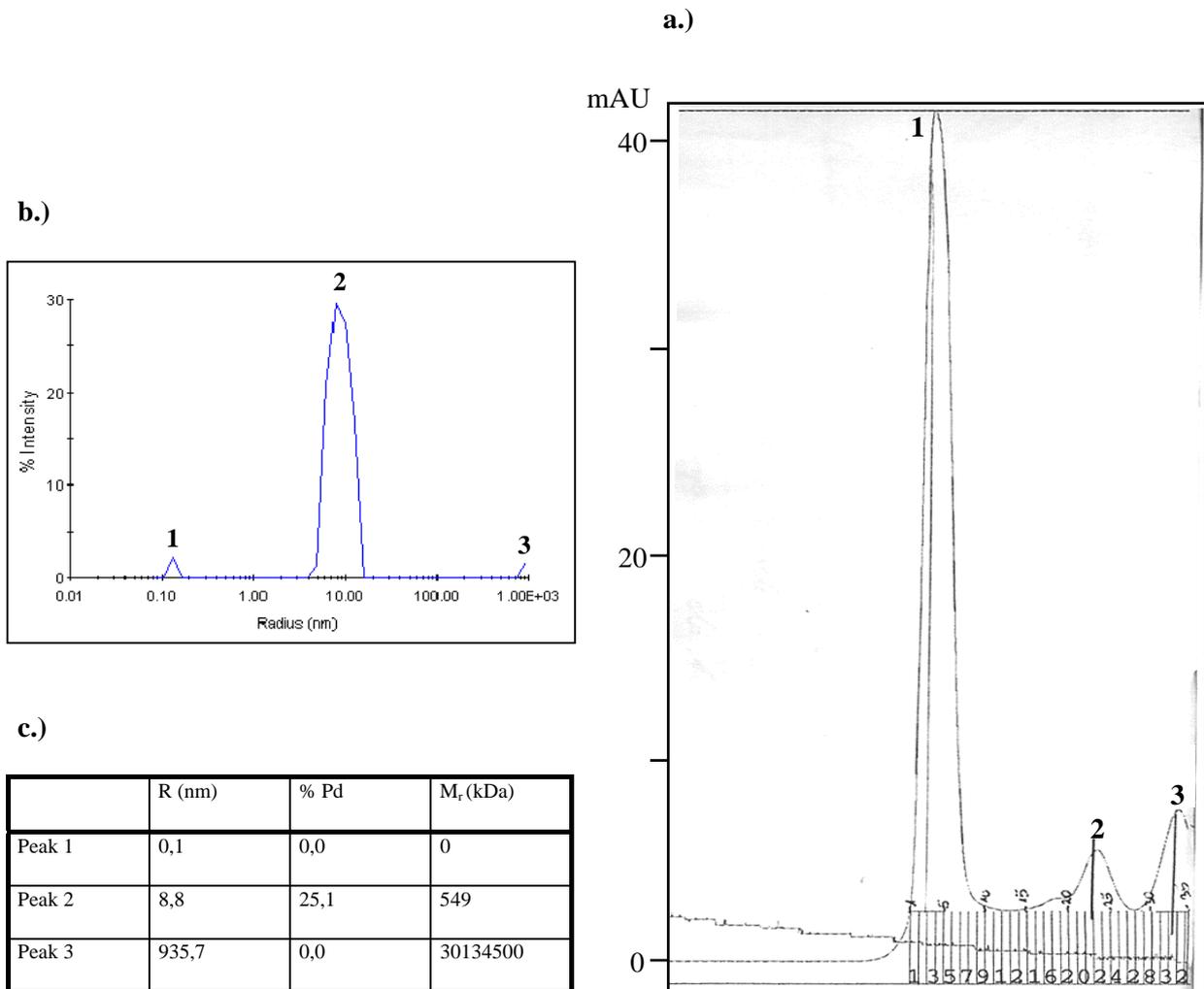


Abb. 3.2: Aufreinigung von D212A in Standardpuffer

a.): Elutionsprofil der Gelfiltration von D212A nach Aufreinigung mit Standardpuffer: Peak 1: multimeres Protein, $V_e = 134$ ml (entspr. ca. 207 kDa); Peak 2: dimeres Protein, $V_e = 194$ ml (ca. 96,1 kDa); Peak 3: monomeres Protein, $V_e = 224$ ml (ca. 40,6 kDa).

b.): DLS-Messung der Monomerenfraktion der Gelfiltration von D212 in Standardpuffer (a.: Peak 3)

c.): Parameter der DLS-Analyse: R: berechneter Molekulradius; % Pd: prozentualer Anteil an polydispersen Protein; M_r : berechnetes durchschnittliches Molekulargewicht. Peak 2 entspricht dem gelösten Protein, während Peak 1 niedermolekulare Pufferbestandteile und Peak 3 Verunreinigungen durch Proteinaggregate darstellen.

Nach dem Gellauf wurden die Fraktionen 30-35 (Peak 3) vereinigt und eine DLS-Messung durchgeführt (Abb. 3.2 b., c.). Im Diagramm (b.) sind 3 Peaks unterschiedlicher Größe zu erkennen. Der große Peak (Peak 2) repräsentiert das gelöste Protein, während die beiden kleineren Peaks von niedermolekularen Pufferbestandteilen (Peak 1) bzw. großen partikulären Verunreinigungen der Lösung wie Aggregaten (Peak 3) herrühren. Anhand des gemittelten Molekulargewichts von 549 kDa, was einem Vielfachen des tatsächlichen M_r von D212A von ca. 60 kDa entspricht, und des mit 25,1%

relativ hohen Anteils an polydispersem Protein erkennt man, dass sich das monomere Protein nach der Gelfiltration wieder zu größeren multimeren Gebilden zusammenschließt, die Multimerisierung also eine Gleichgewichtsreaktion darstellt.

3.2.2.4 Verhalten von D212A nach Aufreinigung in Ca^{2+} -haltigem Puffer

Bei der Aufreinigung in Ca^{2+} -haltigen Puffer sind die Übergänge zwischen Multimer- (Peak 1: Frakt. 5-20) und Dimerfraktion (Peak 2: Frakt. 21-27) in der Gelfiltration fließend und die einzelnen Proteinpopulationen nicht mehr zu trennen. Eine eindeutige Baseline ist nicht auszumachen (Abb.3.3).

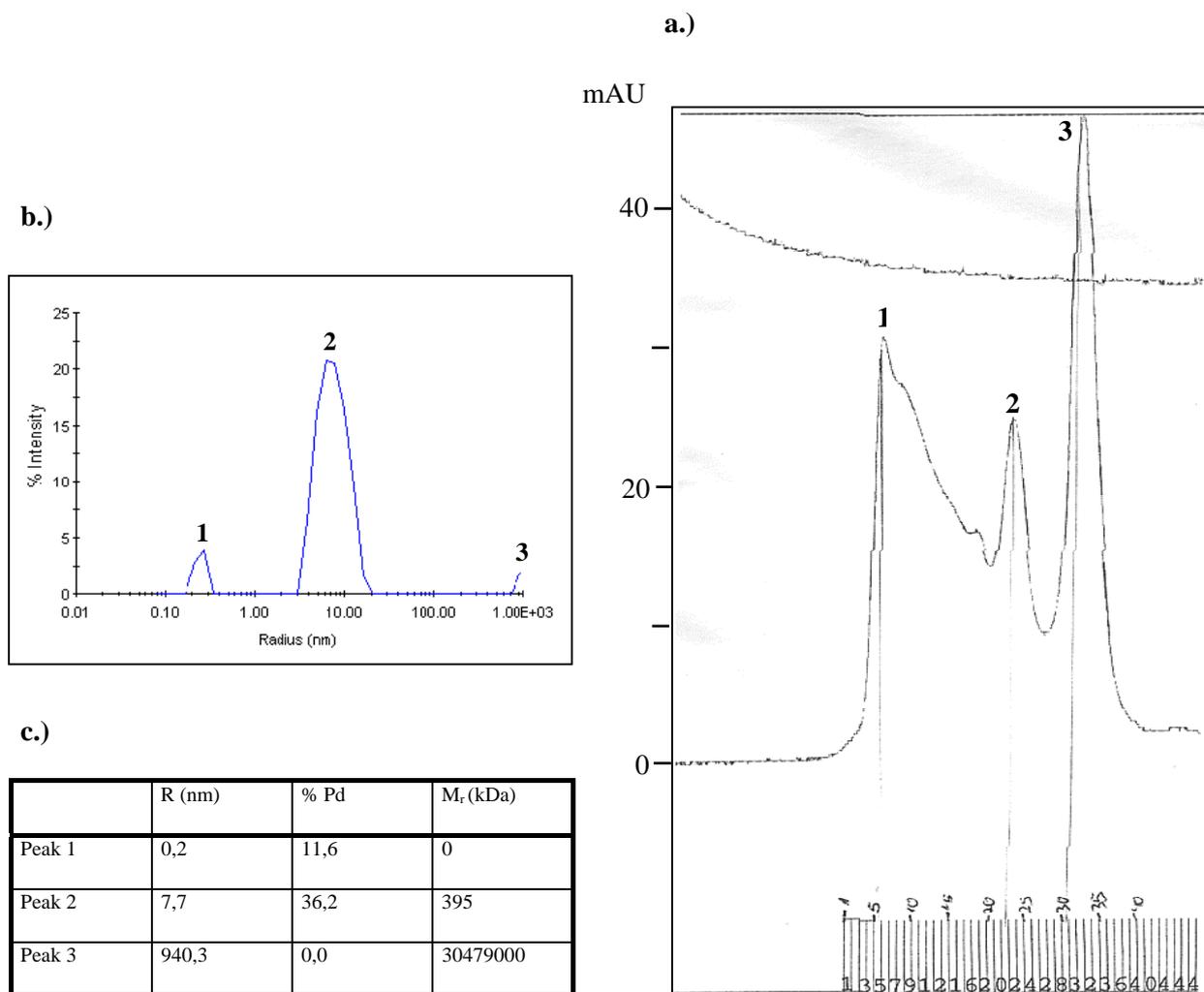


Abb. 3.3: Aufreinigung von D212A in Ca^{2+} -haltigem Puffer

a.) Elutionsprofil der Gelfiltration von D212A nach Aufreinigung in Ca^{2+} -haltigem Puffer (Standardpuffer + 20 mM Ca^{2+}): Peak 1: multimeres Protein, $V_e = 143$ ml (entspr. ca. 190,45 kDa); Peak 2: dimeres Protein, $V_e = 200$ ml (ca. 85 kDa); Peak 3: monomeres Protein, $V_e = 221$ ml (ca. 46,15 kDa).

b.) DLS-Messung der Monomerenfraktion der Gelfiltration von D212A in Ca^{2+} -haltigem Puffer (a.: Peak 3)

c.) Parameter der DLS-Analyse: R: berechneter Molekülradius; % Pd: prozentualer Anteil an polydispersem Protein; M_r : berechnetes durchschnittliches Molekulargewicht. Peak 2 entspricht dem gelösten Protein, während Peak 1 niedermolekulare Pufferbestandteile und Peak 3 Verunreinigungen durch Proteinaggregate darstellen.

Im Vergleich zur Aufreinigung in Standardpuffer fällt ein erhöhter Anteil an monomerem Protein auf (Peak 3). Jedoch ist der Anteil an multimerem Protein unvermindert hoch. Im Unterschied zur Aufreinigung im Standardpuffer ist der Peak der Monomer-Fraktionen zwar deutlich höher als der der Multimer-Fraktionen, jedoch ist letzterer über einen wesentlich größeren Fraktionsbereich gespreitet.

Auch hier wurde die Fraktion des monomeren Proteins (Fraktion 27-33) einer DLS-Analyse unterzogen. Mit 36,2% ist hier der Anteil an polydispersem Protein deutlich höher als unter Standardbedingungen. Das mittlere Molekulargewicht fällt mit 395 kDa zwar geringer aus, beträgt aber immer noch ein Vielfaches des eigentlichen M_r von D212A von 60 kDa.

3.2.2.2.5 Verhalten von D212A nach Aufreinigung in EGTA-haltigem Puffer

Bei der Analyse der Aufreinigung in EGTA-haltigem Puffer fällt eine starke Erhöhung des Anteils an monomerem Protein auf, das mit Abstand den größten Proteinanteil ausmacht (Peak 3; Frakt. 30-35). Der Anteil an multimerem Protein ist verglichen mit den vorangegangenen Messungen sehr gering (Peak 1; Frakt. 3-7). Der Peak des dimeren Proteins (Peak 2; Fraktion 20-27) ist im Vergleich zur Aufreinigung in Standardpuffer erhöht. Das aus den Eichwerten für die GF-Säule berechnete M_r des monomeren Proteins von 59,1 kDa stimmt mit dem tatsächlichen M_r von D212A überein.

Mit einem Anteil an monodispersem Protein von 78,4% ($\%Pd = 21,6\%$) im Vergleich zu 74,9% bei der Aufreinigung im Standardpuffer zeigt die DLS-Analyse der monomeren Proteinfractionen (Peak 3; Fraktion 30-35) eine Erhöhung des Anteils an monodispersem Protein an. Das durch DLS ermittelte mittlere M_r des D212A Monomers liegt mit 157 kDa deutlich höher als das durch die GF bestimmte apparente Molekulargewicht (M_a). Die Daten lassen sich nur so interpretieren, dass sich auch nach der GF ein Gleichgewicht zwischen monomerem und multimerem Protein einstellt, wenngleich die Tendenz zur Multimerisierung deutlich geringer ausfällt als in Anwesenheit von Ca^{2+} .

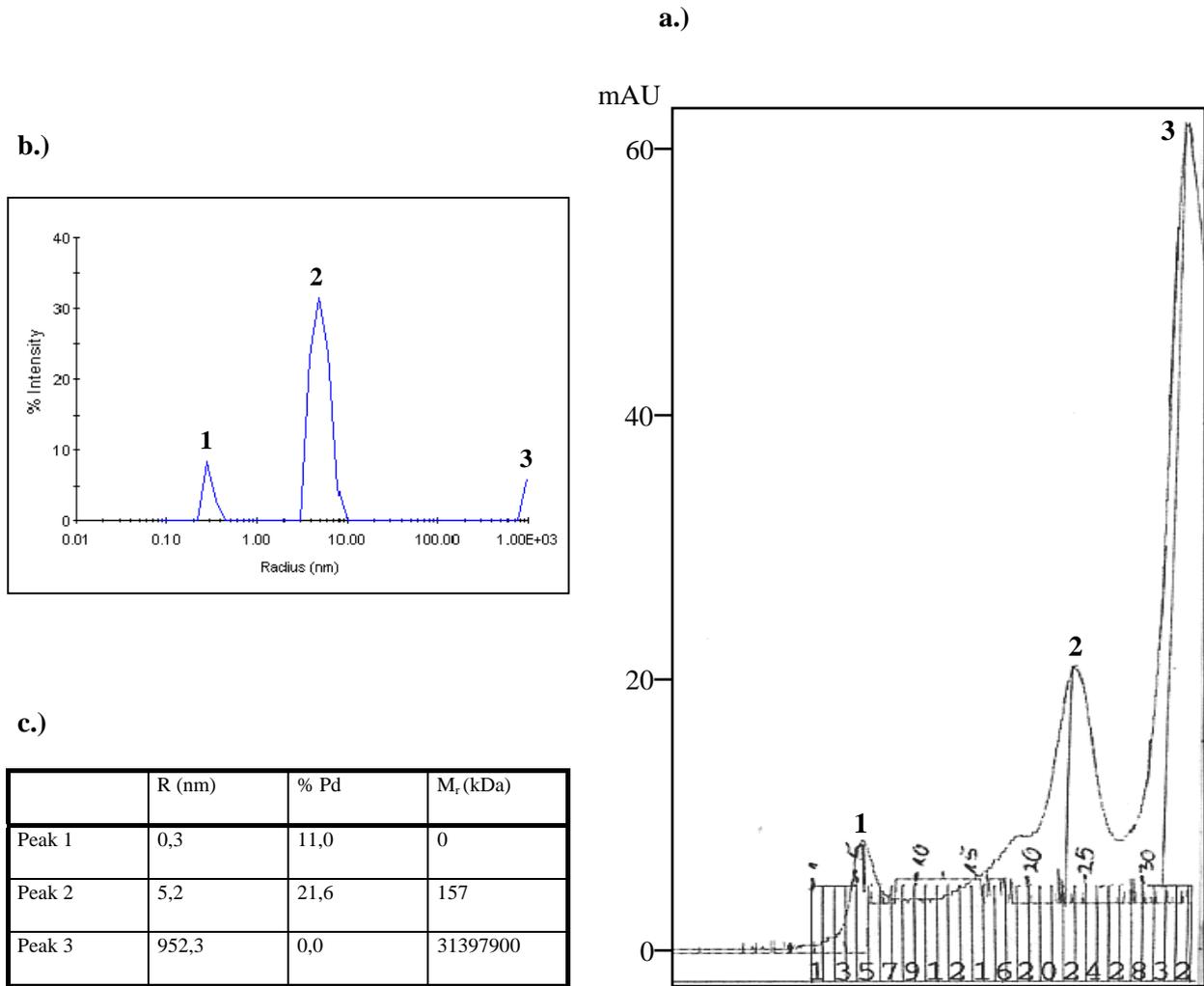


Abb. 3.4: Aufreinigung von D212A in EGTA-haltigem Puffer

a.): Elutionsprofil der Gelfiltration von D212A nach Aufreinigung in EGTA-haltigem Puffer (Standardpuffer + 20 mM EGTA): Peak 1: multimeres Protein, $V_e = 140$ ml (entspr. ca. 196,41 kDa); Peak 2: dimeres Protein, $V_e = 197$ ml (ca. 90,55 kDa); Peak 3: monomeres Protein, $V_e = 214$ ml (ca. 59,1 kDa).

b.): DLS-Messung der Monomerenfraktion der Gelfiltration von D212A in EGTA-haltigem Puffer (a.: Peak 3)

c.): Parameter der DLS-Analyse: R: berechneter Molekülradius; % Pd: prozentualer Anteil an polydispersen Protein; M_r : berechnetes durchschnittliches Molekulargewicht. Peak 2 entspricht dem gelösten Protein, während Peak 1 niedermolekulare Pufferbestandteile und Peak 3 Verunreinigungen durch Proteinaggregate darstellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei Verwendung von EGTA-haltigem Puffer während der Aufreinigung der D212A-Mutante, der Großteil des Proteins als Monomer vorliegt und die Ausbildung von Multimeren stark zurückgedrängt wird. Im Gegensatz dazu zeigt das Protein, das in Gegenwart von Ca^{2+} aufgereinigt wurde, eine hohe Tendenz zur Ausbildung von Multimeren. Die durch Ca^{2+} hervorgerufene Konformationsänderung der Kinase scheint also die Bildung von multimeren Formen des Proteins zu begünstigen.

Die Auswertung der DLS-Daten (%Pd und M_r) zeigt, dass alle drei über die GF erhaltenen Monomerfraktionen einen hohen Anteil an multimerem Protein enthalten. Somit stellt die Ausbildung der Multimere eine Gleichgewichtsreaktion dar, die sich nach Auftrennung der einzelnen

Proteinpopulationen wieder einstellt. Der Grad der Multimerisierung ist abhängig von den gewählten Pufferbedingungen. In Anwesenheit von freiem Calcium ist er mit 36,2 %Pd und einem berechnetem apparenten Molekulargewicht von 549 kDa mit Abstand am höchsten, während er in Abwesenheit von freiem Calcium (EGTA-Puffer) mit 21,6%Pd und einem berechnetem M_a von 157 kDa am geringsten ausfällt. Der Prozentsatz an polydisperssem Protein ist jedoch für Kristallisationsuntersuchungen nicht zufriedenstellend, da hier in der Regel Werte im Bereich von 10% angestrebt werden.

Die Anteil an monodisperssem Protein der D212A Mutanten konnte durch den Entzug von Ca^{2+} während der Proteinaufreinigung deutlich verbessert werden. Jedoch gibt es immer noch mindestens zwei Faktoren, die dem entgegen wirken. Zum einen besitzen die Monomere die Tendenz, sich nach der GF wieder zu multimeren Gebilden zusammenzulagern (siehe berechnetes apparentes Molekulargewicht im DLS). Zum anderen sind in der Mutante selbst Strukturen vorhanden, welche eine inhomogene Proteinpopulation zur Folge haben. Beide Faktoren könnten eine Kristallisation nachhaltig erschweren. Es musste daher der Schluss gezogen werden, dass die D212A Mutante in der vorliegenden Form schwierig zu kristallisieren sein würde.

Da durch die Proteinaufreinigung in EGTA-haltigem Puffer der Anteil der monomeren Proteinfraction stark erhöht werden konnte, wurden diese Bedingungen für alle nachfolgenden Proteinaufreinigungen von PfCDPK1 und ihrer Mutanten beibehalten.

3.2.2.3 Proteolytischer Verdau von D212A

Durch den Verdau von D212A mit den Proteasen Trypsin und Chymotrypsin wurde versucht, die Kinase in definierte stabile Domänen zu fragmentieren. Diese Arbeiten wurden von Lars Meyer durchgeführt. Da sie großen Einfluss auf die weitere Vorgehensweise hatten, wird hier kurz auf die Ergebnisse von Lars Meyer Bezug genommen.

Der Chymotrypsin-Verdau von D212A ergab eine relativ stabile Bande, die etwa 50 AS kleiner als das unverdaute Mutantenprotein war. Die Sequenzierung des Fragments zeigte, dass es sich bei den fehlenden AS um die N-terminalen 50 AS von PfCDPK1 handelt, die wie unter 1.6.3 beschrieben als Membrananker fungieren und vor der katalytischen Proteinkinasedomäne liegen. Die Analyse dieser N-terminalen AS deutet auf das Vorhandensein zweier helikaler Strukturen im Bereich zwischen AS 30 und AS 51 hin.

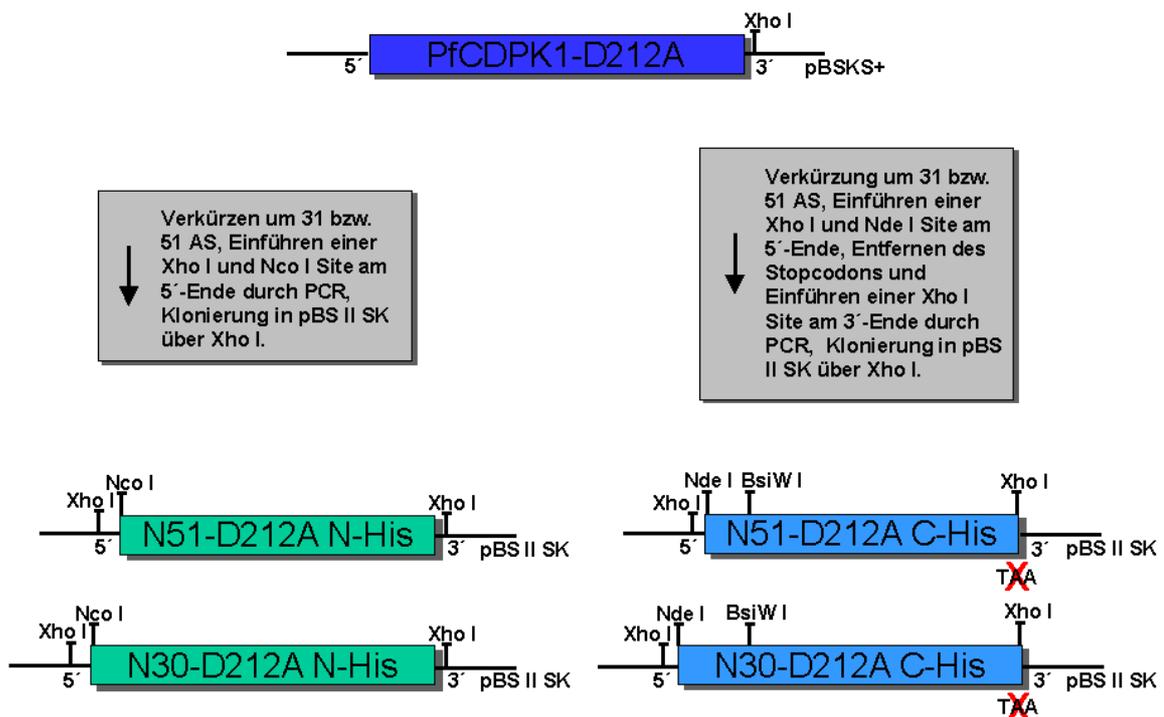
3.2.3 Untersuchungen mit den N-terminal verkürzten PfCDPK1 Mutanten N51 und N30

Ein relativ langer, flexibler Membrananker an der Oberfläche der Kinase könnte für den hohen Anteil an polydisperssem Protein verantwortlich sein und somit die geordnete Anlagerung der monomeren Kinase in der Kristallisation entscheidend erschweren. Eine Verkürzung des Proteins um die N-

terminalen 30 bzw. 51 AS könnte die Flexibilität der Mutante verringern, ohne die Struktur der Kinasedomäne zu zerstören und gleichzeitig die elektrostatische Annäherung zwischen zwei monomeren Proteinen verbessern.

3.2.3.1 Klonierung der Expressionskonstrukte

Als Resultat der vorangegangenen Überlegungen wurden zwei verkürzte Varianten der D212A Mutante hergestellt. Die N51-D212A Mutante wurde N-terminal um 51 AS und die N30-D212A Mutante um 30 AS verkürzt. Im Gegensatz zu N51-D212A besitzt N30-D212A N-terminal noch zwei helicale Bereiche. Expressionskonstrukte wurden sowohl mit pETM-11 (N-terminaler His-tag, TEV-Erkennungssequenz) wie auch mit dem Expressionsvektor pET-21a(+) (C-terminaler His-tag) hergestellt. Die einzelnen Klonierungsschritte für die Synthese der Konstrukte sind in der folgenden Abbildung schematisch wiedergegeben. Genauere Ausführungen zu den einzelnen Schritten finden sich im anschließenden Text.



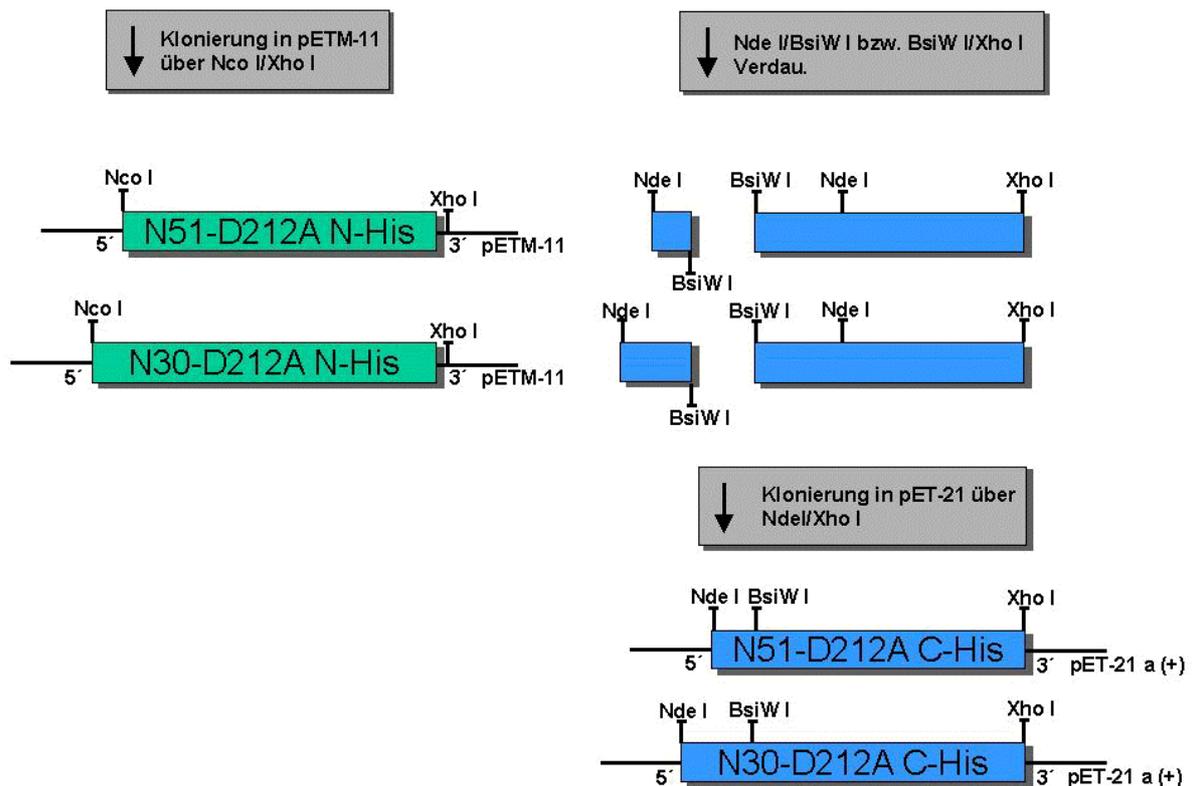


Abb. 3.5: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte zur Klonierung der N51- bzw. N30-D212A Konstrukte in pETM-11 bzw. pET-21a(+)

Für die Klonierung aller 4 Konstrukte wurde von der D212A Mutante in pBSKS+ ausgegangen. Zunächst wurden mit Hilfe der PCR das 5' Ende der cDNA um die Codons der N-terminalen 30 bzw. 51 AS verkürzt und gleichzeitig geeignete Schnittstellen für die Klonierung in die Expressionsvektoren eingeführt. Bei den für die Klonierung in pETM-11 bestimmten Konstrukten wurden durch die Primer *PfCDPK1_30GNNK_NcoI.fwd* bzw. *PfCDPK1_51GKIG_NcoI.fwd* am 5'-Ende eine Xho I und Nco I Schnittstelle eingeführt. Als Gegenprimer diente *T3.seq*. Bei den für die Klonierung in pET-21a(+) bestimmten Konstrukten wurde durch die Primer *PfCDPK1_30GNNK_NdeI.fwd* bzw. *PfCDPK1_51GKIG_NdeI.fwd* am 5'-Ende eine Xho I und Nde I Schnittstelle eingeführt. Durch den Gegenprimer *PfCDPK1_nostop_XhoI.rev* wurde am 3'-Ende das Stopcodon TAA eliminiert, um die Translation des His-tags zu ermöglichen, und gleichzeitig eine Xho I Site eingeführt. Die PCR-Produkte wurden ungerichtet über Xho I in den Vektor pBS II SK kloniert. Die Klonierung in pETM-11 erfolgte gerichtet über Nco I/Xho I. Da die cDNA von N30-D212A bzw. N51-D212A bereits zwei Nde I Schnittstellen enthält, erforderte die Herstellung der pET-21a(+) Konstrukte eine Doppelligation. Zunächst wurde die N30-D212A bzw. N51-D212A Mutante in pBS II SK mit Nde I/BsiW I sowie BsiW I/Xho I verdaut, die entsprechenden Fragmente isoliert und in einer

Doppelligation in den Nde I/Xho I verdauten pET-21a(+) Vektor kloniert. Die Richtigkeit der Klonierungen wurde mittels Restriktionsverdau mit Nde I/Xho I bzw, Nco I/Xho I bestätigt.

3.2.3.2 Optimierung der Expressions- und Aufreinigungsbedingungen der N30- und N51-Expressionskonstrukte zur Gewinnung von rekombinantem Protein für Kristallisations- und Charakterisierungsexperimente

Zielsetzung war es, die Expression und Aufreinigung der einzelnen PfCDPK1 Mutanten so zu optimieren, dass monomeres Protein höchster Reinheit (Monodispersität) bei größtmöglicher Ausbeute erhalten wurde.

Infolge der Erfahrungen, die bei der Expression und Aufreinigung von D212A gewonnen wurden, wurde ein Standardprotokoll erstellt, welches in mehr oder weniger unveränderter Form für die Gewinnung von rekombinantem Protein der unterschiedlichen PfCDPK1-Mutanten übernommen wurde. Grundsätzlich wurden für die Expression nur frisch transformierte *E. coli* des Stammes BL21 (DE3) verwendet. Nach Induktion mit 400 μ M IPTG erfolgte die Expression ÜN bei 18°C. Expressionstests bei unterschiedlichen Temperaturen (Daten nicht gezeigt) ergaben, dass so der Bildung von inclusion bodies (Einschlusskörpern) vorgebeugt und der Anteil an löslichem Protein erhöht werden konnte. Die Zellyse erfolgte in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren (Complete EDTA-free; Merck) durch Ultraschallbehandlung auf Eis. Nach Pelletierung der Zelltrümmer und der bakteriellen DNA, wurde der Überstand sofort auf eine Ni-NTA Affinitätschromatographiesäule (5 ml Säulenvolumen) geladen. Sowohl die Zellyse wie auch die Affinitätsreinigung erfolgten in Puffer A (50 mM Tris/HCl pH 7,4 / 500 mM NaCl / 10 mM Imidazol / 10 % Glycerol / 0,7 mM β -ME). Durch Erhöhung der NaCl-Konzentration von 300 auf 500 mM, sowie durch den Zusatz von 10% Glycerol konnte das Protein in Lösung stabilisiert werden. Die Säule wurde in 4 Schritten mit steigenden Mengen (0%, 8%, 12%, 16%) an Imidazol-haltigem Puffer B (Säulenpuffer + 500 mM Imidazol) gewaschen und mit 500 mM (100% Puffer B) Imidazol eluiert.

Da die Eluatfraktionen von N51-D212A C-His, wie aus der SDS-PAGE Analyse in Abb. 3.6 a.) ersichtlich ist, nach der Affinitätsreinigung noch Verunreinigungen und zusätzlich, wie die Gelfiltrationsanalyse zeigte, neben monomerem Protein noch größere Mengen an Dimeren bzw. Multimeren enthielten, wurde standardmäßig im Anschluss an die Affinitätschromatographie ein Gelfiltrationsschritt unter Ca^{2+} Ausschluss (EGTA-Puffer), wie im vorherigen Kapitel für die D212A Mutante beschrieben, durchgeführt. Da die Pufferbedingungen des Eluats der Affinitätschromatographie ungeeignet für die Gelfiltration sind, wurde das Protein zunächst ÜN in Gelfiltrationspuffer (GF-Puffer: 1 M NaCl / 20 mM Tris/HCl pH 7,4 / 2 mM EGTA / 2 mM CaCl_2 / 2% Glycerol / 0,7 mM β -ME) umdialysiert. Schließlich wurde dem GF-Puffer 10 mM EGTA zugesetzt, um die Ausbildung von Multimeren zu verringern (siehe Abschnitt 3.2.2.2.5).

