

HABILITATIONSSCHRIFT

50 Jahre Proteinkinase CK2

-

ein Beitrag zur Strukturbiologie eukaryontischer Proteinkinasen

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln
von

Karsten Niefind

Köln, im Mai 2004

*für
Nadja,
Fritjof & Svea*

*Das ist's ja, was den Menschen zieret,
Und dazu ward ihm der Verstand,
Daß er im inner'n Herzen spüret,
Was er erschafft mit seiner Hand.*

Friedrich Schiller (1759-1805)

Danksagung

Vor fast zehn Jahren, am 22. Juni 1994, wurden die ersten Kristallisationsansätze mit CK2 α aus Mais pipettiert, mit denen das Projekt „Strukturbiologie der Proteinkinase CK2“ begann. Zu den seither erzielten Ergebnissen, auf denen diese Schrift basiert, haben verschiedene Personen und Organisationen wichtige und teilweise unverzichtbare Beiträge geleistet:

Ausgangspunkt des ganzen war eine Kooperationsvereinbarung der Professoren Dietmar Schomburg (Köln, damals Braunschweig) und Olaf-Georg Issinger (Odense, damals Homburg/Saar), zu deren Umsetzung mir die proteinkristallographischen Arbeiten übertragen wurden. Später durfte ich das Thema weiterentwickeln und zu einem Habilitationsprojekt ausbauen. Dafür, für die Möglichkeit, die strukturelle biologische Infrastruktur am Institut für Biochemie der Universität zu Köln nutzen zu können, für die Gesamtunterstützung der Habilitation sowie für die in jüngster Zeit gewährte Freiheit, eine ausführliche Habilitationsschrift verfassen zu dürfen, bin ich Dietmar Schomburg in besonderem Maße dankbar.

Herzlich danken möchte ich auch Olaf-Georg Issinger: Er hat mir nicht nur im Verlaufe einer jahrelangen erfolgreichen Kooperation die zellbiologischen und biomedizinischen Hintergründe des Projektes nahegebracht, hat mir nicht nur Proteine und Expressionssysteme anvertraut, sondern seine - schon für Anfang der 90er Jahre in der CK2-Literatur dokumentierte - Offenheit gegenüber biophysikalischen Methoden hat zu der entscheidenden Initiative geführt.

Seine damalige Doktorandin Frau Professor Dr. Barbara Guerra hat mit ihrem proteinchemischen Geschick wesentlich dazu beigetragen, daß es diese Kooperation war, die die ersten Kristallstrukturen einer CK2-Untereinheit - eben jener CK2 α aus Mais - und später eines CK2-Holoenzym publizieren konnte. Als jedoch - im Falle der CK2 α aus *Homo sapiens* - die reine Proteinchemie nicht mehr ausreichte, um zu einem kristallisierbaren Protein zu gelangen, war es Frau Professor Dr. Brigitte Boldyreff, die uns mit ihrem molekulargenetischen Wissen dazu verhalf. Beiden sei herzlich gedankt!

Die Einsicht, daß es bei aller zellbiologischen Relevanz des Enzyms auch ein lebensmittelchemisches Interesse an ihm gibt, verdanke ich Frau Dr. Delphine Chaillot und Herrn Dr. Thierry Chardot, beide damals am „Institut National de la Recherche Agronomique“ (INRA) in Thiverval-Grignon bei Paris. Vor allem aber danke ich ihnen dafür, daß sie mich an der ersten Protein-Design-Studie auf der Basis einer CK2 α -Kristallstruktur teilhaben ließen.

Pionierarbeit leistete auch Herr Dipl.-Phys. Michael Pütter während seiner Diplomarbeit: Seinen experimentellen Fertigkeiten entsprangen die ersten Tieftemperatur-Diffraktionsmessungen mit CK2 α -Kristallen, die dann zur Aufklärung der strukturellen Basis der dualen Cosubstratspezifität von CK2 geführt haben. Es waren gleichzeitig die ersten Cryo-Diffraktionsmessungen überhaupt am Institut für Biochemie in Köln.

Mit Hilfe der CK2 zur Biochemie gelangt ist Frau Dipl.-Chem. Inessa Ermakova, die maßgeblichen Anteil an der Kristallisation des CK2-Holoenzym hatte. Ihre dabei gewonnenen Erfahrungen hat sie im Rahmen ihrer Doktorarbeit in die Aufklärung zweier weiterer Strukturen eingebracht, die in dieser Schrift angesprochen werden: die von C-terminal verkürzter und die von einer zusätzlich doppelt mutierten CK2 α aus *Homo sapiens*. Die Herstellung und kinetische Charakterisierung dieser Doppelmutante war das Werk von Frau B. Sc. Christina Westmose Yde, die derzeit bei Olaf-Georg Issinger in Odense promoviert. Beiden, Inessa Ermakova und Christina Westmose Yde, sei herzlich gedankt für ihre Mitarbeit und für die Bereitstellung einiger noch unveröffentlichter Daten!

Dankbar bin ich weiterhin für die kompetenten Beiträge von Frau Sabine Weißflog (Braunschweig), Frau Elena Bakusheva, Frau Sabine Lohmer, Frau Anja Hochheiser, Frau Cäcilia Anstötz, Herrn Uwe Otto, Herrn Michael Zimmermann, Herrn Michael Köllemann und Herrn Dr. Peter Krämer (alle Köln). Sabine Weißflog und Elena Bakusheva haben etliche Milligramm CK2 α und CK2-Holoenzym gereinigt und teilweise zur Kristallisation gebracht. Neben verschiedenen kleineren und größeren Aufgaben hatte ich Sabine Lohmer mit der Kristallisation eines chimären CK2-Holoenzym aus Mais-CK2 α und menschlicher CK2 β betraut: eine undankbare Arbeit, weil sie - wie sich später herausstellte - aufgrund von Aggregationsproblemen zum Mißerfolg verurteilt war. Anja Hochheiser hat die zwischenzeitlich immer wieder nötigen Massenspektren aufgenommen. Cäcilia Anstötz war mir bei der Verwaltung meines CK2-Drittmittelkontos eine ebenso wichtige Hilfe, wie Uwe Otto bei der Pflege und Wartung der Röntgendiffraktometer und wie Michael Zimmermann, Michael Köllemann und Peter Krämer bei der Lösung von EDV-Problemen.

Den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dietmar Schomburgs - allen voran meiner Büronachbarin Frau Dr. Shivani Chatterjee - danke ich für eine kollegiale Arbeitsatmosphäre und für diverse Hilfen, die hier im einzelnen nicht genannt werden können.

Finanziell gefördert wurden die hier vorgestellten Arbeiten durch die „European Molecular Biology Organization“ (EMBO), den Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD), die Professor-Dr-Werner-Petersen-Stiftung in Kiel sowie durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG).

Eine besondere Freude war es in den vergangenen Jahren für mich, die Wirkung der CK2 bei der Zellproliferation *in vivo* beobachten und miterleben zu können. Die in dem Zusammenhang nötigen Experimente haben bisher zweimal zum Erfolg geführt, nämlich zu Fritjof und Svea. Zu dieser Freude hat mir meine Ehefrau Nadja verholfen, der ich dafür und für manche andere Unterstützung danke.

Inhalt

<i>I</i>	<i>Vorspann</i>	1
1	Formales	1
1.1	<i>Definitionen und Abkürzungen</i>	1
1.2	<i>Zum Begriff „Eukaryontische Proteinkinasen“</i>	2
1.3	<i>Rechtschreibung</i>	2
1.4	<i>Graphikprogramme</i>	2
2	Liste der für diese Schrift relevanten eigenen Arbeiten	3
3	Zusammenfassung	4
<i>II</i>	<i>Vorgeschichte(n) und Entdeckung(en)</i>	6
4	Phosphor: mit Minimalchemie zu einem Schlüsselement der Biochemie	6
5	Casein war das erste bekannte Phosphoprotein	8
6	Mit den Caseinkinasen begann 1954 die Proteinkinaseforschung	9
7	Mit der DNA-Doppelhelix begann 1953 die Molekular-, aber auch die Strukturbiologie	10
<i>III</i>	<i>Biochemie der CK2 im Spiegel ihrer Namens- und Forschungsgeschichte bis zu den ersten Kristallstrukturen</i>	11
8	Von „Protein-Phosphokinase“ zu „Proteinkinase CK2“ - die Forschungsgeschichte der CK2 ist eine Folge von Umbenennungen	11
9	„Protein-Phosphokinase“: die CK2 der 50er Jahre	13
9.1	<i>Trotz Präferenz für Casein als Substrat blieb die physiologische Funktion der CK2 unbekannt</i>	13
9.2	<i>Regulation durch Phosphorylierung: An Phosphorylase-Kinase wurde erstmals die biologische Bedeutung der Proteinphosphorylierung erkannt</i>	14
9.3	<i>Im Gegensatz zu Phosphorylase-Kinase sind CK1 und CK2 acidophile Proteinkinasen</i>	15
9.4	<i>CK1 und CK2 sind ubiquitär verbreitet</i>	15
9.5	<i>Zusammenfassung</i>	16
10	„Phosvitinkinase“: die CK2 der 60er Jahre	16
10.1	<i>Die wachsende Zahl der Proteinkinasen erforderte eine genauere Benennung</i>	16
10.2	<i>Duale Cosubstratspezifität: CK2 kann statt ATP auch GTP als Cosubstrat verwenden</i>	16

10.3	<i>CK2 benötigt monovalente Kationen zur Aktivierung</i>	17
10.4	<i>Hinter „Phosvitinkinase“ verbergen sich zwei unterschiedliche Enzyme: CK1 und CK2</i>	17
10.5	<i>Die Entdeckung der CAPK: Durchbruch für die Proteinkinaseforschung</i>	18
10.5.1	Die erste Regulationskaskade wird entschlüsselt	18
10.5.2	Pleiotropie: Die CAPK ist eine Breitbandkinase	18
10.5.3	Wissenschaftsgeschichtliche Bedeutung der CAPK	19
10.6	<i>cGMP und Ca²⁺: weitere „second messenger“-Moleküle als Proteinkinase-Regulatoren</i>	19
10.7	<i>Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase: die erste „atypische“ Proteinkinase</i>	19
10.8	<i>Zusammenfassung</i>	19

11 Anschwellende Namensflut: CK2 in den 70er und frühen 80er Jahren 20

11.1	<i>Zellzyklus und Krebs: Schrittmacher der Proteinkinaseforschung</i>	20
11.2	<i>Erste Klassifizierung von Proteinkinasen</i>	21
11.3	<i>„Caseinkinasen“: acidophile versus basophile Proteinkinasen</i>	21
11.4	<i>„cAMP-unabhängige Proteinkinasen“: das Rätsel der CK2-Regulation</i>	21
11.4.1	Auch das Regulationsverhalten liefert keinen Hinweis auf die Funktion der CK2	21
11.4.2	ATP-Kompetitoren und Polyanionen inhibieren, Polykationen aktivieren CK2	22
11.5	<i>Die Unterscheidung von CK1 und CK2</i>	22
11.5.1	Chromatographische Trennung: Nomenklatur nach Elutionsprofil	22
11.5.2	CK2 bindet an Phosphocellulose und bildet unspezifische Aggregate	23
11.5.3	CK2 α und CK2 β : CK2, nicht jedoch CK1 besitzt eine heterotetramere Quartärstruktur	23
11.5.4	„Caseinkinase G“ und „Caseinkinase TS“: Benennung nach Substrat- und Cosubstratspezifität	24
11.5.5	Erste Erkennungssequenzen für CK1 und CK2	24
11.5.6	Wie stabil ist das CK2-Holoenzym?	24
11.6	<i>CK2-Benennung nach der Lokalisation</i>	25
11.6.1	„Nukleare Proteinkinase NII“: Im Zellkern ist ein Schwerpunkt der CK2-Aktivität	25
11.6.2	„Membrankinase I“: CK2 als Membran- und Ectoenzym	25
11.7	<i>Substratproteine als Namensgeber für die CK2</i>	25
11.7.1	„eIF-2 β -Kinase“: CK2 und die Regulation der Proteinbiosynthese	25
11.7.2	„Troponin-T-Kinase“	26
11.7.3	„Glycogensynthase-Kinase 5“: CK2 als „graue Eminenz“ der Stoffwechselregulation?	26
11.8	<i>„Novikoff Ascites Tumor Proteinkinase II“: CK2 und Tumorforschung</i>	27
11.8.1	Tumorzellen besitzen eine erhöhte CK2-Aktivität	27
11.8.2	CK2-Autophosphorylierung an der CK2 β -Untereinheit	27
11.8.3	Konstitutive Aktivität der CK2	28
11.8.4	Proteinkinasen als Onkogen-Produkte: die Entdeckung der Protein-Tyrosinkinasen	28
11.9	<i>Zusammenfassung</i>	29

12 „Caseinkinase 2“: die CK2 der 80er Jahre	29
12.1 Sequenzen, Tendenzen und Konsequenzen	29
12.2 Die biochemische Ähnlichkeit und die Kreuzreaktivität von Antikörpern zeigen, daß CK2 evolutionär hochkonserviert ist	30
12.3 CK2 α gehört zur Superfamilie der „eukaryontischen Proteinkinasen“	31
12.4 CK2 β besitzt fast keine näheren Verwandten	31
12.5 CK2 α gehört zur CMGC-Familie der eukaryontischen Proteinkinasen	32
12.6 Zellzykluskontrolle durch cyclinabhängige Proteinkinasen	32
12.7 MAP-Kinasen und ihre Auswirkung auf die CK2-Forschung	33
12.7.1 MAP-Kinase-Signalwege und das Phänomen der dualen Spezifität	33
12.7.2 Duale Spezifität der CK2?	34
12.7.3 CK2-Stimulation durch Hormone und andere exogene Faktoren	35
12.8 Die Konsensussequenz für CK2-Substrate	35
12.9 Proteinphosphorylierung in Bakterien: die ersten Protein-Histidinkinasen	36
12.10 Zusammenfassung	37
13 „Proteinkinase CK2“: die CK2 der 90er Jahre	37
13.1 Das andauernde Schattendasein der CK2 bewirkt eine letzte Umbenennung	37
13.2 Globale und lokale CK2-typische Sequenzmuster	38
13.2.1 Neue Einsichten durch Bioinformatik	38
13.2.2 CK2 α und CK2 β sind hochkonserviert	38
13.2.3 CK2 β besitzt ein Zinkbindungsmotiv	39
13.2.4 Autophosphorylierungsstelle und „saure Schleife“ in CK2 β	44
13.2.5 Enthält CK2 β eine Signalsequenz zum proteolytischen Abbau?	44
13.2.6 Nukleotidbindung durch CK2 α	45
13.2.7 CK2 α -Phosphorylierung an Tyr50 inmitten der glycinreichen Region?	45
13.2.8 Der „basische Strang“ in CK2 α	45
13.2.9 NLS-Signale	46
13.3 Wichtige Eigenschaften der rekombinant hergestellten CK2-Untereinheiten	46
13.3.1 Herstellung der isolierten CK2-Untereinheiten durch heterologe Genexpression	46
13.3.2 Isolierte CK2 α ist auch nach rekombinanter Herstellung katalytisch aktiv	47
13.3.3 CK2 α und CK2 β kombinieren sich <i>in vitro</i> spontan zum CK2-Holoenzym	48
13.3.4 CK2 β stabilisiert CK2 α gegenüber thermischer und chemischer Denaturierung	48
13.3.5 CK2 β moduliert die katalytische Aktivität und die Substratspezifität von CK2 α	48
13.4 Studien zur Quartärstruktur der CK2	49
13.4.1 CK2 α bildet Monomere	49
13.4.2 CK2 β bildet stabile Dimere	50
13.4.3 CK2 β wechselwirkt mit CK2 α und bildet als Dimer den Kern des CK2-Holoenzym	51
13.4.4 CK2-Holoenzymkomplexe können oligomere Aggregate bilden	52
13.4.5 CK2 in Pflanzen: Variabilität in der Quartärstruktur	53
13.4.6 Nukleare CK2 aus <i>Chironomus tentans</i> : freie CK2 α und CK2 β neben dem CK2-Holoenzym	54

13.5	<i>Die Rolle der (Auto-)Phosphorylierung der CK2 auf ihre Aktivität und Quartärstruktur</i>	54
13.6	<i>Funktionelle Studien</i>	55
13.6.1	Die Ausgangslage	55
13.6.2	Knockout-Experimente: CK2 α ist überlebensnotwendig in allen eukaryontischen Zellen, CK2 β nur in höheren Eukaryonten	56
13.6.3	CK2 und Zellzyklus	56
13.6.4	Noch mehr Substrate: Auch CK2 ist eine Breitbandkinase	57
13.6.5	Mutagenesestudien zur Substratspezifität	57
13.6.6	Suche nach Wechselwirkungspartnern	58
13.6.7	<i>Theileria parva</i> : Zelltransformation durch CK2?	59
13.7	<i>Einige allgemeine Tendenzen der Proteinkinaseforschung in den 90er Jahren</i>	60
13.7.1	Erste 3D-Strukturen von Proteinkinasen	60
13.7.2	„Atypische“ Proteinkinasen	60
13.7.3	Das Kinom: Proteinkinasen sind die häufigsten Proteine in eukaryontischen Organismen	61
13.7.4	Nomenklaturprobleme: Sowohl „eukaryontische“ als auch „prokaryontische“ Proteinkinasen sind ubiquitär verbreitet	62
14	Zusammenfassung: CK2 ist eine unorthodoxe Proteinkinase	63
<i>IV</i>	<i>Strukturbiologie der CK2</i>	65
15	Die Schlüsselstrukturen der CK2 - eine Übersicht	65
15.1	<i>Kristallstruktur von CK2α aus Mais: erste 3D-Struktur einer pflanzlichen Proteinkinase</i>	65
15.2	<i>Kristallstruktur von CK2β¹⁻¹⁸² aus Mensch: CK2β dimerisiert über einen Zinkfinger</i>	68
15.3	<i>Die Kristallstruktur des CK2-Holoenzym offenbarte dessen globale Architektur</i>	69
15.3.1	Degradations- und Aggregationsprobleme bei der Kristallisation	69
15.3.2	Quartärstruktur von CK2: ein zentrales CK2 β -Dimer vernetzt zwei CK2 α -Monomere	69
15.4	<i>Weitere CK2α-Strukturen</i>	72
16	Katalytische Schlüsselemente	72
16.1	<i>Die ATP-bindende Schleife</i>	72
16.2	<i>Magnesiumbindungsstellen</i>	74
16.3	<i>Lys68 und seine Salzbrücke zur Helix αC</i>	75
16.4	<i>Die katalytische Schleife</i>	76
16.5	<i>Die Aktivierungsschleife</i>	76
16.6	<i>Die (p+1)-Schleife</i>	78
16.7	<i>Der Reaktionsmechanismus eukaryontischer Proteinkinasen</i>	79
16.7.1	Übersicht	79

16.7.2	Der Phosphotransfer von ATP auf das Substrat ist eine nukleophile Substitution	80
16.7.3	Ist Asp156 eine katalytische Base?	80
16.7.4	Dissoziativer oder assoziativer Mechanismus?	81
16.7.5	Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in EPK-katalysierten Reaktionen . . .	82
16.7.6	Der Ladungszustand der ATP-bindenden Schleife ist entscheidend für die katalytische Effizienz von CK2 α	83
17	Die 3D-Strukturen von CK2α stehen im Einklang mit ihrer konstitutiven Aktivität	85
17.1	<i>Strukturelle Plastizität von EPK-Enzymen in der Aktivierungsschleife und in der Helix αC</i>	85
17.2	<i>Grobregrulation durch Umfaltung der Aktivierungsschleife und der Helix αC</i>	85
17.2.1	Die Bindung von Cyclin A erzwingt in CDK2 die aktiven Konformationen der Aktivierungsschleife und der Helix α C	85
17.2.2	In CK2 α fixiert das N-terminale Segment die Aktivierungsschleife und die Helix α C in ihren aktiven Konformationen	86
17.3	<i>Feinregulation durch Anionenbindung in der Aktivierungsschleife</i>	87
17.3.1	RD-Kinasen benötigen eine negative Ladung im Bereich der Aktivierungsschleife	87
17.3.2	Die Aktivierungsschleifen der CDK2 und der MAP-Kinasen ERK2 und p38 γ rasten nach Phosphorylierung in die aktiven Konformationen ein	88
17.3.3	Die Aktivierungsschleifen von GSK3 und CK2 α liegen auch ohne Phosphorylierung in aktiven Konformationen vor	88
17.3.4	Anionenbindung an CK2 α und ihre Bedeutung für die Substratspezifität und die konstitutive Aktivität	91
17.3.5	Anionenbindung an der (p+1)-Schleife: erneutes Zusammenspiel zwischen Substraterkennung und Regulation	93
17.3.6	War CK2 α ursprünglich eine prolindirigierte Proteinkinase?	95
18	Strukturelle Basis der Substratspezifität von CK2	97
19	Strukturelle Basis der dualen Cosubstratspezifität von CK2	100
19.1	<i>Kristallstrukturen binärer Komplexe aus zmCK2α mit Cosubstratanaloga</i>	100
19.2	<i>Die Purinbindungsebene: Freiheit im 2D-Raum</i>	103
19.2.1	Benzamidin und die Rolle von Met163 und Ile/Val66 bei der Cosubstratbindung	103
19.2.2	Komplexstrukturen von zmCK2 α mit ATP-kompetitiven Inhibitoren	104
19.2.3	Rationales Protein-Design: die Mutante hsCK2 α ¹⁻³³⁵ -V66A/M163L	104
20	Strukturelle Details von CK2β	106
20.1	<i>Das zinkbindende Motiv</i>	106
20.2	<i>CK2β ist auch auf Strukturebene ein einzigartiges Protein</i>	107

21	Architektur des CK2-Holoenzym	108
21.1	<i>Die Kristallstruktur von zmCK2α mit einem hsCK2β-Peptid: Identifizierung des Kontaktbereiches der CK2α mit CK2β</i>	108
21.2	<i>Die erste Kristallstruktur eines CK2-Holoenzym</i>	109
21.2.1	Die zentralen Befunde zur Architektur des CK2-Holoenzym werden bestätigt	109
21.2.2	Protein-Protein-Wechselwirkungen und ihre Klassifizierungen	110
21.2.3	Der β/β -Kontakt	112
21.2.4	Der α/β -Kontakt	112
21.2.5	Flexibilität im α/β -Kontaktbereich: die „Gelenkpfanne“ von CK2 α	112
21.2.6	Die α/β -Kontaktfläche ist überraschend klein	114
21.3	<i>Beeinflusst die $\beta4/\beta5$-Schleife das CK2α/CK2β-Assoziationsgleichgewicht?</i>	116
21.4	<i>Wie beeinflusst CK2β die Aktivität von CK2α?</i>	117
21.4.1	Übersicht und Klassifizierung	117
21.4.2	Fernwirkungen	118
21.4.3	Nahwirkungen	118
21.4.4	Unterstützt CK2 β die Interdomänen-Flexibilität?	118
21.4.5	Stabilisierung der ATP-bindenden Schleife „von hinten“	119
21.4.6	Ringstrukturen im Kristall - das Rätsel der sauren Schleife	121
V	Schlußfolgerungen und Ausblick	124
22	Auswirkungen der Kristallstrukturen auf die CK2-Forschung	124
22.1	<i>Erklärungs- und Hypothesepotential von 3D-Strukturen am Beispiel der dualen Cosubstratspezifität von CK2</i>	124
22.2	<i>Das Erklärungs- und Hypothesepotential der CK2-Holoenzymstruktur</i>	125
22.2.1	Promiskuität von CK2 α und CK2 β - ein Leben ohne Holoenzym?	125
22.2.2	Die Struktur des CK2-Holoenzym relativiert dessen Bedeutung	126
22.2.3	CK2 im Überlebenskampf der Zelle - Die Holoenzymstruktur paßt zur Rolle der CK2 bei der Herabregulation der RNA-Polymerase-III unter Zellstreßbedingungen	126
22.2.4	CK2 β als Ankerprotein - Interaktionen ohne Kompetition mit CK2 α	128
22.2.5	CK2 β als Bindungspartner verschiedener Proteinkinasen - CK2 α -kompetitive Interaktionen	128
22.2.6	Die CK2-Holoenzymstruktur bei der Erklärung der CK2-Funktion im Tagesrhythmus	129
22.3	<i>Das Hypothesepotential der CK2α-Strukturen</i>	130
22.3.1	Konstitutiv aktive CK2 α , regulierbares CK2-Holoenzym?	130
22.3.2	CK2-Phosphorylierung: ein Fall von substrat-unterstützter Katalyse?	131
22.4	<i>CK2 und Glycogenstoffwechsel - warum die Verschiebung der ersten Anionenbindungstelle notwendig und sinnvoll war</i>	131
23	CK2 und Globalisierung	132
24	Ein Schlußwort	133
	Literaturliste	134

I Vorspann

1 Formales

1.1 Definitionen und Abkürzungen

Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m} = 0,1 \text{ nm}$)
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPPNP	5'-Adenylylimidodiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CAPK	cAMP-abhängige Proteinkinase
cAMP	cyclo-3',5'-Adenosinmonophosphat
CDK	cyclinabhängige Proteinkinase
CHK1	„Checkpoint“-Kinase 1
CLK	„CDK-like protein kinases“
CK1	Caseinkinase 1
CK2	Caseinkinase 2
CK2 α	katalytische Untereinheit der Proteinkinase CK2
CK2 β	nicht-katalytische (regulatorische) Untereinheit der Proteinkinase CK2
xyCK2 α/β	Die biologische Art, aus der eine CK2-Untereinheit stammt, wird in dieser Schrift durch zwei kursive Kleinbuchstaben angedeutet, die vor die Kürzel CK2 α oder CK2 β gesetzt werden, also z.B. <i>hsCK2α</i> für CK2 α aus <i>Homo sapiens</i> . Komplette Listen dieser Abkürzungen befinden sich in Abb. 5 auf Seite 41 für CK2 α und in Abb. 6 auf Seite 43 für CK2 β .
CMGC-Familie	Untergruppe der eukaryontischen Proteinkinasen, benannt nach den CDKs, den MAP-Kinasen, der GSK3 und CLKs
<i>dmSSL</i>	„suppressor of stellate-like protein“ aus <i>Drosophila melanogaster</i>
eIF	eukaryontischer Initiationsfaktor (der Translation)
EPK	eukaryontische Proteinkinase
ERK	extrazellulär-regulierte Proteinkinase
FACT	„facilitates chromatin transcription“: Proteinkomplex, der die durch RNA-Polymerase katalysierte DNA-Transkription an den Nukleosomen-Partikeln des Chromatins unterstützt
GSK3	Glycogensynthase-Kinase 3 In Säugetieren gibt es zwei Isoformen von GSK3 (GSK3 α und GSK3 β), deren Aminosäuresequenzen zu 90 % identisch sind und von denen bislang nur GSK3 β kristallisiert worden ist. Im Rahmen der Strukturdiskussion (Teil IV) ist daher mit dem Kürzel GSK3 immer die β -Isoform gemeint.
GTP	Guanosintriphosphat
GMPPNP	5'-Guanylylimidodiphosphat
IUBMB	„International Union of Biochemistry and Molecular Biology“
IUPAC	„International Union of Pure and Applied Chemistry“
MAP-Kinasen	mitogen-aktivierte Proteinkinasen

MPF	„M-Phase Promoting Factor“ oder „Mitose Promoting Factor“
NF- κ B	nuklearer Faktor κ B
NLS	nukleare Lokalisationssequenz
p38 γ	mitogen-aktivierte Proteinkinase 12
PDB	Protein Data Bank ¹
RSV	Rous-Sarcoma-Virus
SPF	„S-Phase Promoting Factor“
TFII/TFIII	Transkriptionsfaktoren der RNA-Polymerasen II und III
TBB	4,5,6,7-Tetrabromo-2-benzotriazol

1.2 Zum Begriff „Eukaryontische Proteinkinasen“

Der weitaus größte Teil der bisher charakterisierten Proteinkinasen aus eukaryontischen Organismen - darunter die katalytische Untereinheit der Proteinkinase CK2 - sind phylogenetisch miteinander verwandt (homolog) und bilden eine Protein-Superfamilie. Sie werden in dieser Schrift, beginnend mit dem Titel, als „eukaryontische Proteinkinasen“ (EPK) bezeichnet. Diese Benennung folgt einer gängigen Praxis², ist jedoch strenggenommen falsch. Denn wie genomweite Analyse gezeigt haben, sind EPKs ubiquitär verbreitet, kommen also auch in prokaryontischen Zellen vor. Außerdem gehören keineswegs alle Proteinkinasen aus Eukaryonten in die Superfamilie der EPKs (s.a. Kap. 13.7.4 auf Seite 62). Der Begriff „eukaryontische Proteinkinasen“, der auch in dieser Schrift verwendet wird, ist daher ein Arbeitsname ohne streng wissenschaftlichen Anspruch.

1.3 Rechtschreibung

Angesichts der fortdauernden Diskussion über die sogenannte „neue Rechtschreibung“ und der Unsicherheit darüber, welche der Neuregelungen am Ende der im Jahre 2005 endenden Übergangsfrist wieder zurückgenommen oder modifiziert werden, folgt dieser Text den Regeln der „alten Rechtschreibung“. Laut Beschluß der Kultusministerkonferenz vom 31.11.1995 gelten sie bis zum 31.07.2005 als nicht falsch.

1.4 Graphikprogramme

Zum Zeichnen der im Teil IV wiedergegebenen Strukturabbildungen wurden die folgenden Graphikprogramme benutzt:

- Molscript³ und Raster3D⁴ für Abb. 12, Abb. 14, Abb. 15, Abb. 27
- Bobscrip⁵ und Raster3D⁴ für Abb. 17, Abb. 18, Abb. 23, Abb. 24A/B/C, Abb. 26, Abb. 28, Abb. 30, Abb. 31, Abb. 32A/B
- BRAGI⁶ für Abb. 21, Abb. 22, Abb. 25, Abb. 32C, Abb. 33, Abb. 34

Chemische Formeln und Reaktionsgleichungen (Abb. 2, Abb. 3, Abb. 19, Abb. 20) wurden mit ChemWindow (Version 2.01) von SoftShell International Ltd. gezeichnet.