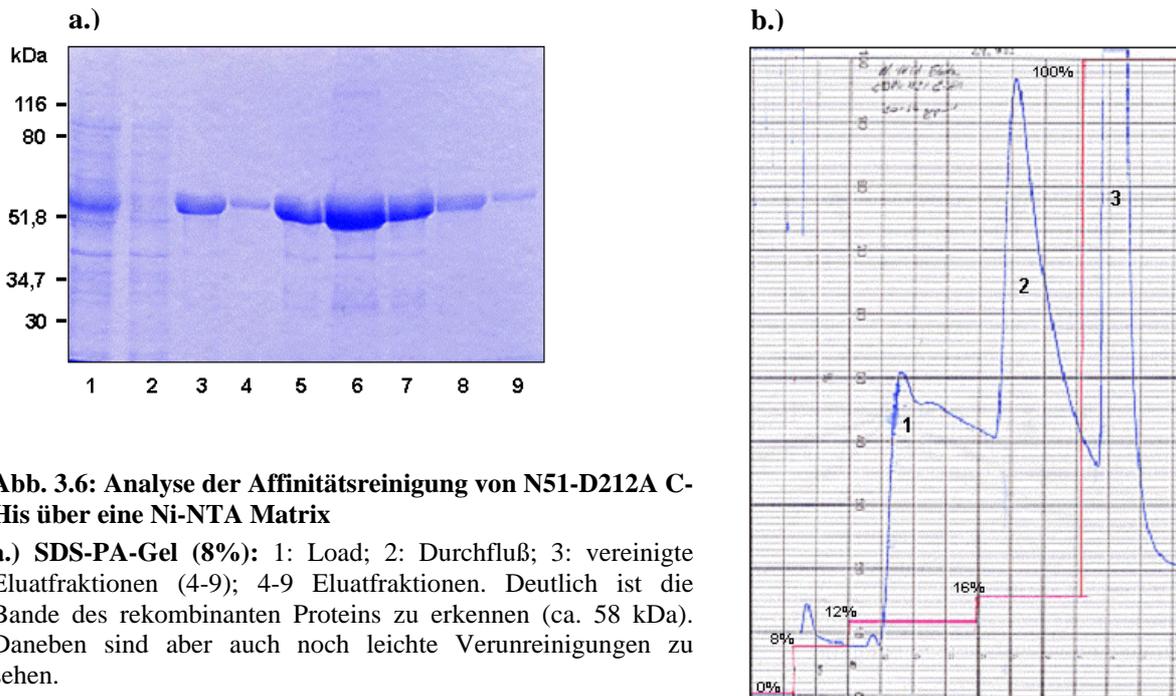


Abb. 3.6: Analyse der Affinitätsreinigung von N51-D212A C-His über eine Ni-NTA Matrix

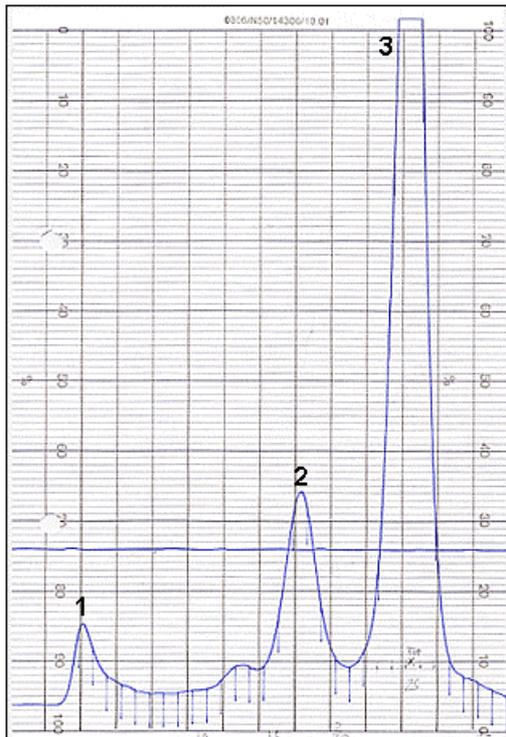
a.) SDS-PA-Gel (8%): 1: Load; 2: Durchfluß; 3: vereinigte Eluatfraktionen (4-9); 4-9 Eluatfraktionen. Deutlich ist die Bande des rekombinanten Proteins zu erkennen (ca. 58 kDa). Daneben sind aber auch noch leichte Verunreinigungen zu sehen.

b.) Elutionsprofil der Ni-Affinitätschromatographie (blau):

Papiervorschub: 1 mm/min; Pumpgeschwindigkeit 2 ml/min. Zunächst wurde mit 4 verschiedenen Imidazolkonzentrationen (rote Linie) ausgedrückt in %-Anteil an Puffer B (500 mM Imidazol) im Waschpuffer A (0%: 10 mM Imidazol, 8%: 49,2 mM Imidazol, 12%: 68,8 mM Imidazol, 16%: 88,4 mM Imidazol) gewaschen. Abschließend wurde N51-D212A C-His mit 100% Puffer B (500 mM Imidazol) eluiert. Die Peaks 1 + 2 stellen Verunreinigungen dar, 3 das Proteineluat.

Untersuchungen an PfCDPK1 haben gezeigt, dass eine Aktivierung der Kinase erst nach Bindung von zwei Ca^{2+} -Ionen erfolgt. Die für die Aktivierung erforderliche Konformationsänderung erfolgt ebenfalls erst nach Bindung des zweiten Ca^{2+} Ions (Zhao et al., 1994b). Aufgrund der Annahme, dass die Bindung eines Calcium-Ions sich möglicherweise strukturstabilisierend auswirken könnte, wurde dem Eluat der Ni-Säule zunächst 10 mM EGTA zur Komplexbildung von Ca^{2+} zugesetzt, letzteres aber bei der anschließenden Dialyse in GF-Puffer wieder eingeführt. Durch das Vorhandensein von äquimolaren Mengen an EGTA und Calcium wurde gewährleistet, dass es zu keiner Aktivierung der Kinase infolge zu hoher Ca^{2+} -Konzentrationen kommen konnte. Das Elutionsprofil der GF entspricht dem der D212A Mutante in 10 mM EGTA und ist durch einen hohen Anteil an monomerem und durch einen verhältnismäßig geringen Anteil an dimerem und multimerem Protein gekennzeichnet. Die SDS-PAGE- sowie DLS-Analyse der Monomer-Fractionen, sprechen außerdem für einen hohen Grad an Reinheit, Monodispersität (%Pd: 12,9) und eine geringe Multimerisierungsneigung (M_r 71 kDa; s. Abb. 3.8 a.).

a.)



b.)

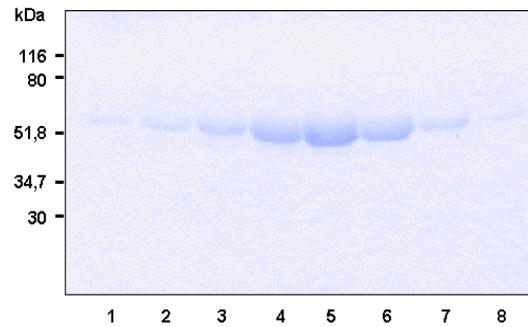
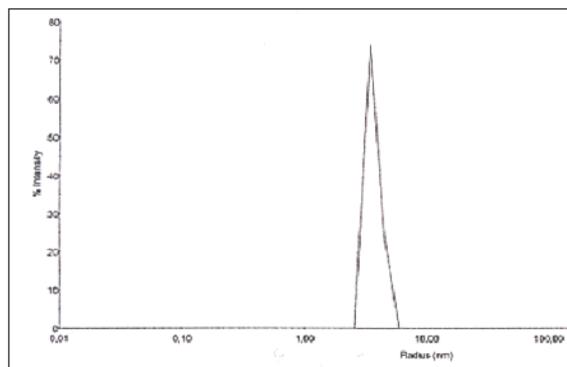


Abb. 3.7: Gelfiltration von N51-D212A C-His

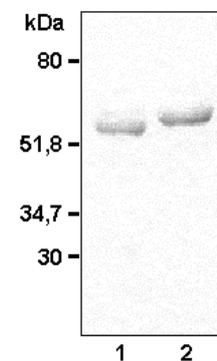
a.) Elutionsprofil der Gelfiltration von N51-D212A-C-His nach Standardprotokoll: 1: multimerer Proteinfraktion; 2: dimere Proteinfraktion; 3: monomere Proteinfraktion.

b.) SDS-PA-Gel (8%): 1-8: Peak 3, Fraktionen 21-28 der Gelfiltration von N51-D212A C-His.

a.)



b.)



	R (nm)	% Pd	M _r (kDa)
Peak 1	3,7	12,9	71

Abb. 3.8:

a.) **DLS-Analyse der Monomerenfraktion der Gelfiltration von N51-D212A C-His**

Die Aufreinigung erfolgte nach Standardprotokoll. Vor der Gelfiltration wurde Ca^{2+} durch Dialyse gegen 2 mM $\text{Ca}^{2+}/2$ mM EGTA in geringem Umfang wieder eingeführt. Die Werte der DLS-Messung (%Pd: 12,9; M_r: 71 kDa) sprechen für einen geringen Anteil an multimerem Protein und stellen eine deutliche Verbesserung gegenüber der D212A Mutanten dar.

b.) **TEV-Verdau von N51-D212A N-His in pETM-11**

Im SDS-PA-Gel (12%) ist deutlich die höhere elektrophoretische Mobilität der Probe, bei welcher der His-tag durch Verdau mit TEV-Protease abgespalten wurde (1) gegenüber dem unverdauten Protein (2) zu erkennen.

Erste Tests zur Expression und Aufreinigung zeigten, dass mit allen 4 Konstrukten das entsprechende rekombinante Protein erhalten werden konnte. Allerdings fiel die Ausbeute des N30-D212A Proteins, sowohl mit N- wie auch C-terminalem His-tag, stets deutlich geringer aus als die Ausbeuten der N51-D212A Mutanten. Bei diesen wurde in der Regel zwischen 8-12 mg Protein pro Liter Zellansatz für beide His-tag Varianten erhalten. Da für die Kristallisationsansätze relativ große Proteinmengen benötigt werden, wurden die N51-D212A den N30-D212A Mutanten vorgezogen und für die weiteren Versuche verwendet.

Im Gegensatz zur Mutante D212A, gelang es bei der Mutante N51-D212A N-His den N-terminalen His-tag durch die *TEV*-Protease abzuspalten (Abb. 3.8 b.). Jedoch besaß dieses Protein gegenüber N51-D212A C-His keine für die Kristallisation geeignetere Eigenschaften (Daten nicht gezeigt). Daher wurde, da durch den zusätzlichen *TEV*-Verdau Verluste bei der Ausbeute entstehen, für die Kristallisation und alle weitere Untersuchungen nur N51-D212A mit C-terminalem His-tag in pET-21a(+) verwendet.

Im Anschluss an die Gelfiltration wurden die Fraktionen mit monomerem Protein gepoolt und durch Konzentrierung im Centricon YM-30000 auf eine Konzentration von 15-20 mg/ml gebracht, wobei auch maximale Konzentrationen von über 43 mg/ml erreicht wurden.

3.2.3.3 Kristallisationsansätze mit N51 und N30

Zielsetzung dieses Teilprojektes war es Proteinkristalle von PfCDPK1 herzustellen, um mittels der Röntgenstrukturanalyse der Kristalle die dreidimensionale Struktur von PfCDPK1 aufzuklären.

Das Prinzip der Kristallisation beruht darauf, eine Proteinlösung durch langsame kontrollierte Änderung der Löslichkeit, meist durch den Entzug von Wasser, in den Zustand der Übersättigung zu bringen, so dass sich stabile Kristallisationskeime bilden können. Erfolgt dies zu rasch, kommt es statt dessen zur unkontrollierten Präzipitation und zur Entstehung eines amorphen Niederschlages anstelle von Kristallen. Deshalb kommt der Auswahl geeigneter Pufferbedingungen, insbesondere des pH-Wertes sowie der Art und Konzentration der zugesetzten Salze, ein entscheidender Stellenwert zu. Ein zu hoher oder zu niedriger pH-Wert führt durch erhöhte Proteinladung zu einer zu raschen und unkontrollierten Anlagerung der Proteinmoleküle und somit zum Präzipitieren des Proteins. Hohe Salzkonzentrationen schirmen Ladungen am Protein ab, verhindern so die Anlagerung der einzelnen Moleküle, während ein zu niedriger Salzgehalt wiederum unkontrollierte Aggregation zur Folge hat. Durch den Zusatz von Präzipitantien, meist Salze, organische Lösungsmittel, lang- oder kurzkettige Polymere (z.B. Polyethylenglycol (PEG) unterschiedlicher Kettenlänge) kann der Kristallisationsprozess beschleunigt werden. Präzipitantien wie Salze und PEG konkurrieren mit dem Protein um Wassermoleküle und dehydrieren es. Organische Lösungsmittel, aber auch PEG, modifizieren die dielektrischen Eigenschaften des Mediums. Auch die Temperatur hat einen starken Einfluss auf die Kristallisation, da sie die Löslichkeit von Proteinen in Abhängigkeit von dem

umgebenden Medium beeinflusst. Proteine in einer Lösung mit hohem Salzgehalt sind bei niedrigen Temperaturen löslicher, während die Löslichkeit von Proteinen in Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln oder Polymeren bei niedrigen Temperaturen geringer ist. Darüber hinaus ist die Diffusionsrate und die Gleichgewichtseinstellung bei niedrigen Temperaturen herabgesetzt (Michel, 1990).

Proteinkinasen bestehen aus einer hochkonservierten Kernstruktur, die aus 2 Domänen aufgebaut ist. Diese Domänen sind durch einen Peptidstrang, den sog. Linker miteinander verbunden. Dieser Linker bindet den Adeninanteil des ATPs und dient außerdem als eine Art Gelenk, was den Domänen ermöglicht, sich gegeneinander zu verschieben, ohne dass die Sekundärstruktur der Proteinkinase dazu aufgehoben werden muss. Die Kristallisation von Proteinkinasen ist aufgrund ihrer flexiblen Strukturelemente erfahrungsgemäß sehr schwierig. Der Linker ist einer der Gründe für die extreme Flexibilität dieser Enzyme. Aufgrund dieser Flexibilität gelang die Kristallisation von Proteinkinasen häufig nur durch Zugabe von strukturstabilisierenden Agenzien, wie Inhibitoren oder Substratanaloga (Goldberg et al., 1996; Lowe et al., 1997; Schindler et al., 1999).

So wurden auch bei PfCDPK1 zahlreiche Versuche unternommen, die Bedingungen für eine Kristallisation zu optimieren. Grundsätzlich wurde das Protein jeder Aufreinigung für Kristallansätze verwendet, sofern nicht mehr als eine Woche zwischen Aufreinigung und Gebrauch vergangen war. Die Mutante N51-D212A mit C-terminalem His-tag wurde dabei aufgrund der guten Proteinausbeute und der vielversprechenden Daten der GF und DLS, dem systematischsten und umfangreichsten Screening unterzogen. Der Großteil der Kristallansätze erfolgte bei 4°C. Vielversprechende Kristallisationsbedingungen wurden auch bei RT wiederholt.

Begonnen wurde meist mit einem sog. Kristallisationskit (z.B. Wizard I + II), einer kommerziell erhältlichen Auswahl verschiedener Kristallisationsbedingungen, welche sich hinsichtlich pH, Präzipitans und Salzgehalt unterscheiden. Die Resultate aus solchen sog. Sparse Matrix Screenings geben Aufschlüsse über das Verhalten des Proteins unter spezifischen Bedingungen. Ausgehend von diesen Ergebnissen werden Bedingungen, bei denen das Protein trotz Präzipitans in Lösung blieb, graduell verändert, um sie langsam in einen Zustand der Übersättigung, in welchem Kristallisation stattfinden kann, zu überführen. Besonders aussichtsreich erschien die Austestung verschiedener Konzentrationen an Salzen wie Ammoniumsulfat bzw. -phosphat, NaK-Tartrat oder Na-Citrat im pH Bereich von 5,5-8,0. Durch den Zusatz lyotroper Salze wie Li_2SO_4 oder niedermolekularer Alkohole wie Isopropanol konnte die Präzipitation beschleunigt werden. Meist wurden die Komponenten in einer ansteigenden Konzentrationsreihe verwendet, die den Konzentrationsbereich zwischen löslichem Protein und Präzipitation abdeckte.

Zusätzlich wurde versucht die Wahrscheinlichkeit der Kristallisation durch die Zugabe von Strukturstabilisierenden Agentien, die im aktiven Zentrum der Kinase binden, zu erhöhen. Verwendet wurden der Kinaseinhibitor Staurosporin, der mit einer IC_{50} von 60 nM gegenüber PfCDPK1 den derzeit

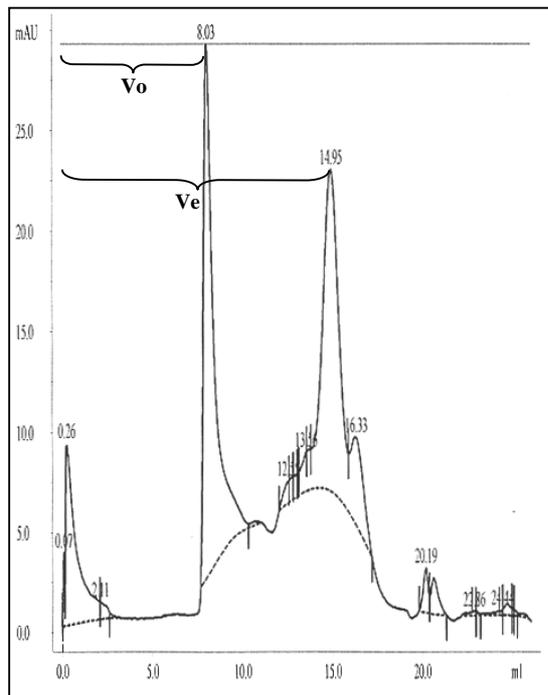
wirksamsten Inhibitor der PfCDPK1 Kinaseaktivität darstellt (Kappes, unveröffentlichte Ergebnisse), das nicht hydrolysierbare Nucleotid-Analogon Adenylyl-Imidodiphosphat (AMP-PNP) sowie AMP und ADP. Die Substanzen wurden dabei in leichtem Überschuß, gemessen an der Proteinkonzentration, eingesetzt.

Trotz einer enormen Vielzahl von Kristallansätzen bei unterschiedlichsten Kristallisationsbedingungen und erfolgversprechender Daten durch DLS und Gelfiltration, gelang es bis zum Ende dieser Arbeit nicht, PfCDPK1 oder eine ihrer Varianten kristallin darzustellen. Aus diesem Grunde werden auch die einzelnen Kristallisationsbedingungen hier nicht weiter ausgeführt.

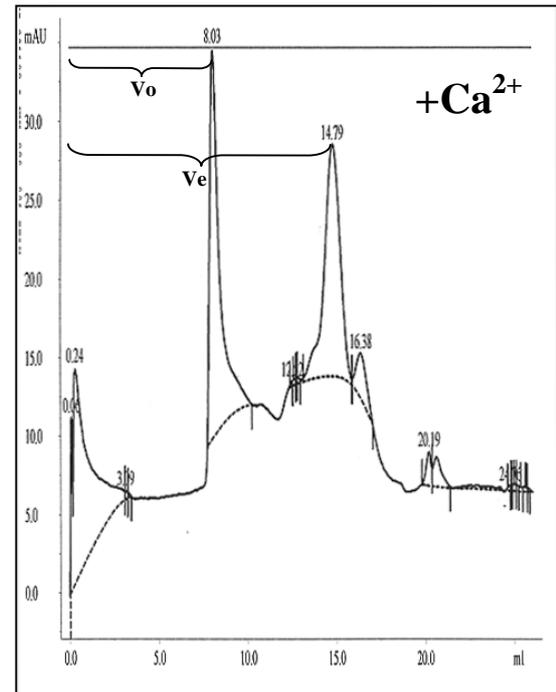
3.2.4 Der Einfluss von Ca^{2+} auf die Konformation und die apparente Größe von PfCDPK1

Bei der Gelfiltration oder auch Größenausschlusschromatographie können Moleküle innerhalb eines definierten Rahmens aufgrund von Größenunterschieden voneinander getrennt werden. Größere Moleküle durchlaufen die Gelmatrix dabei schneller als kleinere, wobei weniger das Molekulargewicht als vielmehr die äußeren Abmessungen ausschlaggebend sind. Verändert ein Protein seine Konformation, z.B. PfCDPK1 nach Aktivierung durch Ca^{2+} , und wird dadurch voluminöser oder kompakter, ist dies aufgrund veränderter Retentionszeiten messbar. Aus diesem Grunde wurde das Laufverhalten von N51-WT C-His in Anwesenheit von 10 mM Ca^{2+} oder 10 mM EGTA bzw. unter Standard-GF-Puffer-Bedingungen (1 M NaCl / 20 mM Tris/HCl pH7,4 / 2% Glycerol / 0,7 mM β -ME) mittels einer analytischen GF-Säule vom Typ Superdex[®] 200 HR 10/30 (Amersham Pharmacia) untersucht. Dabei wurde das Eluat einer Ni-Affinitätsaufreinigung mit einer Proteinkonzentration von 8,2 mg/ml zunächst ÜN in GF-Puffer ohne EGTA oder Ca^{2+} dialysiert. Im Anschluss wurde der Ansatz filtriert, gedrittelt und je ein Drittel mit 10 mM CaCl_2 bzw. 10 mM EGTA versetzt. Von jedem dieser Ansätze wurden 3 Proben zu je 200 μl auf der GF-Säule vermessen, wobei der jeweilige GF-Puffer dieselben Zusätze enthielt.

a.)



b.)



c.)

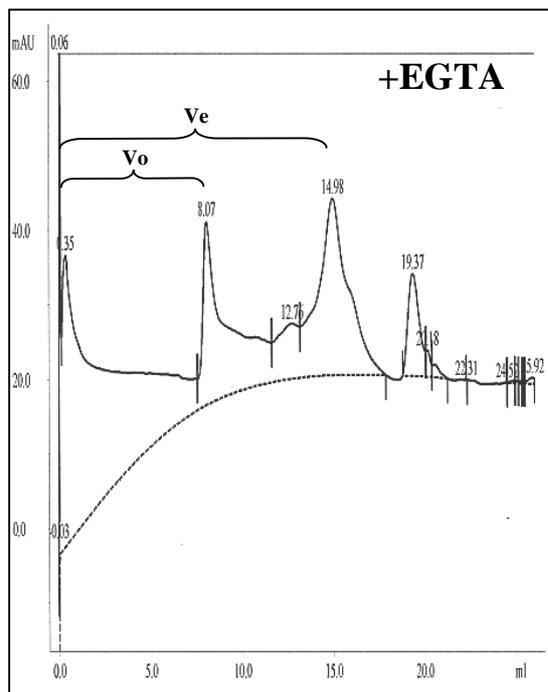


Abb. 3.9: Elutionsprofile der Gelfiltration zur Ermittlung der apparenten Größe von N51-WT C-His bei unterschiedlichen Pufferbedingungen

Auf der Ordinatenachse ist die Absorption des Eluats bei 280 nm aufgetragen, auf der Abszisse das Elutionsvolumen. Die entsprechenden Gelläufe wurden 3 mal wiederholt. Anhand der Elutionsvolumina V_e wurde das apparente Molekulargewicht mittels einer Eichgeraden bestimmt und der Mittelwert aus den 3 Messungen gebildet. Für jede Pufferbedingung ist hier repräsentativ ein Gellauf dargestellt.

a.): Gelpuffer ohne Zusätze (Messung 2)

b.): Gelpuffer + 10 mM Ca^{2+} (Messung 3)

c.): Gelpuffer + 10 mM EGTA (Messung 1)

Bei näherer Betrachtung kann man deutliche Gemeinsamkeiten der Elutionsprofile aller 9 Messungen feststellen (Abb. 3.9). Zum einen ist deutlich der Multimerenpeak im Bereich von 8 ml Elutionsvolumen, was in etwa dem Totvolumen der Säule entspricht, zu sehen, zum anderen der Peak der monomeren Kinase im Bereich von 15 ml. Zur genauen Auflösung des Peaks der dimeren Kinase

ist die Trennleistung der Säule nicht ausreichend. Ein Peak im Bereich 19,36 ml, welcher bei zwei Proben auftrat, ist das Resultat einer Kontamination der Einspritzvorrichtung durch Proteasen.

Die Elutionsvolumina der Monomerenpeaks der einzelnen Pufferbedingungen unterschieden sich geringfügig. Um genauere Aussagen treffen zu können, wurde das apparente Molekulargewicht (M_a) anhand einer mittels definierter Größenmarker (Gel filtration molecular weight markers 12.4 - 200 kDa: Sigma) für diese Säule erstellten Eichgeraden aus dem Elutionsvolumen V_e des monomeren Proteins sowie dem Totvolumen V_o der Säule berechnet. Durch lineare Regression ergab sich für die Geradengleichung folgende Funktion: $\log M_a = 5,1601 - 1,8919 \times (V_e/V_o)$. Das Totvolumen der Säule V_o betrug 8,16 ml.

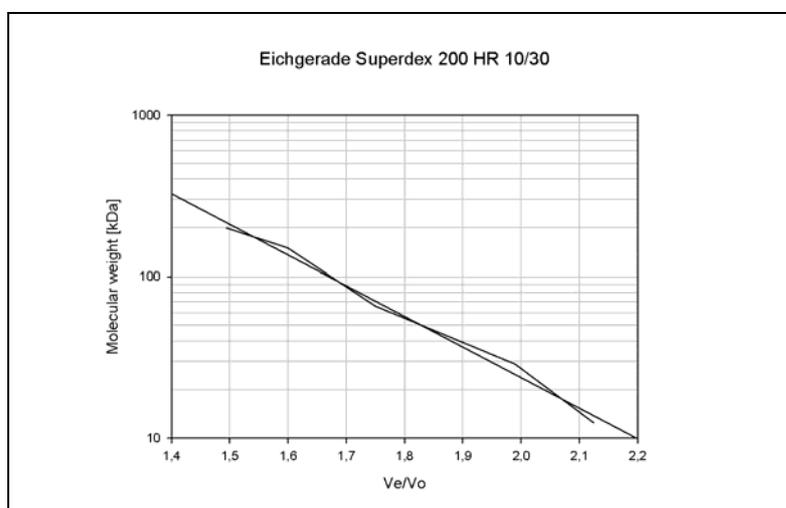


Abb. 3.10: Eichgerade der Superdex 200 HR 10/30 Gelfiltrationssäule

Probe	Messung 1 V_e [ml]	Messung 2 V_e [ml]	Messung 3 V_e [ml]	Messung 1 M_a [kDa]	Messung 2 M_a [kDa]	Messung 3 M_a [kDa]	Mittelwert M_a [kDa]
N51	14,95	14,95	14,95	49,43	49,43	49,43	49,43
N51+Ca ²⁺	14,78	14,83	14,79	54,13	52,70	53,84	53,56
N51+EGTA	14,98	14,98	14,97	48,64	48,64	48,90	48,73

Tabelle 3.5: Zusammenstellung der Elutionsvolumina V_e aus der Gelfiltrationsanalyse von N51 C-His und das daraus errechnete apparente Molekulargewicht M_a .

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, bewirkt die Anwesenheit von Ca²⁺ im „normalen“ Gelfiltrationspuffer eine deutliche Zunahme des M_a um 4 kDa, welche nicht alleine durch die Bindung von Ca²⁺ (Zunahme von maximal 0.160 kDa) begründet werden kann. Noch deutlicher wird der Unterschied wenn man die EGTA enthaltende Probe, in welcher das Ca²⁺ durch Komplexbildung gänzlich entfernt wurde, mit der des Ca²⁺ beladenen Proteins vergleicht. Hier beträgt die Differenz ca.

5 kDa. Da sich die Molekülmasse an sich nicht ändern kann, erfolgt die scheinbare Vergrößerung durch eine Volumenzunahme infolge einer Konformationsänderung der Kinase. Die ermittelten Molekulargewichte korrelieren recht gut mit dem tatsächlichen Molekulargewicht von N51-WT C-His, welches bei 56,5 kDa liegt. Die Abweichungen zeigen, dass bei der Gelfiltration von Proteinen das Laufverhalten weniger vom Molekulargewicht als vielmehr von der räumlichen Ausdehnung des Moleküls abhängig ist.

3.2.5 Charakterisierung der Autophosphorylierung von PfCDPK1 über Ionenaustauschchromatographie

Die während der Expression in *E. coli* beobachtete Autophosphorylierung von PfCDPK1 könnte für dessen Struktur mitbestimmend sein. Ähnlich wie für CaMK 1, cAPK oder CDK gezeigt werden konnte, könnten Phosphorylierungen im Innern der Kinase strukturbildende Aufgaben übernehmen und bestimmte Konformationen begünstigen (Goldberg et al., 1996; Goldsmith und Cobb, 1994; Taylor und Radzio-Andzelm, 1994). Zielsetzung dieses Teilprojektes war es, das autophosphorylierte Protein wieder soweit zu dephosphorylieren, dass schwer zugängliche Phosphorylierungsstellen im Innern des Proteins, die nach unsere Hypothese eine strukturbildende oder unterstützende Funktion haben könnten, erhalten bleiben. So sollte eine einheitlich phosphorylierte Proteinspezies mit besseren Kristallisationseigenschaften als die bisher verwendeten rekombinanten Proteine hergestellt werden.

Zur Aufreinigung der unterschiedlichen Phosphorylierungsspezies wurde die Ionenaustauschchromatographie gewählt, da hier die Aufenthaltsdauer in der stationären Phase und somit die Auftrennung abhängig ist vom Ladungszustand des Probenmoleküls. Es wurde eine Kationenaustauschersäule, RESOURCE[®]-S (Pharmacia; S-Säule), mit einem Säulenvolumen von 1 ml eingesetzt. Die Einführung einer Phosphatgruppe in ein Protein bedingt eine Zunahme der negativen Ladung um zwei Einheiten. Dies schwächt die Bindung zur ebenfalls negativ geladenen Säulenmatrix, so dass höher phosphorylierte Proteine früher von der Säule eluiert werden. Durch Auswahl geeigneter Elutionsbedingungen können die einzelnen Spezies aufgetrennt werden.

Für das Experiment wurde die N51-D212A C-His Mutante in den katalytisch aktiven Zustand zurückmutiert. Hierzu wurde ein 800 bp BsrG I/Nsi I Fragment, das die Mutation trägt, aus der N51-D212A C-His Mutante ausgeschnitten und durch das entsprechende Fragment aus dem WT-Gen ersetzt (N51-WT C-His).



Abb. 3.11: Schematische Darstellung des katalytisch aktiven N51-WT C-His Konstruktes

Die katalytisch aktive Form wurde durch den Austausch eines ca. 800 bp BsrG I/Nsi I Restriktionsfragmentes, welches die Mutation enthält, durch ein entsprechendes Fragment aus WT-PfCDPK1 hergestellt.

Expression und Affinitätsreinigung erfolgte wie bei der katalytisch inaktiven Variante. Bei der Ionenaustauschchromatographie werden Proteine durch kompetitive Verdrängung mit hohen Konzentrationen an gleichsinnig geladenen Ionen, in der Regel Na^+ bei Kationen- und Cl^- bei Anionenaustauschersäulen eluiert. Damit ist der Puffer, in dem sich das Eluat der Ni-NTA Säule befindet, mit seinem hohen Salzgehalt für eine Bindung des Proteins an die S-Matrix ungeeignet. Dieser enthält 500 mM NaCl und 500 mM Imidazol, was eine Bindung des Proteins an die S-Säule verhindern würde. Außerdem liegt sein pH mit 7,4 nicht im optimalen Bindungsbereich des Proteins von mind. einer pH Einheit unter dem isoelektrischen Punkt, der theoretisch errechnet bei 6,8 liegt. Um eine Bindung an die S-Matrix zu ermöglichen, wurde das Protein deshalb auf MES-A Puffer, welcher nur noch 20 mM NaCl und einen pH-Wert von 6,0 besitzt, umgepuffert. Eine weitere Reduzierung des pH war nicht möglich, da die Proteinlösung zunehmend instabil wurde und präzipitierte. Das Protein wurde ohne vorherige Aufkonzentrierung auf die Säule geladen und mit steigenden Mengen an NaCl-haltigem Säulenpuffer (MES-B: 1M NaCl) eluiert. Der Verlauf der Eluierung des Proteins wurde anhand von Absorptionmessungen des Durchflusses dokumentiert. Um die Auftrennung zu verbessern, wurde der NaCl-Gradient im Bereich des erwarteten Absorptionspeaks des Proteins sehr flach, d.h. verteilt über 80 Säulenvolumen (SV), gefahren.

Zunächst wurde eine unbehandelte Probe auf der S-Säule aufgetrennt. Vorausgegangene Testläufe ließen die Elution des Proteins im Bereich zwischen 10% und 30% Puffer B (120-320 mM NaCl) erwarten, weshalb der Gradient im Bereich von 7-35% Puffer B sehr flach angesetzt wurde (75 SV). Anhand des Elutionsprofils (Abb. 3.12), welches mehrere ineinander übergehende Peaks aufweist, kann man erkennen, dass es sich bei dem aufgereinigten Protein tatsächlich um ein Proteingemisch mit unterschiedlichen Ladungszuständen handelt. Die Elution erfolgte ab einem Puffer B Gehalt von ca. 17% ($V_e = 50 \text{ ml}$), was ca. 190 mM NaCl entspricht.

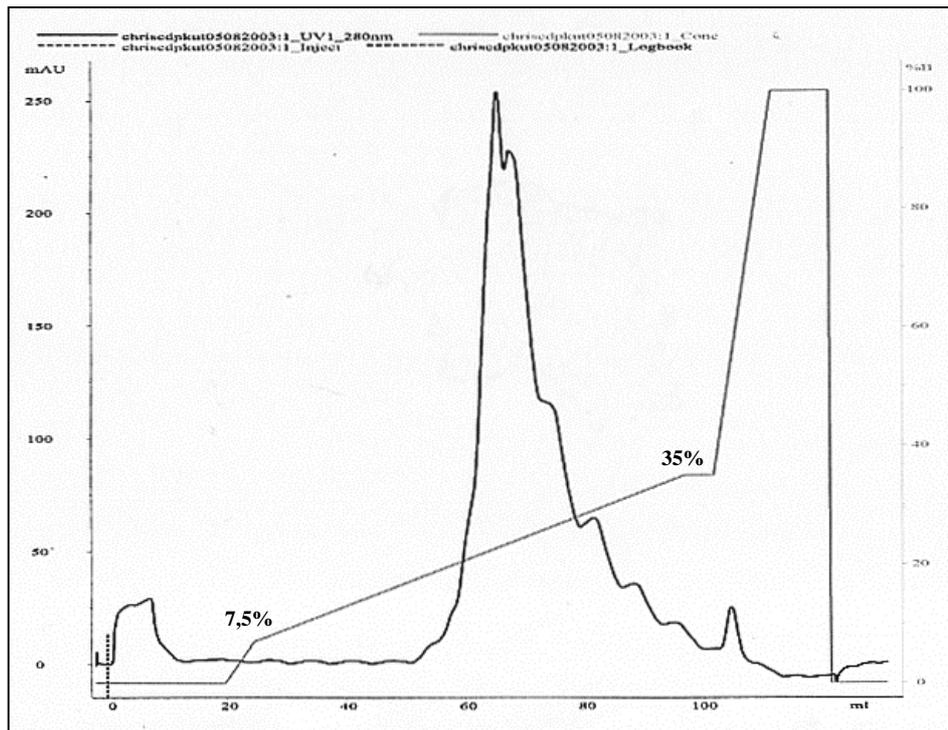


Abb. 3.12: Elutionsprofil der ionenaustauschchromatographischen Auftrennung der katalytisch aktiven N51 Variante (N51-WT C-His)

Der Verlauf der Elution (schwarze Linie) ist anhand der Lichtabsorption des Eluats bei 280 nm dargestellt (linker Schenkel: Einheit Absorptionseinheit $\times 10^{-3}$ [mAU]). Die graue Linie gibt den Verlauf des NaCl-Gradienten in % Puffer B (1 M NaCl) an (rechter Schenkel). Auf der Abszisse ist das Elutionsvolumen (V_e) in ml angegeben).

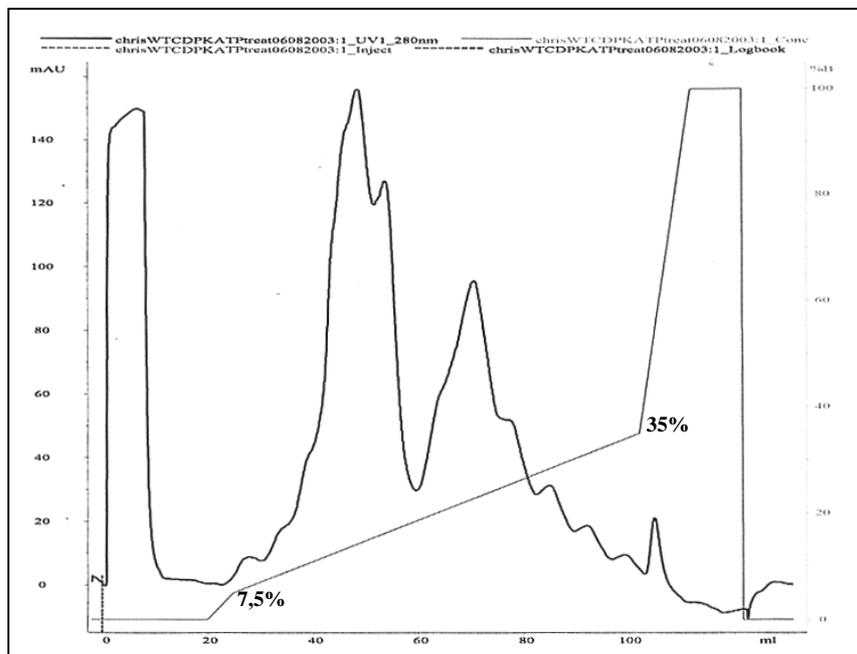
Um nachzuweisen, dass die unterschiedlichen Ladungszustände der Kinase, auf unterschiedliche Phosphorylierungszustände zurückzuführen sind, wurde N51-WT C-His einerseits durch Zugabe von ATP hyperphosphoryliert, andererseits durch einen Phosphataseverdau dephosphoryliert. Das Laufverhalten der so behandelten Proben wurde mit dem der unbehandelten Probe verglichen.