2 Liste der für diese Schrift relevanten eigenen Arbeiten

- 1) Guerra, B., Niefind, K., Pinna, L. A., Schomburg, D. & Issinger, O.-G. (1998). Expression, purification and crystallization of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays*. *Acta Cryst.* **D54**, 143-145
- 2) Niefind, K., Guerra, B., Pinna, L. A., Issinger, O.-G. & Schomburg, D. (1998). Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays* at 2.1 Å resolution. *EMBO J.* **17**, 2451-2462
- 3) Niefind, K., Pütter, M., Guerra, B., Issinger, O.-G. & Schomburg, D. (1999). GTP plus water mimics ATP in the active site of protein kinase CK2. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 1100-1103
- 4) Chaillot, D., Declerck, N., Niefind, K., Schomburg, D., Chardot, T. & Meunier, J. C. (2000). Mutation of recombinant catalytic subunit of the protein kinase CK2 that affects catalytic efficiency and specificity. *Protein Eng.* **13**, 291-298
- 5) Niefind, K., Guerra, B., Ermakova, I. & Issinger, O.-G. (2000). Crystallization and preliminary characterization of crystals of human protein kinase CK2. *Acta Cryst.* **D56**, 1680-1684
- 6) Niefind, K., Guerra, B., Ermakova, I. & Issinger, O.-G. (2001). Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J.* **20**, 5320-5331
- 7) Guerra, B., Niefind, K., Ermakova, I. & Issinger, O.-G. (2001). Characterization of CK2 holoenzyme variants with regard to crystallization. *Mol. Cell. Biochem.* **227**, 3-11
- 8) Ermakova, I., Boldyreff, B., Issinger, O.-G. & Niefind, K. (2003). Crystal structure of a C-terminal deletion mutant of human protein kinase CK2 catalytic subunit. *J. Mol. Biol.* **330**, 925-934

Diese Schrift wurde so verfaßt, daß sie aus sich selbst heraus verständlich ist. Sie bietet einen Gesamtüberblick über die Strukturbiologie der Proteinkinase CK2, in den auch neuere und noch unveröffentlichte sowie fremde Arbeiten einbezogen worden sind. Die obengenannten Publikationen wurden zur Orientierung in der angegebenen Reihenfolge als Anhang beigefügt.

3 Zusammenfassung

Die vorliegende Schrift faßt die strukturellen Erkenntnisse über die Proteinkinase CK2 (früher „Caseinkinase 2“ genannt) zusammen, die zu einem Großteil in den vergangenen Jahren am Institut für Biochemie der Universität zu Köln erarbeitet worden sind. Die CK2 ist eine Protein-Serin/Threonin-Kinase aus der Superfamilie der eukaryontischen Proteinkinasen mit ausgeprägter Vorliebe für saure Substratproteine (Acidophilie). Sie besitzt eine heterotetramere Quartärstruktur und besteht aus zwei katalytischen α -Untereinheiten (CK2 α) und zwei nicht-katalytischen β -Untereinheiten (CK2 β). Dieser $\alpha_2\beta_2$ -Komplex wird auch als „CK2-Holoenzym“ bezeichnet.

Das Enzym wurde vor 50 Jahren als erste Proteinkinase der Biochemiegeschichte entdeckt. In den darauffolgenden Jahrzehnten hat es eine Fülle verschiedener Benennungen erfahren, in denen sich jeweils aktuelle Entwicklungen der CK2- und der allgemeinen Proteinkinaseforschung widerspiegeln. Das Jubiläum der CK2-Entdeckung wird daher zum Anlaß genommen, einleitend die biochemischen Eigenschaften des Enzyms im Rahmen eines Streifzuges durch fünf Jahrzehnte Namens- und Forschungsgeschichte vorzustellen.

Der Hauptteil dieser Schrift ist dann der Strukturbiochemie der CK2 gewidmet, genauer gesagt dem Versuch, einige ihrer markantesten Eigenschaften auf der Grundlage von 3D-Strukturen zu verstehen. In erster Linie ist hier die konstitutive Aktivität des Enzyms zu nennen, das für eine Proteinkinase ungewöhnliche Fehlen inaktiver Zustände und der von anderen Proteinkinasen bekannten Regulationsprinzipien. Konnte man vor den Strukturaufklärungen noch vermuten, daß hier neuartige Mechanismen eine Rolle spielen, die lediglich noch nicht entdeckt worden sind, so sprechen die 3D-Strukturen von CK2 α in isolierter Form und innerhalb des Holoenzymkomplexes eine andere Sprache: Die konstitutive Aktivität scheint eine ureigene, phylogenetisch optimierte Eigenschaft des Enzyms zu sein, die für seine physiologische Funktion unerlässlich ist. Das wichtigste Indiz dafür ist ein intensiver und unter den Strukturen eukaryontischer Proteinkinasen bisher einzigartiger Kontakt zwischen dem N-terminalen Segment einerseits und der sogenannten Aktivierungsschleife und der Helix α C andererseits.

Jene Schlußfolgerung hinsichtlich der Evolution drängt sich jedoch insbesondere auf, wenn man - wie es in dieser Schrift erstmals umfassend geschieht - CK2 α strukturell mit seinen nächsten Sequenzverwandten aus der sogenannten CMGC-Familie der eukaryontischen Proteinkinasen vergleicht, mit den cyclinabhängigen Kinasen, mit den mitogenaktivierten Kinasen und mit der Glycogensynthase-Kinase 3. Diese funktionell bedeutenden Proteinkinasen werden allesamt streng reguliert, und sie sind obendrein prolindirigiert, d.h. in ihren bevorzugten Substraten folgt unmittelbar auf das zu phosphorylierende Serin oder Threonin die Aminosäure Prolin. Die an jenen CMGC-Kinasen erkennbaren molekularen Details der Aktivitätskontrolle und der Prolinspezifität sind zwar auch in CK2 α noch rudimentär angelegt, jedoch sind sie im Sinne konstitutiver Aktivität und Acidophilie modifiziert. Somit liefert der Vergleich gleichzeitig ein strukturbasiertes Verständnis der Substratspezifität von CK2 und CK2 α .

Eine weitere ungewöhnliche Eigenschaft der CK2 ist ihre duale Cosubstratspezifität, d.h. ihre Fähigkeit, außer ATP auch GTP als Phosphogruppendonor zu verwenden. Die strukturelle Basis dieses Vermögens konnte durch Strukturaufklärungen binärer Komplexe von CK2 α mit ATP- und GTP-Analoga geklärt werden. Ausgehend von diesem Ergebnis wurde eine CK2 α -Mutante hergestellt, deren Cosubstratspezifität deutlich in Richtung ausschließlicher ATP-Nutzung verschoben war. Die Strukturanalyse dieser Mutante im Komplex mit einem ATP-Analogen zeigte, daß sich die Bindung des Nukleotids in

der vorhergesagten Weise verändert hatte. Die deutlichen strukturellen Anpassungen des Enzyms zugunsten einer GTP-Nutzung legen die Vermutung nahe, daß diese Eigenschaft in der Evolution nicht zufällig, sondern als Ergebnis eines entsprechenden Selektionsvorteils entstanden ist. Worin dieser besteht, ist gegenwärtig allerdings noch unbekannt.

Im Gegensatz zu CK2 α ist CK2 β ein Protein, von dem fast keine Sequenzverwandten bekannt sind. Diese Einzigartigkeit hat sich auch auf struktureller Ebene bestätigt: Während die Grundfaltung von CK2 α mit einer N-terminalen β -Faltblatt-Domäne und einer C-terminalen α -helikalen Domäne bei allen eukaryontischen Proteinkinasen zu finden ist, besitzt die CK2 β -Struktur keinerlei Ähnlichkeit zu den heute bekannten Proteinstrukturen. Die Strukturaufklärung von CK2 β als isoliertes Protein und gebunden an CK2 α hat obendrein eine hochkonservierte Zinkbindungsstelle offenbart, die zuvor aufgrund von Sequenzmusteranalysen vorhergesagt worden war und deren Aufgabe darin besteht, eine stabile Dimerisierungsdomäne zu formen.

Schließlich konnte durch Kristallstrukturanalyse Klarheit über die lange Zeit strittige Architektur des CK2-Holoenzym erzielt werden. Es bestätigte sich, daß der Kern dieses Komplexes durch ein CK2 β -Dimer gebildet wird, an das zwei CK2 α -Ketten angelagert sind, ohne miteinander Kontakt zu haben. Im Einklang mit der konstitutiven Aktivität bleibt die Struktur von CK2 α durch Komplexbildung mit CK2 β weitgehend erhalten. Die einzigen leichten Veränderungen in funktionellen Schlüsselbereichen sind an der ATP-bindenden Schleife zu beobachten, die „von hinten“ durch CK2 β stabilisiert wird. Auf diesem Kontakt beruht möglicherweise die stimulierende Wirkung, die CK2 β bei vielen Substraten auf CK2 α ausübt.

Die überraschendsten Ergebnisse der Holoenzym-Strukturanalyse waren die geringe Größe der CK2 α /CK2 β -Kontaktfläche, wie sie normalerweise für nicht-permanente Proteinkomplexe typisch ist, und die Lokalisation dieser Kontaktzone an einem strukturell hochkonservierten Teil von CK2 α , nämlich auf der äußeren Oberfläche des zentralen β -Faltblattes der N-terminalen Domäne. Nachdem das CK2-Holoenzym bis Mitte der 90er Jahre als äußerst stabiler und permanenter Komplex galt und CK2 α und CK2 β nur im Zusammenhang mit diesem Holoenzym bekannt waren, passen diese Befunde zu verschiedenen, seither aufgetauchten Indizien, wonach die Untereinheiten sehr wohl unabhängig vom Holoenzym existieren und eigene Funktionen erfüllen können und wonach insbesondere CK2 β auch an andere Proteinkinasen binden kann.

Im Schlußteil dieser Schrift wird das Erklärungspotential der CK2-Kristallstrukturen noch einmal zusammengefaßt. Während diese mit einer chemisch-analytischen Technik gewonnenen Erkenntnisse für ein Verständnis der chemisch-molekularen Eigenschaften des Enzyms offenkundig unerlässlich sind, wird insbesondere der Frage nachgegangen, welche Bedeutung sie für die spezifisch biologischen Aspekte der CK2-Forschung wie etwa das Problem der physiologischen Funktion(en) des Enzyms haben. Obgleich Kristallstrukturen diesbezüglich ihrem Wesen nach von begrenzter Aussagekraft sind, sind sie dennoch nicht irrelevant, weil sie neben ihrem Erklärungs- auch ein ebenso wichtiges Hypothese-potential besitzen. Hierfür bietet die Strukturbilogie der CK2 Musterbeispiele.

II Vorgeschichte(n) und Entdeckung(en)

4 Phosphor: mit Minimalchemie zu einem Schlüsselement der Biochemie

Das Element Phosphor wurde 1669 in Hamburg vom Alchemisten Henning Brand beim Eindampfen von Urin und Glühen des Rückstandes entdeckt (Abb. 1), und zwar anhand seiner charakteristischsten chemischen Eigenschaft, seiner Reaktivität gegenüber Sauerstoff. Bei dem Experiment entstand zunächst elementarer weißer Phosphor, der danach unter Ausstrahlung hellweißen Lichtes verbrannte.



Abb. 1: Die Entdeckung des Phosphors im Jahre 1669 durch den Hamburger Alchemisten Henning Brand (1630-1710) in einer Darstellung Joseph Wrights of Derby (1734-97) aus dem Jahre 1771. Der genaue Titel des Bildes lautet: „*Der Alchemist beim Suchen nach dem Stein der Philosophen entdeckt den Phosphor und betet für ein erfolgreiches Ende seiner Operation, wie es Sitte war bei den alten Astrologen.*“

Diese Affinität des Phosphors zu Sauerstoff ist so groß, daß er in der Biosphäre - und zwar auch im reduzierenden Milieu innerhalb lebender Zellen - überwiegend (aber keineswegs ausschließlich^{7,8}!) voll oxidiert und in chemischer Bindung an Sauerstoffatome auftritt (Abb. 2), d.h. als Phosphation oder als Phosphogruppe (entgegen den IUPAC-IUBMB-Regeln⁹ oft als Phosphorylgruppe bezeichnet). Aus der reichhaltigen Chemie des Phosphors kommt somit in der Biochemie nur ein kleiner Ausschnitt zur Geltung.

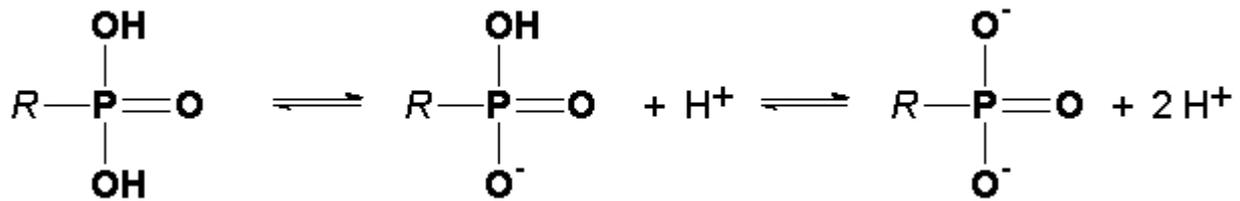


Abb. 2: Die Phosphogruppe im ungeladenen sowie im einfach und im doppelt geladenen Zustand. Der chemisch korrekte Name lautet „Phosphono“ und ist von der Phosphonsäure H_3PO_3 abgeleitet. In Biomolekülen erfolgt die Bindung an den Molekülrest R meistens über ein Sauerstoffatom („*O*-Phosphono“), mitunter über ein Stickstoffatom („*N*-Phosphono“) und in seltenen Fällen über ein Schwefel- („*S*-Phosphono“) oder ein Kohlenstoffatom. Nach den Nomenklaturregeln der IUPAC und der IUBMB⁹ kann die Gruppenbezeichnung „*O*-Phosphono“ zu „Phospho“ verkürzt werden; üblich ist jedoch die generelle Gleichsetzung von „Phospho“ und „Phosphono“. Noch häufiger findet man in der biochemischen Literatur die Benennung „Phosphoryl“, die gemäß IUPAC und IUBMB⁹ jedoch eigentlich vermieden werden sollte.

Trotz dieser „Minimalchemie“ ist der Phosphor in seiner Sauerstoffverpackung ein Schlüsselement der Biochemie. Schon die skizzierte Entdeckungsgeschichte deutet an, daß der Phosphor in der Biosphäre nicht selten ist. Bei phosphorhaltigen Biomolekülen denkt man zunächst an Nucleinsäuren, Nucleotide, Zuckerphosphate und Phospholipide oder an anorganische Phosphate in Knochen oder Zähnen, nicht aber an die Proteine, denn deren 21 Grundbausteine, die proteinogenen Aminosäuren^a, sind frei von Phosphor. Trotzdem ist mittlerweile klar, daß Phosphor auch in Proteinen kein seltenes Element ist, denn schätzungsweise ein Drittel aller Proteine sind phosphoryliert¹⁰, d.h. sie haben nach ihrer Biosynthese eine, meistens jedoch mehrere Phosphogruppen übertragen bekommen.

In allen phosphorylierten Biomolekülen ist die Phosphogruppe durch eine energiereiche Anhydrid- oder eine Esterbindung mit dem Rest des Moleküls verknüpft. Die Ausbildung solcher Bindungen erfordert demnach Energie, die in manchen Fällen durch ein Membranpotential oder durch eine Oxidation aufgebracht wird, die jedoch meistens dadurch bereitgestellt wird, daß die Phosphogruppe von einer noch energiereicheren Substanz transferiert wird. Derartige Gruppenübertragungen bezeichnet man als Phosphorylierungen. Sie werden durch Phosphotransferasen enzymatisch katalysiert, die auch als *Kinasen* bezeichnet werden.

Derzeit sind etwa 17000 verschiedene Kinasen bekannt¹¹. Knapp 10000 davon sind *Proteinkinasen*, die Phosphogruppen von Adenosintriphosphat (ATP) oder in Einzelfällen einem anderen Nucleosidtriphosphat auf die nukleophilen Zentren bestimmter proteingebundener Aminosäureseitenketten (in erster Linie Serin, Threonin, Tyrosin und Histidin) übertragen. Diese Phosphorylierungen können durch Hydrolyse - meistens unter der katalytischen Wirkung von *Phosphoprotein-Phosphatasen* - rückgängig gemacht (Abb. 3) und unterliegen im allgemeinen einem hohen Durchsatz.

^aunter Einschluss des Selenocysteins

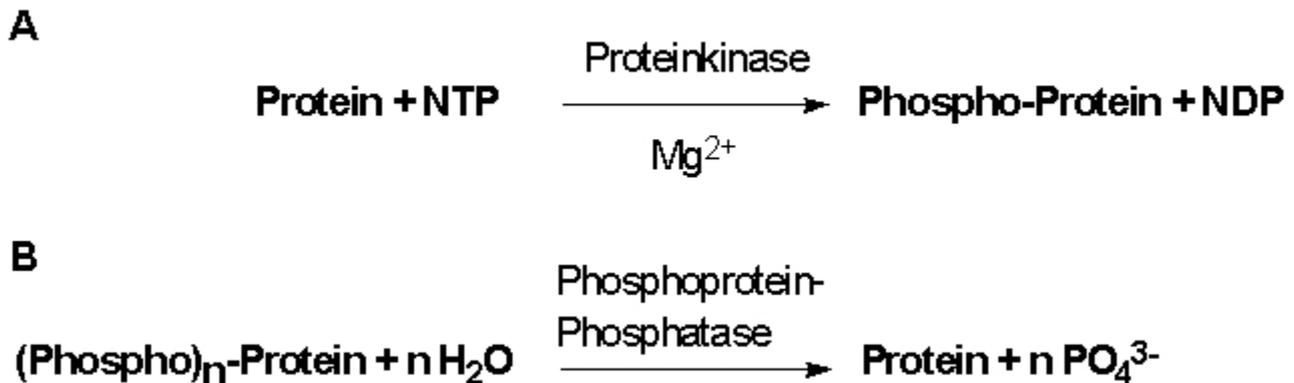


Abb. 3: Prinzipielle Reaktionsgleichungen für die katalytische Wirkung einer Proteinkinase (**A**) und einer Phosphoprotein-Phosphatase (**B**). „NTP“ steht für Nukleotid-Triphosphat, also in der Regel ATP. Bei der Kinasereaktion ist die Anwesenheit von Mg^{2+} (oder Mn^{2+}) nötig. In (B) ist angedeutet, daß viele Phosphoproteine mehrfach phosphoryliert sind.

Ca. 2 % aller Gene in Eukaryonten enthalten Abschnitte für Proteinkinasen¹². Obendrein machen die Phosphoprotein-Phosphatasen etwa 1 % der informativen Abschnitte des Genoms aus. Allein diese Zahlen belegen, daß die Phosphorylierung von Proteinen zumindest für eukaryontische, möglicherweise aber auch für prokaryontische Zellen¹³ eine überragende Bedeutung besitzt.

5 Casein war das erste bekannte Phosphoprotein

Die ersten bekannten „Phosphoproteine“ waren Nahrungseiweiße mit auffällig hohem Phosphoranteil wie das Casein aus Milch oder die Vitellinsäure aus Eigelb, die später „Phosvitin“ genannt wurde¹⁴. Sie waren auch ohne chromatographische Verfahren leicht zu präparieren. Casein zum Beispiel wurde nach Hammarsten¹⁵ durch wiederholte Fällung mit Essigsäure gewonnen.

Doch nicht nur aus methodischen, sondern auch aus inhaltlichen Gründen waren Phosphoproteine beliebte Forschungsobjekte der frühen Biochemie. So gab es verschiedene Indizien, die auf wichtige physiologische Funktionen dieser Substanzen hindeuteten. Phosphoproteine wurden nämlich nicht nur in Nahrungseiweißen gefunden, sondern darüber hinaus in fast allen tierischen Organen¹⁶ und besonders reichlich in embryonalem und schnell wachsendem Gewebe¹⁷. So berichteten Kennedy & Smith¹⁸ 1954, daß bestimmte Tumorzellen nicht nur über einen hohen Gehalt an proteingebundenem Phosphat verfügen, sondern daß dieses Phosphat obendrein ziemlich rasch umgesetzt wird. Diese Beobachtung ließ auf eine hohe Aktivität entsprechender Enzyme schließen und führte in der Tat zur Entdeckung der ersten Proteinkinase. Die sich schon damals andeutende Nähe zur Krebsmedizin ist bis in unsere Tage eine entscheidende Triebkraft der Proteinkinaseforschung geblieben.

Auch über die Chemie der Proteinphosphorylierung war schon vieles bekannt, bevor man etwas

über Proteinkinasen wußte. Als erste proteingebundene^a Phosphoaminosäure wurde 1932 das Phosphoserin¹⁹ aus Vitellinsäure (Phosvitin) isoliert, gefolgt 1952 vom Phosphothreonin aus Casein²⁰. Diese beiden „O-Phosphate“²¹ sind bei der sauren Hydrolyse, wie sie zum Proteinaufschluß benutzt wurde, stabil. Im Gegensatz dazu neigen andere phosphorylierte Aminosäuren wie die „N-Phosphate“²¹ Phosphoarginin, Phosphohistidin und Phospholysin und die „Acyl-Phosphate“²¹ Phosphoaspartat und Phosphoglutamat zumindest in saurem Milieu zur Hydrolyse, d.h. zum Verlust der Phosphogruppe^b. Dieser Stabilitätsvorteil ist einer der Gründe dafür, daß die Proteinkinaseforschung von vornherein auf die serin- und threonin- und später auch auf die tyrosinspezifischen Proteinkinasen ausgerichtet war.

Daß die Phosphoproteinforschung in den frühen 50er Jahren an einem kritischen Punkt angelangt war, wird in einem Übersichtsartikel von Perlmann aus dem Jahre 1955 deutlich¹⁷: Die Autorin stellt dort fest, daß trotz umfassender chemischer Kenntnisse über Phosphoproteine deren biologische Funktion noch immer unbekannt sei, daß es aber zunehmend mehr neuere Ergebnisse gebe, nach denen die Phosphoproteine in einer Vielzahl metabolischer Prozesse von Bedeutung seien. Mit anderen Worten: Das Gebiet war reif für den wissenschaftlichen Durchbruch.

6 Mit den Caseinkinasen begann 1954 die Proteinkinaseforschung

Angesichts der markanten Phosphoakzeptor-neigung des Caseins ist es nicht verwunderlich, daß dieses Protein als Substrat eingesetzt wurde, um nach enzymatischer Aktivität zur Protein-Phosphorylierung zu suchen. Fündig wurde man erstmals 1954²². Hinter der damals beschriebenen Caseinkinase - d.h. Proteinkinase-Aktivität mit deutlicher Spezifität zugunsten von Casein - verbargen sich nach heutiger Benennung höchstwahrscheinlich die Proteinkinasen CK1 und CK2.

Das sich daraus entwickelnde Forschungsgebiet erhielt seine eigentliche Initialzündung jedoch aus dem Glycogenstoffwechsel, dessen regulatorisches Schlüsselenzym, die Glycogen-Phosphorylase-b-Kinase, 1955 entdeckt wurde²³. Auch in den folgenden Jahrzehnten gab es immer wieder einzelne Proteinkinasen, die einen Großteil der Aufmerksamkeit in der wissenschaftlichen Öffentlichkeit auf sich lenkten, zu denen jedoch die CK2 nie gehörte. Typische „Mainstream“-Proteinkinasen oder -Proteinkinasegruppen waren stattdessen die cAMP-abhängige Proteinkinase (CAPK)²⁴, die cyclin-abhängigen Proteinkinasen, die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) und die Rezeptor-Tyrosinkinasen.

Das Forschungsgebiet, das sich um diese Proteinkinasen herum entwickelt hat, ist heute nahezu unüberschaubar geworden. In dieser Schrift wird es nur so weit beleuchtet, wie es für die Biochemie und die Strukturbiologie der CK2 sinnvoll ist.

^aIsoliertes, d.h. nicht-proteingebundenes Phosphoarginin war schon 1928 entdeckt worden.

^bDas „S-Phosphat“ Phosphocystein ist zwar sowohl unter sauren als auch unter alkalischen Bedingungen stabil²¹, kommt jedoch so selten vor, daß es bisher in der Phosphoproteinforschung nahezu keine Rolle gespielt hat.

7 Mit der DNA-Doppelhelix begann 1953 die Molekular-, aber auch die Strukturbiologie Ebenfalls vor etwa 50 Jahren publizierten Watson & Crick²⁵ ihr 3D-Strukturmodell der DNA-Doppelhelix. Dieses Ereignis gilt im allgemeinen als Geburtsstunde der Molekularbiologie (molekulare Genetik), in gleicher Weise jedoch markiert es den Anfangspunkt jener Teildisziplin der Biochemie, die wir heute als Strukturbiologie bezeichnen. Ziel und Anspruch der Strukturbiologie ist es, biologische Phänomene auf der Grundlage dreidimensionaler Strukturen der beteiligten Biomoleküle zu verstehen. Hierfür ist das 3D-Strukturmodell der DNA, durch das die strukturelle Basis der Vererbung erklärt wurde, das erste Beispiel in der Wissenschaftsgeschichte.

In der Folgezeit war es vor allem die röntgenkristallographische Strukturaufklärung von Proteinen und die Aufdeckung der strukturellen Grundlagen ihres Wirkens, durch die sich die Strukturbiologie etablierte. 3D-Strukturen von Biomolekülen, insbesondere von Proteinen gehören heute zum selbstverständlichen Repertoire biochemischen Arbeitens.

Das gilt mittlerweile auch für die Proteinkinaseforschung, obwohl deren Berührung mit der Strukturbiologie relativ spät erfolgte. So wurde die erste Röntgenstruktur einer Proteinkinase erst 1991 veröffentlicht²⁶, zu einer Zeit also, als das Forschungsgebiet in molekulargenetischer und zellbiologischer Hinsicht immerhin schon so weit entwickelt war, daß im Folgejahr ein erster Nobelpreis dafür vergeben wurde.

Im Falle der Proteinkinase CK2 begann das „Strukturzeitalter“ noch später, nämlich 1998 mit der Kristallstruktur der katalytischen Untereinheit der CK2 aus *Zea mays*²⁷. Im Teil IV dieser Schrift werden die strukturbiologischen Beiträge zur CK2 aus den Folgejahren resümiert, und es wird in dem Zusammenhang erläutert, welchen Beitrag sie zum Verständnis der CK2 geleistet haben. Im abschließenden Teil V wird dann dargelegt, welche weitergehenden Fragen diese Strukturen aufgeworfen haben und welche Rückwirkungen sie bisher auf die allgemeine CK2-Forschung hatten.

III Biochemie der CK2 im Spiegel ihrer Namens- und Forschungsgeschichte bis zu den ersten Kristallstrukturen

8 Von „Protein-Phosphokinase“ zu „Proteinkinase CK2“ - die Forschungsgeschichte der CK2 ist eine Folge von Umbenennungen

Obwohl stets am Rande des Hauptstroms der Proteinkinaseforschung, zeichnete sich die CK2-Forschung gleichwohl durch Kontinuität aus, ablesbar am wissenschaftlichen Schrifttum seit 1954. Im Zuge dieser fast fünfzigjährigen Forschungsgeschichte hat die CK2 eine Fülle von Benennungen erfahren (Abb. 4, Tab. 1), mehr vermutlich als jede andere Proteinkinase.

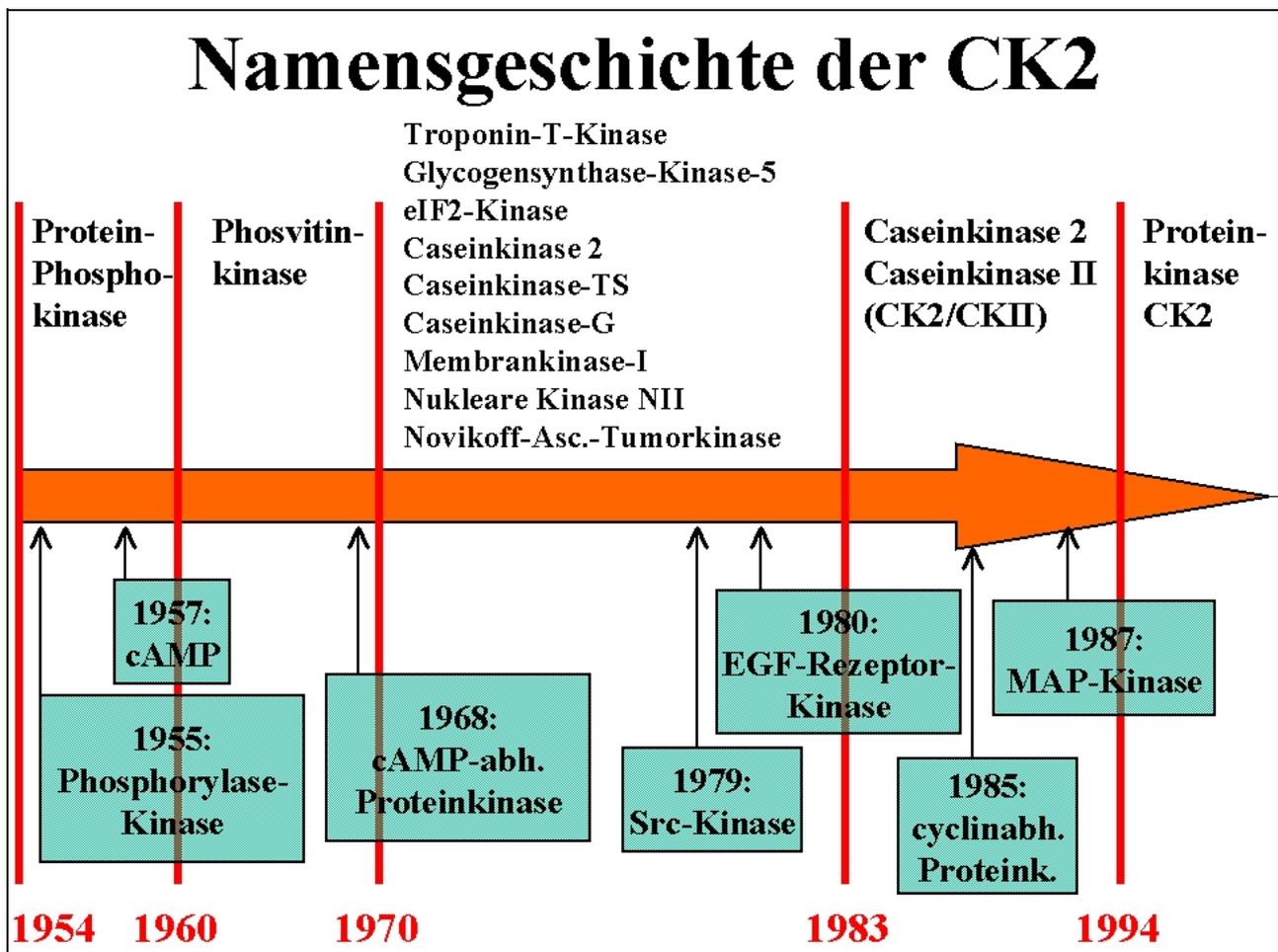


Abb. 4: Zeitpfeil zur CK2-Namensgeschichte. Über dem Pfeil sind jeweils gängige Bezeichnungen für die CK2 angegeben, unter dem Pfeil zur Orientierung die Entdeckungsjahre von cAMP und verschiedenen wichtigen eukaryontischen Proteinkinasen.