Die zu autophosphorylierende Probe wurde im Anschluss an die Dialyse in MES A-Puffer mit 50 mM ATP, 1 mM $MgCl_2$ und 10 mM $CaCl_2$ versetzt und zunächst 6 h bei RT, dann ÜN bei 4°C inkubiert, um die während der Expression in *E. coli* noch unphosphoryliert gebliebenen Phosphorylierungsstellen zu autophosphorylieren. Das hyperphosphorylierte Protein sollte aufgrund der Zunahme an negativer Ladung weniger stark an die S-Matrix gebunden werden und somit früher eluieren, was sich auch in einem veränderten Elutionsprofil widerspiegeln sollte.

Die Dephosphorylierung von N51-WT C-His erwies sich als schwierig. Die verwendete λ -Phosphatase arbeitet bei relativ niedrigen Salzkonzentrationen (50 mM NaCl) und hat eine empfohlene Reaktionstemperatur von 30°C. Unter diesen Bedingungen fielen bis zu 70% des gelösten N51-WT C-His Proteins aus. Durch Verdünnen der Proteinlösung auf maximal 1 mg/ml sowie Glycerolzugabe (10%) konnte jedoch der Verlust auf maximal 20% reduziert werden (siehe Methodenteil). Im Anschluss an die Affinitätsreinigung wurde das Eluat zunächst ÜN in

Phosphatasepuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 10% Glycerol, 0,7 mM β -ME, 0,1 mM EDTA) umdialysiert. Nach Zugabe von 400 U/ml λ -Phosphatase sowie 2 mM MnCl_2 wurde die Reaktion für 3 h bei 30°C inkubiert und anschließend für die Ionenaustauschchromatographie wieder in MES-A umdialysiert. Abb. 3.13 zeigt die Elutionsprofile des hyperphosphorylierten bzw. dephosphorylierten N51- WT C-His Proteins. Das hyperphosphorylierte Protein (Abb. 3.13 a.) zeigt im Bereich $V_e = 60\text{--}100$ ml (18-35% Puffer B entsprechend 196-363 mM NaCl) mehrere Peaks, deren Struktur und Retention stark dem Elutionsprofil der unbehandelten Probe ähnelt. Zusätzlich erscheinen > 5 ineinander laufende Peaks hoher Intensität im Bereich von $V_e = 22\text{--}60$ ml (7,5–18% Puffer B entsprechend 93-196 mM NaCl). Da die Elution bei niedrigeren Salzkonzentrationen erfolgt, muss das Protein zusätzliche negative Ladungen enthalten. Laut unserer Hypothese entsprechen diese früher eluierenden Spezies dem hyperphosphorylierten Protein. Ein großer Teil des Proteins wurde unter den verwendeten Bedingungen weiter phosphoryliert, allerdings nicht vollständig und nicht einheitlich, wie aus der hohen Anzahl der Peaks (> 15) zu ersehen ist. Im Gegensatz dazu eluiert das dephosphorylierte Protein deutlich später ($V_e = 50$ ml), nämlich ab einem Puffer B Anteil von 32% (334 mM NaCl; Abb.3.13 b.). Eine vollständige Dephosphorylierung konnte unter den gewählten Bedingungen nicht erreicht werden, wie man an der Breite des Elutionspeaks, welcher aus mehreren nicht genauer aufgelösten Einzelpeaks besteht, erkennen kann.

a.)



b.)

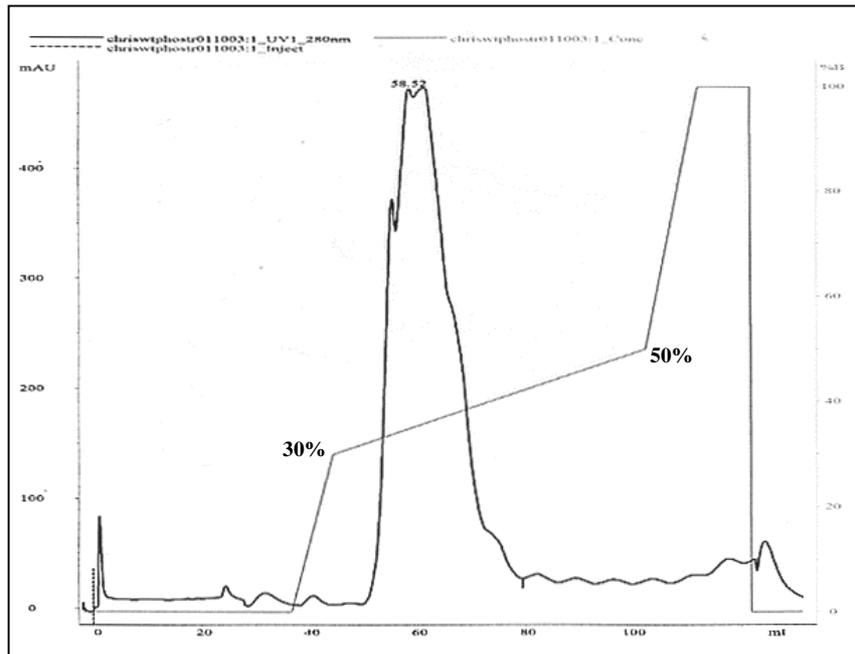


Abb. 3.13: Elutionsprofil der ionenaustauschchromatographischen Auftrennung der katalytisch aktiven N51 Variante (WT-N51 C-His)

a.) nach Hyperphosphorylierung, b.) nach Dephosphorylierung.

Der Verlauf der Elution (schwarze Linie) ist anhand der Lichtabsorption des Eluats bei 280 nm dargestellt (linker Schenkel: Einheit Absorptionseinheit $\times 10^{-3}$ [mAU]). Die graue Linie gibt den Verlauf des NaCl-Gradienten in % Puffer B (1 M NaCl) an (rechter Schenkel). Auf der Abszisse ist das Elutionsvolumen in ml angegeben).

Durch längere Verdauzeiten mit der λ -Phosphatase von bis zu 16 h bei 30°C konnte die Anzahl der Peaks noch weiter auf 3-4 reduziert werden (siehe Abb.3.14 a.), jedoch scheint eine vollständige Dephosphorylierung des Proteins nicht möglich zu sein.

Ein Vergleich der Elutionsprofile der katalytisch inaktiven N51-D212A C-His Mutante, welche nicht phosphoryliert sein sollte, und des dephosphorylierten N51-WT C-His Proteins zeigt deutliche Übereinstimmungen (siehe Abb. 3.14). Beim Elutionsprofil der N51-D212A C-His Mutante treten ebenfalls 3 dicht beieinander liegende Einzelspitzen auf (N51-WT: Peak 1-3 V_e = 40-50 ml; N51-D212A: Peak 1-3 V_e = 70-90 ml), die in einem ähnlichem Größenverhältnis wie die des dephosphorylierten N51-WT-C-His Proteins zueinander stehen (Peak 2 > 3 > 1). In beiden Fällen beginnt die Elution bei einer Salzkonzentration von etwa 26% Puffer B (275 mM NaCl). Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass sich die Mengen an eingesetztem Protein deutlich unterscheiden. 1200 mAU bei N51-WT C-His entspricht ca. 7 mg Protein, wohingegen von der N51-D212A-C-His Mutante erheblich weniger Protein eingesetzt wurde (45 mAU). So ist ein direkter Vergleich nur bedingt möglich. Im Elutionsprofil der N51-D212A C-His Mutante (Abb. 3.14 b.) sind ab einem Elutionsvolumen von 90 ml mehrere kleine Peaks zu erkennen. Die Tatsache, dass die Absorptionswerte in diesem Bereich sehr klein sind (< 5 mAU) und sich auch in den Bereich fortsetzen

in dem der Elutionspuffer eine NaCl-Konzentration von 1 M enthält, spricht dafür, dass diese Absorptionsspitzen das Resultat von Druckschwankungen im Gerät sind und nicht von unterschiedlichen Proteinspezies herrühren.

Die leichte Verschiebung des Elutionsbeginns der dephosphorylierten N51-WT C-His Probe in Abb. 3.14 a.) zu niedrigeren Salzkonzentrationen im Vergleich zu der unter 3.12 beschriebenen dephosphorylierten Probe, ist auf eine geringfügige Veränderung des Protokolls zurückzuführen. Um einen Dialyseschritt einzusparen und somit einem unnötigem Verlust von Protein vorzubeugen, wurden die Probe im Anschluss an den Phosphataseverdau zunächst von 50 mM NaCl auf 35 mM verdünnt, um eine ausreichende Bindung an die Säule zu gewährleisten und dann direkt auf die S-Säule geladen. Die N51-D212A C-His Probe wurde im Anschluss an die Ni-Affinitätsreinigung zunächst in 50 mM Tris pH 7,5 / 50 mM NaCl / 10% Glycerol / 0,7 mM β -ME umdialysiert, dann vor dem Laden auf die S-Säule mit Säulenpuffer A auf 35 mM NaCl verdünnt. Statt 50 mM MES pH 6,0 enthielt der Säulenpuffer A bzw. B in beiden Fällen 50 mM Tris/HCl pH 7,5, so dass die Elution aufgrund des höheren pH Wertes etwas früher erfolgte (26% Puffer B statt 32%).

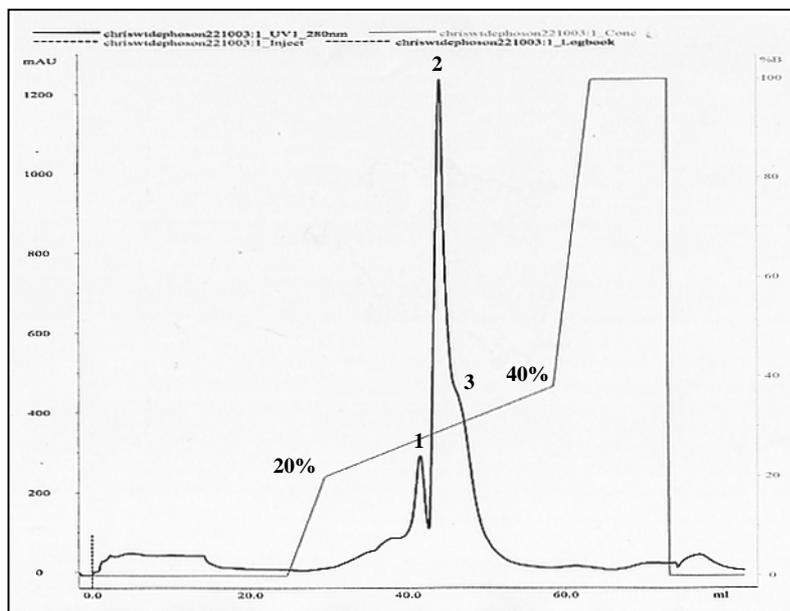
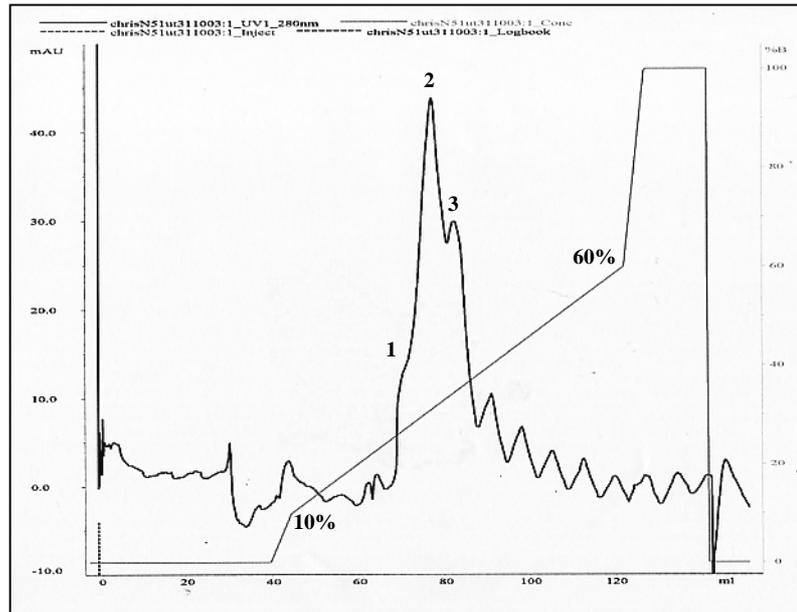


Abb. 3.14 a.): Elutionsprofil der ionenaustauschchromatographischen Auftrennung der katalytisch aktiven N51-WT C-His Mutante nach Dephosphorylierung unter modifizierten Bedingungen

Deutlich sind die drei dicht beieinander liegenden Elutionsspitzen (1-3) zu erkennen, welche ab etwa einer Konzentration von 26% Puffer B eluieren.

Abb.3.14 b.): Elutionsprofil der Ionenaustauschchromatographischen Auftrennung der katalytisch inaktiven N51-D212A C-His Mutante

Das Profil ähnelt stark der dephosphorylierten N51-D212A Mutante. Auch hier sind drei dicht beieinander liegende Elutionsspitzen (1-3), die ab etwa 26% Puffer B eluieren, zu sehen. Der Verlauf der Elution (schwarze Linie) ist anhand der Lichtabsorption des Eluats bei 280 nm dargestellt (linker Schenkel: Einheit Absorptionseinheit $\times 10^{-3}$ [mAU]). Die graue Linie gibt den Verlauf des NaCl-Gradienten in % Puffer B (1 M NaCl) an (rechter Schenkel). Auf der Abszisse ist das Elutionsvolumen in ml angegeben).



Die Ergebnisse zeigten, dass eine weitere Dephosphorylierung der Kinase bei verlängerter Inkubationszeit möglich ist. Es sind aber immer noch deutlich drei individuelle dicht beieinander liegende Elutionsspitzen zu erkennen (Abb. 3.14 a.) 1-3), was für das Vorhandensein mindestens dreier unterschiedlich geladener Proteinspezies spricht. Die Tatsache, dass die katalytisch inaktive N51-D212A C-His Mutante, die nicht in der Lage ist sich zu autophosphorylieren, ein ähnliches Elutionsprofil aufweist (Abb. 3.14 b.), lässt den Schluss zu, dass es sich hierbei nicht unbedingt um unterschiedlich phosphorylierte Proteinspezies handelt. Weitere Aufschlüsse können hier nur eine massenspektroskopische Auswertung der einzelne Peakfraktionen bringen.

3.3 Charakterisierung der Membranverankerung und Zielgebung von PfCDPK1

PfCDPK1 ist meist in Verbindung mit Membranen anzutreffen. Bei differentiellen Zellfraktionierungsexperimenten konnte sie in der Membran- und Organellfraktion des Parasiten nachgewiesen werden. In immunelektronenmikroskopischen Aufnahmen fand man sie in Verbindung mit der Membran der parasitophoren Vakuole (PVM), dem tubovesikulären System (TVS), sowie an der Oberfläche der parasitären Plasmamembran (PM) und intraparasitärer Vakuolen. Bisher ist ungeklärt, wie der Transport der Kinase in die exoparasitären Kompartimente, wie z.B. der PV oder des TVS erfolgt, da eine typische Signalsequenz für den sekretorischen Weg des Proteinexports bei PfCDPK1 fehlt. Die Analyse des N-Terminus von PfCDPK1 führte zu der Hypothese, dass die

Zielgebung statt dessen durch die Acylierung, insbesondere die Palmylierung, N-terminaler AS erfolgen könnte.

Ziel dieser Untersuchungen war es deshalb, die Mechanismen, die für die Membranverankerung von PfCDPK1 verantwortlich sind, aufzuklären und Hinweise über mögliche Zielgebungssignale im N-Terminus der Kinase zu gewinnen.

3.3.1 Einführung von Punktmutationen und Generierung von Deletionsmutationen in PfCDPK1

PfCDPK1 enthält an seinem N-terminalen Ende drei Sequenzmotive, welche für die Membranverankerung sowie Zielgebung der Kinase von entscheidender Bedeutung zu sein scheinen: Dies sind zum einen zwei Acylierungssignale, ein Glycin in Position 2, welches als Anknüpfungspunkt für eine Myristylierung dienen kann und ein Cystein in Position 3, welches durch eine Thioesterbindung mit Palmitinsäure modifiziert werden kann, zum anderen ein benachbartes Cluster an basischen Aminosäuren (MGCSQSSNVKDFKTRRSKFNT). Um die postulierte Bedeutung dieser AS-Motive zu bestätigen, wurde eine Reihe von PfCDPK1-Mutanten hergestellt, bei denen eines oder mehrere dieser Motive durch Punktmutation oder Deletion entfernt wurden. Die Einführung der Mutationen erfolgte mittels ortsspezifischer Mutagenese (site directed mutagenesis) durch PCR (Papworth, 1996). Hierfür wurden spezielle Primer entworfen, welche die gewünschte Mutation, flankiert von jeweils 15-18 Nukleotiden, enthalten. Es werden zwei Primer benötigt, welche an dieselbe Sequenz jedoch auf dem jeweils gegenüberliegenden Strang binden und somit komplementär zueinander sind (Primer: *PfCDPK_VG2.fwd/-rev*, *PfCDPK_AC3.fwd/-rev*, *PfCDPK_VG2AC3DM.fwd/-rev*, *PfCDPK_Δ10-20.fwd/-rev*, *Val_deltaprimer.fwd/-rev*, *Ala_deltaprimer.fwd/-rev*, *DM_deltaprimer.fwd/-rev*). Das Glycin in Position 2 wurde durch die Änderung des Codons GGG zu GTG durch Valin ersetzt. Das Cystein in Position 3 wurde durch die Änderung des Codons TGT zu GCT durch ein Alanin ausgetauscht. Die Primer für die Deletionsmutante Δ10-20 binden zu beiden Seiten der zu deletierenden 33 bp, welche für die AS 10-20 codieren. Die Ursprungs DNA bildet dadurch an dieser Stelle eine Schleife (Loop) aus, wird quasi überlesen und schließlich durch *Dpn* I verdaut. Als Template für die PCR diente cDNA von PfCDPK1 in pBSKS+, bzw. die fertige Δ10-20 Mutante in pBSKS+ für die drei Deletionsmutanten ValΔ, AlaΔ und DMA. Die Mutagenesereaktion erfolgte wie unter Methoden beschrieben.

Die Reaktionsprodukte wurden nach der Reinigung durch Alkoholfällung in den *E. coli*-Stamm XL-1 blue (Stratagene) transformiert. Von den so erhaltenen Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert, mittels Restriktionsverdau linearisiert und durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Dabei zeigte sich jeweils eine Bande bei ca. 4500bp, was der erwarteten Länge des linearen Plasmids entsprach. Ursprünglich sollte durch die mutagenen Primer auch eine *Dra* I Schnittstelle während der PCR deletiert werden, um die erfolgreiche Mutation mittels Restriktionsverdau nachweisen zu können. Dies

gelang jedoch nur bei den Deletionsmutanten $\Delta 10-20$, Val Δ , Ala Δ und DM Δ , da hier die *Dra I* Site im Bereich der deletierten AS liegt. Bei allen übrigen Ansätzen wurde die Mutation, welche in der letzten Base des Primers erfolgen sollte (TTC statt TTT), wohl durch die Proof-Reading Aktivität der *Pfu*-DNA-Polymerase korrigiert. Die Verifizierung der Mutationen erfolgte durch Sequenzierung des PfCDPK1-Inserts. Die Mutanten waren Ausgangsbasis für die Klonierung zahlreicher Expressionskonstrukte.

Mutationen:

PfCDPK1:	M G CSQSSNV KDFK TRRSKFT-
VG2:	M V CSQSSNV KDFK TRRSKFT-
AC3:	M G ASQSSNV KDFK TRRSKFT-
DM:	M V ASQSSNV KDFK TRRSKFT-
$\Delta 10-20$:	M G CSQSSNV-----
Val Δ :	M V CSQSSNV-----
Ala Δ :	M G ASQSSNV-----
DM Δ :	M V ASQSSNV-----

Abb. 3.15: N-terminale AS-Sequenz von PfCDPK1 und Mutanten mit verändertem Membranankermotiv
Die Mutationen erfolgten an der Myristylierungsstelle (Gly in Position 2; rot), an der Palmytylierungsselle (Cys in Position 3; grün) und im polybasischen Cluster (basische Aminosäuren K und R blau).

3.3.2 Metabolische Markierung von PfCDPK1 in vivo

Ziel dieses Experimentes war es zu zeigen, dass die N-Myristylierung sowie Palmytylierung von PfCDPK1 Prozesse sind, welche im lebenden Parasiten erfolgen. Zu diesem Zwecke wurden Parasitenkulturen metabolisch mit $[9,10\text{-}^3\text{H}]$ Myristat bzw. $[9,10\text{-}^3\text{H}]$ Palmitat markiert. Eine Modifikation der Kinase mit den radioaktiven Fettsäuren wurde nach Saponinlyse der iRBC und Immunpräzipitation mittels SDS-PAGE und Fluorographie untersucht.

3.3.2.1 Metabolische Markierung von PfCDPK1 mit $[9,10\text{-}^3\text{H}]$ Myristat

Parasitenkulturen wurden mit 200 $\mu\text{Ci/ml}$ $[9,10\text{-}^3\text{H}]$ Myristat markiert und einer Saponinlyse unterzogen. Im Lysat wurde PfCDPK1 mit Hilfe zweier affinitätsgereinigter Antikörper (2129a und 2979a) immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Geeignete Fluorogramme erhielt man nach einer Expositionszeit von 3 Monaten. Mit beiden Antikörpern wurde ein Signal bei ungefähr 60 kDa erhalten, welches mit der Größe von PfCDPK1 übereinstimmt (Abb. 3.16). Zusätzlich konnte eine schwächere Bande mit geringerer elektrophoretischer Mobilität beobachtet werden. Dieses Muster ist typisch für PfCDPK1, welche im Gesamtparasiten-Lysat als Doppelbande erscheint, von denen die unterer immer die stärkere ist. Bei Verwendung des

Antikörpers 2129a ist dieser Effekt immer ausgeprägter (Zhao et al., 1994b). Mit diesem Ergebnis konnte gezeigt werden, dass endogenes PfCDPK1 in vivo myristyliert wird.

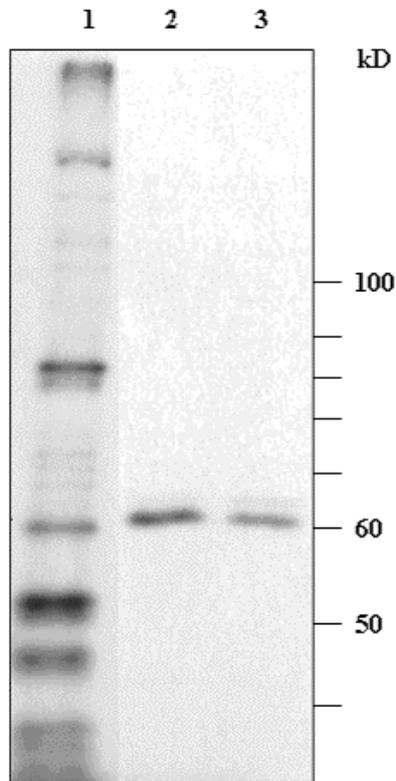


Abb. 3.16: Metabolische Markierung von PfCDPK1 mit [9,10-³H]Myristat

Das Fluorogramm zeigt:

Bahn 1: [³H]Myristat-markiertes Parasitenlysat
Bahn 2 und 3: Immunpräzipitat mit den spezifischen PfCDPK1 Antikörpern 2979 (2) bzw. 2129 (3). Das Auftreten der Bande bei 60 kDa spricht deutlich für eine Myristylierung von PfCDPK1 in vivo. Die Expositionszeit des Gels betrug 122 d mit Verstärkerfolie bei -70°C.

3.3.2.2 Metabolische Markierung von PfCDPK1 mit [9,10,³H]Palmitat

Parasitenkulturen wurden mit 200 µCi/ml [9,10,³H]Palmitat markiert und einer Saponinlyse unterzogen. Im Lysat wurde PfCDPK1 mit Hilfe zweier affinitätsgereinigter Antikörper (2129a und 2979a) immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Um zu zeigen, dass markiertes PfCDPK1 tatsächlich an der erwarteten Konsensussequenz palmityliert wird und nicht etwa Palmitat kovalent an anderer Stelle gebunden wird, wurden die Gele im Anschluss an die Elektrophorese zusätzlich entweder mit Hydroxylamin-haltigem oder reinem Tris-Puffer behandelt. Hydroxylamin spaltet die relativ labilen Thioesterbindungen zwischen Palmitinsäure und Cystein, lässt aber stabile Amid- oder Estherbindungen und somit die des gebundenen Myristats intakt (Godsel und Engman, 1999). Bei erfolgter Palmitoylierung sollte also das Palmitat während der Hydroxylamin-Behandlung aus dem Gel diffundieren und die Bande verschwinden. Die fluorographische Analyse der Gele zeigte jedoch auch nach 8 monatiger Exposition des Films in Anwesenheit einer Verstärkerfolie keine erkennbaren Banden. Das Experiment wurde mit 750 µCi/ml [9,10,³H]Palmitat wiederholt,

jedoch zeigten sich auch hier nach 8 monatiger Exposition des Films keine von der Hintergrundstrahlung differenzierbaren Banden.

Dieses Ergebnis muss jedoch nicht zwangsläufig bedeuten, dass PfCDPK1 nicht palmyliert wird. Im Gegensatz zur Myristylierung ist die Palmylierung ein post-translatinaler Prozess, vermittelt durch Palmyl-Acyltransferasen (PAT). Das Ausmaß der Palmylierung hängt stark von der Aktivität und dem Vorhandensein von PAT in der Zelle ab. Zudem ist die Palmylierung im Gegensatz zu anderen stabilen Fettsäure-Modifikationen ein reversibler Prozeß. Durch die Aktivität von Thioesterasen kann das Palmitat vom Protein wieder entfernt werden. Der Zeitpunkt, das Ausmaß und der Ort der Palmylierung sind also schwer vorhersagbare Faktoren, welche im Verlauf des parasitären Zyklus sicher auch starken Schwankungen unterworfen sind. Schließlich ist auch nicht auszuschließen, dass während der Lyse und Aufarbeitung der Parasiten ein beträchtlicher Teil des relativ schwach gebundenen Palmitats wieder abgespalten wird.

3.3.3 Untersuchungen zur Membranverankerung von PfCDPK1 mittels in vitro Transkription/Translation

Anhand der folgenden Experimente sollte gezeigt werden, dass die unter 3.3.2.1 beschriebene Myristylierung tatsächlich am Glycin in Position 2 erfolgt. Außerdem sollte der Beitrag der N-Myristylierung und des polybasischen Clusters zur Membranverankerung von PfCDPK1 untersucht werden. Hierzu wurde die Methode der in vitro Transkription/Translation (T/T) verwendet, welche die Transkription und anschließende Translation einer Gensequenz in ihre Aminosäuresequenz erlaubt. PfCDPK1-WT und die Mutanten VG2, der die Myristylierungsstelle fehlt, $\Delta 10-20$, in der das polybasische Cluster deletiert wurde und Val Δ , der beiden Anker motive fehlen, wurden in einer gekoppelten in vitro T/T-Reaktion in Anwesenheit von [³⁵S]Methionin, welches während der Synthese in die neu entstehende Polypeptidsequenz eingebaut wird, oder [9,10 ³H]Myristat hergestellt und mittels SDS-PAGE und Fluorographie analysiert.

Das hier verwendete TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation System von Promega vereinigt in seinem Master Mix Retikulozyten-Lysat vom Kaninchen, welches die für die Transkription/Translation erforderliche Maschinerie liefert, den Reaktionspuffer, T7 RNA-Polymerase für die Transkription der Zielsequenz in RNA, eine Mischung der für die Translation benötigten AS sowie RNasin[®], einem RNase Inhibitor. Dieses System ermöglicht die Transkription einer unter der Kontrolle des T7-Promotors stehenden DNA-Sequenz und die anschließende Translation der RNA in die entsprechende AS-Sequenz. Gewisse co-translationale Prozesse wie die Myristylierung können mit dem TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation System ebenfalls nachgewiesen werden. Eine Palmylierung hingegen erfolgt wegen der Abwesenheit von PAT im Retikulozytenlysat nicht (Busconi et al., 1997).

3.3.3.1 Klonierung der Konstrukte für die *in vitro* Transkriptions-/ Translationsreaktionen

Die zu transkribierende Sequenz muss unter die Kontrolle des T7-Promotors gestellt werden, um eine erfolgreiche T/T zu gewährleisten. Als besonders geeignet erwies sich hierfür der Vektor pGEM[®]-3Z von Promega, welcher den T7-Promotor in 5'-Richtung zur Multiple Cloning Site enthält. In der Folge wurde die cDNA von PfCDPK1 über BamH I/Pst I in den Vektor pGEM[®]-3Z kloniert. Die jeweiligen Mutanten wurden durch Austausch eines N-terminalen Nco I/PpuM I Fragmentes, welches die Mutationen enthält, hergestellt. Die einzelnen, für die Klonierung erforderlichen Schritte sind der folgenden Übersicht zu entnehmen.

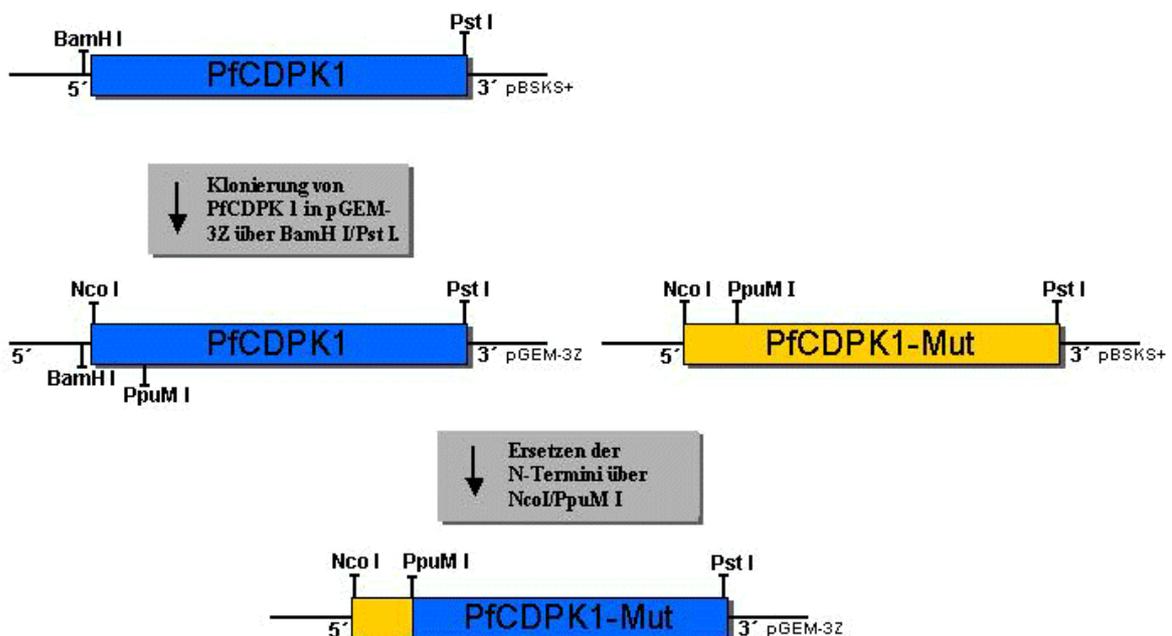


Abb. 3.17: Schematische Darstellung der einzelnen Klonierungsschritte für die Herstellung der *in vitro* Transkriptions/Translations-Konstrukte von PfCDPK1 und ihrer Mutanten

Zunächst wird die cDNA der WT-PfCDPK1 aus dem Ausgangsvektor pBSKS+ durch BamH I/Pst I Verdau herausgeschnitten und über diese Klonierungsstellen in pGEM-3Z kloniert. Die Mutationen werden anschließend durch Nco I/PpuM I Verdau der PfCDPK1-Mutanten in pBSKS+ und Austausch des 5'-Endes von PfCDPK1 in pGEM-3Z eingeführt. Der Erfolg der Klonierung wurde anschließend durch Sequenzierung bestätigt.

3.3.3.2 In vitro Transkription/Translation in Anwesenheit von [³⁵S]Methionin

Zunächst wurde die T/T-Reaktion in Anwesenheit von [³⁵S]Methionin durchgeführt. Hierdurch sollte sichergestellt werden, dass die translatierten Proteine die richtige Größe besaßen. Im T/T-Assay wurden die cDNAs von WT-PfCDPK1 und ihrer Mutanten VG2, Δ10-20 sowie ValΔ eingesetzt. Als Kontrolle diente ein Reaktionsansatz ohne Plasmid-DNA. Im Anschluss an die Reaktion wurden die Reaktionsprodukte auf einem 8% SDS-PAGE getrennt und mittels Fluorographie analysiert. Abb. 3.18 A zeigt das Ergebnis der in vitro T/T-Reaktion in Anwesenheit von [³⁵S]Methionin. Die Translationsprodukte aller eingesetzter Plasmide zeigten wie erwartet ein Molekulargewicht von ungefähr 60 kDa. Bei den Deletionsmutanten, in denen das basische Cluster fehlt (Δ10-20, ValΔ), ist deutlich eine leicht erhöhte elektrophoretische Mobilität festzustellen (Abb. 3.18 Bahn 3 und 4). Zusätzlich zu dieser Bande erschien bei allen durchgeführten Reaktionen eine Bande von geringerer Intensität mit einem etwas geringeren Molekulargewicht. Da die Kontrollreaktion ohne Plasmid weder die eine, noch die andere Bande zeigte, muss es sich bei beiden Proteinen um Produkte der eingesetzten Plasmid-DNA handeln. Möglicherweise ist die Bande mit reduziertem Molekulargewicht das Resultat eines internen Translationsstarts oder das Produkt eines proteolytischen Abbaus. In allen durchgeführten T/T-Reaktionen waren die Banden der VG2 Mutanten, der das Glycin für die Myristylierung fehlt, trotz derselben Menge an eingesetztem DNA-Template von etwas geringerer Intensität.

3.3.3.3 In vitro Transkription/Translation in Anwesenheit von [9,10-³H]Myristat

Das Ergebnis der T/T-Reaktion in Anwesenheit von [³⁵S]Methionin zeigt, dass PfCDPK1-WT und ihre Mutanten unter den gewählten Bedingungen erfolgreich transkribiert und translatiert werden. In der Folge sollte nun der Einfluss der Mutationen auf die Myristylierung von PfCDPK1 untersucht werden. Hierzu wurde die T/T-Reaktion unter leicht abgewandelten Bedingungen (siehe Methodenteil) in Anwesenheit von [9,10-³H]Myristat wiederholt. Dabei wurde erwartet, dass nur die Mutanten, die die Myristylierungsstelle in Position 2 besitzen (WT und Δ10-20) ein Signal im Fluorogramm ergeben (Abb. 3.18 B).