In diesem Zusammenhang muß allerdings beachtet werden, daß sich kollektive Gewohnheiten der Namensgebung nie schlagartig ändern, weshalb die in Tab. 1 angegebenen Zeiträume nur als Anhaltspunkte dienen. So gibt es viele Überschneidungen im Gebrauch der genannten Bezeichnungen. Dies ist bei einem mutmaßlich multifunktionellen Enzym wie der CK2 mit einer Vielzahl beschriebener Proteinsubstrate allerdings auch nicht verwunderlich. Selbst ein Versuch der international renommiertesten CK2-Forscher aus dem Jahre 1994²⁸, die Bezeichnung „Proteinkinase CK2“ als verbindlich durchzusetzen, war nur teilweise erfolgreich.

Tab. 1: Wissenschaftliche Bezeichnungen für Proteinkinase CK2 mit Literaturbeispielen

Zeitraum	Benennung	Literaturbeispiele
1954-1960	Protein-Phosphokinase	22,29
überwiegend 1960er Jahre	Phosvitin-Kinase	30
1970-1975	Phosphoprotein-Kinase	31
1972-1977	Nukleare Proteinkinase NII	32
1977	Membrankinase I	33
1977	Novifoff ascites tumor protein kinase II	34
1981	eIF-2 β -Kinase	35
1982-1984	Glycogen-Synthasekinase 5	36,37
1979-1981	Troponin-T-Kinase	38,39,40
1978-1983	Caseinkinase TS	41
Anfang der 1980er Jahre	Caseinkinase G, Caseinkinase (G-Typ)	42
seit 1975	Caseinkinase 2 (CK2), Caseinkinase II (CKII)	43,44
seit 1994	Proteinkinase CK2	28

Tab. 2: Übersichtsartikel zur Proteinkinase CK2

Autoren/Erscheinungsjahr/Ref.	inhaltliche Schwerpunkte
Filhol <i>et al.</i> (2004) ⁴⁵	Dynamik der CK2 α -CK2 β -Wechselwirkung
Meggio & Pinna (2003) ⁴⁶	Pleiotropie, Substratspezifität, Liste aller CK2-Substrate
Litchfield (2003) ⁴⁷	Struktur, Regulation und Funktion von CK2
Pinna (2003) ⁴⁸	Bedeutung konstitutiv aktiver Kinasen am Beispiel der CK2
Pinna (2002) ⁴⁹	CK2 als Ausnahmeerscheinung unter den EPKs
Ahmed <i>et al.</i> (2002) ⁵⁰	CK2 bei Streßabwehr und zellulären Überlebensstrategien
Riera <i>et al.</i> (2001) ⁵¹	Besonderheiten von CK2 in Pflanzen
Blanquet (2000) ⁵²	Rolle der CK2 im Nervensystem
Faust & Montenarh (2000) ⁵³	subzelluläre Lokalisation von CK2
Guerra & Issinger (1999) ⁵⁴	biomedizinische und pathologische Aspekte der CK2
Glover (1998) ⁵⁵	CK2 aus Bäckerhefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
Allende & Allende (1998) ⁵⁶	Architektur d. CK2-Holoenzym; Promiskuität d. Untereinheit.
Pinna & Meggio (1997) ⁵⁷	Gesamtübersicht; CK2 und Zellteilung; Liste aller Substrate
Allende & Allende (1995) ⁵⁸	Gesamtübersicht; Pleiotropie; Rätsel der Regulation von CK2
Pinna (1994) ⁵⁹	Forschungsgeschichte der CK2
Issinger (1993) ⁶⁰	molekulargenetische und zellbiologische Grundlagen von CK2
Tuazon & Traugh (1991) ⁴⁴	vergleichende Gesamtübersicht über CK1 und CK2
Pinna (1990) ⁴³	Gesamtübersicht; Substratspez.; verdeckte Funktionen von CK2
Hathaway & Traugh (1982) ⁶¹	vergleichende Gesamtübersicht über CK1 und CK2

Gleichwohl spiegeln sich in den für die CK2 benutzten Namen und in den Motiven für die Umbenennungen sowohl wesentliche biochemische Eigenschaften des Enzyms als auch allgemeine Tendenzen der Proteinkinaseforschung wider. Die Namensgeschichte der CK2 ist daher ein wertvoller Leitfaden, um die Biochemie des Enzyms vorzustellen und um ein paar CK2-relevante Streiflichter auf die Entwicklungsgeschichte des Gesamtgebietes zu werfen.

Dies soll in den folgenden Kapiteln geschehen. Der Schwerpunkt wird dabei auf diejenigen biochemischen Charakteristika des Enzyms gelegt, die strukturellbiologisch wesentlich sind und im Hauptteil dieser Arbeit noch einmal zur Sprache kommen. Daher ist der forschungsgeschichtliche Überblick, der sich nun anschließt, weder in historischer noch in biochemisch-zellbiologischer Hinsicht vollständig. Seine Aufgabe ist vielmehr didaktischer Natur: Der Leser soll die CK2 kennen lernen, indem er das Wachsen der wissenschaftlichen Erkenntnis über dieses Enzym nachvollzieht. Hinsichtlich der aktuellen zellbiologischen Literatur und weitergehender Einzelheiten rund um die CK2 sei auf eine Reihe teilweise exzellenter Übersichtsartikel verwiesen (Tab. 2).

9 „Protein-Phosphokinase“: die CK2 der 50er Jahre

9.1 *Trotz Präferenz für Casein als Substrat blieb die physiologische Funktion der CK2 unbekannt*

Als 1954 Burnett & Kennedy²² als erste über „die enzymatische Phosphorylierung von Proteinen“, also über eine Proteinkinase-Aktivität berichteten, nannten sie das entsprechende Enzym „Protein-Phosphokinase“. Es stammte aus Leber-Mitochondrien, besaß eine deutliche Substratspezifität zugunsten von Casein und katalysierte die Phosphorylierung bestimmter Serin-Seitenketten innerhalb des Caseins. Heute wird vermutet⁵⁹, daß sich hinter der „Protein-Phosphokinase“ zwei Enzyme, nämlich die Proteinkinasen CK1 und CK2 verbargen.

„*The physiological significance of this new type of enzymatic action still remains to be discovered*“, stellten Burnett & Kennedy in ihrer Pionierarbeit²² fest. Trotz der Spezifität ihrer „Protein-Phosphokinase“ zugunsten von Casein war klar, daß Casein kein *in-vivo*-Substrat eines Enzyms aus Leber-Mitochondrien sein kann und daß umgekehrt die natürliche Phosphorylierung des Caseins in Milchdrüsen vermutlich anderweitig katalysiert wird. Heute wissen wir, daß dafür eine spezifische und nur in Milchdrüsengewebe produzierte Caseinkinase zuständig ist^{62,63}.

Die Unklarheit über die physiologische Bedeutung der „Protein-Phosphokinase“ hat gewiß dazu geführt, daß die CK2 innerhalb der beginnenden Proteinkinaseforschung wenig beachtet wurde. Sie mag darüber hinaus der Grund dafür gewesen sein, daß Burnett und Kennedy ihre Arbeiten zur Proteinphosphorylierung nicht weiter führten, obwohl ihnen sehr wohl klar war, daß „*the great biological reactivity of the phosphoproteins of a wide variety of tissues, particularly tumors, ... appears to point to some role of importance.*“²²

Er habe damit „eine Perle weggeworfen“, stellte Eugene Kennedy später bedauernd fest⁶⁴. In der Tat werden daher die Ursprünge der Proteinkinaseforschung heute in erster Linie mit den Namen Edmond Fischer und Edwin Krebs, den Medizin-Nobelpreisträgern des Jahres 1992, verbunden. Sie waren die Entdecker der Glycogen-Phosphorylase-b-Kinase oder auch „Phosphorylase-Kinase“²³, wie das Enzym noch heute verkürzt genannt wird.

9.2 Regulation durch Phosphorylierung: An Phosphorylase-Kinase wurde erstmals die biologische Bedeutung der Proteinphosphorylierung erkannt

Während die physiologische Bedeutung der „Protein-Phosphokinase“ unklar blieb, war es bei der zweiten Proteinkinase der Wissenschaftsgeschichte⁶⁵, der Glycogenphosphorylase-Kinase, genau umgekehrt: Bei ihr war der biologische Hintergrund längst etabliert, als das chemische Prinzip noch im Dunkeln lag.

Durch Arbeiten des Ehepaars Carl und Gerty Cori war schon Ende der 30er Jahre bekannt, daß das entscheidende Enzym des Glycogenabbaus, die Glycogenphosphorylase in zwei Formen vorliegen kann, einer inaktiven B-Form und einer aktiven A-Form. Genauer gesagt, kann Phosphorylase-b durch AMP aktiviert werden, während die Aktivität der Phosphorylase-a AMP-unabhängig ist. Eine der entscheidenden Entdeckungen der Coris war, daß beide Formen der Phosphorylase *in vivo* ineinander umgewandelt werden können und daß diese Interkonversion regulatorisch wichtig ist. Dies war die erste Aufdeckung eines metabolischen Regulationsprinzips überhaupt und führte im Jahre 1947 zur Verleihung eines Nobelpreises an das Ehepaar Cori.

Das Ideengebäude der Coris hatte allerdings eine Lücke: Die chemische Natur der Umwandlung der beiden Phosphorylase-Formen blieb ihnen unbekannt, obwohl sie 1943 ein Enzym entdeckt hatten, das *in vitro* die Konversion von Phosphorylase-a in Phosphorylase-b katalysiert. Sie nannten es „prosthetic-group-removing enzyme“ (PR-Enzym) in der fälschlichen Annahme, es bewirke die Freisetzung von AMP⁶⁶. Diese Hypothese konnte jedoch nie bewiesen werden und wurde daher abgelöst von der Idee, das PR-Enzym sei eine Protease, ein - um die Abkürzung beibehalten zu können - „peptide-removing enzyme“ oder ein „phosphorylase-rupturing enzyme“. Dem lag die Beobachtung zugrunde, daß Phosphorylase-a durch Trypsinbehandlung in eine phosphorylase-b-ähnliche Form umgewandelt werden kann. Erst die Arbeiten von Krebs und Fischer machten klar, daß das PR-Enzym ein „phosphate-removing enzyme“ ist, nämlich nach heutiger Benennung die Protein-Phosphatase 1 (PP1)⁶⁷.

Krebs' und Fischers Interesse galt indessen zunächst dem umgekehrten Vorgang, der Umwandlung von Phosphorylase-b zu Phosphorylase-a. Sie konnten zeigen, daß dieser Prozeß ATP, Ca²⁺-Ionen sowie ein spezielles Enzym benötigt und daß sowohl Phosphorylase-a als auch ADP dabei produziert werden^{23,68}. Das konvertierende Enzym wurde Phosphorylase-Kinase genannt und war somit das erste Beispiel für eine Proteinkinase, der ein physiologisches Substrat und eine eindeutige biologische Funktion zugeordnet werden konnten. Die Rolle der Calciumionen bestand, wie 1964 gezeigt werden konnte⁶⁹, in der Aktivierung der Phosphorylase-Kinase.

Diese Entdeckungen wurden durch Arbeiten Earl Sutherlands und seiner Mitarbeiter abgerundet, die mit Phosphorylase aus Leber arbeiteten. Sie konnten bereits 1955 Phosphat als Produkt der enzymatischen Umwandlung des aktiven in das inaktive Enzym identifizieren⁷⁰. Die Bedeutung Sutherlands liegt aber vor allem darin, daß er die Wirkung bestimmter Hormone in diesem Zusammenhang erklären konnte. So hatte er schon 1951 zeigen können, daß der phosphorylase-katalysierte Glycogenabbau in intakten Leberzellen durch Adrenalin und Glucagon stimuliert werden kann⁷¹. Im Jahre 1957 schließlich entdeckte er eines der zentralen Bindeglieder, das 3',5'-cyclo-Adenosinmonophosphat (cAMP), das unter dem Einfluß von Adrenalin gebildet wird und das das Hormonsignal als intrazellulärer (sekundärer) Botenstoff („second messenger“) weiterleitet^{72,73}. Dieses cAMP sollte für die weitere Geschichte der Proteinkinaseforschung von entscheidender Bedeutung werden.

9.3 Im Gegensatz zu Phosphorylase-Kinase sind CK1 und CK2 acidophile Proteinkinasen

Als 1960 Rabinowitz & Lipmann die zweite große Studie zu CK1/CK2 vorlegten, sprachen sie immer noch von „Protein-Phosphokinase“²⁹. Daß diese ungenaue Bezeichnung beibehalten wurde, hatte zwei Gründe: Erstens war nach wie vor kein physiologisches Substrat des Enzyms bekannt, und zweitens reichte der Begriff, um das Enzym eindeutig von der einzigen anderen damals bekannten Proteinkinase, der Phosphorylase-Kinase, zu unterscheiden.

Daß eine solche Abgrenzung allerdings auch zwingend ist, war ein wichtiges Ergebnis von Rabinowitz & Lipmann²⁹, denn sie konnten zeigen, daß die Substratspezifitäten beider Enzyme völlig verschieden waren: Protein-Phosphokinase war inaktiv mit Phosphorylase-b als Substrat, dagegen hochaktiv mit dem Phosvitin; für die Phosphorylase-Kinase stellten sie das Gegenteil fest.

Phosvitin ist ein Protein, bei dem 54 % der Aminosäuren Phosphoserine sind. Hinzukommen weitere negativ geladene Aminosäuren, so daß Phosvitin genau wie Casein ein markant „saureres“ Protein ist. Durch den Befund, daß Phosvitin ein ebenso gutes Substrat für „Protein-Phosphokinase“ ist wie Casein, begann sich der „acidophile“ Charakter von CK1 und CK2 abzuzeichnen, der aus heutiger Sicht zu den spezifischsten Eigenschaften dieser Enzyme im Vergleich zur großen Mehrheit der Proteinkinasen gehört. Dieses Ergebnis wurde durch eine scheinbar paradoxe Beobachtung unterstrichen: Rabinowitz & Lipmann²⁹ stellten nämlich fest, daß Phosvitin zu einem schwachen Substrat wird, wenn man es zuvor alkalisch dephosphoryliert. Das hieß also, daß die negativ geladenen Phosphogruppen in unbehandeltem Phosvitin dessen Acidophilie und Substratcharakter für Protein-Phosphokinase erhöhen.

Ein zunächst noch wenig beachtetes Ergebnis der Studie von Rabinowitz & Lipmann²⁹ war, daß Protein-Phosphokinase zwar kein isoliertes Serin, wohl aber aus Casein gewonnene Peptide mit einer Länge von 13 bis 15 Aminosäuren phosphorylieren kann. Die naheliegende Schlußfolgerung war, daß das Phosphorylierungspotential einer Seitenkette in Gegenwart einer Proteinkinase weniger durch die Gesamtstruktur des Proteinsubstrates, sondern in erster Linie durch die Aminosäuren in der Umgebung der Phosphorylierungsstelle bestimmt wird.

Im Falle der Glycogen-Phosphorylase wurde die Aminosäuresequenz der Phosphorylierungsstelle bereits 1964 publiziert⁷⁴. Sie lautet Lys-Arg-Lys-Gln-Ile-**Ser**-Val-Arg, d.h. das zu phosphorylierende Serin ist von auffällig vielen positiv geladenen Aminosäuren umgeben. Dieses Ergebnis stand in vollem Einklang mit den Spezifitätsbefunden von Rabinowitz & Lipmann²⁹ und wies die Phosphorylase-Kinase als eine basophile Proteinkinase aus.

9.4 CK1 und CK2 sind ubiquitär verbreitet

Rabinowitz & Lipmann²⁹ isolierten 1960 ihre „Protein-Phosphokinase“ aus Hefe und aus Kälberhirn und lieferten damit erste Anzeichen für deren ubiquitäre Verbreitung innerhalb eines Organismus' und im Eukaryontenreich. In der Tat wissen wir heute, daß CK2 nicht nur in allen eukaryontischen Lebewesen vorkommt, sondern daß CK2-Aktivität auch innerhalb von Organismen und Zellen in fast allen Organen oder Organellen detektiert werden kann⁵³. Ähnliches gilt für die CK1.

Diese ubiquitäre Verbreitung von CK2 unter den Eukaryonten ist ein wichtiges Indiz für ihren essentiellen Charakter und ihre Ursprünglichkeit. Dies haben insbesondere genomweite Analysen der jüngsten Zeit bestätigt, auf die wir im Kapitel 13.7.2 zurückkommen werden.

9.5 Zusammenfassung

Am Ende der 50er Jahre waren zwei Proteinkinasen bekannt: die acidophile CK1/CK2 alias „Protein-Phosphokinase“ und die basophile Phosphorylase-Kinase. Die „Protein-Phosphokinase“ war direkt über ihre enzymatische Aktivität gegenüber dem artifiziellen Substrat Casein gefunden worden. Demgegenüber war die Phosphorylase-Kinase indirekt, nämlich über ihr Substrat Glycogen-Phosphorylase-b und das zugehörige Phosphoprotein Glycogen-Phosphorylase-a entdeckt worden. Dieser indirekte Weg hatte den großen Vorteil, daß damit die biologische Funktion der Phosphorylase-Kinase von vornherein klar war. Demgegenüber sollte die physiologische Bedeutung von CK2 (und CK1) noch über Jahrzehnte hinweg im Dunkeln bleiben. Die ubiquitäre Verbreitung der CK1/CK2-Aktivität deutete sich allerdings schon an und wies auf eine wichtige Rolle dieser Enzyme hin.

10 „Phosvitinkinase“: die CK2 der 60er Jahre

10.1 Die wachsende Zahl der Proteinkinasen erforderte eine genauere Benennung

In den 60er Jahren verdichteten sich die Hinweise, daß es weitere Proteinkinasen gibt. Dazu trug nicht nur jene wichtige Arbeit von Rabinowitz & Lipmann²⁹ bei, sondern vor allem die wachsende Zahl identifizierter Phosphoproteine. Beispielsweise wurde bereits 1959 beobachtet, daß Phosphorylase-Kinase unter dem Einfluß von cAMP aktiviert werden kann, daß diese Aktivierung jedoch zwingend ATP und Mg²⁺-Ionen erfordert⁷⁵. Die korrekte Schlußfolgerung aus diesem Befund war, daß aktive Phosphorylase-Kinase selbst ein Phosphoprotein ist.

Ein weiteres frühes Beispiel war die UDP-Glucose-Glycogen-Transglucosylase oder kurz „Glycogen-Synthase“, die metabolische Gegenspielerin der Glycogen-Phosphorylase. 1962 wurde erkannt, daß auch sie phosphoryliert vorkommen kann⁷⁶, daß sie also ein Substrat für eine - allerdings noch unbekannte - Proteinkinase sein sollte.

Unter dem Eindruck dieser Entwicklungen setzte sich unter den an „Protein-Phosphokinase“ interessierten Wissenschaftlern die Einsicht durch, daß es vorsorglich geboten sei, von einer unspezifischen Benennung abzurücken und die „Protein-Phosphokinase“ entsprechend ihrer Substratspezifität umzubenennen (L. A. Pinna, persönliche Mitteilung), und zwar ungeachtet der Tatsache, daß kein physiologisches Substrat bekannt war. So führten Rodnight & Lavin³⁰ 1964 in der wichtigsten CK2-Arbeit der 60er Jahre, für die sie ausschließlich Phosvitin als Substrat benutzt hatten, den Namen „Phosvitinkinase“ ein, der anschließend überwiegend benutzt wurde.

10.2 Duale Cosubstratspezifität: CK2 kann statt ATP auch GTP als Cosubstrat verwenden

Die erwähnte Schrift von Rodnight & Lavin³⁰ ist eine Schlüsselpublikation der frühen CK2-Forschung. Denn dort wird u.a. eine markante Eigenschaft der CK2 beschrieben, die sich zwar erst 15 Jahre später in Namen wie „Caseinkinase G“ oder „G-Typ-Caseinkinase“ niedergeschlagen hat, die jedoch schon an dieser Stelle erwähnt werden muß, weil sie wenig später zur Unterscheidung zwischen CK1 und CK2 geführt hat. Die Rede ist von der Fähigkeit des Enzyms, GTP genauso effektiv als Cosubstrat zu nutzen wie ATP, die später „duale Cosubstratspezifität“ genannt wurde⁷⁷. Sie wurde in der Folgezeit immer

wieder für CK2-Präparationen aus verschiedenen Quellen bestätigt, so daß Hathaway & Traugh⁶¹ 1982 eine Übersicht erstellen konnten, aus der ersichtlich ist, daß der K_M -Wert der CK2 für ATP im Bereich von 4 bis 15 μM liegt, der K_M -Wert für GTP dagegen im Bereich von 7 bis 40 μM .

Daß diese duale Cosubstratspezifität der CK2 eine Besonderheit unter den Proteinkinasen ist, deutete sich spätestens 1974 an, als das ATP/GTP-Aktivitätsverhältnis für vier verschiedene Proteinkinasen - darunter CK1, CK2 und CAPK - aus Kaninchen bestimmt wurde⁷⁸. Es lag im Falle der CK2 bei 67 %, in den anderen drei Fällen jedoch bei 2 bis 4 %. Dieser Befund, wonach eukaryontische Proteinkinasen eine klare Präferenz für ATP gegenüber GTP besitzen, verdichtete sich im Laufe der Zeit mit der Entdeckung und Charakterisierung vieler weiterer EPKs. Durch die Nutzung von GTP als Phosphodonor und saurer Proteine als Phosphoakzeptoren läßt sich daher CK2 recht eindeutig auch in nicht oder nur grob gereinigter Form identifizieren.

Zu diesem diagnostischen Zweck, nämlich um CK2-Aktivität zu identifizieren, wird die duale Cosubstratspezifität des Enzyms auch heute noch benutzt. Ob sich dahinter jedoch auch ein biologischer Sinn verbirgt, wurde m.W. nie untersucht. In dieser Hinsicht liefert die Arbeit von Rodnight & Lavin³⁰ den einzigen Fingerzeig: Daß nämlich die Autoren GTP als Cosubstrat für „Phosvitinkinase“ testeten, war durch Berichte motiviert worden, wonach GTP in gewissen Hirngewebeschnitten nach elektrischer Stimulation angereichert wird⁷⁹. Diese Indizien führten zu der Hypothese, daß die proteingebundenen Phosphogruppen in diesem Gewebe von GTP und nicht von ATP stammen könnten.

10.3 CK2 benötigt monovalente Kationen zur Aktivierung

Die von Rodnight & Lavin³⁰ präparierte Phosvitinkinase aus Schweinehirn erwies sich als sehr empfindlich gegenüber monovalenten Kationen. Voll aktiv war das Enzym erst in Anwesenheit von 200 mM NaCl oder noch besser KCl. Dieses Verhalten ist später wiederholt beschrieben worden, und zwar sowohl für CK2 aus natürlichen Quellen³⁴ als auch für rekombinant hergestelltes Enzym⁸⁰. Dabei verfestigte sich eine bei Rodnight & Lavin³⁰ nur angedeutete Tendenz, daß nämlich die Aktivität der CK2 bei KCl-Konzentrationen über 500 mM wieder deutlich zurückgeht.

10.4 Hinter „Phosvitinkinase“ verbergen sich zwei unterschiedliche Enzyme: CK1 und CK2

Zum Wachstum der Zahl bekannter Proteinkinasen in den 60er Jahren trug auch die Erkenntnis bei, daß sich hinter der „Phosvitinkinase“ zwei Enzyme verbargen, die CK1 und die CK2. Diese Unterscheidung wurde spätestens 1969 offenbar, als Pinna *et al.*⁸¹ berichteten, daß die casein- und phosvitinphosphorylierende Aktivität aus Leber anhand ihrer Löslichkeit in zwei Fraktionen geteilt werden kann, von der nur eine GTP als Cosubstrat nutzen kann. Spätere Untersuchungen haben in der Tat gezeigt, daß CK1 mit 900 μM einen viel höheren K_M -Wert für GTP als für ATP (13 μM) besitzt⁸².

Auf die Namensgebung wirkten sich diese frühen Befunde zunächst nicht aus, weil es zu jener Zeit noch nicht gelang, beide Varianten der Phosvitinkinase effektiv zu reinigen und getrennt voneinander zu charakterisieren.

10.5 Die Entdeckung der CAPK: Durchbruch für die Proteinkinaseforschung

10.5.1 Die erste Regulationskaskade wird entschlüsselt

Zur vollen Entfaltung kam die Proteinkinaseforschung erst nach 1968, als das schon 1959 postulierte Enzym⁷⁵, das die Phosphorylase-Kinase phosphoryliert und aktiviert, tatsächlich entdeckt wurde²⁴. Die Aktivität dieses Enzyms ist streng cAMP-abhängig²⁴, und es wird deshalb auch „cAMP-abhängige Proteinkinase“ (CAPK) genannt. Wegen seiner überragenden Bedeutung spricht man jedoch auch oft von „Proteinkinase A“ (PKA). Mit der CAPK wurde schlagartig die Lücke zwischen dem adrenalin-induzierten cAMP-Signal und dem Glycogenstoffwechsel geschlossen: Die erste Regulationskaskade kam zum Vorschein.

Die Erkenntnisse über die Kontrollfunktion der CAPK im Glycogenstoffwechsel wurden sinnvoll abgerundet, indem auch die Glycogensynthese einbezogen wurde. Bereits 1966 war berichtet worden, daß auch im Falle der Glycogensynthese die Phosphorylierung cAMP-abhängig ist⁸³, wobei sie hier allerdings zur Hemmung des Enzyms führt. Diese Beobachtungen fanden durch die Entdeckung der CAPK eine zwanglose Erklärung: CAPK phosphoryliert sowohl Phosphorylase-Kinase als auch Glycogensynthese und wirkt dadurch aktivierend auf den Glycogenabbau und gleichzeitig inhibierend auf den Glycogenaufbau. Aus heutiger Sicht ist das Regulationsgeschehen an der Glycogensynthese allerdings noch erheblich komplizierter, denn im Gegensatz zur Glycogen-Phosphorylase besitzt sie sieben Phosphorylierungsstellen und gilt heute als ein Musterbeispiel für eine multiple Phosphorylierung an mehreren Seitenketten⁸⁴.

Schon bald nach der Entdeckung der CAPK wurde offenbar, daß die cAMP-Abhängigkeit mit der Quartärstruktur des Enzyms zusammenhängt^{85,86}. Und zwar liegt das inaktive, cAMP-freie Enzym als Komplex zweier katalytischer C-Untereinheiten mit zwei regulatorischen R-Untereinheiten vor. Das cAMP bindet an die regulatorische Untereinheiten, woraufhin der R₂C₂-Komplex zerfällt und die aktive katalytische Untereinheit freigesetzt wird.

10.5.2 Pleiotropie: Die CAPK ist eine Breitbandkinase

In ihrer Originalarbeit²⁴ nannten die Entdecker der CAPK das Enzym noch „Phosphorylase-Kinase-Kinase“. Edwin Krebs hat später jedoch begründet⁸⁷, warum dieser Begriff fallengelassen wurde: Bereits jene Originalarbeit nämlich enthielt Hinweise auf eine relativ breite Substratspezifität des Enzyms.

Die Entdecker berichteten dort, daß CAPK neben Phosphorylase-Kinase auch Casein und Protamin, also ein typisches saures und ein typisches basisches Protein, als Substrate akzeptiert. Noch wichtiger war der wenig später folgende Bericht, daß CAPK *in vivo* eine spezifische Serinseitenkette im Histonprotein H1 phosphoryliert⁸⁸. Diese Erkenntnis führte die Proteinkinaseforschung über den Glykogenstoffwechsel und allgemein über die Enzyme und ihre Regulation hinaus. Damit wurde die in jener Zeit populäre Vermutung, daß Proteinphosphorylierung ein auf den Glykogenmetabolismus begrenzter Regulationsmechanismus ist, widerlegt.

Die Liste der CAPK-Substrate ist mittlerweile noch erheblich größer, und das Enzym ist ein Musterbeispiel für eine Breitbandkinase⁸⁹, die durch Phosphorylierung viele Wirkungen entfaltet. Ein solches Verhalten wird auch als „Pleiotropie“ bezeichnet.