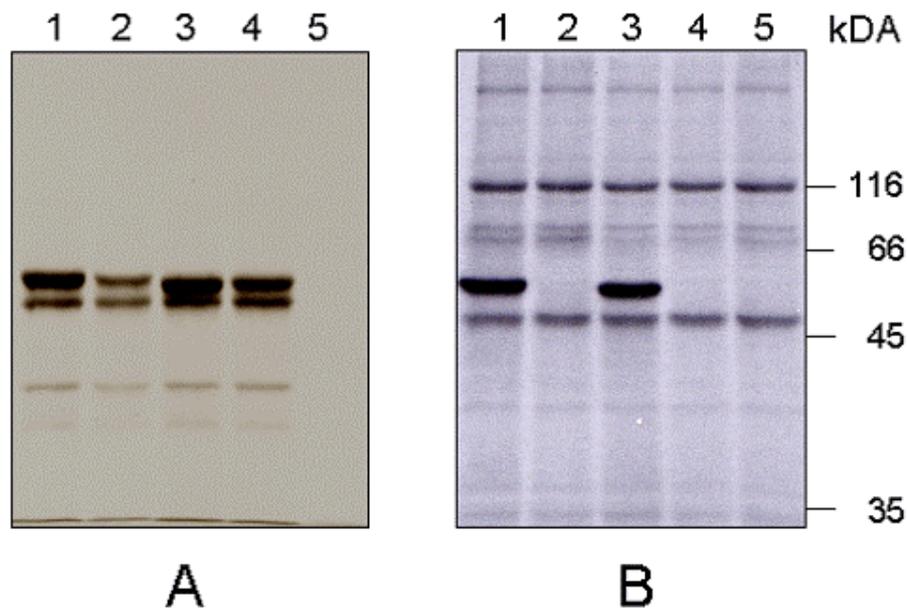


Abb. 3.18: In vitro Synthese und Myristylierung von PfCDPK1 und ihrer Mutanten VG2, Δ10-20 und ValΔ

PfCDPK1 und ihrer Mutanten wurde in Anwesenheit von [^{35}S]Methionin (A) bzw. [9,10- ^3H]Myristat (B) in vitro transkribiert und translatiert. Die Reaktionsprodukte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Fluorographie analysiert. Die Expositionszeit der Gele betrug 1 h ohne Verstärkerfolie (A) bzw. 14 d mit Verstärkerfolie bei -70°C (B). Die Zuordnung der Banden ist wie folgt: **1:** PfCDPK1; **2:** VG2 (ohne Myristylierungsstelle); **3:** Δ10-20 (ohne polybasisches Cluster); **4:** ValΔ (keines der beiden Motive); **5:** Hämolystatkontrolle ohne DNA-Zugabe. Der Proteinstandard-Größenmarker ist auf der rechten Seite aufgetragen.

A: Man erkennt deutlich die Proteinbande bei 60 kDa, welche dem vollständig translatierten Protein entspricht, sowie eine etwas schwächere Bande mit geringfügig höherer elektrophoretischer Mobilität. Da letztere in der Hämolystatkontrolle nicht auftaucht, handelt es sich um ein verkürztes Translationsprodukt.

B: Die Proteine mit intakter Myristylierungsstelle (PfCDPK1 (1) bzw. Δ10-20 (3)) wurden myristyliert. Es ist ein deutliches Signal bei 60 kDa zu sehen. Die übrigen Signale stammen von Proteinen des Retikulocytenlysats, da sie auch in der Kontrolle ohne DNA (5) auftreten.

Wie vorhergesagt, wurden die Translationsprodukte der cDNA's von PfCDPK1-WT und Δ10-20, welche das für die Myristylierung erforderliche Glycin in Position 2 enthalten, myristyliert (Abb 3.18. B Reihe 1 bzw.3), während die Mutanten, bei denen das Glycin durch Valin ersetzt wurde (VG2, ValΔ), kein Signal im Fluorogramm ergaben (Abb 3.18. B Reihe 2 bzw. 4). Somit konnte gezeigt werden, dass ein Glycin an Position 2 eine Grundvoraussetzung für die Myristylierung von PfCDPK1 darstellt.

Das Translationsprodukt mit reduziertem Molekulargewicht, welches bei der Markierung mit [^{35}S]Methionin auftrat, ist bei einer Markierung mit [^3H]Myristat nicht zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass bei diesem Produkt ein Teil des N-Terminus fehlt.

Zusätzlich konnten bei allen Reaktionen, einschließlich der Hämolystatkontrolle, mehrere myristylierte Produkte mit unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität beobachtet werden. Da diese Signale

jedoch auch in der Kontrollreaktion auftraten, dürfte es sich um myristylierte Proteine des Retikulocytenlysats handeln.

3.3.3.4 In vitro Transkription/Translation in Anwesenheit von [9,10-³H]Palmitat

Die Palmytylierung ist im Gegensatz zu Myristylierung ein post-translationaler Vorgang, der die Anwesenheit von Palmitoyl-Acyltransferasen (PAT) erfordert. Untersuchungen haben ergeben, dass eine Palmytylierung in gekoppelten T/T-Reaktionen nicht erfolgt (Busconi et al., 1997). Um eine Palmytylierung bei den folgenden Untersuchungen zur Membranverankerung von PfCDPK1 ausschließen zu können, wurde die T/T-Reaktion jedoch auch in Anwesenheit von [9,10-³H]Palmitat durchgeführt. Dabei wurden dem Reaktionsgemisch (siehe Methodenteil) zusätzlich mikrosomale Membranen (CPMM) zugesetzt um zu sehen, ob diese eventuell eine PAT-Aktivität aufweisen. Die Proben wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen denaturiert, da Substanzen wie DTT oder β -ME die labile Bindung zwischen Cystein und Palmitinsäure spalten können. Statt dessen wurde nach Zusatz von 5 x Probenpuffer ohne β -ME und DTT 10 min bei 70°C denaturiert. Es wurden zwei identische Gele angefertigt, von denen das eine vor der Coomassiefärbung 2 x 30 min in 1 M Hydroxylamin (pH 7,5), das andere in 1 M Tris pH 7,5 gewaschen wurde. Wie erwartet konnte eine Palmytylierungsaktivität weder im Retikulocytenlysat noch in den mikrosomalen Membranen nachgewiesen werden. Das Fluorogramm zeigte keine Signale in Höhe des erwarteten Molekulargewichtes (Daten nicht gezeigt). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die in den folgenden Versuchen gezeigte Membranverankerung von PfCDPK1 und ihren Mutanten ausschließlich durch Myristat und das basische AS-Cluster (PBC) vermittelt wird.

3.3.3.5 In vitro Transkription/Translation in Anwesenheit von mikrosomalen Membranen

In den vorangegangenen Experimenten konnte die N-terminale Myristylierung von PfCDPK1 nachgewiesen werden. Nun stellte sich die Frage, welcher Anteil an der Bindungsenergie den jeweiligen Ankermotiven Myristylierung und PBC zukommt. Hierzu wurde wiederum das TNT-T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) verwendet. Der T/T-Reaktion, unter Verwendung von [³⁵S]Methionin, wurden zusätzlich mikrosomale Membranen (Canine Pancreatic Microsomal Membranes (CPMM), Promega) zugesetzt. Proteine, welche über ein oder mehrere Membranankermotive verfügen, binden an die Membranen und können durch Ultrazentrifugation abgetrennt werden. Im Anschluss an die T/T-Reaktion wurden die Membranen durch Ultrazentrifugation pelletiert und die Überstand- und Pelletfraktion getrennt voneinander mittels SDS-PAGE und Fluorographie analysiert.

Mit zunehmender Bindungsenergie der Membrananker steigt die Affinität zu den CPMM und der Großteil der Signalaktivität sollte sich in der Pelletfraktion konzentrieren. Bei Elimination eines oder mehrerer dieser Signale nimmt die Affinität zur Membran hingegen ab und der Anteil an ungebundenem Protein in der Überstandfraktion sollte zunehmen. Da eine Palmytylierung bei der T/T-Reaktion bereits ausgeschlossen werden konnte (Absch. 3.3.3.4), konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Myristylierung und das PBC. Ihre Membranankerfunktion sollte bestätigt, bzw. ihr individueller Beitrag zur Bindungsenergie ermittelt werden. Neben WT-PfCDPK1, wurden wiederum die Mutanten VG2, ohne Myristylierungsstelle, $\Delta 10-20$, ohne das PBC, sowie Val Δ , welcher beide Motive fehlen, untersucht. Erwartet wurde eine Zunahme der Affinität zu den Membranen in der Reihe Val Δ < $\Delta 10-20$ \cong VG2 < WT.

Beim Austesten geeigneter Reaktionsbedingungen an WT-PfCDPK1 kristallisierte sich schnell heraus, dass durch eine Erhöhung des Anteils mikrosomaler Membranen im Reaktionsgemisch zwar der Anteil an membrangebundenem Protein erhöht werden konnte, andererseits aber die Ausbeute an translatiertem Proteins drastisch sank. Unter Abwägung der beiden Faktoren wurden schließlich Bedingungen ermittelt, welche ein Höchstmaß an Membranbindung bei vertretbarer Ausbeute gewährleisteten. Dieser Zustand konnte durch die Zugabe von 1,4 μ l CPMM pro 25 μ l Reaktionsgemisch erreicht werden. Unter diesen Bedingungen befand sich ein großer Anteil von WT-PfCDPK1 in der Membranfraktion. Zur Quantifizierung und Ermittlung der Verhältnisse zwischen membrangebundenem und nicht-gebundenem Protein, wurden die markierten Banden aus dem Gel geschnitten und die in ihnen inkorporierte Radioaktivität in einem Szintillationszähler bestimmt.

Die Fluorogramme ähnelten stark den in Abb. 3.18 A gezeigten. Das verkürzte Translationsprodukt war jedoch in den Pelletfraktionen höchstens spurenhaf zu sehen, was ein weiteres Indiz dafür ist, dass es sich hierbei um N-terminal verkürzte PfCDPK1 handelt, dem die Membrananker fehlen. Deshalb wurden zur Berechnung des Anteils membrangebundener PfCDPK1 nur die oberen Banden herangezogen. Der Anteil an membrangebundenem Protein berechnet sich aus dem Verhältnis der ermittelten Aktivität in der Pelletfraktion zur Gesamtaktivität in Pellet- und Überstandfraktion. Dabei wurde auch berücksichtigt, dass von der Überstandfraktion nur jeweils ein fünftel der Reaktion für die Elektrophorese eingesetzt wurde. Das Experiment wurde dreimal wiederholt, wobei jeweils ähnliche Ergebnisse erhalten wurden.

Unter den gewählten Bedingungen befanden sich bei WT-PfCDPK1 zwischen 51 und 56% der Aktivität in der Membranfraktion. Um Vergleiche mit den übrigen Mutanten anstellen zu können, wurde dieser Wert als Bezugsgröße gleich 100% gesetzt und die Anteile der übrigen Mutanten zu diesem ins Verhältnis gesetzt.

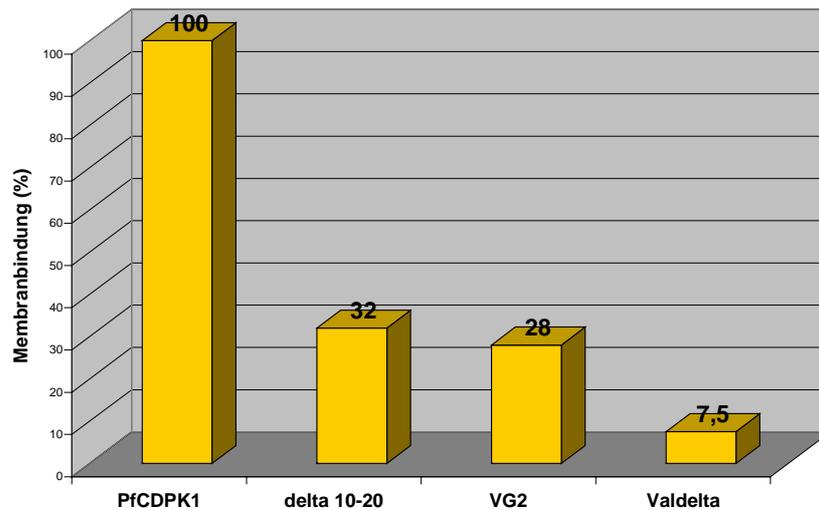


Abb. 3.19: Beitrag von Myristylierung und PBC zur Membranverankerung von PfCDPK1

PfCDPK1 und die Mutanten VG2, $\Delta 10-20$ und Val Δ wurden in Anwesenheit von mikrosomalen Membranen, welche als Akzeptormembranen dienten, *in vitro* transkribiert/translatiert. Im Anschluss an die Reaktion wurden die Membranen durch Ultrazentrifugation pelletiert und Pellet- bzw. Überstandfraktion getrennt voneinander mittels SDS-PAGE und Fluorographie untersucht. Für den direkten Vergleich wurden die einzelnen Banden aus dem Gel geschnitten und die in ihnen eingebaute Radioaktivität in einem Szintillationszähler bestimmt. Der Anteil an membrangebundenem Protein in der Pelletfraktion wurde ermittelt und zu PfCDPK1, welches als Bezugsgröße gleich 100% gesetzt wurde, ins Verhältnis gesetzt. Ohne das PBC ($\Delta 10-20$) geht der Anteil an membrangebundenem Protein auf 32% zurück, ohne Myristat auf 28% und beim Fehlen beider Motive (Val Δ) auf 7,5%. Der Versuch wurde 3 mal wiederholt, wobei jeweils ähnliche Resultate erzielt werden konnten.

Für die VG2 Mutante, der mit dem lipophilen Membrananker Myristat eine entscheidende Komponente für die Membranverankerung fehlt, wurde ein Rückgang des Anteils an membrangebundenem Proteins erwartet. Tatsächlich verringerte sich der Anteil an Protein in der Membranfraktion auf ungefähr 28 % im Vergleich zum WT.

Auch die $\Delta 10-20$ Mutante, welcher das PBC fehlt und die Membranbindung somit fast ausschließlich durch den Myristat-Anker vermittelt wird, sollte in ihrer Fähigkeit an Membranen zu binden eingeschränkt sein. Die Untersuchungen ergaben einen Rückgang des Proteins in der Pellet-Fraktion auf durchschnittlich 32% und somit einen ähnlichen Effekt wie bei der VG2 Mutante.

Die Val Δ Mutante schließlich, welcher beide Membranheftungsmotive fehlen, zeigte mit 7,5% membrangebundenem Protein nur noch rudimentäre Bindungseigenschaften. Dieser Wert liegt nur unwesentlich über dem Wert für die N-terminal verkürzte PfCDPK1, repräsentiert durch die untere Bande im Fluorogramm und damit im background Bereich. Für das verkürzte Protein lag der Anteil an Protein in der Membranfraktion zwischen 4 und 6%. Da hier keine der postulierten Membranbindungsstellen vorhanden ist, handelt es sich wohl um Proteinspuren, welche beim Waschen nicht vollständig entfernt werden konnten.

3.3.3.6 Der Einfluss von Autophosphorylierung auf die Membranbindung von PfCDPK1

Wie gezeigt werden konnte, besitzt PfCDPK1 die Fähigkeit zur Autophosphorylierung (Zhao et al., 1994a). Das N-terminale polybasische Cluster enthält AS-Sequenzen, welche als Phosphorylierungsmotiv für PfCDPK1 (K/R-X-X-X-S/T) fungieren können. Eine Autophosphorylierung der Serin- oder Threoninreste würde durch Einführung negativer Ladungen zu einer Schwächung der elektrostatischen Interaktionen zwischen den basischen AS und den ebenfalls negativ geladenen Phospholipiden der Membran führen. Der Kinase wäre damit die Möglichkeit gegeben, ihre Membrananheftung selbst zu steuern. Um die Auswirkungen einer Autophosphorylierung auf die Membranbindungseigenschaften von PfCDPK1 zu untersuchen, wurde die cDNA zunächst, wie unter 3.3.3.5 beschrieben, in Anwesenheit von CPMM und [³⁵S]Methionin in vitro transkribiert bzw. translatiert. Im Anschluss an eine Ultrazentrifugation bei 100000 x g, wurde das Pellet, welches die membrangebundene PfCDPK1 enthält, in Kinaseassaypuffer resuspendiert und die Kinasereaktion durch Zugabe von ATP sowie 1 mM Ca²⁺ gestartet. Um sicher zu gehen, dass ausreichend aktive PfCDPK1 bei der Reaktion vorhanden ist, wurden bei einer zweiten Probe zusätzlich 50 ng rekombinante PfCDPK1 zugesetzt. Als Kontrolle diente jeweils eine Probe, der anstelle des Ca²⁺ 100 µM EGTA zugefügt wurde, welches durch Komplexbildung von Ca²⁺ die Aktivierung von PfCDPK1 verhindert. Durch die Bereitstellung von ATP, sowie Ca²⁺, welches PfCDPK1 für ihre Aktivierung benötigt, wird die Autophosphorylierung von PfCDPK1 ermöglicht. Erfolgt diese im PBC, hätte das eine Schwächung der Bindung an die Membran und ein vermehrtes Auftreten von Protein in der Überstandfraktion zur Folge.

Die Auswertung des Fluorogrammes (Abb. 3.20) erbrachte keine nennenswerte Zunahme des Proteins in der Überstandfraktion. Auch der Zusatz von exogener PfCDPK1 zur Reaktion hatte darauf keinen Einfluss. In den Pelletfraktionen erhielt man jeweils eine Proteinbande vergleichbarer Intensität, die anhand ihres Molekulargewichtes von 60 kDa PfCDPK1 zugeordnet werden konnte. In den Überstandfraktionen der Proben mit aktiver PfCDPK1 (+ Ca²⁺) war kaum Protein nachzuweisen (Abb. 3.20, Überstand: 1. und 3. Reihe v. 1.). Bei den Kontrollreaktionen hingegen war eine deutliche Bande bei 60 kDa auszumachen (Abb. 3.20, Überstand: 2. und 4. Reihe v. 1.). Da in diesen Proben PfCDPK1 nur sehr schwach aktiv ist, wäre es möglich, dass Kinasen, die im Retikulocytenlysat oder den CPMM enthalten sind, befähigt sind, PfCDPK1 im PBC zu phosphorylieren und so dessen Dissoziation von der Membran zu bewirken. Die Autophosphorylierung von PfCDPK1 scheint dagegen keinen Einfluss auf die Membranverankerung zu haben.

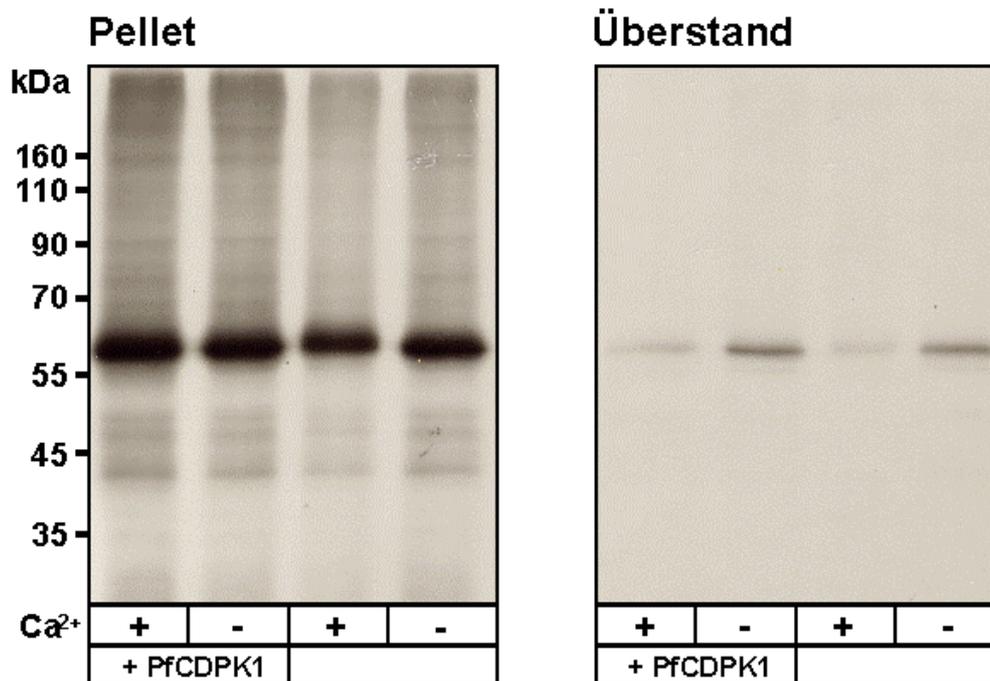


Abb. 3.20: Der Einfluss der Autophosphorylierung auf die Bindung von PfCDPK1 an Akzeptormembranen

Im Anschluss an die *in vitro* Transkription/Translation in Anwesenheit von [³⁵S]Methionin und CPMM wurden die Membranen durch Ultrazentrifugation abgetrennt und unter Kinaseassaybedingungen in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-; mit 100 μ M EGTA) von Ca²⁺ 30 min bei 30°C inkubiert. Einem Teil der Proben wurde dabei zusätzlich 50 ng exogene PfCDPK1 zugesetzt (+ PfCDPK1). Die Reaktion wurde durch Ultrazentrifugation in Überstand und Pellet getrennt und mittels SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Die Expositionszeit des Films betrug 5 h bei RT.

Um sicherzugehen, dass PfCDPK1 unter den gewählten Bedingungen aktiv ist, wurde der Versuch ohne eine [³⁵S]Methionin Markierung des Proteins in Anwesenheit von [γ -³²P]ATP wiederholt und der Einbau von radioaktivem Phosphat mittels SDS-PAGE und Autoradiographie ermittelt. Einer Probe wurde dabei wiederum 50 ng exogene rekombinante PfCDPK1 zugesetzt. Als Kontrollen dienten Ansätze bei denen das Ca²⁺ durch Zusatz von 100 μ M EGTA cheliert wurde. Abb. 3.21 zeigt das Ergebnis der Autoradiographie.

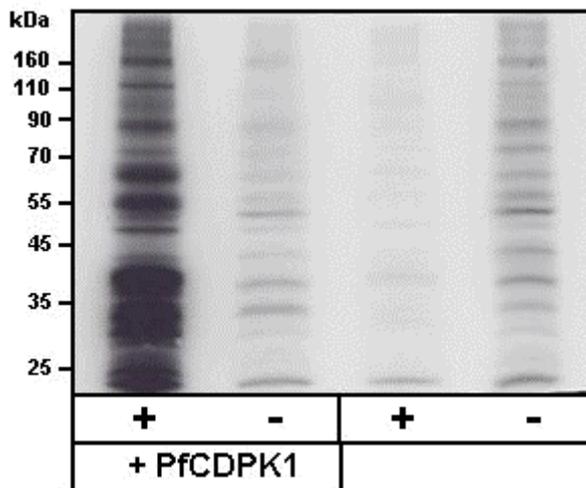


Abb. 3.21: Nachweis der Aktivität von PfCDPK1 durch radioaktive Markierung mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$

Im Anschluss an die T/T-Reaktion wurde an CPMM gebundenes Protein durch Ultrazentrifugation abgetrennt und in einem Kinaseassay mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ markiert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Autoradiographie. Die Reaktion wurde mit (+ PfCDPK1) und ohne Zusatz von 50 ng exogenem PfCDPK1 durchgeführt. (+) enthält 1 mM Ca^{2+} zur Aktivierung von PfCDPK1, (-) stellt die Kontrollreaktion ohne Ca^{2+} mit 100 μM EGTA als Chelator dar, wodurch die Aktivierung von PfCDPK1 verhindert wird. Die Expositionszeit des Autoradiogramms betrug 24 h.

Die Probe mit exogen zugegebener PfCDPK1 zeigte deutliche Kinaseaktivität (Abb. 3.21 Reihe 1). Dabei wurden neben PfCDPK1 (Bande bei 60 kDa) auch zahlreiche Proteine des Retikulocytenlysats und der CPMM phosphoryliert. PfCDPK1 ist also unter den hier verwendeten Bedingungen aktiv. Auch die Probe ohne exogene PfCDPK1, die nur PfCDPK1 aus der in vitro T/T-Reaktion enthält, zeigt Aktivität, die jedoch wesentlich schwächer ausfällt (Abb. 3.21 Reihe 3). Die Tatsache, dass auch die Kontrollreaktionen, bei denen die Aktivität von PfCDPK1 durch Komplexierung des Ca^{2+} unterbunden wird, eine deutliche Kinaseaktivität aufweisen, die sogar diejenige von PfCDPK1 in Probe 3 übersteigt, weist darauf hin, dass im Retikulocytenlysats und/oder den CPMM ebenfalls Kinasen enthalten sind. Diese scheinen durch Calciumkonzentrationen wie sie im Assay vorherrschen inhibiert zu werden.

3.3.4 Untersuchung der Lokalisation von PfCDPK1-Luciferase Fusionsproteinen mittels fraktionierter Saponinlyse

Zur Untersuchung der Lokalisation von PfCDPK1 und ihrer Mutantenproteine im infizierten Erythrocyten wurden spezielle Konstrukte für eine transiente Transfektion in *P. falciparum* hergestellt. Als Marker für PfCDPK1 bzw. ihrer Mutanten diente Luciferase, ein Photoprotein aus der nordamerikanischen Glühwürmchenart *Photinus Pyralis*, welche zur Bildung eines Fusionsproteins hinter das Kinase-Gen kloniert wurde. In Anwesenheit ihrer Substrate ATP und Luciferin produziert die Luciferase eine Chemolumineszenz, deren Intensität proportional zur Anzahl der Luciferasemoleküle ist. Die transfizierten Parasiten wurden bei verschiedenen Saponinkonzentrationen lysiert, fraktioniert und die Verteilung von PfCDPK1 und ihrer Mutanten anhand der Luciferaseaktivität in den unterschiedlichen Fraktionen ermittelt.

3.3.4.1 Klonierung der PfCDPK1-Luciferase Transfektionsplasmide

Wie in Abb. 3.22 zu sehen, besteht das fertige Konstrukt für die transiente Transfektion aus der cDNA von PfCDPK1 bzw. einer der unter 3.3.1 beschriebenen Mutanten, welche am 3'-Ende über BamH I mit dem Luciferase-Gen verbunden wurde. Die Klonierung in den Transfektionsvektor pHCI erfolgte, entgegen der 5'-3'-Richtung des Vektors, ungerichtet über Xho I.

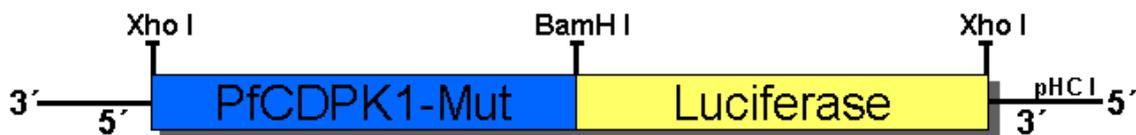
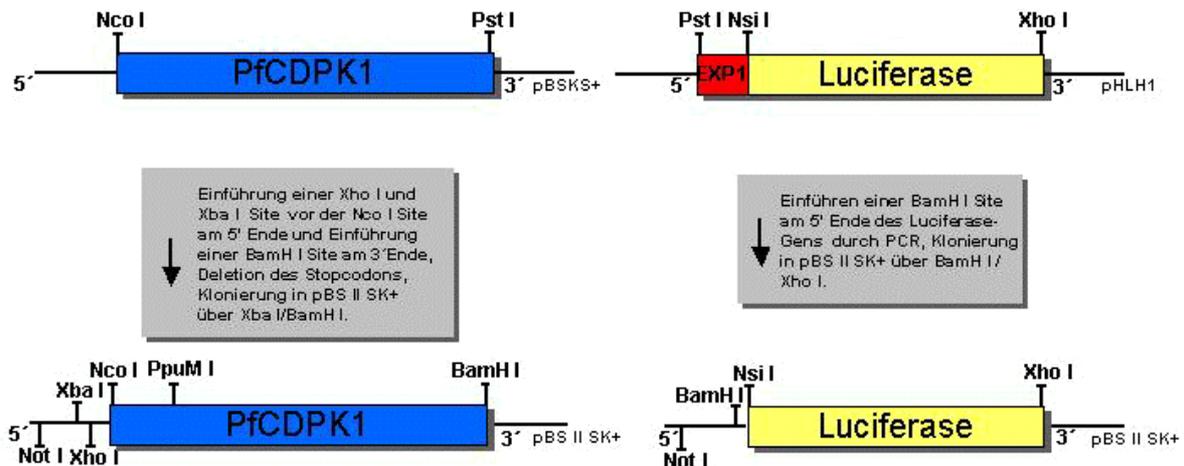


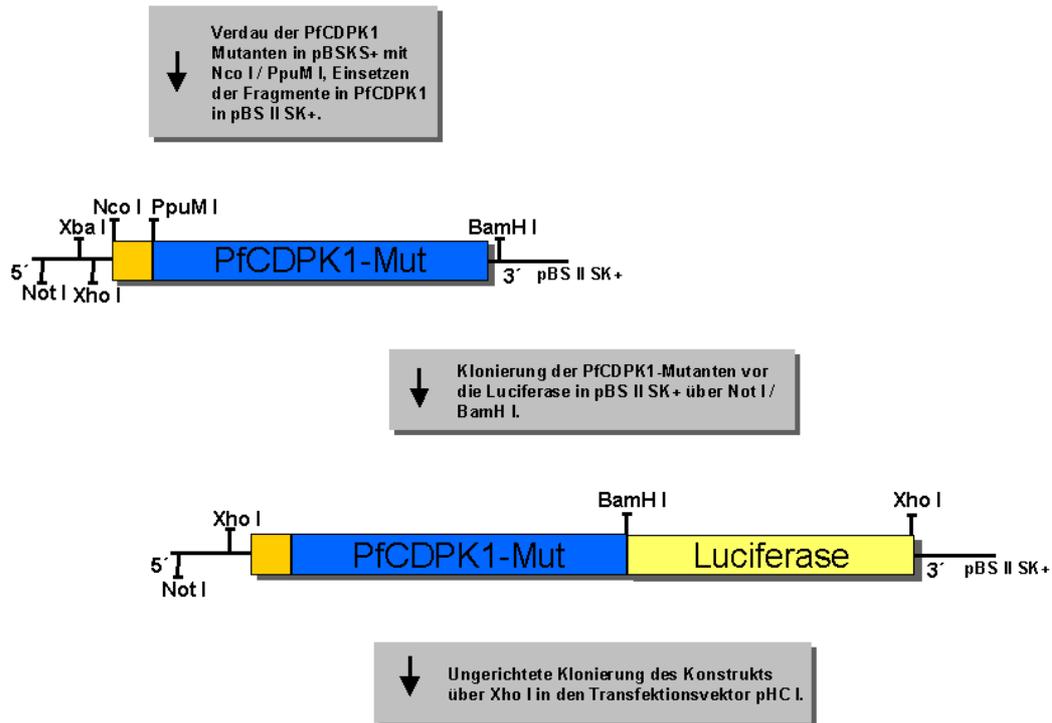
Abb. 3.22: PfCDPK1-Luciferasekonstrukt in pHCI für die transiente Transfektion in *Plasmodium falciparum*.

Die einzelnen Schritte, welche für die Klonierung dieses Konstrukts erforderlich waren, sind in der folgenden Übersichtszeichnung schematisch dargestellt. Detaillierte Ausführungen der einzelnen Schritte sind dem nachfolgenden Text zu entnehmen.

a.)



b.)



c.)

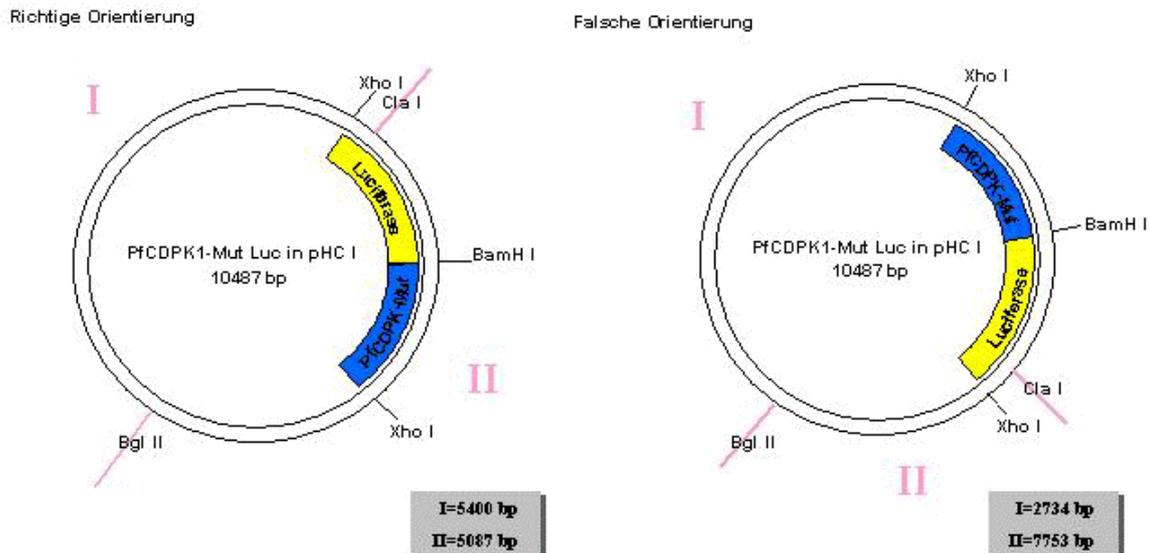


Abb. 3.23: Schematische Darstellung der einzelnen Klonierungsschritte zur Synthese der Transfektionsplasmide von PfCDPK1 und ihrer Mutanten gekoppelt an Luciferase in pHC I

a.) zeigt die Klonierungsschritte zur Herstellung des WT-PfCDPK1-Luciferase Konstruktes.

b.) zeigt die Klonierungsschritte zur Herstellung der Luciferasekonstrukte der PfCDPK1-Mutanten aus dem WT-Konstrukt (a.)

c.) zeigt den Orientierungsverdau für die ungerichtete Klonierung des Kinase-Luciferasekonstrukts über Xho I in den Klonierungsvektor pHC I.

Ausgangs-DNA für die Klonierung ist zum einen ein cDNA-Klon von PfCDPK1 im Vektor pBSKS+ (über Hind III/Xho I) aus unserer Stammsammlung, zum anderen der Vektor pTXx1luc, welcher das Luciferase-Gen über Nsi I/Xho I kloniert enthält. Letzterer wurde von Petra Burghaus in Marburg zur Verfügung gestellt. Um die für die Klonierung erforderlichen Restriktionsenzym-Schnittstellen einzuführen, wurden zunächst die Genenden mittels PCR modifiziert. Durch Verwendung der Primer *BamH I_antisense* und *Xho I_sense* wurde PfCDPK1 aus dem Vektor pBSKS+ amplifiziert. Dabei wurde durch den *BamH I_antisense*-Primer am 3'-Ende eine BamH I Site eingefügt und das Stopcodon entfernt, so dass auch die Translation der nachfolgenden Luciferase ermöglicht wird und ein Fusionsprotein entsteht. Durch den *Xho I_sense*-Primer wurde am 5'-Ende eine Xba I und Xho I Site vor der Nco I Site eingeführt. Das PCR-Produkt wurde Xba I/BamH I verdaut und über diese Schnittstellen in den Vektor pBS II SK+ (SK) kloniert. Luciferase wurde aus pTXx1luc unter Verwendung der Primer *luc_sense* und *luc_antisense* amplifiziert, wobei eine BamH I Site am 5'-Ende eingeführt wurde. Nach Restriktionsverdau mit BamH I/Xho I wurde die Luciferase ebenfalls in SK kloniert (lucSK). Das Ergebnis der Klonierung wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Im nächsten Schritt wurden die N-terminalen Mutationen, welche durch ortsspezifische Mutagenese erhalten wurden (Abschn. 3.3.1), in das PfCDPK1-SK-Konstrukt eingeführt. Hierzu wurden die Produkte der ortsspezifischen Mutagenese, nämlich VG2, AC3, DM, Δ 10-20, Val Δ , Ala Δ und DMA in pBSKS+ durch PpuM I/Nco I verdaut, das 105 bp bzw. 72 bp große Fragment (Δ -Mutanten) isoliert und damit das entsprechende Fragment aus PfCDPK1 in SK ersetzt. Nun wurden *Luciferase* und *PfCDPK1* bzw. ihre Mutanten verbunden, indem zunächst beide Konstrukte in SK Not I/BamH I verdaut wurden und anschließend die PfCDPK1- bzw. Mutantenfragmente in LucSK kloniert wurden. Die direkte Klonierung der PpuM I/Nco I-Fragmente in ein PfCDPK1-Luciferase Fusionskonstrukt war nicht möglich, da Luciferase ebenfalls eine PpuM I Schnittstelle enthält.

Die Klonierung der Kinase-Luciferase Konstrukte in den Transfektionsvektor pHC I erfolgte ungerichtet über Xho I. Da ein Einzelverdau der SK Konstrukte mit Xho I zwei etwa gleich große Fragmente von 3200 und 2900 bp generiert, die bei der anschließenden Gelextraktion nicht voneinander abgetrennt werden können, wurde ein Xho I/Pvu I Doppelverdau durchgeführt, durch den der linearisierte Vektor in zwei Teile (ca. 1200 und 1700 bp) gespalten wurde.