10.5.3 Wissenschaftsgeschichtliche Bedeutung der CAPK

Die CAPK gilt heute als Prototyp der Superfamilie der eukaryontischen Proteinkinasen. Zu ihrer enormen wissenschaftsgeschichtlichen Bedeutung gehört, daß sie die erste vollständig durchsequenzierte Proteinkinase war⁹⁰, daß sie die erste Proteinkinase war, die kristallisiert wurde⁹¹ und deren 3D-Struktur bekannt war²⁶, und daß sie die erste Proteinkinase war, für die eine Konsensus-Aminosäuresequenz zur Erkennung der Phosphorylierungsstelle publiziert wurde⁹². Sie lautete Arg-Arg-X-**Ser**-X, d.h. ähnlich wie Phosphorylase-Kinase benötigt CAPK in ihren Substraten positiv geladene Aminosäureseitenketten in der Nähe der zu phosphorylierenden Seitenkette.

10.6 *cGMP* und Ca^{2+} : weitere „second messenger“-Moleküle als Proteinkinase-Regulatoren

Das cAMP war im Grunde der zweite intrazelluläre Botenstoff, der bekannt war. Denn wie bereits erwähnt, hatte sich schon in den 50er und frühen 60er Jahren eine spezifische Rolle von Ca^{2+} -Ionen bei der Wirkung von Phosphorylase-Kinase abgezeichnet⁶⁹. Später zeigte sich in der Tat, daß Phosphorylase-Kinase eine Untereinheit mit hoher Calciumaffinität besitzt, das sogenannte Calmodulin⁹³.

Die Rolle der Ca^{2+} -Ionen als Aktivator der Phosphorylase-Kinase paßte zu dem Erkenntnis, daß in Muskelzellen nach elektrischer Stimulierung Ca^{2+} -Ionen aus dem sarcoplasmatischen Retikulum in das Cytoplasma freigesetzt werden⁹⁴. Mit anderen Worten: Calcium ist ebenso wie cAMP ein sekundärer Botenstoff für ein externes Signal, das in diesem Falle jedoch aus einem Nervenimpuls und nicht aus einem Hormon besteht.

Das nächste Substanz, die als interzelluläres Signalmolekül identifiziert wurde, war das Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP)⁹⁵, gefolgt 1980 von den Diacylglycerinen⁹⁶. Sie aktivieren eine Proteinkinase, die wegen ihrer gleichzeitigen Abhängigkeit von Ca^{2+} als „Proteinkinase C“ bezeichnet wurde⁹⁶.

10.7 *Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase: die erste „atypische“ Proteinkinase*

Zur Einsicht in die Bedeutung der Proteinphosphorylierung trug ein Bericht von 1969 bei, wonach ein Schlüsselenzym des Kernstoffwechsels, nämlich die Pyruvat-Dehydrogenase, die die Glycolyse mit dem Citratzyklus durch Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA verbindet, durch Phosphorylierung reguliert wird⁹⁷. Die dazu nötige „Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase“ war nach der Phosphorylase-Kinase und der CAPK die dritte Proteinkinase mit einer klar definierten physiologischen Funktion.

Aus heutiger Sicht kommt der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase jedoch noch eine weitere historische Bedeutung zu: Sie war die erste „atypische“, d.h. mit CAPK nicht verwandte Proteinkinase, eine Tatsache, die jedoch erst fast ein Vierteljahrhundert nach ihrer Entdeckung erkannt wurde⁹⁸ und auf die im Kap. 13.7.2 eingegangen wird.

10.8 *Zusammenfassung*

Am Ende der 60er Jahre waren noch immer nicht mehr als eine Handvoll Proteinkinasen charakterisiert. Trotz mangelnder Quantität jedoch hatte die Proteinkinaseforschung durch die Entdeckung der CAPK eine neue Qualität erreicht: Mit diesem Enzym war erstmals eine Regulationskaskade und der Kern

einer Signaltransduktionskette offengelegt worden. Im Falle der acidophilen Phosphotransferasen zeichneten sich erste Unterschiede zwischen CK1 und CK2 ab; die physiologischen Funktionen dieser Enzyme dagegen blieben nach wie vor völlig unklar.

11 Anschwellende Namensflut: CK2 in den 70er und frühen 80er Jahren

11.1 Zellzyklus und Krebs: Schrittmacher der Proteinkinaseforschung

Wie im letzten Abschnitt angedeutet, wurde um 1970 herum erkannt, daß zu den Substraten der CAPK auch bestimmte basische Histonproteine gehören⁸⁸. Histone sind im Zellkern lokalisiert, wo sie mit der DNA zum Chromatin assoziiert und für die Verpackung der DNA verantwortlich sind. Sie sind daher wesentliche Steuerelemente bei der Replikation des Erbgutes, die im Rahmen der Teilung eukaryontischer Zellen während der S-Phase des sogenannten Zellzyklus' stattfindet.

Dieser Zellzyklus wurde in jener Zeit intensiv erforscht. Man kannte bereits einen „Mitose-promoting-factor“ (MPF)⁹⁹ und einen „S-Phase-promoting-factor“ (SPF)¹⁰⁰, ohne allerdings zu wissen, daß diese Komplexe Proteinkinaseaktivität besitzen. Durch die Untersuchung der Histon-Phosphorylierung wurde dann u.a. auch eine von cAMP und anderen sekundären Botenstoffen unabhängige Proteinkinase entdeckt, die die Zellteilung anregen kann¹⁰¹ und von der wir heute wissen, daß es sich um die cyclin-abhängige Proteinkinase 1 (CDK1) gehandelt hat.

Unbeeinflusst durch diesen hohen biochemischen Wissensstand waren es jedoch genetische Studien, die in den 70er Jahren zu den entscheidenden Entdeckungen über den Zellzyklus führten und die daher im Jahre 2001 mit dem Medizin-Nobelpreis gewürdigt wurden¹⁰². Leeland Hartwell und Paul Nurse, zwei der drei Preisträger, untersuchten damals Mutanten der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* mit Störungen bei der Zellteilung. Dabei entdeckten sie u.a. Gene, die - wie sich allerdings erst viel später herausstellen sollte - cyclin-abhängige Proteinkinasen codieren¹⁰².

Auf das engste verbunden mit dem Zellzyklus war die Erforschung der molekularen und genetischen Ursachen der Krebsentstehung, denn Tumorzellen zeichnen sich u.a. dadurch aus, daß bei ihnen der Zellzyklus der typischen Kontrolle durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren entzogen ist. Seit 1911 war bekannt, daß die Transformation einer normalen Zelle in eine Tumorzelle durch bestimmte Viren hervorgerufen werden kann¹⁰³. Später stellte sich heraus, daß es sich um RNA-haltige Retroviren handelt, die sich als sogenannte „Proviren“ in das Genom der Wirtszelle integrieren können. Das dazu nötige Enzym, die reverse Transkriptase, wurde 1970 entdeckt^{104,105}.

Aus dem wichtigsten Versuchsobjekt jener Zeit für retrovirale Transformation, dem „avian sarcoma virus“ [oft nach seiner Entdeckung auch „Rous sarcoma virus“ (RSV) genannt], isolierten Stehelin *et al.*¹⁰⁶ 1976 das sogenannte *src*-Gen, das für die Transformation verantwortlich ist. Das Genprodukt von *src* sollte sich später als Phosphoprotein mit Proteinkinaseaktivität und einer immensen Bedeutung für bestimmte zelluläre Signalketten erweisen.

Während also die Proteinkinaseforschung der 70er Jahre noch reine Biochemie war und von der Entdeckung der CAPK und der sekundären Signalstoffe ihre Impulse erhielt, zeichnete sich das „molekulargenetische Zeitalter“ bereits ab. Denn durch die genetischen Arbeiten der 70er Jahre wurde

die Erforschung des Zellzyklus' und der Tumorgenese auf einen solchen Entwicklungsstand gebracht, daß diese Gebiete zu den entscheidenden Katalysatoren der Proteinkinaseforschung in den 80er Jahren und speziell der CK2-Forschung in den 90er Jahren werden konnten.

11.2 Erste Klassifizierung von Proteinkinasen

Zur Ordnung der wachsenden Zahl von Proteinkinasen wurde zu Beginn der 70er Jahre ein Klassifizierungssystem benötigt¹⁰⁷. Ein solches wurde auf der Basis der biochemischen Eigenschaften der Enzyme vorgeschlagen, d.h. des Grundtyps des Substratprofils (acidophil oder basophil) und des Regulationsverhaltens gegenüber zyklischen Nukleosidmonophosphaten, insbesondere gegenüber cAMP^{108,109}. So wurde in den 70er Jahren ein Testverfahren etabliert, bei dem die Abhängigkeit einer Proteinkinase zumindest gegenüber cAMP geprüft wurde¹⁰⁹. Als Standardsubstrate wurden mit Casein ein saures Protein und mit mindestens einem Histonprotein ein basisches Protein benutzt. Nach diesem Verfahren wurde in den 70er Jahren jede neue Proteinkinase-Aktivität charakterisiert, so daß sich langsam die verschiedenen Grundtypen herauschälten.

11.3 „Caseinkinasen“: acidophile versus basophile Proteinkinasen

Wegen der Verwendung von Casein bei der biochemischen Klassifizierung von Proteinkinasen, kam der Begriff „Caseinkinase“ für die acidophilen, cAMP-unabhängigen Proteinkinasen in Mode und wurde spätestens ab 1975 benutzt⁷⁸. Diese Begrifflichkeit war trotz ihres einschränkenden Charakters sinnvoll, weil nämlich zunehmend offensichtlich wurde, daß Acidophilie eher die Ausnahme unter den Proteinkinasen ist, während die Mehrheit basische Proteinsubstrate bevorzugt.

Heute werden den basophilen und den acidophilen Protein-Serin/Threoninkinasen als dritte Gruppe die prolin-dirigierten Enzyme hinzugesellt¹¹⁰, zu denen die bereits erwähnten cyclinabhängigen Proteinkinasen gehören. Sie zeichnen sich dadurch aus, daß ihre Substrate an der (p+1)-Position, also an der Stelle hinter der zu phosphorylierenden Aminosäure, ein Prolin besitzen.

11.4 „cAMP-unabhängige Proteinkinasen“: das Rätsel der CK2-Regulation

11.4.1 Auch das Regulationsverhalten liefert keinen Hinweis auf die Funktion der CK2

Nachdem bis in die 70er Jahre hinein keine potentiell physiologischen CK2-Substrate entdeckt werden konnten, ließen Vorbilder wie die CAPK oder die Proteinkinase C die Hoffnung zu, daß wenigstens das Regulationsverhalten Hinweise auf die CK2-Funktion geben würde. Diese Hoffnung wurde jedoch enttäuscht. Denn wie angedeutet, fielen die Caseinkinasen unter die „cAMP-unabhängigen Proteinkinasen“. Zudem war schon früher erkannt worden, daß sie im Gegensatz zur Phosphorylase-Kinase in ihrer Aktivität nicht von Ca²⁺-Ionen abhängig sind. Mehr noch: Auch die übrigen damals bekannten sekundären Signalsubstanzen wie cGMP übten keinerlei Einfluß auf die CK2-Aktivität aus. Das in der neueren Literatur - z.B. von Allende & Allende⁵⁸ - immer wieder hervorgehobene „Rätsel der CK2-Regulation“ zeichnete sich also bereits in den 70er Jahren ab.

11.4.2 ATP-Kompetitoren und Polyanionen inhibieren, Polykationen aktivieren CK2

Neben den etablierten sekundären Botenstoffen hat man auf der Suche nach einem physiologischen Regulationsmechanismus für CK2 eine Menge von Substanzen *in vitro* hinsichtlich ihres Einflusses auf die CK2-Aktivität getestet. Dabei können drei Substanzgruppen unterschieden werden:

- *Polyanionen* wie Heparin oder 2,3-Diphosphoglycerat sind effektive Inhibitoren des Enzyms⁶¹. Die Wirkung des 2,3-Diphosphoglycerats wurde 1975 an CK2 aus Erythrozyten entdeckt¹¹¹. Dort ist es u.a. für die Regulation der Sauerstoffbindung an Hämoglobin wichtig, weshalb es auch als Kandidat für die CK2-Regulation *in vivo* gehandelt wurde. Über die CK2-Inhibition durch Heparin wurde erstmals 1977 berichtet¹¹³. Dabei deutete sich an, daß Heparin ein sehr potenter und obendrein recht spezifischer Inhibitor für CK2 ist, was später wiederholt bestätigt wurde⁶¹. In den folgenden Jahren etablierte sich das Inhibitionsexperiment mit Heparin als ein kritischer Test zur CK2-Identifizierung.

Bereits 1982 war bekannt, daß sowohl Heparin als auch 2,3-Diphosphoglycerat in ihrer Inhibitionswirkung kompetitiv zum Casein, jedoch nicht zu ATP sind. Das Verbindende zwischen Casein und jenen Inhibitoren ist der saure und negativ geladene Charakter. Aus diesen Ergebnissen konnte daher geschlossen werden, daß CK2 ein ausgeprägt basisches Bindungsmotiv besitzen muß.

- *Polykationen* wie Polylysin¹¹² oder wie die Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin¹¹³ sind nicht-essentielle Aktivatoren der CK2, d.h. sie stimulieren das Enzym, das jedoch auch in ihrer Abwesenheit aktiv ist. Auch diese Wirkungen wurden bereits Ende der 70er Jahre festgestellt und in den Folgejahren oft bestätigt¹¹⁴.

Ein interessantes Nebenergebnis derartiger Untersuchungen war, daß Mg^{2+} -Ionen über ihre übliche Assoziation mit ATP hinaus aktivierend wirken und dabei in gewisser Weise kompetitiv zu Spermin sind, daß also die aktivierende Wirkung von Mg^{2+} -Ionen einerseits und von Spermin andererseits in Gegenwart des jeweils anderen deutlich vermindert ist^{114,115}.

- Jüngeren Datums ist das Wissen über *ATP-kompetitive Inhibitoren* wie bestimmte Ribofuranosylbenzimidazolderivate¹¹⁶ oder verschiedene flache, polycyclische Aromaten, z. B. einige Anthrachinonderivate¹¹⁷. Bei diesen Substanzen war von vornherein klar, daß es sich nicht um physiologische Inhibitoren handelt. Das Interesse an diesen Substanzen bestand und besteht vielmehr darin, das Enzym *in vivo* auf Proteinebene auszuschalten, um anschließend die Wirkung auf Zelle studieren zu können.

Obwohl somit *in vitro* eine Reihe positiver und negativer Regulatoren der CK2-Aktivität identifiziert werden konnten, konnte in keinem Falle eine physiologische Kontrollfunktion nachgewiesen werden.

11.5 Die Unterscheidung von CK1 und CK2

11.5.1 Chromatographische Trennung: Nomenklatur nach Elutionsprofil

Von „Caseinkinase 2“ und „CK2“ im Unterschied zu „Caseinkinase 1“ und „CK1“ wurde spätestens ab 1979 gesprochen⁸². Die wissenschaftliche Grundlage dieser Unterscheidung war die Elutionsreihenfolge bei der DEAE-Anionenaustauschchromatographie, bei der CK2 deutlich später - also bei höheren Salzkonzentrationen - eluiert als CK1^{82,118}.