Die gewünschte Klonierung des Fragments sollte entgegen der 5'-3'-Richtung des Vektors erfolgen. Um zwischen den zwei bei der ungerichteten Klonierung möglichen Orientierungen des Inserts zu unterscheiden, wurden die Transfektionsplasmide zur Analyse mit Cla I/Bgl II verdaut. Stimmt die Orientierung mit der gewünschten überein, ergibt der Verdau ein Fragment mit 5400 bp und eines mit 5087 bp. Ist dies nicht der Fall, erhält man 2 Fragmente von 2734 bp bzw. 7753 bp. Zusätzlich wurde zur Kontrolle ein Xho I Verdau durchgeführt, welcher das Insert aus dem Vektor freisetzt.

3.3.4.2 Membranfreisetzung der Luciferase-Fusionsproteine von PfCDPK1 und ihrer Mutanten durch fraktionierte Saponinlyse

Die Experimente wurden im Rahmen einer Kooperation von Dr. Petra Burghaus, FB Biologie/Zoologie, Abt. Parasitologie an der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Bei den Ergebnissen wird deshalb Bezug genommen auf die Angaben von Petra Burghaus.

Die transiente Transfektion in den *P. falciparum* Stamm FCBR erfolgte nach (Deitsch et al., 2001). Fraktionierte Saponinlyse der Parasiten und Detektion der Luciferaseaktivität erfolgte wie in (Burghaus und Lingelbach, 2001) beschrieben. Das PfCDPK1-Luciferase-Konstrukt in pHCI bzw. die entsprechenden Konstrukte der Mutanten wurden durch Transfektion in den Parasitenstamm FCBR eingeführt und transient exprimiert. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Parasiten einer fraktionierten Saponinlyse mit ansteigenden Saponinkonzentrationen unterzogen. Bei niedrigen Saponinkonzentrationen (< 0,1%) lysieren nur die Membranen der Erythrocyten und der PV, während die Parasiten intakt bleiben und freigesetzt werden. Durch Zentrifugation erhält man ein Pellet aus Membranen und intakten Parasiten. Der Überstand enthält lösliche Proteine des erythrocytären Cytosols und der PV. Bei steigenden Konzentrationen an Saponin wird auch die Plasmamembran des Parasiten angegriffen, so dass auch zunehmend Proteine des Parasitencytosols im Überstand erscheinen. Aldolase z.B., ein cytosolisches Protein, ist ab einer Konzentration von etwa 0,5% Saponin fast ausschließlich im Überstand zu finden (Burghaus und Lingelbach, 2001). Durch das Saponin werden zusätzlich membrangebundene Proteine aus der Membran herausgelöst und erscheinen im Überstand. Je stärker die Membranbindung eines Proteins, desto höhere Saponinkonzentrationen sind für seine Freisetzung erforderlich.

Die Auswertung der Proben erfolgte durch Bestimmung ihrer Luciferaseaktivität. Die Aktivitäten der Pelletfraktionen wurden dann zu den Aktivitäten der Überstandfraktion ins Verhältnis gesetzt.

Abb 3.24 zeigt das Ergebnis der Fraktionierung des WT-PfCDPK1-Luciferaseklons bei Verwendung steigender Saponinkonzentrationen (0,15-0,8%).

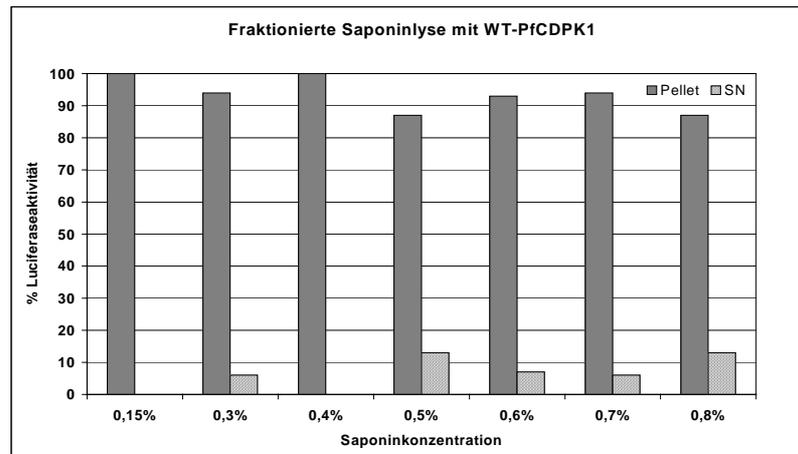


Abb. 3.24: Fraktionierte Saponinlyse von iRBC nach transientscher Transfektion mit einem WT-PfCDPK1-Luciferase-Konstrukt in pHCI

iRBC wurden mit unterschiedlichen Saponinkonzentrationen (0,15%-0,8%) lysiert und durch Zentrifugation in eine Pelletfraktion, welche Membranen und unter einer Saponinkonzentration von 0,5% unvollständig lysierte Parasiten enthält, und eine Überstandfraktion (SN: Supernatant), welche lösliche Zellbestandteile des Erythrocytencytosols, der PV und des Parasitencytosols (ab 0,1% Saponin) enthält. Im Anschluss wurde die Luciferaseaktivität in den einzelnen Fraktionen ermittelt. Die Aktivität der Pelletfraktion wurde zur Aktivität in der Überstandfraktion ins Verhältnis gesetzt. Das Experiment wurde dreimal wiederholt, wobei jeweils ähnliche Ergebnisse erzielt werden konnten (Fehlerrate unter 7%).

Die Auswertung des Schaubildes in Abb. 3.24 zeigt, dass die Luciferaseaktivität auch bei einer Konzentration von 0,8% Saponin noch zum größten Teil (87%) in der Membranfraktion zu finden ist. Im Gegensatz dazu geht Aldolase, unser Markerprotein für lösliche Proteine des Parasitencytosols, bereits ab einer Saponinkonzentration von 0,5% fast vollständig in die Überstandfraktion über. Dieser deutliche Unterschied im Verhalten der beiden Proteine spricht für eine eindeutige Membranverankerung von PfCDPK1.

In einem weiteren Experiment wurde die Membranaffinität von PfCDPK1 (WT) mit der der Mutanten VG2, $\Delta 10-20$ und DMA verglichen. Dafür wurden die Luciferase-Transfektionsklone von WT, VG2, $\Delta 10-20$ und DMA parallel zueinander transfiziert und bei einer Saponinkonzentration von 0,6% lysiert. Nach Zentrifugation wurde die Luciferaseaktivität in der Pellet- und in der Überstandfraktion gemessen und wiederum die beiden Werte zueinander ins Verhältnis gesetzt (Abb. 3.25).

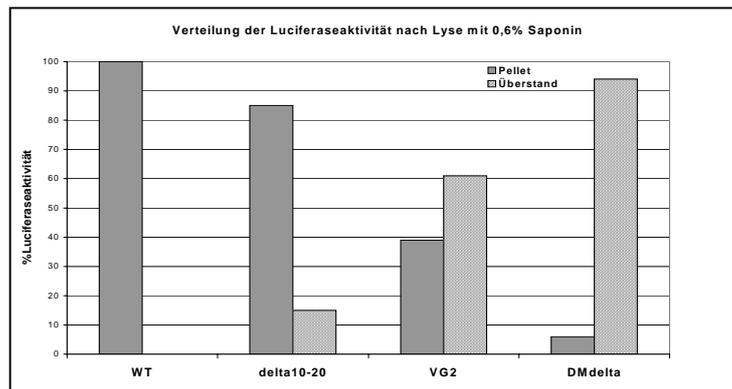


Abb. 3.25: Vergleichende Freisetzung der Luciferase-Fusionsproteine von WT, VG2, Δ 10-20, und DMA aus der Membran bei 0,6% Saponin

Die 4 Transfektionskonstrukte von WT-PfCDPK1, VG2, Δ 10-20 und DMA gekoppelt an Luciferase in pHCI wurden parallel zueinander in *P. falciparum* transfiziert und bei einer Saponinkonzentration von 0,6% lysiert. Die Luciferaseaktivitäten der Pellet- und Überstandfraktionen wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Das Experiment wurde dreimal wiederholt, wobei jeweils ähnliche Ergebnisse erzielt werden konnten (Fehlerrate unter 7%).

Dem Schaubild in Abb. 3.25 ist zu entnehmen, dass bei WT-PfCDPK1, das drei Membranankermotive besitzt, bei einer Konzentration von 0,6% Saponin die Luciferaseaktivität ausschließlich in der Pelletfraktion zu finden ist. PfCDPK1 wird also bei dieser Konzentration nicht aus der Membran herausgelöst. Bei der Δ 10-20 Mutante, der das PBC fehlt, befinden sich bei 0,6% Saponin 15% der Luciferaseaktivität in der Überstandfraktion. Die Affinität zur Membran ist also auch hier verhältnismäßig hoch. Anders sieht es bei der VG2 Mutante aus, die weder myristyliert noch palmytyliert werden kann. Hier sind bei 0,6% Saponin nur noch 39% des Proteins membrangebunden. Im Falle der DMA-Mutante, der die Membrananker gänzlich fehlen, sind schließlich nur noch 6% der Luciferaseaktivität in der Membranfraktion zu finden. Sie verhält sich demnach ähnlich wie Aldolase. Die Membranaffinität der Luciferase Fusionsproteine nimmt deutlich in der Reihenfolge WT > Δ 10-20 > VG2 > DMA ab. Diese Reihenfolge steht im Einklang mit der Zahl der zur Verfügung stehenden Membranankermotive.

3.3.5 Untersuchung der Lokalisation und Zielgebung von PfCDPK1-GFP Fusionsproteinen durch konfokale Laser-Scan-Mikroskopie

Die Absicht hinter diesem Teilprojekt war es mit Hilfe der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie, den Einfluss der Membranankermotive auf die Lokalisation von PfCDPK1 im lebenden Parasiten oder seiner Wirtszelle sichtbar zu machen. Nach unserer Hypothese fällt den N-terminalen Acylierungsstellen nicht nur die Funktion eines Membranankers, sondern auch die eines Zielgebungssignals zu. Wie bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen gezeigt werden konnte (Abschnitt 1.5.3.2 Abb. 1.5) findet sich PfCDPK1 in der PV und assoziierten Membransystemen. Das

Zielgebungssignal hierfür ist unbekannt. Für den Fall, dass die N-terminale Acylierung für den Transport in die PV und das tubovesikuläre System verantwortlich ist, müssten sich die Verteilungsmuster von PfCDPK1 und den Mutanten mit veränderter Acylierungsstelle in der Zelle deutlich voneinander unterscheiden.

Zu diesem Zweck wurde die cDNA von PfCDPK1 und ihrer Mutanten VG2, AC3, DM, Δ 10-20, Val Δ , Ala Δ , DMA Δ (zur Klonierung in den Vektor pHC I) bzw. eine N-terminale Signalsequenz derselben (SP-Mutanten zur Klonierung in pARL-1a+) C-terminal an den Fluoreszenzmarker „grün fluoreszierendes Protein“ (GFP: green fluorescent protein) gekoppelt und mit Hilfe der Transfektionsvektoren pHC I und pARL-1a+ in *P. falciparum* (Stamm 3D7) exprimiert.

GFP ist ein chromophores Protein aus der pazifischen Quallenart *Aequorea victoria* welches nach Anregung durch Licht der Wellenlänge 488 nm (Argon-Laser) ein grünes Fluoreszenzlicht ausstrahlt. GFP wurde in *P. falciparum* zum ersten mal 1997 exprimiert (VanWye and Haldar, 1997). Inzwischen konnten die zur Verfügung stehenden Vektoren soweit verbessert werden, dass eine stabile Transfektion mit GFP möglich ist (de Koning-Ward et al., 2000; Foth et al., 2003; Waller et al., 2000; Wickham et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit kamen die Expressionsvektoren pHC I (Crabb et al., 1997) und pARL-1a+ (Crabb et al., 2004) zum Einsatz.

3.3.5.1 Herstellung und Transfektion der GFP-pHC I Konstrukte

Der Transfektionsvektor pHC I besitzt als Selektionskassette das Gen der Dihydrofolat-Reduktase-Thymidylat-Synthase von *Toxoplasma gondii* (TgDHFR-TS), welches dem Parasiten Resistenz gegenüber dem Antifolat Pyrimethamin verleiht. Durch Verwendung der DHFR-TS von *T. gondii* oder auch der in pARL-1a+ verwendeten humanen DHFR (hDHFR; siehe 3.3.4.2) wird eine ungewollte Integration in den DHFR-TS-Lokus von *P. falciparum* durch homologe Rekombination vermieden, da sich die Gene, da sie von unterschiedlichen Organismen stammen, stark in ihrer Nukleotidzusammensetzung unterscheiden. Unter Selektionsdruck mit Pyrimethamin werden die Plasmide episomal weitergegeben. Wird das Pyrimethamin abgesetzt, gehen die episomalen Kopien verloren (O'Donnell et al., 2001; O'Donnell et al., 2002).

Die Transkription der TgDHFR-TS steht unter der Kontrolle des *P. chabaudi* DHFR-TS Promotors und der 3' untranslatierten Sequenzen des *P. falciparum* histidine-rich protein-2 (HRP2) Gens (siehe auch Anhang). Die Transkription des eingeführten Fusionskonstrukts wird über den Calmodulinpromotor (CAM) von *P. falciparum* und einem 3' untranslatierten Bereich des *P. falciparum* Hitzeschockprotein-86 Gens (HSP86) gesteuert (Crabb et al., 1997).

3.3.5.1.1 Klonierung der GFP Transfektionskonstrukte in den Vektor pHC I

Zur Transfektion wurde folgendes Konstrukt eingesetzt:



Abb. 3.26: Transfektionskonstrukt des Fusionsproteins aus PfCDPK1 bzw. ihrer Mutanten (PfCDPK1-Mut) und GFP im Transfektionsvektor pHC I

Entsprechend den Luciferase-Fusionsproteinen (siehe Absch. 3.3.4.1) wurde PfCDPK1 bzw. ihre Mutanten (PfCDPK1-Mut) C-terminal an GFP gekoppelt und in pHC I kloniert. Als Quelle für GFP diente ein Konstrukt aus GFP und ACP in pBSI, welches von Jude Przyborski (Abteilung Parasitologie, Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde. Mit Hilfe der Primer *GFP_5end* und *GFP_3end* wurde GFP aus dem Template amplifiziert und über BamH I/Xho I in pBS II SK+ (SK) kloniert (siehe Abb. 3.26). PfCDPK1 bzw. ihre Mutanten in SK (Konstruktion siehe Abb. 3.23) wurden Not I/BamH I verdaut und vor das GFP-Gen in SK eingesetzt. Die Klonierung in pHC I erfolgte ungerichtet über Xho I. Zur Ermittlung der richtigen Orientierung des Inserts im Vektor wurde ein analytischer Restriktionsverdau mit EcoR V und Bgl II durchgeführt (siehe Abb. 3.27).

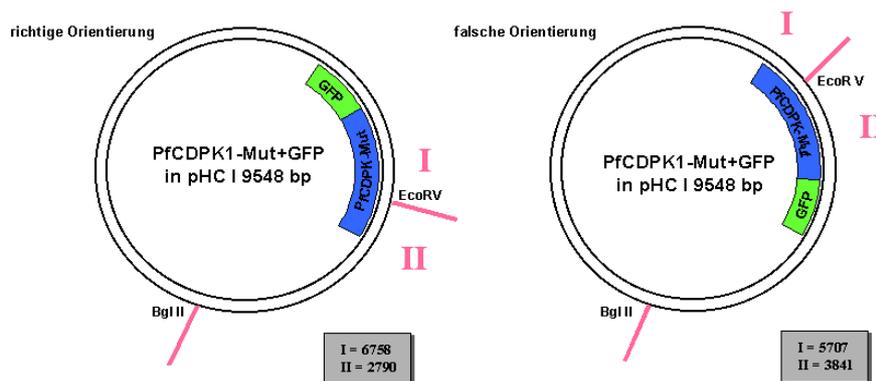


Abb.: 3.27: Orientierungsverdau zur Ermittlung der richtigen Orientierung des PfCDPK1- bzw. Mutante-GFP-Konstrukts in pHC I

Bei richtiger Orientierung ergeben sich bei Verdau mit Bgl II/EcoR V zwei Fragmente von 6758 und 2790 bp, bei falscher Orientierung von 5707 und 3841 bp Länge.

3.3.5.1.2 Transfektion der GFP-pHC I Konstrukte

Die Transfektion der GFP-pHC I-Konstrukte von PfCDPK1 und ihrer Mutanten VG2, AC3, DM, Δ 10-20, Val Δ , Ala Δ und DM Δ in den *P. falciparum* (3D7) wurde zweimal durchgeführt. Nachdem sechs Wochen nach der Transfektion noch keine Parasiten im Blutausschlag nachweisbar waren, wurde der Versuch abgebrochen.

Ein Transfektionsansatz, welcher das Δ 10-20-Konstrukt enthielt, wuchs 4 Wochen nach der Transfektion an. Allerdings war unter dem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop nach Anregung durch den Argon Laser bei 488 nm keine Fluoreszenz durch GFP feststellbar. Mit Hilfe der Primer *85_DHFR.fwd* und *P2_DHFR.rev* wurde aus genomischer DNA der Transfektanden ein 708 bp Fragment der parasiteneigenen DHFR amplifiziert und zur Sequenzierung geschickt. Dieser Abschnitt codiert für AS, deren Vorhandensein kritisch für die Wirksamkeit der Selektionsdroge Pyrimethamin sind. So verleiht der Austausch eines S in Position 108 der PfDHFR gegen N 3D7 eine Resistenz gegenüber Pyrimethamin. Hierfür ist nur eine einzige Punktmutation im Codon (AAC→AAA) erforderlich (Zolg JW, 1989). Ebenso führt der Austausch von N gegen I an Position 51 sowie von C gegen R an Position 59 zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Pyrimethamin. Die Sequenzanalyse ergab, dass das S an Position 108 gegen ein N ausgetauscht war und somit die selektionierten Parasiten resistent gegenüber Pyrimethamin waren. Die Transfektion war also auch hier nicht erfolgreich.

3.3.5.2 Herstellung und Transfektion der GFP-pARL-1a+ Konstrukte

Der Grund für das Versagen der Transfektion mit pHC I könnte zum einen im Vektor, zum anderen in der toxischen Wirkung der exprimierten Proteine zu finden sein. GFP hat nachweislich negative Auswirkungen auf das Wachstum von Zellen. Darüber hinaus könnte aber auch die Überexpression der Proteinkinase toxisch für den Parasiten gewesen sein. Die Überlegungen waren nun, einerseits die Expression unter die Kontrolle eines schwächeren Promotors zu stellen und andererseits die katalytische Aktivität der Kinase durch Deletion der für die Katalyse erforderlichen Domänen auszuschalten. Die soeben ausgeführten Überlegungen sowie die, dass eine Resistenzentwicklung der parasiteneigenen DHFR künftig vermieden werden sollte, führten dazu, dass anstelle des pHC I Vektors der neu entwickelte Transfektionsvektor pARL-1a+ (Crabb et al., 2004), der uns großzügigerweise von Tim Gilberger und Alan Cowman vom WEHI in Melbourne zur Verfügung gestellt wurde, zum Einsatz kam. Dieser enthält als Selektionsgen die humane DHFR (hDHFR), die eine Resistenz gegenüber der synthetischen Droge WR99210 vermittelt (Fidock et al., 1998; Fidock und Wellems, 1997; Zolg JW, 1989). Für eine Resistenzentwicklung gegen WR99210 sind in der parasitären DHFR mindestens drei Punktmutationen erforderlich, so dass die Wahrscheinlichkeit für ein solches Ereignis deutlich sinkt.

Der Transfektionsvektor pARL-1a+ hatte bereits gute Transfektionsergebnisse auch mit GFP-Fusionsproteinen gebracht (persönliche Kommunikation mit Yvonne Kuhn und Jude Przyborski, Parasitologie Universität Heidelberg). Die Expression erfolgt hier unter der Kontrolle des schwächeren Promotors PfCRT 5' (siehe Anhang). Um mögliche in der Kinaseaktivität begründete toxische Effekte auf das Parasitenwachstum auszuschließen, wurden für die GFP-pARL-1a+ Transfektionskonstrukte nur die N-terminalen 50 bzw. 40 AS (bei den Mutanten ohne PBC) verwendet.

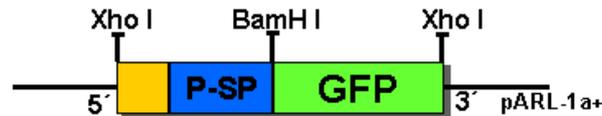
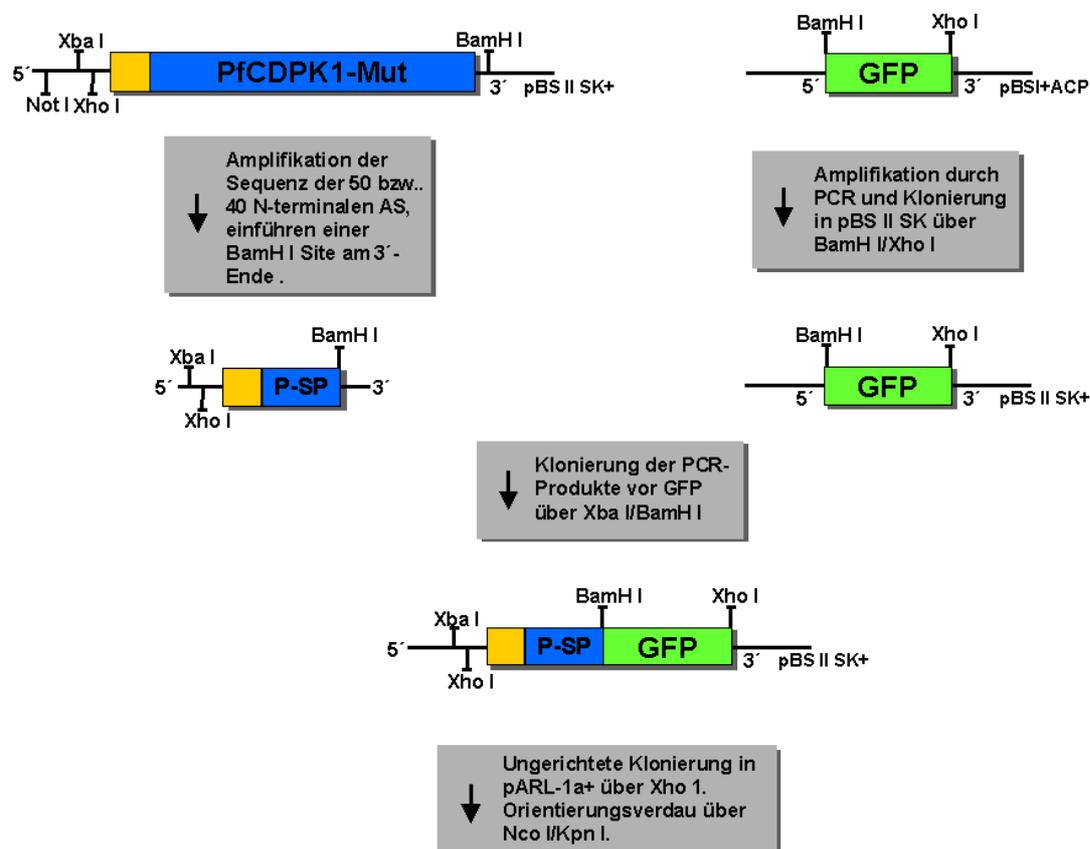


Abb. 3.28: Transfektionskonstrukt des Fusionsproteins aus der N-terminalen Signalsequenz von PfCDPK1 bzw. dessen Mutanten (kurz als P-SP bezeichnet) und GFP im Transfektionsvektor pARL-1a+

3.3.5.2.1 Klonierung der GFP Transfektionskonstrukte im Vektor pARL-1a+

Die einzelnen Klonierungsschritte, die für die Herstellung der Konstrukte aus der N-terminalen Signalsequenz von WT-PfCDPK1 bzw. ihrer Mutanten VG2, AC3, DM, Δ10-20, Val Δ, AlaΔ und DMA, kurz als P-SP für PfCDPK1 short performance bezeichnet, vor GFP in pARL-1a+ erforderlich waren, sind im folgenden Übersichtsbild schematisch dargestellt. Genauere Ausführungen zu den einzelnen für die Klonierung erforderlichen Schritte sind im anschließenden Text gegeben.



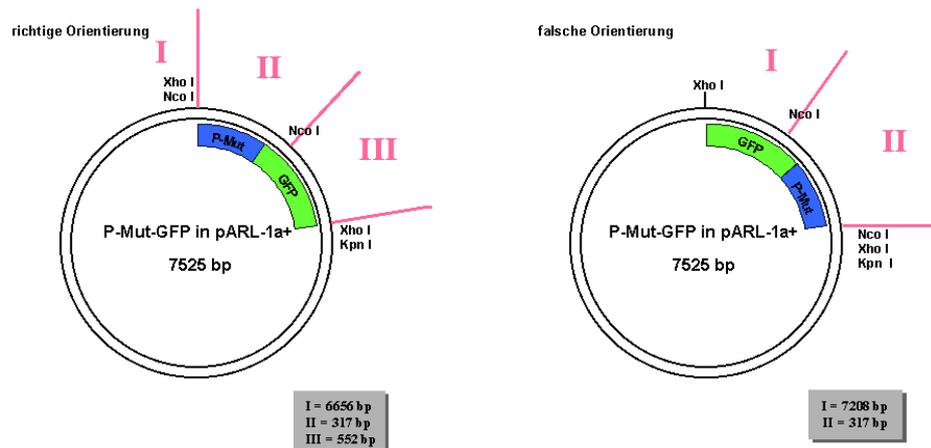


Abb. 3.29: Schematische Darstellung der einzelnen Klonierungsschritte zur Synthese der PfCDPK1-GFP-Transfektionsplasmide

Die letzte Darstellung zeigt den Orientierungsverdau für die ungerichtete Klonierung des P-SP-GFP-Konstrukts über Xho I in den Klonierungsvektor pARL-1a+. Bei richtiger Orientierung ergeben sich bei Verdau mit Nco I/Kpn I drei Fragmente mit 6656, 317 und 552 bp, bei falscher Orientierung ergeben sich zwei Fragmente mit 7208 und 317 bp.

Zunächst wurden mittels PCR die ca. 150 bzw. 120 bp lange N-terminalen Signalsequenzen von PfCDPK1 und den Mutanten gewonnen. Als Template dienten die Konstrukte der Mutationsklone bzw. von PfCDPK1-WT in pBS II SK (siehe Abschn. 3.3.1), als Primer dienten *PfCDPK1_leader_seq.fwd* und *PfCDPK1_leader_seq.rev*. Durch die PCR wurde am 3' Ende eine BamH I Site eingeführt, welche gemeinsam mit Xba I zur Klonierung der PCR-Produkte in das GFP-pBS II SK-Konstrukt diente. Die anschließende Klonierung des Fusionskonstrukts in pARL-1a+ erfolgte ungerichtet über Xho I. Zur Kontrolle der korrekten Orientierung des Inserts im Vektor wurde ein Nco I/Kpn I Verdau durchgeführt. Das Konstrukt mit der korrekten Orientierung ergibt drei Restriktionsfragmente (6656 bp, 552 bp, 317 bp), während die falsche Orientierung nur zwei Fragmente liefert (7208 bp und 317 bp). Zur Unterscheidung von den Konstrukten, die das vollständige Gen von PfCDPK1 oder ihrer Mutanten enthalten, wurde bei den verkürzten Konstrukten das Kürzel SP für short performance an den Namen der Mutante angehängt.

In der Regel replizieren bakterielle Plasmide, welche durch Transfektion in *P. falciparum* eingeführt wurden, recht gut, werden allerdings während der Mitose nur unzureichend auf die Tochterzellen aufgeteilt. Um diesen Umstand zu umgehen und die Transfektionseffizienz zu erhöhen, wurde zusätzlich eine sogenannte Rep20 Sequenz in den Transfektionsvektor eingeführt. Dabei handelt es sich um eine repetitive Sequenz von 280 bp Länge, die aus sich wiederholenden Einheiten eines 21 bp langen Motivs besteht. Sie ist eines von sechs verschiedenen repetitiven Elementen, welche sich in subtelomeren Bereichen der Chromosomen von *P. falciparum* befinden (O'Donnell et al., 2002). Diese auch als telomere-associated repeat elements (TAREs) bezeichneten Elemente finden sich nur bei *P. falciparum*, nicht jedoch bei anderen *Plasmodien*-Arten oder sonstigen eukaryontischen Zellen. Sie vermitteln die Anheftung der Plasmide an Chromosomen und führen so zu einer dramatischen

Verbesserung der Verteilung der Plasmide auf die Tochter-Merozoiten. In Untersuchungen konnte so die Zeit zwischen der Transfektion und dem ersten Auftreten stabiler Transfektanden fast halbiert werden (O'Donnell et al., 2002).

Das Rep20-Element wurde ungerichtet über Not I in das Transfektionskonstrukt kloniert, wobei die Orientierung des Inserts im Vektor keine Rolle spielt.

Als Kontrolle für die Transfektion diente ein Konstrukt aus GFP in pARL-1a+, welches von Svenja Günther (AG PD Dr. Barbara Kappes, Parasitologie, Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde.

3.3.5.2.2 Transfektion der GFP-pARL-1a+ Konstrukte

Die acht Konstrukte WT-SP, VG2-SP, AC3-SP, DM-SP, Δ 10-20-SP, Val Δ -SP, Ala Δ -SP, DM Δ -SP +GFP in pARL-1a+ wurden zweimal, im Abstand von 4 Wochen, in *P. falciparum* 3D7 transfiziert. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurde mit der Selektion durch Zugabe von 5 nM WR99210 begonnen. Bei allen Transfektionen waren erste resistente Parasiten zwischen dem 18. und 25. Tag im Blutausschlag sichtbar. Die Transfektanden wurden unter Beibehaltung der Inhibitorkonzentration weiter kultiviert, wobei eine Parasitämie von 5% nicht überschritten wurde. Bei allen Klonen konnte man die GFP-spezifische Fluoreszenz bei Anregung durch Licht mit $\lambda = 488$ nm beobachten.

3.3.5.2.3 Mikroskopische Analyse der GFP exprimierenden Transfektionsklone

Für die mikroskopische Analyse der Transfektanden wurden Kulturen mit einer Parasitämie von 10 - 15% verwendet. Um die Konzentration an toxischen Stoffwechselprodukten, welche bei derartigen hohen Parasitämien anfallen, gering zu halten, wurde das Medium zweimal täglich gewechselt. Es wurden keine hoch synchronen Kulturen verwendet, jedoch wurde darauf geachtet, dass sich die Mehrzahl der Parasiten für die Untersuchung im Trophozoiten- oder frühen Schizontenstadium befanden. Um die mikroskopische Analyse zu erleichtern wurden die iRBC mit Hilfe einer magnetischen Trennsäule auf 70-85% angereichert. Da das magnetische Feld eine Belastung für die Parasiten darstellt, wurde die Säulenaufenthaltszeit minimiert und den Parasiten vor der mikroskopischen Analyse eine Regenerationszeit von 1-2 h bei 37°C gewährt. Zum Anfärben der parasitären DNA wurde 10 μ l Hoechst 33342-Reagenz (5 μ M in PBS) zugesetzt und 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Messung erfolgte in einer Messzelle, deren Boden mit einem Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger verschlossen war, auf dem die iRBC haften blieben. In die Messkammer wurden 500 μ l auf 37°C temperierte Ringerlösung und 5 μ l des infizierten Erythrocytenkonzentrats gegeben. Die Parasiten wurden unter einem konfokalen Mikroskop vom Typ Zeiss LSM510 untersucht (genaueres siehe Methodenteil).

Bei der mikroskopischen Untersuchung fiel zunächst auf, dass sowohl die Expressionsrate der GFP-Konstrukte, wie auch die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichtes zwischen den einzelnen Konstrukten sehr stark variierte. Nur ein kleiner Teil der Parasiten (10%) zeigte eine deutlich ausgeprägte Lichtemission. Zwar war auch bei den übrigen Parasiten eine grüne Färbung feststellbar, die bei der Betrachtung von nicht transfizierten Parasiten des gleichen Stammes nicht auftrat; jedoch war ihre Intensität für die mikroskopische Auswertung zu gering. Der Großteil der Parasiten schien das GFP-Fusionsprotein zudem in seiner Nahrungsvakuole zu verdauen, worauf eine schwache Konzentrierung von GFP Signalen im Bereich der Nahrungsvakuolen schließen ließ. Der Grund für diese Beobachtung ist unbekannt. Denkbar wäre, dass das parasitenfremde GFP sich toxisch auf den Parasiten auswirkt, so dass dieser versucht, sich des GFPs durch dessen Abbau in der Nahrungsvakuole zu entledigen.

Positiv auf die Expression des GFPs und somit auf die Intensität des emittierten Lichtes wirkte sich eine Erhöhung der WR99210-Konzentration auf 40 nM wenige Tage vor der Analyse aus. Ähnliche Effekte erzielte auch ein häufigerer Mediumwechsel (≥ 2 mal täglich) und ein niedriger Hkt der Parasitenkultur im Vorfeld der mikroskopischen Untersuchung. Mit zunehmendem Alter der Kulturen schienen die Transfektanden ihre Fähigkeit zur Expression von GFP einzubüßen.

Da der UV-Laser (488 nm) am Ende seiner Lebensdauer angelangt war, ist in manchen Aufnahmen die DNA-Färbung durch Hoechst Farbstoff 33342 nur schwach oder teils gar nicht zu sehen. Nach Austausch der Lasereinheit konnte dieser Umstand behoben werden. Das Fehlen der Hoechst Färbung soll hier also nicht das Fehlen von parasitärer DNA bedeuten.

GFP-Kontrolle:

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Parasiten, die mit der GFP-Kontrolle transfiziert wurden, zeigte sich eine gleichmäßige starke Anfärbung des Cytoplasmas der Parasiten (Abb. 3.30). Die Aufnahmen wurden von Svenja Günther (AG Kappes, Parasitologie, Universität Heidelberg), die auch für die Klonierung des GFP-pARL-1a+-Konstruktes verantwortlich war, für ihre Diplomarbeit angefertigt.

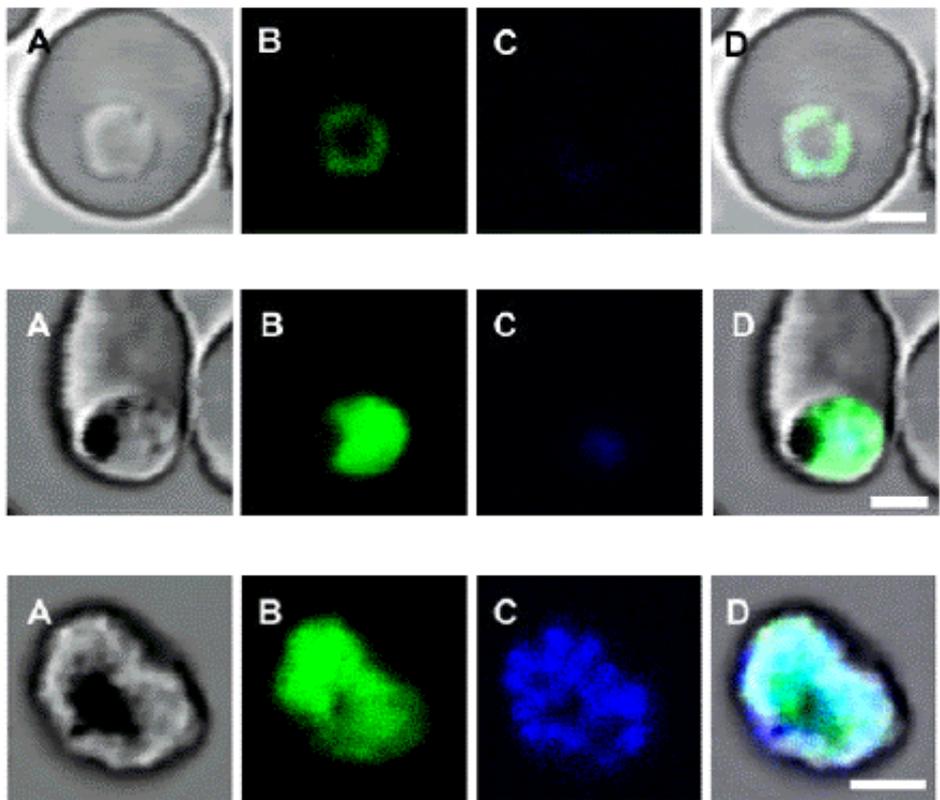


Abb. 3.30: Expression von GFP in pARL-1a+ (mit Rep20) in *P. falciparum*

A entspricht dem Durchlicht-Kanal, unter B ist die grüne Fluoreszenz des GFP zu erkennen, C zeigt die blaue Fluoreszenz, der mit Hoechst 33342 gefärbten DNA und D ist die Überlagerung aller drei Kanäle. Der Maßstab entspricht 2 μm .

oben: Parasit im Ringstadium, der die GFP-Kontrolle exprimiert.

Mitte: Trophozoit mit gefärbtem Cytoplasma.

unten: Schizont, der schon mehrere Kernteilungen durchlaufen hat.

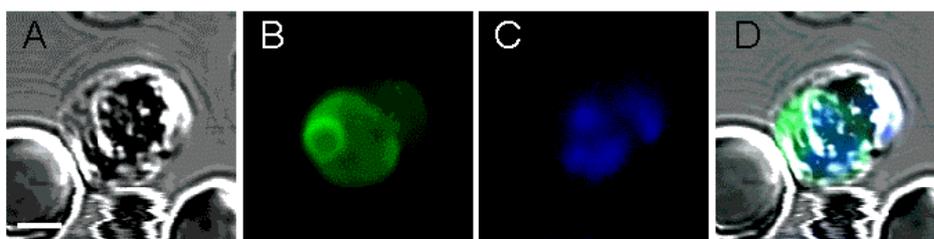
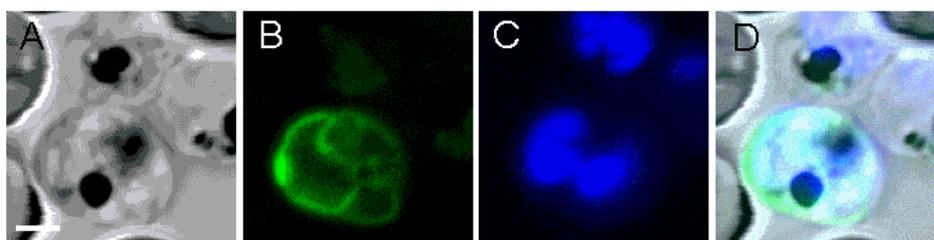
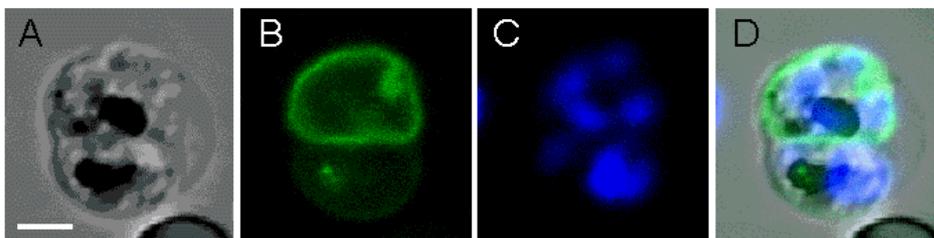
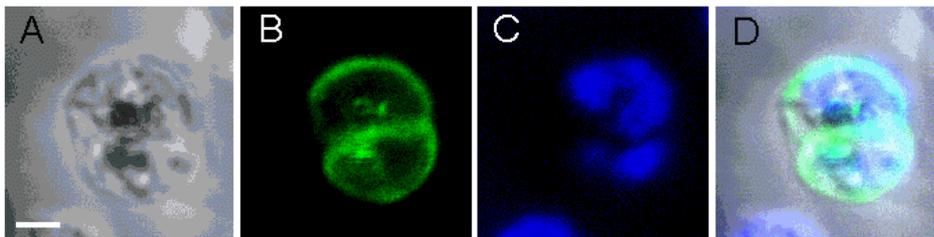
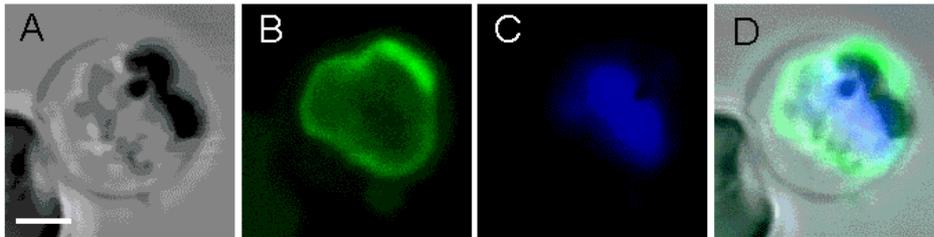
(Quelle: Diplomarbeit Svenja Günther)

WT-SP + GFP in pARL-1a+:

Die Parasiten, welche das Fusionsprotein aus dem unveränderten N-Terminus von PfCDPK1 und GFP exprimieren, zeigten deutliche Hinweise auf eine Lokalisation des Fusionsproteins in der parasitophoren Vakuole (PV). In Trophozoiten und frühen Schizonten war bei vielen Beispielen deutlich die ringförmig angefärbte PV auszumachen (Abb. 3.31a.). Diese Färbung ist typisch für Proteine, welche in der PV lokalisiert sind (Waller et al., 2000; Wickham et al., 2001). Auch eine Färbung von Organellen, die sich von der PV ableiten, konnte beobachtet werden (Abb. 3.31a 1. von unten). Am Ende des Schizontenstadiums zeigte sich in späten Segmenten (Abb. 3.31b.) ein sternförmiges Muster, das bereits bei Co-Lokalisations-Untersuchungen von PfCDPK1 und MSP1 (merozoite surface protein 1) beobachtet werden konnte (Kappes, unveröffentlichte Daten). Dieses Muster entsteht durch Invaginationen der parasitären Plasmamembran zur Ausbildung der Plasmamembranen der neuen Merozoiten. Es ist nur äußerst selten zu beobachten, da die neu

entstehenden Merozoiten hierfür alle in einer Ebene liegen müssen, die zudem durch das Mikroskop senkrecht erfasst werden kann. Liegt die Fokusebene des Mikroskops schräg zu dieser Ebene, ist die Struktur nicht zu erkennen.

a.)



b.)

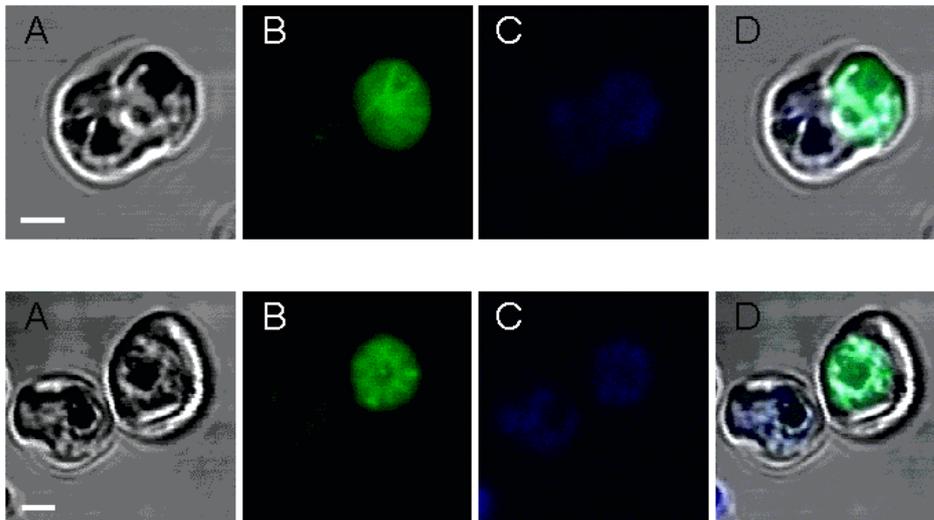


Abb.: 3.31: Expression des Transfektionsklons WT-SP + GFP in pARL-1a+ in *P. falciparum*

A entspricht dem Durchlicht-Kanal, unter **B** ist die grüne Fluoreszenz des GFP zu erkennen, **C** zeigt die blaue Fluoreszenz, der mit Hoechst 33342 gefärbten DNA und **D** ist die Überlagerung der drei Kanäle. Der Maßstab entspricht 2 μm .

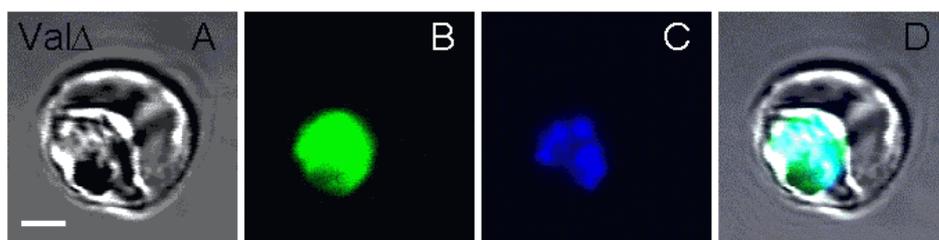
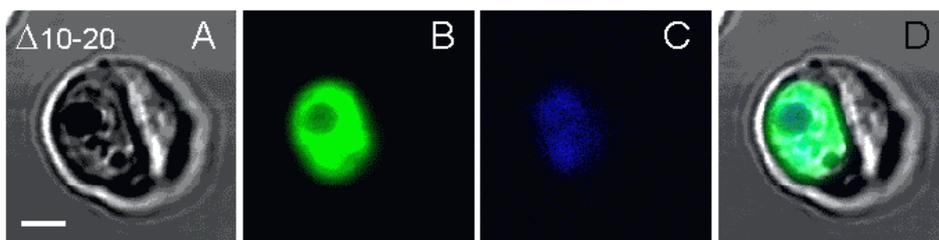
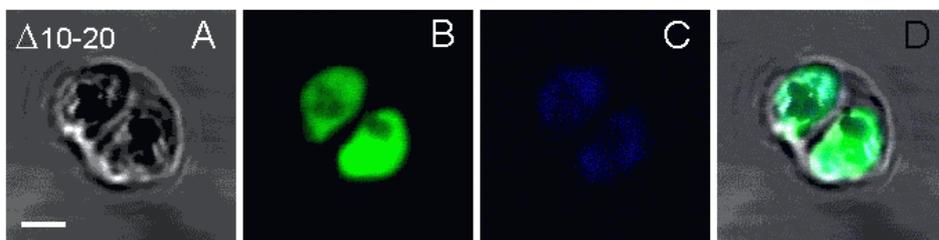
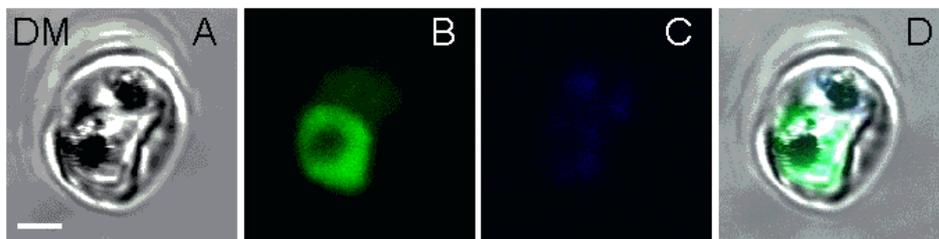
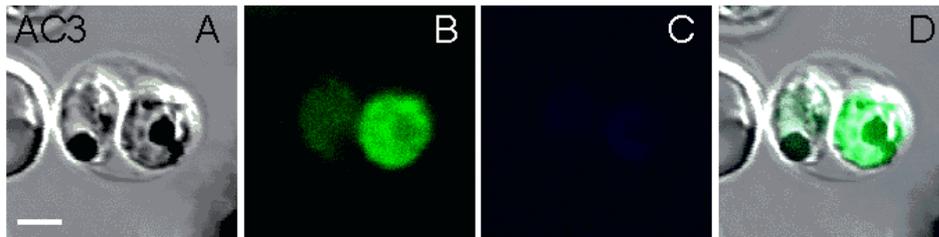
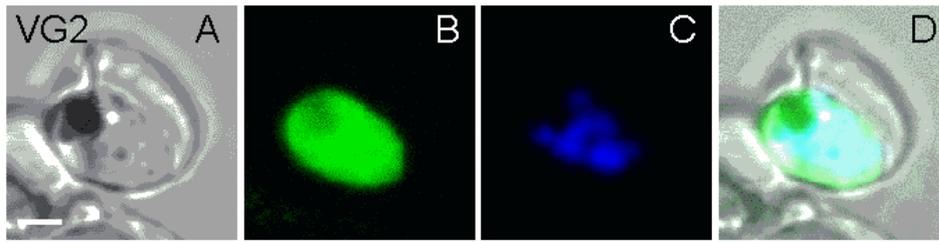
a.) Schizonten: Deutlich ist die ringförmige Struktur der PV zu sehen. Es tritt sowohl ein einfacher (1. v. oben) wie auch ein doppelter (2. und 3. v. oben) und eventuell ein dreifacher (4. v. o.) Befall auf.

Im Bild unten sind Organellstrukturen des TVS zu sehen.

b.) Segmenter: Es sind sternförmige Strukturen zu erkennen, die durch die Invagination der parasitären Plasmamembran zur Ausbildung der Merozoitenmembranen entstehen.

Mutanten mit veränderten Membranbindungsmotiven + GFP in pARL-1a+:

Im Gegensatz zum WT-Konstrukt zeigten die Konstrukte von VG2-SP, AC3-SP, DM-SP, Δ 10-20-SP, Val Δ -SP und DMA Δ -SP + GFP in pARL-1a+ keine Färbung, wie sie für eine Lokalisation in der PV typisch ist (siehe Abb. 3.18). Es konnten weder die typischen Ringstrukturen noch die sternförmigen Strukturen beobachtet werden. Statt dessen spricht der Vergleich mit der GFP-Kontrolle (Abb. 3.16) für eine Lokalisation des GFPs im Cytosol des Parasiten. Das Cytoplasma ist hier gleichmäßig angefärbt. Die Nahrungsvakuole ist als dunkler Fleck auszumachen. Keines der sechs Konstrukte scheint also in der Lage zu sein, die PV zu erreichen. Möglicherweise sind für den Export in dieses Kompartiment alle drei Membranbindungsmotive erforderlich. Die Mutante Ala Δ -SP + GFP in pARL-1a+ wurde zwar auch erfolgreich in *P. falciparum* exprimiert, jedoch ging sie infolge von Kontaminationen in der Parasitenkultur verloren, bevor Aufnahmen gemacht werden konnten. Da jedoch Voruntersuchungen keine Hinweise auf eine von den anderen Mutanten abweichende Verteilung von GFP ergaben, wurde von einer erneuten Transfektion Abstand genommen.



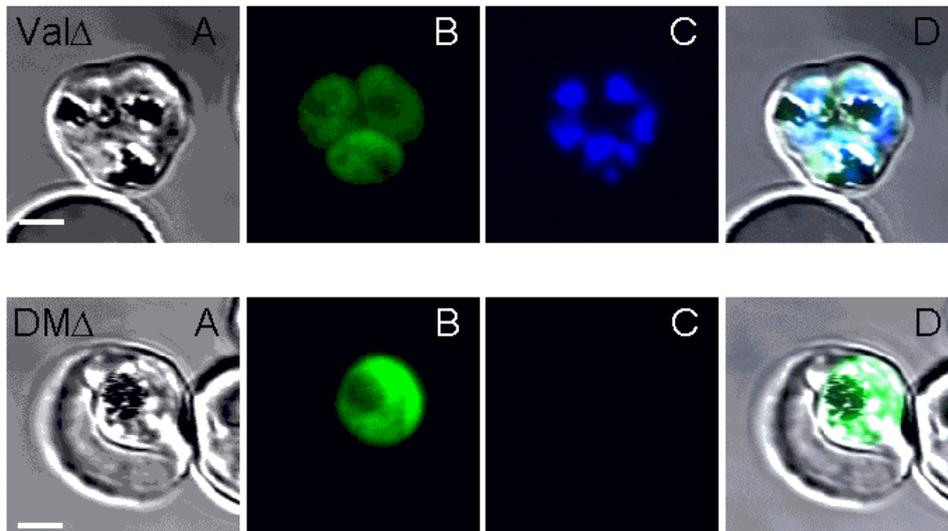


Abb. 3.32: Expression der Transfektionsklone VG2-, AC3-, DM-, Δ 10-20-, Val Δ - DM Δ -SP + GFP in pARL-1a+ in *P. falciparum*

A entspricht dem Durchlicht-Kanal, unter **B** ist die grüne Fluoreszenz des GFP zu erkennen, **C** zeigt die blaue Fluoreszenz, der mit Hoechst 33342 gefärbten DNA und **D** ist die Überlagerung der drei Kanäle. Der Maßstab entspricht 2 μ m.

Bei allen Konstrukten ist das Cytosol des Parasiten gleichmäßig durch GFP gefärbt. Die Nahrungsvakuole zeichnet sich als dunkler Fleck ab. Eine Färbung der PV konnte nicht beobachtet werden.

4 Diskussion

4.1 Identifikation spezifischer gegen PfCDPK1 gerichteter Inhibitoren

Die calciumabhängigen Proteinkinasen von *P. falciparum* (PfCDPKs) stellen in vieler Hinsicht ein ideales Angriffsziel für die Entwicklung neuer Pharmaka gegen die Malaria tropica dar. Calciuminduzierte Signaltransduktionswege nehmen in eukaryontischen Zellen eine herausragende Stellung bei der Vermittlung zahlreicher zellulärer Prozesse ein. So auch bei *P. falciparum*, für das gezeigt werden konnte, dass Calcium sowohl für die Invasion der Erythrocyten wie auch für die intraerythrocytäre Entwicklung der Parasiten essentiell ist (Tanabe, 1990; Vial et al., 1982; Wasserman et al., 1982; Wasserman and Chaparro, 1996). Infizierte Erythrocyten akkumulieren Calcium zu bis zu 20-fach höheren Konzentrationen als normale Erythrocyten, was die besondere Bedeutung der Calciumhomöostase für diesen Organismus unterstreicht. Eine Schlüsselstellung bei der Vermittlung calciuminduzierter Phosphorylierungsereignisse scheinen dabei, wie bei Pflanzen, die calciumabhängigen Proteinkinasen (CDPKs) einzunehmen. Da sie nur in Pflanzen und einigen Protozoen, so auch in *Plasmodium*, nicht aber in tierischen Zellen vorkommen, bieten sie ein ideales Angriffsziel für die Entwicklung neuer Pharmaka. Mit Hilfe eines spezifischen Inhibitors gegen PfCDPKs könnte so gezielt gegen den Parasiten vorgegangen werden, ohne den Menschen als Wirt zu schädigen. Da dieser selbst keine CDPKs besitzt, könnte so die Gefahr von Nebenwirkungen deutlich reduziert werden. Davon abgesehen stellt ein spezifischer Inhibitor ein nützliches Werkzeug für die Klärung einer Vielzahl biologischer Fragestellungen dar.

Der erste Ansatz einen spezifischen Inhibitor zu identifizieren bestand darin, eine Herbizid-Bank, bestehend aus über 350 Substanzen, auf ihre inhibitorische Wirkung gegen PfCDPK1 zu testen. Da in Pflanzen viele wichtige Prozesse durch CDPKs vermittelt werden, wäre es denkbar, dass einige der Herbizide ihre Wirkung durch eine Hemmung der pflanzlichen CDPKs ausüben. Diese Inhibitoren könnten möglicherweise auch gegen PfCDPK1 wirksam sein. Wir identifizierten fünf Substanzen, die PfCDPK1 bei einer Konzentration von 10 μM zu über 50% inhibierten. Die weitere Analyse der Herbizide zeigte jedoch, dass ihre Wirkung eher auf unspezifische Mechanismen zurückzuführen war. Bei drei Substanzen handelte es sich um chemisch verwandte metallorganische Verbindungen, die ihre Wirkung eher dem Anteil an Schwermetall verdanken. Eine Substanz wirkte alkylierend. Sie wird, genauso wie die fünfte Substanz, deren Wirkmechanismus nicht genau bekannt ist, hauptsächlich als Fungizid eingesetzt, was eine spezifische Wirkung auf PfCDPK1 ebenfalls ausschließt, da CDPKs in Pilzen nicht vorkommen. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man ausschließen, dass die getesteten Substanzen durch Hemmung pflanzlicher CDPKs wirken.

Dank des TDR/DDR-Programms (Research and Training in Tropical Disease / Drug Discovery Research) der WHO wurde uns die Möglichkeit gegeben, in einem High Throughput Screen (HTS) die inhibitorische Aktivität von über 19442 Substanzen gegenüber PfCDPK1 und zum Teil auch gegen *P. falciparum* zu testen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden uns mehrere hundert Analoga der potentiellen Hit-Substanzen zur Testung zur Verfügung gestellt. Ziel war es, eine Leitstruktur für einen spezifischen Inhibitor von PfCDPK1 zu identifizieren.

Die Ausbeute des HTS blieb mit sieben Hit-Substanzen deutlich hinter den Erwartungen zurück, zumal allein drei Substanzen davon einer speziellen Auswahl von 279 Substanzen mit Kinaseinhibitor-Pharmakophoren entstammen. Für die restlichen 19163 Substanzen des HTS, die aufgrund ihrer Diversität ausgewählt wurden, würde man erfahrungsgemäß eigentlich eine Trefferquote von 0,1 - 0,5%, also 19 - 90 Treffer, erwarten. Die Firma DTL, welche den HTS durchgeführt hat, begründet die geringe Trefferquote mit der relativ geringen Anzahl an getesteten Substanzen, die im Industriemaßstab in der Regel bei weit über 100000 Substanzen liegt.

Bei der Auswertung der Strukturen zeigte sich, dass allein drei der Hit-Substanzen des HTS und die 10 besten Substanzen der Hit-Analoga, die uns von der Firma SPECS zur Verfügung gestellt wurden, als Kernstruktur einen Indol-2-on Heterocyclus besitzen. Im Falle der SPECS-Substanzen ist dies besonders bemerkenswert, da von den fünf verschiedenen Substanzklassen, die bei den 436 Hit-Analoga vertreten waren, allein die Gruppe der Indol-2-one eine deutliche inhibitorische Wirkung aufwies. Bei den anderen Substanzklassen zeigte sich keine derartige Häufung inhibitorischer Effekte. Das Indol-2-on Grundgerüst bietet also eine gewisse Grundvoraussetzung für einen Inhibitor.

Die negativen Ergebnisse, die bei der Testung der 283 Hit-Analoga der Firma Olivia, welche ebenfalls in ihrer Mehrzahl aus Indol-2-on-Derivaten zusammengesetzt waren, erhalten wurden, machten jedoch deutlich, dass über das Indol-2-on Grundgerüst hinaus noch weitere Anforderungen an die Struktur bestehen. So scheint insbesondere der Substituent in Position 3 des Indolringes über eine Inhibition zu entscheiden. Es ist also noch zu früh, um von einer wirklichen Leitstruktur zu sprechen. Zumal es sich bei den Indol-2-on-Derivaten des HTS um bereits beschriebene Kinaseinhibitoren handelt, so dass keine spezifische Wirkung gegenüber PfCDPK1 erwartet werden kann. Die essentiellen Strukturelemente müssen weiter eingekreist werden und durch Testung anderer Kinasen unspezifische Inhibitoren ausgelesen werden. Hilfreich wäre hier die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur von PfCDPK1, so dass man den spezifischen Inhibitor durch molecular modelling quasi am Computer entwerfen könnte.

Die mangelnde Spezifität und die IC_{50} -Werte im mikromolaren Bereich verhindert auch den vorläufigen Einsatz der Substanzen in zellbiologischen Experimenten. Der Serin/Threonin-Kinaseinhibitor Staurosporin und der selektive Inhibitor der Src-Tyrosinkinase-Familie 4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP1) z.B. weisen im Vergleich dazu IC_{50} -Werte

von 60 nM bzw. 340 nM gegenüber PfCDPK1 auf (Bishop and Shokat, 1999; Bishop et al., 2000; Toledo and Lydon, 1997).

Analoge von Staurosporin und PP1 waren im HTS nur unzureichend vertreten. Es wäre interessant zu sehen, ob auch andere Vertreter der Gruppe der Maleimide (Staurosporin) und der 1H-Pyrazolo[4,3-d]Pyrimidine (PP1) in der Lage sind, PfCDPK1 in ähnlichem Ausmaß oder besser zu inhibieren. Die Möglichkeiten des Substanz-Screenings sind somit bei weitem nicht ausgeschöpft. Zur Zeit ist die WHO in Verhandlungen mit einem der weltweit führenden pharmazeutisch ausgerichteten Biotechnologie-Unternehmen, dessen Kinaseinhibitorbank möglicherweise für ein Screening mit PfCDPK1 genutzt werden kann.

4.2 Biochemische Charakterisierung von PfCDPK1 zur Verbesserung der Kristallisationseigenschaften

Für die Entwicklung spezifischer und hoch wirksamer Inhibitoren ist die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des Zielproteins häufig eine Voraussetzung oder zumindest zeitsparend und kostendämpfend. Beim molecular modelling können Inhibitoren anhand der bekannten Bindungsverhältnisse und Strukturen im Protein direkt am Computer entworfen werden.

Die Strukturaufklärung von Proteinen erfolgt meist über die Kristallisation des Proteins und eine anschließende Röntgenstrukturanalyse der Proteinkristalle. Die Kristallisation von Proteinen ist ein komplexer Prozess dessen Gelingen von einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren abhängt. Besonders kritisch für die Kristallisation ist einerseits die Reinheit des rekombinanten Proteins, andererseits, dass das zu kristallisierende Protein als homogene Proteinpopulation vorliegt. Multimerisierungs- oder Aggregationstendenzen, inhomogene Proteinpopulationen und flexible Strukturen im Molekül wirken der Kristallisation entgegen. Daher ist eine genaue biochemische Charakterisierung des Proteins im Vorfeld der Kristallisation erforderlich, um auf seine spezifischen Eigenschaften reagieren zu können.

Im Verlauf dieses Teilprojektes gelang es, die Eigenschaften der rekombinanten PfCDPK1 durch verschiedene Maßnahmen soweit zu optimieren, dass sie für eine Kristallisation geeignet erschienen. Ein entscheidender Beitrag zur Reinheit der Proteinlösung wurde durch das Hintereinanderschalten von zwei auf unterschiedlichen Prinzipien basierenden Reinigungsverfahren, nämlich der Ni-Affinitätschromatographie und der Gelfiltration, erreicht.

Eine bei Verwendung des Expressionsvektors Stueber No. 9 auftretende, nur unzureichende Bindung an die Matrix der Affinitätssäule konnte durch die Verwendung der Vektoren pETM-11 oder pET-21a(+) stark verbessert werden, so dass unspezifisch gebundenes Protein im Eluat reduziert und die Reinheit des rekombinanten Proteins deutlich erhöht werden konnte. Das gelfiltrierte Protein zeigte im

SDS-PAGE keine sichtbaren Verunreinigungen mehr (Abb. 3.7 b.) und konnte nach Konzentrierung auf 15-20 mg/ml direkt für die Kristallisation verwendet werden.

Dem Problem einer inhomogenen Proteinpopulation wurde auf verschiedene Weise begegnet. Durch den Einsatz der katalytisch inaktiven Mutante D212A wurde die Autophosphorylierung der Kinase verhindert, so dass keine unterschiedlich phosphorylierten Proteinspezies nebeneinander existieren.

Eine weitere Quelle für eine inhomogene Proteinpopulation stellt das in Spuren vorhandene Ca^{2+} in den Pufferlösungen dar. PfCDPK1 wird durch Ca^{2+} aktiviert, wobei es seine Konformation ändert (Zhao et al., 1994). Nach unserer Arbeitshypothese klappt hierbei die Ca^{2+} -bindende Domäne praktisch auf und gibt das aktive Zentrum der Kinasedomäne frei (s. Abb. 4.1). Neben einer Volumenvergrößerung wäre ein solcher Vorgang auch mit einer Zunahme an Flexibilität innerhalb der Proteinstruktur verbunden, wodurch eine Kristallisation erschwert wird. Dieser Einfluss von Ca^{2+} auf Größe und Eigenschaften von PfCDPK1 wurde mit Hilfe der Gelfiltration und des DLS genauer untersucht. Hierfür wurde das Verhalten von N51-D212A C-His, einer verkürzten und katalytisch inaktiven Mutante von PfCDPK1, unter drei verschiedenen Calciumbedingungen analysiert (Abschn. 3.2.4). Dabei zeigte sich, dass in Anwesenheit von 10 mM Ca^{2+} das apparente Molekulargewicht (M_a), also das Raumvolumen, das PfCDPK1 einnimmt, deutlich zunahm. Der Unterschied zu einer Probe in welcher das Ca^{2+} durch Komplexbildung mit EGTA entfernt wurde, betrug dabei fast 5 kDa (Tab. 3.5). Eine weitere Probe, welche ohne Ca^{2+} - und EGTA-Zusatz in Standard-Gelfiltrationspuffer aufgetrennt wurde, zeigte gegenüber der Ca^{2+} -freien Probe ein um 4 kDa vergrößertes M_a . Unter Standardbedingungen reichen also die Spuren von Ca^{2+} in der Pufferlösung aus, um eine Zunahme des M_a zu bewirken. Diese Größenzunahme kann nicht ausschließlich über die Bindung von Ca^{2+} erklärt werden, welche das M_r um maximal 0,160 kDa steigern würde. Sie wird folglich durch eine Konformationsänderung ausgelöst, infolge derer die Kinase ein größeres Raumvolumen beansprucht. Diese Ergebnisse unterstützen somit unser Arbeitsmodell, nach dem durch Ca^{2+} -Bindung eine Konformationsänderung der Ca^{2+} -bindenden Domäne bewirkt wird, die zur Folge hat, dass diese von der katalytischen Domäne wegklappt, wodurch das katalytische Zentrum der Kinase zugänglich wird. Dieser für die Aktivierung vorgeschlagene Mechanismus würde mit einer Volumenzunahme der Kinase einhergehen (Abb.4.1).

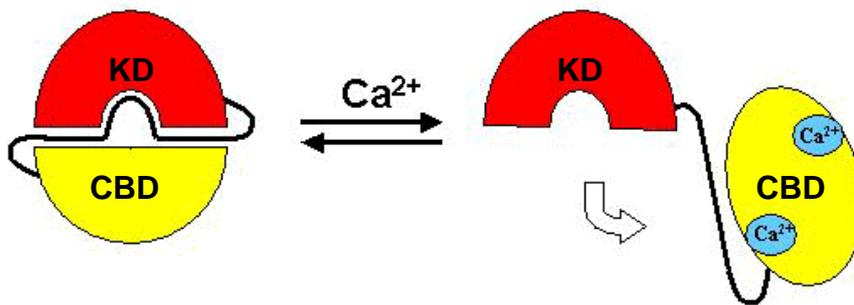


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Aktivierung von PfCDPK1 durch Ca^{2+}

Durch die Bindung von Ca^{2+} an die Ca^{2+} -bindende Domäne CBD klappt PfCDPK1 unter Vergrößerung ihres Raumanpruches auf und gibt das aktive Zentrum (Z) in der katalytischen Domäne (KD) frei.

Ferner bestätigen unsere Daten auch teilweise die Beobachtungen von (Christodoulou et al., 2004) an einer CDPK aus *Arabidopsis thaliana*, wonach bereits substöchiometrische Konzentrationen von Ca^{2+} eine Konformationsänderung in der calciumbindenden Domäne (CBD) auslösen, infolge derer der C-terminale Teil dieser Domäne, der die Ca^{2+} -Bindungsstellen III und IV enthält, an das Verbindungsstück zwischen CBD und katalytischer Domäne (KD) bindet. Die Struktur erfährt hierdurch eine Stabilisierung, ohne dass die Kinase dabei aktiviert wird. Ein ähnlicher Mechanismus bei PfCDPK1 würde erklären, weshalb es im Standardpuffer ohne Zusatz von Ca^{2+} zu einer Konformationsänderung kommt. Allerdings schlagen Christodoulou et al. ein Modell vor, wonach die CBD in Abwesenheit von Ca^{2+} infolge der fehlenden Bindung an die Linkerregion ein größeres Raumvolumen einnimmt, was im Widerspruch zu unseren Ergebnissen steht, nach denen die Kinase in Ca^{2+} -freiem Milieu eine Volumenverkleinerung erfährt. Die Untersuchungen von Christodoulou erfolgten jedoch an der isolierten CBD der Kinase während für unseren Arbeiten ein Konstrukt zur Anwendung kam, das sowohl die CBD als auch die KD enthielt. Der Einfluss der KD auf die Konformation der CDPK ist bei Christodoulou et al. im Gegensatz zu unseren Arbeiten nicht berücksichtigt, weshalb ein direkte Vergleich nicht möglich ist.

Im Verlauf unserer Untersuchungen zeigte sich auch, dass die durch Ca^{2+} bewirkte Konformationsänderung der Kinase außerdem die Bildung von PfCDPK1-Multimeren in Lösung begünstigt. Beim Vergleich der Elutionsprofile der Gelfiltration sowie der DLS-Daten der Mutante D212A nach Aufreinigung in Standard-, Ca^{2+} -haltigem und EGTA-haltigem Puffer fiel der hohe Anteil an Multimeren bei Verwendung von Standard- und Ca^{2+} -haltigem Puffer auf. Durch Zusatz von EGTA, welches Ca^{2+} durch Chelierung entzieht, konnte hingegen das Verhältnis deutlich zu Gunsten des monomeren Proteins verschoben werden. Unter diesen Bedingungen lag der Großteil des Proteins (80-90%) als Monomer vor, während die Bildung von Multimeren fast ganz zurückgedrängt werden konnte. Der Anteil des Dimers war bei den drei Bedingungen relativ konstant. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Ca^{2+} -induzierte Konformationsänderung der Kinase nicht nur die Aktivierung der Kinase bewirkt, sondern auch Strukturen freilegt, welche die Anlagerung an Schwestermoleküle begünstigen. Die Multimerisierung von PfCDPK1 ist eine Gleichgewichtsreaktion, die sich, wie wir

im DLS zeigen konnten, auch nach Entfernen der Multimere mittels Gelfiltration wieder einstellt. Daher können die Multimere nicht dauerhaft aus der Lösung entfernt werden. Durch den Zusatz von EGTA bei der Aufreinigung von D212A konnte jedoch der Anteil an monomerem Protein stark erhöht werden.

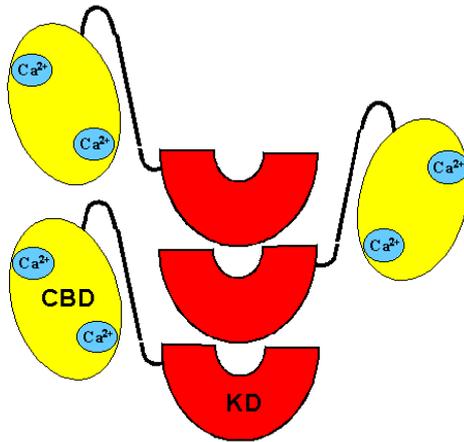


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Multimerisierung der katalytisch inaktiven PfCDPK1 Mutante D212A nach Aktivierung durch Ca^{2+}

CBD: Calciumbindende Domäne; KD: katalytische Domäne

Trotz des drastischen Rückgangs an Multimeren in der EGTA-Probe war der Anteil an polydispersem Protein bei der DLS-Analyse mit 21,6% deutlich höher als erwartet und zu hoch, um eine Kristallisation aussichtsreich erscheinen zu lassen. Es waren also noch weitere Faktoren für die inhomogene Proteinpopulation verantwortlich. Als mögliche Ursache konnte in Verdaustudien mit den Proteasen Trypsin und Chymotrypsin eine N-terminale Sequenz von 50 AS identifiziert werden, welche wie unter 1.6.3 beschrieben als Membrananker fungiert. Dieser Sequenz kommt keine katalytische Funktion zu, da sie, wie Sequenzalignments ergaben, vor der Kinasedomäne liegt. Solch ein peitschenartiger Membrananker an der Oberfläche der Kinase könnte durch seine lange, flexible Struktur die geordnete Anlagerung einzelner Monomere entscheidend behindern und eine Kristallisation erschweren. Ferner könnte er durch die geladenen basischen AS des polybasischen Clusters (PBC) eine Anlagerung an Schwestermoleküle und somit die Multimerisierung begünstigen. Aus diesem Grunde wurde eine um die 51 AS des Membranankers verkürzte Variante von PfCDPK1-D212A, N51-D212A C- oder N-His, und eine um 30 AS verkürzte Variante, N30-D212A C- oder N-His, hergestellt. Während der Expression und Aufreinigung der N30-D212A Mutanten zeigte sich, dass ihre Ausbeute deutlich geringer ausfiel, als die der N51-D212A Mutanten. Aus diesem Grunde wurde für alle weiteren Untersuchungen die um 51 AS verkürzte Variante eingesetzt.

Durch den Einsatz der N51-D212A Mutante mit C- oder N-terminalem His-tag, welcher bei letzterer durch TEV-Proteaseverdau entfernt werden konnte, und durch die Zugabe von 10 mM EGTA zum Gelfiltrationspuffer gelang es schließlich, den Anteil an polydispersem Protein (%Pd) auf Werte zwischen 10 und 12% zu reduzieren. Die Werte für das M_a , welches sowohl bei der Gelfiltration als auch bei der DLS berechnet wurde, näherten sich zudem stark an das tatsächliche Molekulargewicht von N51-D212A an. Diese Ergebnisse sprechen für eine relativ homogene monomere

Proteinpopulation mit geringer Tendenz zur Multimerisierung, erfahrungsgemäß optimale Voraussetzungen für die Kristallisation eines Proteins. Somit scheint der Membrananker wie vermutet, die Aggregation von PfCDPK1 zu beeinflussen. Dabei besteht die Möglichkeit, dass er zum einen direkt an der Bindung zu benachbarten Proteinen beteiligt ist, zum anderen aber durch seine lange flexible Struktur nur ein größeres Protein vortäuscht. Die Auflösung der DLS ist nicht ausreichend, um zwischen einem längeren Molekül und einem Dimer zu unterscheiden.

Aufgrund ihrer für die Kristallisation geeigneten Eigenschaften wurde hauptsächlich die N51-D212A Variante mit C-terminalem His-tag in pET-21a(+) zur Kristallisation verwendet. Zwar verhielt sich die Variante mit abgetrenntem N-terminalen His-tag ähnlich, jedoch ist hier die Proteinausbeute durch den *TEV*-Verdau geringer. Anhand einer Vielzahl von Sparse Matrix Screens wurde nach geeigneten Kristallisationsbedingungen für N51-D212A C-His gesucht. Aufgrund der auf persönlichen Erfahrungen geübter Kristallographen beruhenden Einschätzung der Beschaffenheit und des Aussehens der Niederschläge schien die Austestung verschiedener Salzbedingungen im pH-Bereich zwischen 5,5 und 8,0 besonders aussichtsreich. Dabei wurde vor allem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, welches sich schon in der Vergangenheit als äußerst erfolgreich bei der Kristallisation von Proteinen erwiesen hatte, als Präzipitans eingesetzt (Ries-Kautt, 1989).

Alle eukaryotischen Proteinkinasen besitzen eine hochkonservierte katalytische Kernstruktur. Sie besteht aus zwei Unterdomänen, die über einen Peptidstrang, den sog. Linker, miteinander verbunden sind. Dieser Linker fungiert als eine Art Gelenk, das es den beiden Domänen ermöglicht, sich gegeneinander zu verschieben und dem Protein einen gewissen Grad an Flexibilität verleiht, was eine Kristallisation erschwert. Die Bindung von $\text{ATP}/\text{Mg}^{2+}$ bzw. von Substratanaloga oder dem Kinaseinhibitor Staurosporin kann eine Konformationsänderung im Molekül bewirken und die Struktur durch einen sog. induced fit fixieren (Goldsmith and Cobb, 1994; Prade et al., 1997). Aufgrund der ausgeführten Gründe wurde durch den Zusatz von strukturstabilisierenden Agentien, wie Staurosporin oder dem Substratanaloga AMP-PNP, sowie ADP und AMP versucht, die Kinase in einer bestimmten Konformation zu fixieren.

Trotz der Vielzahl der getesteten Kristallisationsbedingungen und etlicher erfolgsversprechender Ansätze gelang es mit keinem der eingesetzten Mutantenproteine bis zum Abschluss dieser Arbeit Proteinkristalle zu erhalten.

Die Kristallisation ist ein komplexer Prozess, der von vielen verschiedenen Faktoren abhängt und deshalb schwer vorhersagbar ist. Obwohl unsere Versuche, PfCDPK1 zu kristallisieren, bisher negativ verlaufen sind, sind die Variationsmöglichkeiten für die Kristallisationsbedingungen noch lange nicht ausgeschöpft. Ein Ansatz wäre sicherlich als Präzipitantien anstelle von Salzen organische Lösungsmittel oder PEG auszutesten. Auch Temperatur, Proteinkonzentration, pH und Pufferzusammensetzung geben noch Spielraum für Veränderungen. Sicher muss man sich aber auch

mit dem Gedanken auseinandersetzen, dass bei N51-D212A noch immer Strukturelemente vorhanden sind, die eine Kristallisation verhindern. Für diesen Fall müssen neue Konstrukte hergestellt werden.

Bei Struktur- und Sequenzalignments zeigte sich z.B., dass PfCDPK1 im Bereich der α 1-Helix der kleinen Untereinheit der Kinasedomäne zusätzliche AS besitzt (De Bondt et al., 1993). Sie ist bei PfCDPK1 dadurch länger als bei vergleichbaren Kinasen und ragt weit in den Raum vor dem Eingang zum katalytischen Zentrum hinein. Diese Helix könnte der Kinase ein zusätzliches Maß an Flexibilität verleihen und die Kristallisation behindern. Aus diesem Grund wurde eine Mutante von N51-D212A C-His mittels Fusions-PCR hergestellt, bei der die Helix um 17 nicht konservierte AS gekürzt wurde. Erste Expressionstest deuten darauf hin, dass sich diese als N51-Loop bezeichnete Mutante ähnlich verhält wie N51-D212A.

Ein weiterer Ansatz für die Kristallisation bestand darin, statt der katalytisch inaktiven N51-D212A Mutante, aktives Protein einzusetzen. Der Grund, der hinter dieser Überlegung stand, ist die Beobachtung, dass eine Phosphorylierung spezifischer AS-Seitenketten im Innern von Kinasen, die Ausbildung und Stabilisierung gewisser Konformationen vermitteln kann (Goldsmith and Cobb, 1994; Taylor and Radzio-Andzelm, 1994). Falls durch Autophosphorylierung ebenfalls solche strukturstabilisierenden Phosphatgruppen in PfCDPK1 eingeführt würden, könnte so die Struktur fixiert werden, was im Idealfall bessere Kristallisationseigenschaften zur Folge hätte. Zu diesem Zweck wurde die katalytisch aktive N51-WT C-His Mutante hergestellt. Da die Autophosphorylierung von PfCDPK1 jedoch nicht einheitlich verläuft, so dass man eine Reihe von unterschiedlich phosphorylierten Proteinspezies erhält, wurde versucht an der Oberfläche liegende und damit leicht zugängliche Phosphatgruppen durch Phosphataseverdau wieder zu entfernen, wobei die schwer zugänglichen Phosphatgruppen im Innern der Kinase erhalten bleiben sollten. Um das Ausmaß der Autophosphorylierung und die Effektivität der zur Dephosphorylierung eingesetzten λ -Phosphatase abzuschätzen, wurde die Kationenaustauschchromatographie (KACH) eingesetzt. Dabei wurde das Elutionsprofil der KACH einer nach Standardprotokoll aufgereinigten Probe von N51-WT C-His mit dem Elutionsprofil einer dephosphorylierten und dem einer hyperphosphorylierten Probe verglichen. Dabei bestätigte sich durch das Auftreten mehrerer Elutionsspitzen (Abb. 3.12), dass N51-WT C-His während der Expression an mehreren Stellen autophosphoryliert wird. Durch Behandlung der Kinase mit λ -Phosphatase konnten die Phosphatgruppen wieder weitgehend entfernt werden (Abb. 3.14 a), wohingegen durch ATP- und Mg^{2+} -Zusatz zusätzliche Phosphatgruppen eingeführt wurden (Abb. 3.13 b.). Die aufgereinigte Kinase nimmt also sozusagen eine Zwischenstellung zwischen unphosphoryliertem und vollständig autophosphoryliertem Protein ein. Es gelang jedoch in keinem der drei Fälle, eine einheitliche Proteinspezies zu erhalten. Das Auftreten mehrerer Peaks zeigte, dass immer mehrere unterschiedlich phosphorylierte Spezies nebeneinander existieren. Dieses Ergebnis ist hinsichtlich der Vielzahl an Phosphorylierungsstellen nicht überraschend. Um den Grad der Dephosphorylierung abschätzen zu können, wurde die dephosphorylierte N51-Wildtyp Kinase mit der

N51-D212A C-His Mutante, die aufgrund der fehlenden Kinaseaktivität keiner Autophosphorylierung unterliegt, verglichen. Hierbei konnten deutliche Übereinstimmungen zwischen den beiden Elutionsprofilen festgestellt werden (Abb.3.14 a. + b.). Überraschenderweise zeigten beide Proben ein sehr ähnliches Elutionsprofil, drei dicht beieinander liegende Elutionsspitzen, die im selben Konzentrationsbereich des Elutionspuffers B (26-37% Puffer B) eluierten. Auch die Höhenverhältnisse der einzelnen Peaks liegen in derselben Größenordnung. Dies legt den Schluß nahe, dass durch die Dephosphorylierung alle Phosphatgruppen entfernt werden konnten, so dass der Ladungszustand der dephosphorylierten N51-WT Mutante dem der N51-D212A Mutante entspricht. Dennoch existieren 3 Proteinspezies nebeneinander, deren Nettoladung sich geringfügig unterscheidet. Dieser Ladungsunterschied kann aber nicht durch zusätzliche Phosphatgruppen hervorgerufen werden, da N51-D212A keine Kinaseaktivität besitzt.

Über die Gründe, weshalb auch bei der katalytisch inaktiven Mutante N51-D212A C-His drei Elutionsspitzen auftraten, kann nur spekuliert werden. So könnten unterschiedliche Konformationen des Proteins für den Ladungsunterschied verantwortlich sein, vorausgesetzt dass sich durch die Konformationsänderung die Nettoladung an der Oberfläche des Proteins verändert. Da bei der Aufreinigung kein EGTA zum Einsatz kam, könnte es sich dabei um unterschiedliche Aktivierungszustände der Kinase infolge von Ca^{2+} -Bindung handeln. Gewissheit darüber könnte nur eine Wiederholung des Versuches unter EGTA-Bedingungen bringen.

Die oben genannten Gründe könnten natürlich auch die Ursache für das Auftreten der drei Peaks beim WT-Protein sein. Jedoch muss auch in Betracht gezogen werden, dass das Auflösungsvermögen der KACH begrenzt ist. Durch sie werden nur an der Oberfläche des Proteins sitzende Ladungen erfasst. Eine Ladung (z.B. eine Phosphatgruppe) im Innern des Proteins hingegen könnte soweit abgeschirmt werden, dass sein Beitrag zur Nettoladung nicht registriert werden kann. Um genauere Aussagen über der Beschaffenheit der dephosphorylierten Proteinspezies treffen zu können, müßten also empfindlichere Analysemethoden wie z.B. die Massenspektroskopie herangezogen werden. Falls mit Hilfe der Massenspektroskopie eine Phosphorylierung von Gruppen im Innern von N51-WT nachgewiesen werden würde, könnten gleichartig phosphorylierte Spezies für die Kristallisation verwendet werden. Hierzu müßten die Bedingungen für die Ionenaustauschchromatographie soweit optimiert werden, dass eine eindeutige Trennung der einzelnen Fraktionen möglich wird.

Wenn auch das eigentliche Ziel dieses Teilprojektes, nämlich die Kristallisation und Strukturaufklärung von PfCDPK1 oder eine ihrer Mutanten nicht erreicht wurde, so konnte durch ihre biochemische Charakterisierung, die für die Kristallisation erforderlich war, dennoch eine Vielzahl neuer Erkenntnisse gewonnen oder bisherige Befunde untermauert werden. Diese liefern die Grundlage für die Entwicklung neuer aussichtsreicher Strategien für die Kristallisation der Kinase.

Die Kristallisation einer Proteinkinase ist aufgrund der Flexibilität der beiden Unterdomänen kein einfaches Vorhaben. In unserem Falle wird sie aber durch das Vorliegen einer regulatorischen Ca^{2+} -

bindenden Domäne, die ebenfalls zur erhöhten Flexibilität des Moleküls beiträgt, noch zusätzlich erschwert. Darüber hinaus ist wenig über die Interaktionen der katalytischen Domäne und der Ca^{2+} -bindenden Domäne bekannt. Die aufgrund der Ca^{2+} -bindenden Domäne zusätzlich erhöhte Flexibilität der CDPKs ist wohl mit ein Grund, dass bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Struktur einer CDPK gelöst werden konnte. Neue Strategien zur Fixierung der flexiblen Strukturen und zur Stabilisierung bestimmter Konformationen sind also gefragt, um die Homogenität der Proteinpopulation soweit zu steigern, dass eine Kristallbildung möglich wird. Zusätzlich muss sicher über die Alternative nachgedacht werden, die katalytische Domäne getrennt von der regulatorischen zu kristallisieren.

4.3 Charakterisierung der Membranverankerung und Zielgebung von PfCDPK1

Eine Reihe von Proteinen kann erst dann ihre spezifischen Funktion ausüben, wenn sie ihren Zielort, z.B. eine Membran, erreichen. Dabei gibt es die verschiedensten Mechanismen, die es einem Protein ermöglichen, zu einer Membran zu gelangen und sich darin zu verankern. Eine Möglichkeit besteht in der Modifikation eines Proteins mit den gesättigten Fettsäuren Myristin- und Palmitinsäure, welche als lipophile Membrananker in die Phospholipiddoppelschicht eintauchen. Die Mehrheit dieser acylierten Proteine besitzt eine Kombination aus zwei Membranankermotiven. Einige Proteine werden zweifach palmitoyliert, wobei diese Modifikation an beliebigen Stellen des Proteins erfolgen kann. Andere Proteine werden an ihrem N-terminalen Glycinrest myristyliert. Als zweites Motiv kann dann entweder die Palmitoylierung eines benachbarten Cysteinrestes oder ein Cluster von basischen AS (PBC) fungieren. Beispiele für myristylierte und palmitoylierte Proteine sind Mitglieder der Src-Familie, die endotheliale NO-Synthetase (eNOS) oder die α -Untereinheiten heterotrimärer G-Proteine. Beispiele für myristylierte Proteine mit basischem Cluster sind Src, HIV-Gag-1 und MARCKS (Resh, 1999; van't Hof and Resh, 2000).

PfCDPK1 besitzt in seiner Sequenz drei Motive für eine Membranverankerung: eine Myristylierungsstelle, ein Palmitoylierungssignal und ein polybasisches Cluster. Dies ist sozusagen ein Signal zuviel, um ein Protein stabil in einer Membran zu verankern. Deshalb stellte sich uns die Frage, ob diese Kombination von drei Membranankermotiven nicht zusätzliche Funktionen z.B. bei der Zielgebung von PfCDPK1 erfüllt. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte PfCDPK1 in der PV und in daraus abgeleiteten Membransystemen wie dem tubovesikulären System beobachtet werden. PfCDPK1 verfügt jedoch über kein Signalpeptid für den klassischen ER/Golgi-abhängigen Weg des Proteinexports. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass das ER von *P. falciparum* als intrazellulärer Calciumspeicher dient, erscheint dies durchaus sinnvoll (Garcia, 1999). Die Translokation von PfCDPK1 in das ER mit seinen hohen Ca^{2+} -Konzentrationen hätte deren uneingeschränkte Aktivierung zur Folge.

Die Acylierung von Proteinen erfüllt häufig Zielgebungsfunktionen, so dass die N-terminalen Modifikationen von PfCDPK1 für dessen Translokation über die Plasmamembran und darüber hinaus zu weiteren Strukturen im TVS verantwortlich sein könnten (Bijlmakers and Marsh, 2003; Dammann et al., 2003; Denny et al., 2000; Resh, 1999). Das Ziel dieses Teilprojektes war es deshalb, 1. Kenntnisse über die Mechanismen der Membranverankerung von PfCDPK1 zu gewinnen und den Beitrag der einzelnen Motive zur Membranbindung zu untersuchen; 2. den Nachweis einer Beteiligung des Triple-Motivs an der Zielgebung von PfCDPK1 zu erbringen.

Im Verlauf dieser Arbeit konnte die Myristylierung von PfCDPK1 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bestätigt werden (vgl. Abb. 3.16 + 3.18). PfCDPK1 wurde metabolisch mit [9,10-³H]Myristat markiert und das myristylierte Protein mittels Immunpräzipitation nachgewiesen. In einer *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion (T/T-Reaktion) konnte im Retikulocytenlysate ein Protein in der Größe von PfCDPK1 (60 kDa) hergestellt werden, welches myristyliert wurde. Die Myristylierung ist an das N-terminale Glycin in Position 2 gekoppelt, da sie bei den Mutanten VG2 und Val Δ , bei denen das Glycin an Position 2 durch Valin ersetzt wurde, nicht zu beobachten war (Abb. 3.18 B). Neben der 60 kDa Bande trat in der *in vitro* T/T-Reaktion noch eine weitere etwas schwächere Bande mit etwas erhöhter elektrophoretischer Mobilität auf. Dieses verkürzte Produkt wurde nicht myristyliert, was darauf hindeutet, dass ihm ein Teil des N-Terminus fehlt. Seine Entstehung könnte entweder auf ein internes Initiationssignal für die Translation oder auf einen proteolytischen Abbau zurückzuführen sein (Abb. 3.18A).

Im Gegensatz zur Myristylierung gelang der direkte Nachweis einer Palmytylierung des Cysteins in Position 3 nicht. Generell kann eine Palmytylierung von Proteinen aufgrund des Fehlens von Palmytyl-Acyltransferasen (PATs) im Retikulocytenlysate, bei der *in vitro* T/T nicht beobachtet werden (Busconi et al., 1997). Dies konnte für unsere Reaktionsbedingungen bestätigt werden. Aufgrund der extremen Schwierigkeiten, die bei der Aufreinigung von PATs auftreten, sind PATs bisher weder in adäquater Menge erhältlich noch konnte eine ihrer Gensequenzen aufgeklärt werden. So ist also eine *in vitro* Palmytylierung bisher weder mit aufgereinigtem noch mit rekombinant hergestelltem Enzym möglich. Der Nachweis der Palmytylierung konnte also nur auf direktem Wege über eine metabolische Markierung erfolgen.

Die metabolische Markierung von PfCDPK1 mit [9,10-³H]Palmitat und anschließender Immunopräzipitation erbrachte auch nach einer Expositionszeit der Gele von 8 Monaten kein eindeutiges Signal. Dennoch muss dies nicht bedeuten, dass PfCDPK1 nicht palmytyliert wird. Die Palmytylierung ist im Gegensatz zur Myristylierung ein post-translationaler Prozess, welcher durch die Aktivität der PATs vermittelt wird. PATs sind membranassoziiert und sowohl in der Plasmamembran als auch in intrazellulären Membranen wie der Membran des Golgi, der Mitochondrien oder der Vakuolen zu finden. Auch eine Anreicherung in lipid rafts, auch detergent resistant membranes (DRM) genannt, konnte beobachtet werden (Bijlmakers and Marsh, 2003). Bisher liegen leider nur

wenige Kenntnisse über PATs und die der Palmytylierung zugrunde liegenden Mechanismen vor, da sich wie bereits oben erwähnt ihre Aufreinigung als äußerst schwierig erwiesen hat. Es existieren jedoch viele Hinweise auf die Existenz einer Vielzahl von PATs mit unterschiedlichen Substratspezifitäten, welche ihre Aktivitäten an unterschiedlichen Stellen in der Zelle ausüben (Bijlmakers and Marsh, 2003; Resh, 1999). In *Plasmodium* wurden bisher keine PATs beschrieben. Es sind also keine Daten über Zeitpunkt und Ausmaß der Expression sowie der Lokalisation und Aktivität plasmodialer PATs verfügbar. Da die Palmytylierung ein reversibler Prozess ist, wäre es möglich, dass sie nur während bestimmter Entwicklungsstadien des Parasiten zu beobachten ist. Ferner kann das Ausmaß der Palmytylierung so gering sein, dass sie unter den gewählten Reaktionsbedingungen nicht detektiert werden kann. Vergleichbare *in vivo* Experimente wurden an humanen Zelllinien durchgeführt (Robbins et al., 1995). Es ist fraglich, ob diese Versuchsbedingungen ohne weiteres auf die komplizierteren Verhältnisse in den iRBC übertragbar sind.

Aufgrund der Tatsache, dass während der *in vitro* T/T-Reaktion in Gegenwart von Mikrosomen keine Palmytylierung erfolgt, ergab sich die Möglichkeit, die Einflüsse der Myristylierung und des PBC auf die Membranverankerung *in vitro* zu untersuchen. WT-PfCDPK1 sowie die Mutanten VG2, $\Delta 10-20$ und Val Δ wurden in Anwesenheit von [³⁵S]Methionin und mikrosomalen Membranen *in vitro* transkribiert/translatiert und der Anteil an membrangebundenem Protein durch Ermittlung der in den einzelnen SDS-PAGE Banden inkorporierten Radioaktivität berechnet. Dabei zeigte sich, dass in Abwesenheit eines der beiden Membranankermotive die Membranbindung deutlich schwächer ausfiel (Abb. 3.19). Verglichen mit der zweifach verankerten WT-PfCDPK1 ging der Anteil an membrangebundenem Protein bei der Mutante, der die Myristylierungsstelle fehlt (VG2), auf 30% und bei der Mutante, bei der das PBC deletiert war ($\Delta 10-20$) auf 28% zurück. Bei der Val Δ Mutante, welche keines der beiden Motive enthält, fand sich nur noch 7,5% der Aktivität in der Membranfraktion, was an den Bereich der unspezifischen Bindung (4-6%) heranreicht. Auch wenn diese Methode die tatsächlichen Verhältnisse im infizierten Erythrocyten vermutlich nicht gänzlich widerspiegelt, bestätigen die Ergebnisse doch den Einfluss der einzelnen Membranankermotive. Sowohl die Myristylierung als auch das PBC vermitteln eine Membranheftung von PfCDPK1. Beide Motive tragen in dem von uns verwendeten System in etwa dem gleichen Maße zur Membranbindung bei. Die Kombination beider Motive, Myristylierung und PBC, führt zu einem Synergismus, welcher die Bindungskraft über die Summe der Einzelbeiträge steigerte. Die Doppelmutante Val Δ hingegen besitzt kaum noch die Fähigkeit, an Membranen zu binden.

Proteine, die über die kooperative Bindung von Myristat und einem PBC in der Membran verankert werden, enthalten in ihrem PBC häufig die phosphorylierbaren AS Serin und Threonin. Wie für MARCKS gezeigt werden konnte, führt die Phosphorylierung dieser AS durch Proteinkinase C aufgrund von elektrostatischer Abstoßung zu einer Unterbrechung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen PBC und den negativ geladenen Phospholipiden der Membran (Seykora

et al., 1996). Dies hat die Dissoziation des Proteins von der Membran zur Folge. Durch Dephosphorylierung kann dieser Prozess wieder umgekehrt werden. Phosphorylierung und Dephosphorylierung im PBC ermöglichen es dem Protein, reversibel an die Membran zu binden. Man spricht in diesem Zusammenhang vom myristoyl-electrostatic switch Mechanismus (McLaughlin and Aderem, 1995; Resh, 1999).

Auch PfCDPK1 verfügt über Serin- und Threoninreste, die im PBC eingebettet sind, was die Existenz eines myristoyl-electrostatic switch Mechanismus nahe legt. Einige dieser Serin- und Threoninreste des PBC erfüllen die Anforderungen eines Phosphorylierungsmotives von PfCDPK1. Uns stellte sich also die Frage, ob die Autophosphorylierung von PfCDPK1 eine Rolle bei der reversiblen Membrananheftung der Kinase spielen könnte. Um den Einfluss der Autophosphorylierung auf die Membranbindung zu untersuchen, wurde in einer *in vitro* T/T-Reaktion erhaltenes, an CPMM gebundenes Protein einer Kinasereaktion unterzogen. Im Falle einer Autophosphorylierung im PBC sollte sich verstärkt Protein von der Membran lösen und in der Überstandfraktion erscheinen. Wie das Fluorogramm in Abb. 3.20 zeigt, konnte keine Schwächung der Interaktion von PfCDPK1 mit der Membran durch Autophosphorylierung nachgewiesen werden. Auch durch den Zusatz von exogener rekombinanter PfCDPK1 für den Fall, dass das bei der *in vitro* T/T erhaltene Protein nicht ausreichend aktiv ist, konnte das Verhältnis nicht zu Gunsten des löslichen Proteins verschoben werden. Um nachzuweisen, dass PfCDPK1 unter den gegebenen Bedingungen tatsächlich aktiv ist, wurde der Versuch auch in Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in der Kinasereaktion durchgeführt (Abb. 3.21). Dabei zeigte sich eine deutliche Kinaseaktivität in den PfCDPK1 und Ca^{2+} enthaltenden Proben. Somit hat eine Autophosphorylierung von PfCDPK1 keine Einfluss auf ihre Membranverankerung. Wenn PfCDPK1 also dem postulierten myristoyl-electrostatic switch Mechanismus unterliegt, wie es durch die Anwesenheit der Serin- und Threoninreste im PBC impliziert wird, wird dieser durch die Aktivität einer anderen Kinase gesteuert.

Interessanterweise stieg bei dem Experiment zum Nachweis der Autophosphorylierung der Anteil an PfCDPK1 im Überstand der Kontrollreaktionen, in welchen die Aktivität von PfCDPK1 durch Komplexierung von Ca^{2+} mittels EGTA unterdrückt war, an (Abb.3.20: Überstand (-) und (- + PfCDPK1)). Bei Überprüfung der Kinaseaktivität von PfCDPK1 durch Einsatz von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Abb. 3.21) konnte außerdem auch in den Kontrollreaktionen eine gewisse Kinaseaktivität nachgewiesen werden. Da die Aktivität von PfCDPK1 durch Komplexierung von Ca^{2+} hier weitestgehend ausgeschaltet ist, müssen im Retikulocytenlysats und/oder den mikrosomalen Membranen Kinasen vorhanden sein, die durch Ca^{2+} inhibiert werden, die aber unter Ca^{2+} -freien Bedingungen in der Lage sind, PfCDPK1 und andere Proteine des Retikulocytenlysats oder der mikrosomalen Membranen zu phosphorylieren. Eine dieser Kinasen könnte folglich auch Serin- und/oder Threoninreste im PBC phosphorylieren und somit einen myristoyl-electrostatic switch Mechanismus auslösen, wodurch die Schwächung der Bindung von PfCDPK1 an die mikrosomalen Membranen und der leicht erhöhte

Anteil des Proteins in der Überstandfraktion der Kontrollreaktionen erklärt werden könnte (Abb. 3.20). Theoretisch könnten aber auch die veränderten Salzbedingungen in der Kontrolle für die abweichenden Bindungseigenschaften des Proteins verantwortlich sein.

Da die Verhältnisse im Parasiten und seinem Wirtserythrocyten aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Kompartimente und Organellen ungleich komplizierter sind, als sie durch die *in vitro* T/T wiedergegeben werden, wurde die Membranverankerung von PfCDPK1 auch *in vivo* untersucht. Hierzu dienten Luciferase-Fusionsproteine von PfCDPK1 und ihren Mutanten, welche transient in *P. falciparum* exprimiert wurden. Über fraktionierte Saponinlyse gefolgt von der Bestimmung der Luciferase-Aktivität in den erhaltenen Fraktionen wurde dann der Einfluss der Membranankermotive auf die Membranbindung ermittelt (Abschnitt 3.3.4). Dabei wurden die Ergebnisse der *in vitro* T/T weitgehend bestätigt. WT-PfCDPK1 zeigte die höchste Affinität zu parasitären Membranen. Die Fähigkeit der Mutanten an Membranen zu binden nahm hingegen in Übereinstimmung mit der Anzahl ihrer Anker motive in der Reihenfolge $\Delta 10-20 > VG2 > DMA$ ab (Abb. 3.25). Die höhere Affinität der $\Delta 10-20$ Mutanten im Vergleich zu VG2 liegt darin begründet, dass $\Delta 10-20$ noch beide Acylierungsmotive besitzt, *in vivo* also myristyliert und palmityliert werden sollte, während die Membranverankerung der VG2-Mutante ausschließlich über das basische Cluster erfolgt. VG2 kann nicht mehr palmityliert werden, da für eine Palmitylierung eine vorausgegangene Myristylierung erforderlich ist.

Die Durchführung der Experimente erwies sich als schwierig, insbesondere da die Reproduzierbarkeit der Daten anfangs Schwierigkeiten bereitete. So wurde diese Technik lediglich zur Charakterisierung des Beitrags der Acylierung und des PBC zur Membranverankerung von PfCDPK1 eingesetzt. Eine Untersuchung der postulierten Zielgebungsfunktion der einzelnen Motive und eine genauere Lokalisierung der Proteine in der iRBC war hingegen nicht möglich, da mit der Methode der fraktionierten Saponinlyse bei niedrigen Saponinkonzentrationen bei denen der Parasit noch intakt bleibt, nicht zwischen einem membrangebundenen Protein in der parasitophoren Vakuole und einem Protein, welches sich im Cytosol des Parasiten befindet, differenziert werden kann.

Statt dessen wurden GFP-Fusionsproteine eingesetzt, welche eine 50 bzw. 40 AS lange N-terminale Sequenz von PfCDPK1 oder ihrer Mutanten, bei denen die Membranankermotive verändert waren, enthielten. Nach Transfektion in *P. falciparum* wurden die GFP-Fusionsproteine in der Zelle mittels konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie sichtbar gemacht. Es sollten so Unterschiede in der Lokalisation von PfCDPK1 und ihrer Mutanten untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass nur das GFP-Fusionsprotein mit dem intakten PfCDPK1-Membrananker (WT-SP) in der Lage war, in die parasitophore Vakuole zu gelangen. Nur hier konnte eine Verteilung des Proteins in der Zelle, wie sie für Proteine, welche in der PV lokalisiert sind, charakteristisch ist (z.B. ACP (acyl carrier protein); Waller et al., 2000), beobachtet werden. Des Weiteren waren im Segmenter Stadium ausschließlich mit dem WT-Konstrukt das für PfCDPK1 typische sternförmige Muster, in dem die Kinase mit MSP1,

dem Merozoiten Oberflächenprotein co-lokalisiert, zu sehen (Kappes unveröffentlichte Ergebnisse). Alle übrigen Konstrukte, bei denen eines oder mehrere der Membranankermotive fehlten, zeigten eine Verteilung, die auf eine Lokalisation im Cytosol des Parasiten schließen lässt. Eine genauere Aussage darüber, ob das Protein dabei membrangebunden oder löslich vorliegt, konnte aufgrund der begrenzten Auflösung des Mikroskops nicht getroffen werden. Jedoch zeigen die Daten, dass für den Transport von PfCDPK1 in die PV und wahrscheinlich auch in weitere exoparasitäre Kompartimente wie dem tubovesikulären System das Triple-Motiv, nämlich die Myristylierungsstelle, die Palmylierungsstelle und das PBC vorhanden sein müssen. Es bedarf also des Zusammenspiels aller drei Motive, um einen Transport in den Extrazellularraum des Parasiten zu erzielen. Darüber hinaus ist dieses Ergebnis als weiterer indirekter Nachweis für die Palmylierung von PfCDPK1 zu werten, da die Mutante AC3, welche über kein Palmylierungsmotiv verfügt, nicht in die PV transportiert wird und somit dem Cystein in Position 3 eine essentielle Funktion als Targeting- (Zielgebungs-) Motiv zufällt.

HASPB, ein Oberflächenprotein des humanpathogenen Parasiten *Leishmania major*, besitzt wie PfCDPK1 weder eine klassische Signalsequenz für den Transport ins ER, noch eine Transmembrandomäne oder eine Konsensussequenz für einen GPI-Anker, was gegen den Transport über den klassischen ER/Golgi-abhängigen sekretorischen Weg spricht. Trotzdem wird es an die Zelloberfläche transportiert (Denny et al., 2000). Mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen konnte gezeigt werden, dass die 18 N-terminalen AS von HASPB ausreichend sind, um GFP an die Zelloberfläche des Parasiten zu dirigieren. Diese Sequenz enthält sowohl eine Myristylierungsstelle wie auch eine Palmylierungsstelle, ein Cystein in Position 5. Beide Modifikationen sind notwendig aber nicht ausreichend, um eine Translokation von HASPB auf die extrazelluläre Seite der Membran zu bewirken. Nach Mutation der Palmylierungsstelle reicherte sich das Fusionsprotein im Bereich des Golgi an. Die Palmylierung von N-myristyliertem HASPB erfolgt also an Membranen, die dem sekretorischen Weg zugeordnet werden. Das bedeutet, dass das doppelt acylierte HASPB möglicherweise Teile des klassischen Transportweges nutzt. Ein weiteres Konstrukt, welches lediglich die 10 N-terminalen AS enthielt, fand zwar seinen Weg in die Plasmamembran, konnte diese aber nicht überqueren. Diese Daten sprechen dafür, dass die Acylierung von HASPB notwendig ist, um das Protein zur Plasmamembran zu bringen und dort zu verankern, dass aber für die Translokation über die Membran eine zusätzliche Interaktion der 18 N-terminalen AS mit der postulierten Exportmaschienerie erforderlich ist. Diese bisher weitgehend unerforschte Exportmaschienerie findet sich auch in verschiedenen Säuger-Zelllinien, was den Schluß nahe legt, dass es sich hierbei um einen konservierten nicht-klassischen Exportweg bei Eukaryonten handelt (Denny et al., 2000; Nickel, 2003).

Für die Translokation von PfCDPK1 in die parasitophore Vakuole wäre ein ähnlicher Mechanismus denkbar. Auch PfCDPK1 besitzt keine Signalsequenz für den klassischen Transportweg. Es muss also ein alternativer Weg eingeschlagen werden, für den Motive im Bereich der AS 1-50 entscheidend sind.

Das GFP-Fusionsprotein der PfCDPK1 Mutante $\Delta 10-20$ -SP, der die AS 10-20 fehlen, wird ebensowenig in die PV transportiert wie die Mutanten denen eine oder beide Acylierungsstellen fehlen. Legt man für PfCDPK1 einen ähnlichen Mechanismus wie bei HASPB zugrunde, würde dies bedeuten, dass die Acylierungsstellen für die Membranlokalisierung von PfCDPK1 verantwortlich wären, während das PBC oder weitere Strukturen im PBC für den Transport über die Membran erforderlich sind. Es wäre aber auch der umgekehrte Fall denkbar, bei dem das PBC die Bindung des Proteins an bestimmte Bereiche der Membran soweit verstärkt, dass es für die PAT und somit die Palmytylierung überhaupt erst zugänglich wird (Bijlmakers and Marsh, 2003).

Viele myristylierte und palmytylierte Proteine assoziieren mit spezialisierten Membranbereichen, den sog. Mikrodomänen wie lipid rafts (oder DRM) oder Caveolae (Bijlmakers and Marsh, 2003; Resh, 1999; Robbins et al., 1995; Simons and Ikonen, 1997). Die Mechanismen, die für die Anreicherung zweifach acylierter Proteine in lipid rafts verantwortlich sind, sind noch weitgehend ungeklärt. Zum einen wird diskutiert, dass eine Insertion der gesättigten Fettsäurereste in die Mikrodomänen energetisch begünstigt ist, zum andern könnten Interaktionen mit Proteinen der Mikrodomänen, wie z.B. dem Caveolin der Caveolae, spezialisierten lipid rafts an der Oberfläche der Plasmamembran, die Akkumulation bestimmter Proteine zur Folge haben (Resh, 1999). In den Mikrodomänen konnte außerdem eine Anreicherung von PAT-Aktivität beobachtet werden, die dazu führen könnte, dass Proteine nach erfolgter Palmytylierung in den rafts verbleiben (Bijlmakers and Marsh, 2003; Dunphy et al., 2001). Auch in der Membran der parasitophoren Vakuole von *P. falciparum* konnten solche lipid rafts nachgewiesen werden (Lauer et al., 2000). PfCDPK1 könnte aufgrund der indirekt nachgewiesenen Palmytylierung durchaus in solchen Mikrodomänen lokalisiert sein.

Lipid rafts ermöglichen der Zelle die laterale Organisation ihrer Zellmembran (Helms and Zurzolo, 2004; Simons and Ikonen, 1997). Sie dienen zur Abgrenzung und Anreicherung von Membranproteinen in bestimmten Membranbereichen. Hierdurch entstehen in der Membran funktionell unterscheidbare Areale, die aufgrund der Anreicherung funktionell ineinander greifender Proteine und anderer Moleküle, ihre spezialisierte Funktion wesentlich effektiver und spezifischer erfüllen können (Simons and Ikonen, 1997; Simons and Ikonen, 2000). So gibt es Hinweise auf eine Anreicherung von Komponenten gewisser Signaltransduktionswege in solchen Mikrodomänen. Ein besonders eindrückliches und gut erforschtes Beispiel für die Bedeutung der Organisation von Signalproteinen in lipid rafts liefert die Aktivierung von T-Zellen (Resh, 1999). Viele der kritischen Komponenten, die an der T-Zell-Rezeptor vermittelten Signalübertragung beteiligt sind, finden sich in solchen lipid rafts, darunter die myristylierten und palmytylierten Tyrosinkinasen Fyn und Lck, die der Src-Familie angehören (Zhang et al., 1998). Eine Aktivierung der T-Zell-Rezeptoren bewirkt die Ansammlung weiterer Signalmoleküle in den lipid rafts. Die Zerstörung der raft-Struktur durch Agentien wie Filipin oder Nystatin oder die Inhibierung der Palmytylierung von Fyn und Lck durch 2-

Brompalmitat hingegen führt zur Unterbrechung oder Beeinträchtigung der T-Zell-Rezeptor vermittelten Signaltransduktion (Resh, 1999; Webb et al., 2000).

Eine Lokalisation von PfCDPK1, welches in seiner Funktion als Kinase ebenfalls an der Übermittlung von Signalen beteiligt ist, in lipid rafts wäre also durchaus sinnvoll. Die Acylierung, insbesondere die Palmytylierung, könnte hierfür das nötige Signal liefern. Auch die Anwesenheit eines Translokations-Kanals in Mikrodomänen und somit eine Beteiligung der rafts beim Transport von PfCDPK1 über die Plasmamembran wie es von Denny et al. für HASPB vorgeschlagen wird, wäre denkbar (Denny et al., 2000). In jeden Fall ist es wahrscheinlich, dass die Palmytylierung von PfCDPK1 als zusätzliches Sortierungssignal dient. Die Tatsache, dass die übrigen PfCDPKs entweder nur zwei (Myristylierung + PBC: PfCDPK2 + 4) oder keine (PfCDPK3 + 5) Membranankermotive besitzen, legt den Schluss nahe, dass sie ihre Aufgaben an von PfCDPK1 abweichenden Orten, wahrscheinlich im Cytosol oder an der Plasmamembran des Parasiten ausüben. Die Motive im N-Terminus erfüllen somit auch eine Verteilerfunktion.

Um genauere Aussagen über die Funktion von PfCDPK1 und seiner Zielgebungssignale treffen zu können, sind noch weitergehende Untersuchungen erforderlich. Notwendig wäre in diesem Zusammenhang sicherlich der Nachweis einer Lokalisation von PfCDPK1 in lipid rafts. Dadurch könnten Rückschlüsse auf mögliche Zielproteine der Kinase und beteiligte Prozesse gezogen und die Rolle der Palmytylierung bei der Zielgebung von PfCDPK1 genauer charakterisiert werden.

Auch der Transport von PfCDPK1 über die Plasmamembran in die PV birgt viele offene Fragen. Ein „flip-flop“-Mechanismus, wie er für die Translokation von HASPB vorgeschlagen wurde (Denny et al., 2000), wäre auch für PfCDPK1 denkbar. Dafür würde die Tatsache sprechen, dass für den Transport über die Plasmamembran sowohl bei HASPB als auch bei PfCDPK1 eine Myristylierung, eine Palmytylierung sowie ein weiteres Motiv innerhalb der ersten 20 AS benötigt wird.

Der Nachweis eines neuen, ER/Golgi-unabhängigen Transportweges für PfCDPK1 könnte neue Möglichkeiten eröffnen, den Export von parasiteneigenen Proteinen gezielt zu hemmen.

Literaturverzeichnis

- Alberts, B.B., D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. (1995) *Molekularbiologie der Zelle*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Ansorge I, B.J., Bhakdi S, Lingelbach K. (1996) Protein sorting in Plasmodium falciparum-infected red blood cells permeabilized with the pore-forming protein streptolysin O. *Biochem. J.*, **315**, 307-314.
- Bijlmakers, M.J. and Marsh, M. (2003) The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol*, **13**, 32-42.
- Bilker, O., Dechamps, S., Tewari, R., Wenig, G., Franke-Fayard, B., Brinkmann, V. (2004) Calcium and Calcium Dependent Protein Kinase Regulate Gamete Formation and Mosquito Transmission in a Malaria Parasite. *submitted*.
- Bishop, A.C. and Shokat, K.M. (1999) Acquisition of inhibitor-sensitive protein kinases through protein design. *Pharmacol Ther*, **82**, 337-346.
- Bishop, A.C., Ubersax, J.A., Petsch, D.T., Matheos, D.P., Gray, N.S., Blethrow, J., Shimizu, E., Tsien, J.Z., Schultz, P.G., Rose, M.D., Wood, J.L., Morgan, D.O. and Shokat, K.M. (2000) A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature*, **407**, 395-401.
- Bloland, P.B. (2001) Drug resistance in malaria. WHO, WHO/CDS/DRS/2001.4, p. 32.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Burghaus, P.A. and Lingelbach, K. (2001) Luciferase, when fused to an N-terminal signal peptide, is secreted from transfected Plasmodium falciparum and transported to the cytosol of infected erythrocytes. *J Biol Chem*, **276**, 26838-26845.
- Busconi, L., Boutin, P.M. and Denker, B.M. (1997) N-terminal binding domain of Galpha subunits: involvement of amino acids 11-14 of Galphao in membrane attachment. *Biochem J*, **323 (Pt 1)**, 239-244.
- Chahaun, V., Cowman, A., Chitnis, Ch., Crabb, B., Duraisingh, M., Maier, A., Malhotra, P., Thompson, J. (2002) *Plasmodium falciparum* transfection manual. *Malaria Transfection Workshop*, New Delhi, India, p. 26.
- Cheng, S.H., Willmann, M.R., Chen, H.C. and Sheen, J. (2002) Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol*, **129**, 469-485.
- Christodoulou, J., Malmendal, A., Harper, J.F. and Chazin, W.J. (2004) Evidence for differing roles for each lobe of the Calmodulin-like domain in a calcium-dependent protein kinase (CDPK). *J Biol Chem*.
- Clark, I.A. and Schofield, L. (2000) Pathogenesis of malaria. *Parasitol Today*, **16**, 451-454.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. and Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**, 2110-2114.
- Cosloy, S.D. and Oishi, M. (1973) The nature of the transformation process in Escherichia coli K12. *Mol Gen Genet*, **124**, 1-10.
- Crabb, B.S., Rug, M., Gilberger, T.W., Thompson, J.K., Triglia, T., Maier, A.G. and Cowman, A.F. (2004) Transfection of the Human Malaria Parasite Plasmodium falciparum. *Methods Mol Biol*, **270**, 263-276.
- Crabb, B.S., Triglia, T., Waterkeyn, J.G. and Cowman, A.F. (1997) Stable transgene expression in Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol*, **90**, 131-144.
- Dammann, C., Ichida, A., Hong, B., Romanowsky, S.M., Hrabak, E.M., Harmon, A.C., Pickard, B.G. and Harper, J.F. (2003) Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from Arabidopsis. *Plant Physiol*, **132**, 1840-1848.
- De Bondt, H.L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H.D., Morgan, D.O. and Kim, S.H. (1993) Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, **363**, 595-602.
- de Koning-Ward, T.F., Janse, C.J. and Waters, A.P. (2000) The development of genetic tools for dissecting the biology of malaria parasites. *Annu Rev Microbiol*, **54**, 157-185.
- Deitsch, K., Driskill, C. and Wellems, T. (2001) Transformation of malaria parasites by the spontaneous uptake and expression of DNA from human erythrocytes. *Nucleic Acids Res*, **29**, 850-853.
- Denny, P.W., Gokool, S., Russell, D.G., Field, M.C. and Smith, D.F. (2000) Acylation-dependent protein export in Leishmania. *J Biol Chem*, **275**, 11017-11025.
- Dunn, P.P., Bumstead, J.M. and Tomley, F.M. (1996) Sequence, expression and localization of calmodulin-domain protein kinases in Eimeria tenella and Eimeria maxima. *Parasitology*, **113 (Pt 5)**, 439-448.
- Dunphy, J.T., Greentree, W.K. and Linder, M.E. (2001) Enrichment of G-protein palmitoyltransferase activity in low density membranes: in vitro reconstitution of Galphai to these domains requires palmitoyltransferase activity. *J Biol Chem*, **276**, 43300-43304.
- Ellard-Ivey, M., Hopkins, R.B., White, T.J. and Lomax, T.L. (1999) Cloning, expression and N-terminal myristoylation of CpCPK1, a calcium-dependent protein kinase from zucchini (Cucurbita pepo L.). *Plant Mol Biol*, **39**, 199-208.

- Epstein J. E., J.K.B., Stephen L. Hoffman. (2000) Malaria Therapy. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, **2**, 266-276.
- Farber, P.M., Graeser, R., Franklin, R.M. and Kappes, B. (1997) Molecular cloning and characterization of a second calcium-dependent protein kinase of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, **87**, 211-216.
- Fidock, D.A., Nomura, T. and Wellems, T.E. (1998) Cycloguanil and its parent compound proguanil demonstrate distinct activities against *Plasmodium falciparum* malaria parasites transformed with human dihydrofolate reductase. *Mol Pharmacol*, **54**, 1140-1147.
- Fidock, D.A. and Wellems, T.E. (1997) Transformation with human dihydrofolate reductase renders malaria parasites insensitive to WR99210 but does not affect the intrinsic activity of proguanil. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10931-10936.
- Fitzpatrick, T., Ricken, S., Lanzer, M., Amrhein, N., Macheroux, P. and Kappes, B. (2001) Subcellular localization and characterization of chorismate synthase in the apicomplexan *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*, **40**, 65-75.
- Foth, B.J., Ralph, S.A., Tonkin, C.J., Struck, N.S., Fraunholz, M., Roos, D.S., Cowman, A.F. and McFadden, G.I. (2003) Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, **299**, 705-708.
- Garcia, C.R. (1999) Calcium homeostasis and signaling in the blood-stage malaria parasite. *Parasitol Today*, **15**, 488-491.
- Gilberger, T.W., Walter, R.D. and Muller, S. (1997) Identification and characterization of the functional amino acids at the active site of the large thioredoxin reductase from *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, **272**, 29584-29589.
- Godsel, L.M. and Engman, D.M. (1999) Flagellar protein localization mediated by a calcium-myristoyl/palmitoyl switch mechanism. *Embo J*, **18**, 2057-2065.
- Goldberg, J., Nairn, A.C. and Kuriyan, J. (1996) Structural basis for the autoinhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *Cell*, **84**, 875-887.
- Goldsmith, E.J. and Cobb, M.H. (1994) Protein kinases. *Curr Opin Struct Biol*, **4**, 833-840.
- Gottesmann, S., Halpern, E., & Trisler, P. (1981) Role of sulA and sulB in filamentation by lon mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **148**, 265-273.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Harmon, A.C., Gribskov, M., Gubrium, E. and Harper, J.F. (2001) The CDPK superfamily of protein kinases. *New Phytologist*, **151**, 175-183.
- Harmon, A.C., Gribskov, M. and Harper, J.F. (2000) CDPKs - a kinase for every Ca²⁺ signal? *Trends Plant Sci*, **5**, 154-159.
- Harmon, A.C., Yoo, B.C. and McCaffery, C. (1994) Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry*, **33**, 7278-7287.
- Harper, J.F., Huang, J.F. and Lloyd, S.J. (1994) Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry*, **33**, 7267-7277.
- Hausmann, K.a.H., N. (1996) *Protozoology*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Helms, J.B. and Zurzolo, C. (2004) Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic*, **5**, 247-254.
- Hrabak, E.M., Chan, C.W., Gribskov, M., Harper, J.F., Choi, J.H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H.G., Sussman, M.R., Thomas, M., Walker-Simmons, K., Zhu, J.K. and Harmon, A.C. (2003) The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol*, **132**, 666-680.
- Hunt, N.H. and Grau, G.E. (2003) Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol*, **24**, 491-499.
- Kappes, B., Doerig, C.D. and Graeser, R. (1999) An overview of *Plasmodium* protein kinases. *Parasitol Today*, **15**, 449-454.
- Kayser, F.H., Bienz, K. A., Eckert, J. and Zinkernagel, R. M. (2001) *Medizinische Mikrobiologie*, Stuttgart New York.
- Kieschnick, H., Wakefield, T., Narducci, C.A. and Beckers, C. (2001) *Toxoplasma gondii* attachment to host cells is regulated by a calmodulin-like domain protein kinase. *J Biol Chem*, **276**, 12369-12377.
- Kim, K., Messinger, L.A. and Nelson, D.L. (1998) Ca²⁺-dependent protein kinases of *Paramecium*--cloning provides evidence of a multigene family. *Eur J Biochem*, **251**, 605-612.
- Kramer, R. and Ginsburg, H. (1991) Calcium transport and compartment analysis of free and exchangeable calcium in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *J Protozool*, **38**, 594-601.
- Kwiatkowski, D., Cannon, J.G., Manogue, K.R., Cerami, A., Dinarello, C.A. and Greenwood, B.M. (1989) Tumour necrosis factor production in *Falciparum* malaria and its association with schizont rupture. *Clin Exp Immunol*, **77**, 361-366.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

- Lambros, C. and Vanderberg, J.P. (1979) Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*, **65**, 418-420.
- Lauer, S., VanWye, J., Harrison, T., McManus, H., Samuel, B.U., Hiller, N.L., Mohandas, N. and Haldar, K. (2000) Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *Embo J*, **19**, 3556-3564.
- Lee, J.Y., Yoo, B.C. and Harmon, A.C. (1998) Kinetic and calcium-binding properties of three calcium-dependent protein kinase isoenzymes from soybean. *Biochemistry*, **37**, 6801-6809.
- Li, J.L., Baker, D.A. and Cox, L.S. (2000) Sexual stage-specific expression of a third calcium-dependent protein kinase from *Plasmodium falciparum*. *Biochim Biophys Acta*, **1491**, 341-349.
- Löffler, G. and Petrides, P.E. (2003) *Biochemie & Pathobiochemie*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Lowe, E.D., Noble, M.E., Skamnaki, V.T., Oikonomakos, N.G., Owen, D.J. and Johnson, L.N. (1997) The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide substrate complex: kinase substrate recognition. *Embo J*, **16**, 6646-6658.
- Lucius, R.u.L.-F., Brigitte. (1997) *Parasitologie, Grundlagen für Biologen, Mediziner und Veterinärmediziner*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
- Ludwig, A.A., Romeis, T. and Jones, J.D. (2004) CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *J Exp Bot*, **55**, 181-188.
- Martin, M.L. and Busconi, L. (2000) Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. *Plant J*, **24**, 429-435.
- McAinsh, M., R. and Hetherington, A., M. (1998) Encoding specificity in Ca²⁺ signalling systems. *Trends in Plant Science*, **3**, 32-36.
- McConkey, G.A., Pinney, J.W., Westhead, D.R., Plueckhahn, K., Fitzpatrick, T.B., Macheroux, P. and Kappes, B. (2004) Annotating the *Plasmodium* genome and the enigma of the shikimate pathway. *Trends Parasitol*, **20**, 60-65.
- McLaughlin, S. and Aderem, A. (1995) The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem Sci*, **20**, 272-276.
- Mehlhorn, H. (1988) *Parasitology in focus*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Michel, H. (1990) *Crystallisation of membrane proteins*. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston.
- Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K. and Doumbo, O.K. (2002) The pathogenic basis of malaria. *Nature*, **415**, 673-679.
- Naik, R.S., Branch, O.H., Woods, A.S., Vijaykumar, M., Perkins, D.J., Nahlen, B.L., Lal, A.A., Cotter, R.J., Costello, C.E., Ockenhouse, C.F., Davidson, E.A. and Gowda, D.C. (2000) Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *J Exp Med*, **192**, 1563-1576.
- Nickel, W. (2003) The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem*, **270**, 2109-2119.
- O'Donnell, R., Preiser, P.R., Williamson, D.H., Moore, P.W., Cowman, A.F. and Crabb, B.S. (2001) An alteration in concatameric structure is associated with efficient segregation of plasmids in transfected *Plasmodium falciparum* parasites. *Nucleic Acids Res*, **29**, 716-724.
- O'Donnell, R.A., Freitas-Junior, L.H., Preiser, P.R., Williamson, D.H., Duraisingh, M., McElwain, T.F., Scherf, A., Cowman, A.F. and Crabb, B.S. (2002) A genetic screen for improved plasmid segregation reveals a role for Rep20 in the interaction of *Plasmodium falciparum* chromosomes. *Embo J*, **21**, 1231-1239.
- Papworth, C., Bauer, J. C., Braman, J., and Wright, D. A. (1996) Site-Directed Mutagenesis in One Day with >80% Efficiency. *Strategies*, **9**, 3-4.
- Peitzsch, R.M. and McLaughlin, S. (1993) Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry*, **32**, 10436-10443.
- Playfair, J.H., Blackwell, J.M. and Miller, H.R. (1990) Modern vaccines. Parasitic diseases. *Lancet*, **335**, 1263-1266.
- Prade, L., Engh, R.A., Girod, A., Kinzel, V., Huber, R. and Bossemeyer, D. (1997) Staurosporine-induced conformational changes of cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit explain inhibitory potential. *Structure*, **5**, 1627-1637.
- Przyborski, J.M., Wickert, H., Krohne, G. and Lanzer, M. (2003) Maurer's clefts--a novel secretory organelle? *Mol Biochem Parasitol*, **132**, 17-26.
- Resh, M.D. (1996) Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins. *Cell Signal*, **8**, 403-412.
- Resh, M.D. (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1451**, 1-16.
- Ries-Kautt, M.M and Ducruix, .A.F. (1989) Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme. *J. Biol. Chem.*, **264**, 745-748.

- Robbins, S.M., Quintrell, N.A. and Bishop, J.M. (1995) Myristoylation and differential palmitoylation of the HCK protein-tyrosine kinases govern their attachment to membranes and association with caveolae. *Mol Cell Biol*, **15**, 3507-3515.
- Rosario, V. (1981) Cloning of naturally occurring mixed infections of malaria parasites. *Science*, **212**, 1037-1038.
- Rosenthal, P.J. (2003) Antimalarial drug discovery: old and new approaches. *J Exp Biol*, **206**, 3735-3744.
- Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G.G. (1992) *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*. WVG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Rudd, J.J., Franklin-Tong, V. E. (1999) Calcium signaling in plants. *CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences*, **55**, 214-232.
- Rutschmann, F., Stalder, U., Piotrowski, M., Oecking, C. and Schaller, A. (2002) LeCPK1, a calcium-dependent protein kinase from tomato. Plasma membrane targeting and biochemical characterization. *Plant Physiol*, **129**, 156-168.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanders, D., Brownlee, C. and Harper, J.F. (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell*, **11**, 691-706.
- Schindler, T., Sicheri, F., Pico, A., Gazit, A., Levitzki, A. and Kuriyan, J. (1999) Crystal structure of Hck in complex with a Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. *Mol Cell*, **3**, 639-648.
- Schirmer, R.H., Coulibaly, B., Stich, A., Scheiwein, M., Merkle, H., Eubel, J., Becker, K., Becher, H., Muller, O., Zich, T., Schiek, W. and Kouyate, B. (2003) Methylene blue as an antimalarial agent. *Redox Rep*, **8**, 272-275.
- Schlichtherle, M., Wahlgren, M., Perlmann, H. and Scherf. (2000) *Methods in Malaria Research*. MR4 / ATCC,, Manassas, Virginia.
- Seykora, J.T., Myat, M.M., Allen, L.A., Ravetch, J.V. and Aderem, A. (1996) Molecular determinants of the myristoyl-electrostatic switch of MARCKS. *J Biol Chem*, **271**, 18797-18802.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.
- Simons, K. and Ikonen, E. (2000) How cells handle cholesterol. *Science*, **290**, 1721-1726.
- Stueber, D., Matile, H., & Gaotta, G. (1990) *Immunological Methods*. Academic Press, New York.
- Suetterlin BW, K.B., Franklin RM. (1991) Localization and stage specific phosphorylation of Plasmodium falciparum phosphoproteins during the intraerythrocytic cycle. *Mol Biochem Parasitol.*, **46**, 113-122.
- Tanabe, K. (1990) Ion metabolism in malaria-infected erythrocytes. *Blood Cells*, **16**, 437-449.
- Tanabe, K., Mikkelsen, R.B. and Wallach, D.F. (1982) Calcium transport of Plasmodium chabaudi-infected erythrocytes. *J Cell Biol*, **93**, 680-684.
- Taylor, S.S. and Radzio-Andzelm, E. (1994) Three protein kinase structures define a common motif. *Structure*, **2**, 345-355.
- Toledo, L.M. and Lydon, N.B. (1997) Structures of staurosporine bound to CDK2 and cAPK--new tools for structure-based design of protein kinase inhibitors. *Structure*, **5**, 1551-1556.
- Trager, W. and Jensen, J.B. (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, **193**, 673-675.
- Uhlemann, A.-C., Staaloe, T., Klinkert, M.-Q. and L., H. (2000) Analysis of Plasmodium falciparum-infected red blood cells. *.MACS&more*, **4**, 7-8.
- van't Hof, W. and Resh, M.D. (2000) Targeting proteins to plasma membrane and membrane microdomains by N-terminal myristoylation and palmitoylation. *Methods Enzymol*, **327**, 317-330.
- VanWye, J.D. and Haldar, K. (1997) Expression of green fluorescent protein in Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol*, **87**, 225-229.
- Veit, M., Dietrich, L.E. and Ungermann, C. (2003) Biochemical characterization of the vacuolar palmitoyl acyltransferase. *FEBS Lett*, **540**, 101-105.
- Veit, M., Laage, R., Dietrich, L., Wang, L. and Ungermann, C. (2001) Vac8p release from the SNARE complex and its palmitoylation are coupled and essential for vacuole fusion. *Embo J*, **20**, 3145-3155.
- Vial, H.J., Thuet, M.J. and Philippot, J.R. (1982) Inhibition of the in vitro growth of Plasmodium falciparum by D vitamins and vitamin D-3 derivatives. *Mol Biochem Parasitol*, **5**, 189-198.
- Waller, R.F., Reed, M.B., Cowman, A.F. and McFadden, G.I. (2000) Protein trafficking to the plastid of Plasmodium falciparum is via the secretory pathway. *Embo J*, **19**, 1794-1802.
- Wasserman, M., Alarcon, C. and Mendoza, P.M. (1982) Effects of Ca⁺⁺ depletion on the asexual cell cycle of Plasmodium falciparum. *Am J Trop Med Hyg*, **31**, 711-717.
- Wasserman, M. and Chaparro, J. (1996) Intraerythrocytic calcium chelators inhibit the invasion of Plasmodium falciparum. *Parasitol Res*, **82**, 102-107.
- Waters, A.P., Thomas, A.W., van Dijk, M.R. and Janse, C.J. (1997) Transfection of malaria parasites. *Methods*, **13**, 134-147.

- Webb, Y., Hermida-Matsumoto, L. and Resh, M.D. (2000) Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem*, **275**, 261-270.
- Wickham, M.E., Rug, M., Ralph, S.A., Klonis, N., McFadden, G.I., Tilley, L. and Cowman, A.F. (2001) Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes. *Embo J*, **20**, 5636-5649.
- Zhang, W., Tribble, R.P. and Samelson, L.E. (1998) LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity*, **9**, 239-246.
- Zhao, Y., Franklin, R.M. and Kappes, B. (1994a) Plasmodium falciparum calcium-dependent protein kinase phosphorylates proteins of the host erythrocytic membrane. *Mol Biochem Parasitol*, **66**, 329-343.
- Zhao, Y., Kappes, B. and Franklin, R.M. (1993) Gene structure and expression of an unusual protein kinase from Plasmodium falciparum homologous at its carboxyl terminus with the EF hand calcium-binding proteins. *J Biol Chem*, **268**, 4347-4354.
- Zhao, Y., Kappes, B., Yang, J. and Franklin, R.M. (1992) Molecular cloning, stage-specific expression and cellular distribution of a putative protein kinase from Plasmodium falciparum. *Eur J Biochem*, **207**, 305-313.
- Zhao, Y., Pokutta, S., Maurer, P., Lindt, M., Franklin, R.M. and Kappes, B. (1994b) Calcium-binding properties of a calcium-dependent protein kinase from Plasmodium falciparum and the significance of individual calcium-binding sites for kinase activation. *Biochemistry*, **33**, 3714-3721.
- Zolg JW, P.J., Chen GX, Palmer S. (1989) Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol.*, **36**, 253-262.

Anhang

Sequenzen:

PfCDPK1:

```

ATGGGGTGTT CACAAAGTTC AAACGTGAAA GATTTTAAAA CGAGGAGAAG TAAATTTACG
AATGGAAATA ATTATGGGAA AAGTGGTAAT AATAAAAATT CGGAGGACCT AGCGATAAAC
CCAGGTATGT ATGTTAGAAA AAAAGAAGGG AAGATAGGGG AGTCCTATTT CAAAGTTCGC
AAATTAGGTA GCGGTGCGTA CGGAGAAGTA TTATTGTGTA GAGAAAAACA TGGACATGGT
GAGAAGGCTA TTAAGGTTAT AAAGAAGTCC CAATTTGATA AGATGAAATA TTCGATAACA
AATAAGATCG AATGTGATGA TAAAATACAT GAAGAAATAT ATAATGAGAT ATCATTATTA
AAATCATTAG ATCATCCTAA TATAATAAAA TTGTTTGATG TTTTGAAGA TAAGAAATAT
TTTTATTTAG TAACCGAATT TTATGAAGGT GGGGAATTAT TTGAACAAAT TATTAATCGT
CATAAATTTG ATGAATGTGA TGCTGCTAAT ATAATGAAAC AAATATTAAG TGGCATATGT
TATTTACATA AACATAATAT TGTACATCGA GATATTAAC CAGAAAATAT TTTATTAGAA
AATAAACATA GTTTATTAATA TATAAAAATT GTCGATTTTG GTTTATCTTC CTTTTTCTCA
AAAGATAATA AGTTAAGAGA TAGATTAGGT ACAGCATATT ATATTGCACC TGAAGTTTTG
AGGAAAAAAT ATAATGAAAA ATGTGATGTC TGGTCATGTG GAGTTATTCT ATATATCTTA
TTATGTGGTT ATCCTCCTTT CGGGGGTCAG AATGATCAAG ATATTATAAA AAAGGTGGAG
AAAGGAAAAT ATTACTTTGA TTTTAATGAC TGGAAAAATA TAAGTGAAGA GGCAAAAGAA
TTAATCAAAC TTATGTTGAC ATATGATTAT AATAAAAAGAA TAACAGCAA GGAAGCTCTA
AATAGTAAAT GGATAAAAAA ATATGCAAAAC AATATTAATA AAAGTGATCA AAAAACTTTA
TGTGGCGCTT TATCAAATAT GAGGAAATTT GAGGGCAGTC AGAAATTAGC TCAAGCAGCC
ATATTATTTA TTGGAAGTAA ATTAACAACA TTAGAGGAAC GTAAAGAGCT TACTGACATT
TTTAAAAAGT TGGATAAAAA TGGCGATGGC CAGCTTGATA AGAAGGAATT GATTGAGGGA
TACAACATAC TTAGGAGCTT TAAGAATGAG TTAGGAGAAC TTAATAATGT CGAGGAAGAA
GTAGACAATA TATTGAAGGA GGTGATTTT GATAAAAATG GATACATAGA ATATTCAGAG
TTTATTTCTG TATGTATGGA TAAGCAAATC CTTTTCAGTG AGGAGAGATT AAGCATGCA
TTCAATTTGT TTGATACTGA TAAAAGTGGA AAAATAACGA AGGAAGAATT AGCAAATTTA
TTTGGTTTTGA CATCCATAAG TGAACAAATG TGGAATGAAG TTCTCGGAGA AGCAGATAAA
AATAAAGATA ACATGATTGA CTTTGATGAA TTCGTTAACA TGATGCACAA AATTTGTGAT
AATAAATCTT CATAA

```

GFP:

```

ATGAGTAAAG GAGAAGAACT TTTCCTGGA GTTGTCCCAA TTCTTGTTGA ATTAGATGGT
GATGTTAATG GGCACAAATT TTCTGTGAGT GGAGAGGGTG AAGGTGATGC AACATACGGA
AAACTTACCC TTAAATTTAT TTGCACTACT GGAAAACTAC CTGTTCCATG GCCAACACTT
GTCACTACTT TCGCGTATGG TCTTCAATGC TTTGCGAGAT ACCCAGATCA TATGAAACAG
CATGACTTTT TCAAGAGTGC CATGCCCGAA GGTTATGTAC AGGAAAGAAC TATATTTTTT
AAAGATGACG GGAACACAA GACACGTGCT GAAGTCAAGT TTGAAGGTGA TACCCTTGTT
AATAGAATCG AGTTAAAAGG TATTGATTTT AAAGAAGATG GAAACATTCT TGGACACAAA
TTGGAATACA ACTATAACTC ACACAATGTA TACATCATGG CAGACAAACA AAAGAATGGA
ATCAAAGTTA ACTTCAAAT TAGACACAAC ATTGAAGATG GAAGCGTTCA ACTAGCAGAC
CATTATCAAC AAAATACTCC AATTGGCGAT GGCCCTGTCC TTTTACCAGA CAACCATTAC
CTGTCCACAC AATCTGCCCT TTCGAAAGAT CCCAACGAAA AGAGAGACCA CATGGTCCTT
CTTGAGTTTG TAACAGCTGC TGGGATTACA CATGGCATGG ATGAACTATA CAAATAA

```

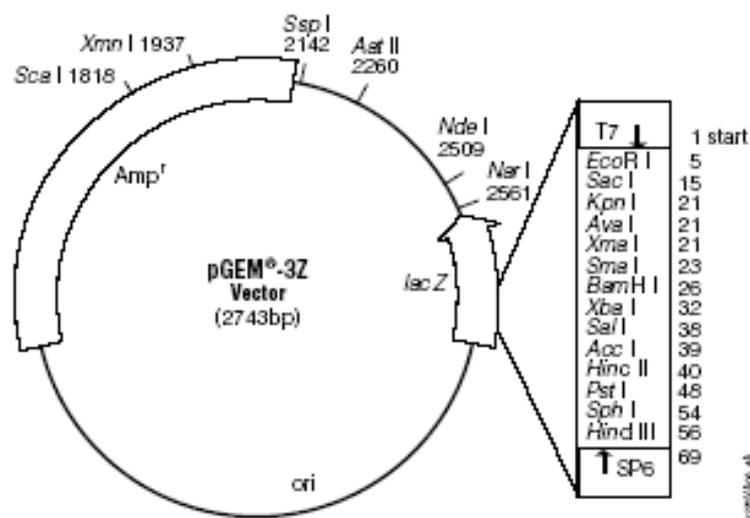
Luciferase:

ATGCAT

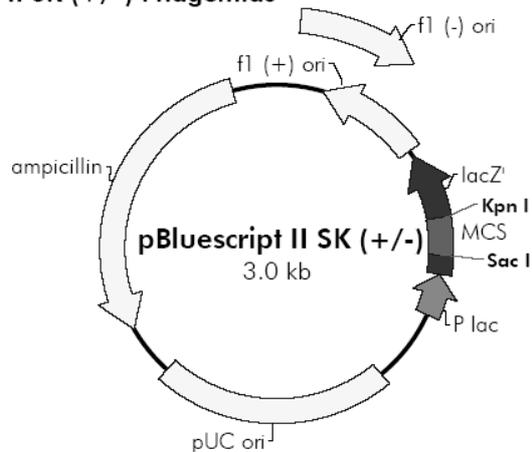
```

GAAGACGCCA AAAACATAAA GAAAGGCCCG GCGCCATTCT ATCCTCTAGA GGATGGAACC
GCTGGAGAGC AACTGCATAA GGCTATGAAG AGATACGCCC TGGTTCCTGG AACAAATTGCT
TTTACAGATG TACATATCGA GGTGAACATC ACGTACGCGG AATACTTCGA AATGTCCGTT
CGGTTGGCAG AAGCTATGAA ACGATATGGG CTGAATACAA ATCACAGAAT CGTCGTATGC
AGTGAAAAC TCTTCAATT CTTTATGCCG GTGTTGGGCG CGTTATTTAT CGGAGTTGCA
GTTGCGCCCG CGAACGACAT TTATAATGAA CGTGAATTGC TCAACAGTAT GAACATTTCCG
CAGCCTACCG TAGTGTTTGT TTCCAAAAAG GGGTTGCAAA AAATTTTGAA CGTGCAAAAA
AAATTACCAA TAATCCAGAA AATTATTATC ATGGATTCTA AAACGGATTA CCAGGGATTT
CAGTCGATGT ACACGTTTCGT CACATCTCAT CTACCTCCCG GTTTTAATGA ATACGATTTT
GTACCAGAGT CTTTTGATCG TGACAAAACA ATTGCACTGA TAATGAATTC CTCTGGATCT
ACTGGGTTAC CTAAGGGTGT GGCCCTTCCG CATAGAATCG CCTGCGTCAG ATTCTCGCAT
GCCAGAGATC CTATTTTTGG CAATCAAATC ATTCCGGATA CTGCGATTTT AAGTGTGTGT
CCATTCCATC ACGGTTTTGG AATGTTTACT ACACTCGGAT ATTTGATATG TGGATTTTCA
GTCGTCTTAA TGTATAGATT TGAAGAAGAG CTGTTTTTAC GATCCCTTCA GGATTACAAA
ATTCAAAGTG CGTTGCTAGT ACCAACCCCTA TTTTCATTCT TCGCCAAAAG CACTCTGATT
GACAAATACG ATTTATCTAA TTTACACGAA ATTGCTTCTG GGGGCGCACC TCTTTCGAAA
GAAGTCGGGG AAGCGGTTGC AAAACGCTTC CATCTTCCAG GGATACGACA AGGATATGGG
CTCACTGAGA CTACATCAGC TATTCTGATT ACACCCGAGG GGGATGATAA ACCGGGCGCG
GTCGGTAAAG TTGTTCCATT TTTTGAAGCG AAGGTTGTGG ATCTGGATAC CGGGAAAACG
CTGGGCGTTA ATCAGAGAGG CGAATTATGT GTCAGAGGAC CTATGATTAT GTCCGGTTAT
GTAAACAATC CGGAAGCGAC CAACGCCTTG ATTGACAAGG ATGGATGGCT ACATCTTGA
GACATAGCTT ACTGGGACGA AGACGAACAC TTCTTCATAG TTGACCGCTT GAAGTCTTTA
ATTAAATACA AAGGATATCA GGTGGCCCCC GCTGAATTGG AATCGATATT GTTACAACAC
CCCAACATCT TCGACGCGGG CGTGGCAGGT CTTCCCGACG ATGACGCCGG TGAACCTCCC
GCCGCCGTTG TTGTTTTGGA GCACGGAAAG ACGATGACGG AAAAAAGAGAT CGTGGATTAC
GTCGCCAGTC AAGTAACAAC CGCGAAAAAG TTGCGCGGAG GAGTTGTGTT TGTGGACGAA
GTACCGAAAG GTCTTACCGG AAAACTCGAC GCAAGAAAAA TCAGAGAGAT CCTCATAAAG
GCCAAGAAGG GCGGAAAGTC CAAATTGTAA
    
```

Vektoren



pBluescript® II SK (+/-) Phagemids



**pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 598–826)**