11.5.2 CK2 bindet an Phosphocellulose und bildet unspezifische Aggregate

Von noch größerer Bedeutung für die Reinigung von CK2 und damit für die Charakterisierung des Enzyms in der „vor-rekombinanten“ Zeit wurde die Anionenaustausch- und Affinitätschromatographie an Phosphocellulose¹¹⁹. Paradoxerweise bindet CK2 an dieses Material nur, wenn die NaCl-Konzentration mindestens 250 mM beträgt, dann jedoch so fest, daß sie erst bei über 700 mM NaCl eluiert⁸², was eine effiziente Trennung von CK1 und anderen Proteinkinasen ermöglicht^a.

Das Bindungs- und Elutionsverhalten der CK2 an Phosphocellulose korreliert auffälligerweise mit dem im Kap. 10.3 erwähnten Bedarf des Enzyms an monovalenten Kationen zur vollen Aktivierung. Als Erklärung dafür wurde die Neigung der CK2 angeführt⁶¹, bei niedrigen Ionenstärken große, unspezifische Aggregate zu bilden, eine Eigenschaft, die Ende 70er Jahre erstmals beschrieben wurde^{33,82}.

11.5.3 CK2 α und CK2 β : CK2, nicht jedoch CK1 besitzt eine heterotetramere Quartärstruktur

Nachdem man CK2 von CK1 durch einen Aktivitätstest mit GTP analytisch unterscheiden und sie chromatographisch voneinander trennen konnte, ließen sich weitere Unterschiede zwischen beiden Enzymen herausarbeiten. So berichteten Kemp *et al.*¹¹⁸ 1975 über eine krasse Differenz in der Molmasse (130 kDa für CK2 und 50 kDa für CK1^b), was wenig später auf Unterschiede in den Quartärstrukturen zurückgeführt werden konnte: Während CK1 ein Monomer ist, wurde 1977 für CK2 eine heterotetramere Quartärstruktur mit $\alpha\alpha'\beta_2$ -Stoichiometrie gefunden^{82,32} und mit Molmassen von 42 kDa für die α -Untereinheit (CK2 α), 39 kDa für die α' -Untereinheit und 26 kDa für die β -Untereinheit (CK2 β). Dieser heterotetramere Komplex wird üblicherweise als „CK2-Holoenzym“ bezeichnet.

Die in der Benennung zum Ausdruck gebrachte Ähnlichkeit zwischen der α - und der α' -Kette in Abgrenzung zur β -Kette beruhte also zunächst einmal nur auf den Molmassen. Schon bald jedoch wurde die Verwandtschaft durch weitere biochemische Befunde untermauert: So berichteten 1977 Dahmus & Natzle³⁴ und 1979 Hathaway & Traugh⁸², daß CK2 sich selbst phosphorylieren kann, daß dabei jedoch ausschließlich CK2 β eine Phosphogruppe übertragen bekommt. 1981 schließlich wurden eindeutig die α - und die α' -Untereinheit als ATP-bindende und damit katalytische Untereinheiten identifiziert¹²⁰.

Die Beziehung zwischen CK2 α und der Variante α' blieb lange Zeit unklar. 1982 schrieben Hathaway & Traugh⁶¹, daß ihnen die Präparation einer CK2 mit reiner $\alpha_2\beta_2$ -Stöchiometrie gelungen sei. Sie führten das auf eine verkürzte Reinigungszeit und den Zusatz von Proteaseinhibitoren zurück, deuteten α' also als ein Abbauprodukt von CK2 α . Dieser Befund wurde dadurch gestützt, daß sie in einem Falle beobachten konnten, wie sich eine CK2-Präparation beim langen Stehen bei 4 °C ohne Aktivitätsverlust von $\alpha_2\beta_2$ in $\alpha'_2\beta_2$ umwandelte⁶¹. Das bereits hier zum Ausdruck kommende Stabilitätsproblem von Säugetier-CK2 α war später eine entscheidende Hürde beim Kristallisieren des Enzyms.

Wenn heute von CK2 α' in Säugetieren die Rede ist, so ist damit jedoch kein Degradationsprodukt von CK2 α gemeint, sondern eine paraloge Polypeptidkette, von der erstmals 1990 gezeigt wurde, daß ihre Sequenz von CK2 α -Sequenz verschieden ist¹²¹. 1995 schließlich wurde demonstriert, daß die drei

^aDeshalb wurde die CK2 vereinzelt auch als „PC_{0,7}“ bezeichnet¹³⁶.

^bIm Gegensatz zur späteren Nomenklatur sind die Kürzel CK1 und CK2 bei Kemp *et al.*¹¹⁸ vertauscht, d.h. CK2 wird dort als CK1 bezeichnet.

aus CK2 α , CK2 α' und CK2 β formbaren Komplexe mit $\alpha_2\beta_2$ -, $\alpha\alpha'\beta_2$ - und $\alpha'_2\beta_2$ -Quartärstruktur tatsächlich *in vivo* gebildet werden¹²².

Nach heutigem Kenntnisstand sind die Verhältnisse noch komplizierter, denn spätestens durch die verschiedenen Totalsequenzierungen der vergangenen Jahre ist offenbar geworden, daß fast alle bisher untersuchten eukaryontischen Spezies paraloge Gene für CK2 α , CK2 β oder für beide besitzen. Dementsprechend gibt es auf Quartärstrukturebene noch erheblich mehr Kombinationsmöglichkeiten.

11.5.4 „Caseinkinase G“ und „Caseinkinase TS“: Benennung nach Substrat- und Cosubstratspezifität
Die Benennung der beiden Caseinkinasen nach dem chromatographischen Elutionsprofil stieß nicht auf einhellige Zustimmung. Beispielsweise kam Ende der 70er Jahre das Namenspärrchen Caseinkinase G/Caseinkinase A auf, dem die unterschiedliche Cosubstratspezifität der Enzyme zugrundelag.

Wie zuvor erwähnt, war die Fähigkeit der „Phosvitinkinase“, neben ATP auch GTP umzusetzen, bereits 1964 aufgefallen³⁰. Nach der Trennung von CK1 und CK2 war es möglich, diese Eigenschaft eindeutig der CK2 zuzuordnen, die somit „Caseinkinase G“ genannt wurde. Im Gegensatz dazu wurde die CK1, die lediglich ATP als Cosubstrat akzeptiert, „Caseinkinase A“ genannt.

Auch die Caseinphosphorylierung durch diese beiden Enzyme wurde nun genauer untersucht⁴¹. Dabei fiel auf, daß CK1 ausschließlich Serinseitenketten im Casein phosphoryliert, während CK2 darüber hinaus auch Threoninseitenketten als Phosphoakzeptoren zuläßt. Auf diesem Unterschied beruht die Bezeichnung „Caseinkinase TS“ für CK2 im Gegensatz zu „Caseinkinase S“ für CK1. Dieser Namensvorschlag hat sich zwar nie durchgesetzt, wurde aber bis mindestens 1987 benutzt¹²³.

11.5.5 Erste Erkennungssequenzen für CK1 und CK2

Wichtiger als die Namensgebung war ein anderes Ergebnis aus den Studien zur Casein-Phosphorylierung Ende der 70er Jahre. Da verschiedene Caseinvarianten mittlerweile sequenziert worden waren, wurden erste Erkennungssequenzen für CK1 und CK2 offenbar^{124,61}: Wie erwartet, ergab sich, daß die Phosphoakzeptor-Seitenketten in beiden Fällen von Aspartat- und Glutamatresten umgeben sind. Als ein wesentlicher Unterschied fiel jedoch auf, daß im Falle der CK1 diese negativ geladenen Determinanten unmittelbar N-terminal von der Phosphorylierungsstelle, im Falle der CK2 jedoch C-terminal von ihr liegen⁶¹.

11.5.6 Wie stabil ist das CK2-Holoenzym?

Die Arbeiten zur Charakterisierung der CK2-Untereinheiten fanden einen ersten Abschluß durch eine einflußreiche Schrift von Cochet & Chambaz⁴², die als erste CK2 α und CK2 β in isolierter Form präparieren konnten. Die Tatsache, daß sie zur Trennung der beiden Untereinheiten denaturierende Bedingungen verwenden mußten, unterstrich die Stabilität des CK2-Holoenzym und führte zu der fast dogmatischen Ansicht, daß *in vivo* allenfalls unmittelbar nach der Proteinbiosynthese isolierte Untereinheiten von CK2 α und CK2 β vorkommen könnten. Erst in den vergangenen zehn Jahren ist diese Ansicht zunehmend in Zweifel gezogen worden⁵⁷.

Die offenbar hohe Stabilität des CK2-Holoenzym sprach jedenfalls nicht für ein dynamisches Gleichgewicht zwischen dem Tetramer und seinen Untereinheiten und schwächte daher die Hoffnung, daß es im Falle der CK2 einen ähnlichen Regulationsmechanismus über die Quartärstruktur geben könnte wie

bei der CAPK. Dagegen sprach auch ein weiteres Ergebnis von Cochet & Chambaz⁴², der Befund nämlich, daß CK2 α auch in isolierter Form katalytische Aktivität zeigte, wenn sie auch gegenüber Casein als Substrat deutlich geringer war als die des CK2-Holoenzym.

11.6 CK2-Benennung nach der Lokalisation

11.6.1 „Nukleare Proteinkinase NII“: Im Zellkern ist ein Schwerpunkt der CK2-Aktivität

Wie bereits erwähnt, fanden im Rahmen der Zellzyklusforschung der frühen 70er Jahre die Histonkinasen und andere Proteinkinasen des Zellkerns ein verstärktes Interesse. Neben der basophilen Histon-H1-Kinase, der späteren CDK1, wurden dabei auch zwei acidophile cAMP-unabhängige Proteinkinasen entdeckt, die „Nuclear Kinase NI“ und „Nuclear Kinase NII“ genannt wurden^{125,126}.

Spätestens 1977 wurde durch eine Arbeit von Thornburg & Lindell³² nahegelegt, daß diese „Nukleare Proteinkinase NII“ mit der CK2 identisch ist. Interessant ist die Angabe jener Autoren, daß lediglich 12 % der von ihnen gefundenen Caseinkinase-Aktivität cytosolischen Ursprungs ist³², daß somit die Hauptmenge vor allem im Zellkern angesiedelt sein muß.

Der derzeit aktuelle Erkenntnisstand zur Verteilung der CK2 auf die verschiedenen Zellkomponenten ist in einer Übersicht von Faust & Montenarh⁵³ dargestellt worden. Entsprechende Untersuchungen werden dadurch erschwert, daß die Ergebnisse von Spezies zu Spezies und von Gewebe zu Gewebe variieren und darüber hinaus extrem stark vom metabolischen Zustand der Zellen abhängen⁵³. Dennoch gilt als gesichert, daß neben dem Cytoplasma der Zellkern einen Schwerpunkt der CK2-Aktivität bildet^{53,60}. Allerdings ist diese katalytische Aktivität nicht unbedingt an das CK2-Holoenzym gebunden. Vielmehr stammen die ersten Hinweise, daß CK2 α *in vivo* auch ungebunden an CK2 β vorliegen kann, aus dem Zellkern¹²⁷.

11.6.2 „Membrankinase I“: CK2 als Membran- und Ectoenzym

Zu den unkonventionellen Beiträgen der CK2-Literatur gehören Berichte über ihre Assoziierung an der Zellmembran oder gar ihre Ausschleusung aus der Zelle. 1976 sind derartige Beobachtungen erstmals von Hosey & Tao¹²⁸ publiziert worden: Die Autoren hatten gefunden, daß Erythrozyten aus Mensch und aus Kaninchen eine cAMP-unabhängige Proteinkinaseaktivität mit dualer Cosubstratspezifität enthalten. Dieselben Autoren nannten diese Proteinkinase in einer Folgearbeit „Membrankinase I“³³.

1982 wurde auf der Oberfläche von HeLa-Zellen eine Proteinkinaseaktivität mit dualer Cosubstratspezifität entdeckt¹²⁹, die später als CK2 identifiziert wurde¹³⁰. Weitere entsprechende Berichte aus den 90er Jahren sind von Faust & Montenarh⁵³ zusammengefaßt worden.

11.7 Substratproteine als Namensgeber für die CK2

11.7.1 „eIF-2 β -Kinase“: CK2 und die Regulation der Proteinbiosynthese

Bis Mitte der 70er Jahre krankte die CK2-Forschung daran, daß mit Casein und Phosvitin lediglich zwei - obendrein artifizielle - *in-vitro*-Substrate der CK2 bekannt waren. Die bereits geschilderten Unsicherheiten und Unschlüssigkeiten bei der Namensgebung waren eine Folge dieser Tatsache. Es ist daher kein Wunder, daß mit der Entdeckung diverser CK2-Proteinsubstrate mit potentiell physiologischer

Bedeutung ab Mitte der 70er Jahre eine lebhafte Namensgebung auf der Grundlage dieser neuen Substrate einsetzte.

Die ersten dieser zwar *in vitro* charakterisierten, aber dennoch potentiellen *in-vivo*-Substrate der CK2 waren die beiden eukaryontischen Translationsinitiationsfaktoren eIF-2 und eIF-3^{131,132}. Daraus abgeleitet wurde der Name „eIF-2 β -Kinase“, der spätestens 1981 erstmals benutzt wurde³⁵.

Aus der Entdeckung dieser Substrate ergab sich unmittelbar die Idee, daß CK2-Phosphorylierung eine wichtige Rolle bei der Proteinbiosynthese spielen könnte. Diese Hypothese wurde dadurch gestärkt, daß später noch verschiedene andere translationsrelevante Proteinsubstrate der CK2 identifiziert wurden⁵⁸, wobei unklar blieb, ob die *in-vitro*-Phosphorylierung des jeweiligen Substrates durch CK2 auch *in vivo* geschieht. So blieb es letzten Endes bei Indizien, und es ist bis heute nicht sicher, in welcher Weise CK2 regulierend auf das Geschehen am Ribosom einwirkt.

11.7.2 „Troponin-T-Kinase“

Das Troponin, ein aus drei Untereinheiten bestehender Komplex aus den dünnen Muskelfilamenten, der die Ca²⁺-Sensitivität der Muskelkontraktion vermittelt, gehörte schon Mitte der 70er zu den beliebtesten Gegenständen der Proteinkinase-Forschung³¹. Erste Hinweise, daß die Troponinkette T ein CK2-Substrat sein könnte, gab es bereits 1976; die entsprechende Publikation in russischer Sprache wurde jedoch nur wenig beachtet¹³³.

Gegen Ende der 70er Jahre verdichteten sich diese Hinweise, und der Name „Troponin-T-Kinase“ wurde zeitweise üblich^{38,39,40}. Besonders interessant ist dabei das übereinstimmende Ergebnis, daß CK2 das Troponin-T mit erheblich höherer Aktivität phosphoryliert als Casein und Phosvitin, daß sie also eine gewisse Spezifität zugunsten von Troponin-T besitzt. Dieses ist allerdings bislang der einzige Hinweis darauf, daß die Troponin-T-Phosphorylierung durch CK2, sofern sie überhaupt *in vivo* stattfindet, eine physiologische Bedeutung haben könnte.

11.7.3 „Glycogensynthase-Kinase 5“: CK2 als „graue Eminenz“ der Stoffwechselregulation?

Schon aus den frühen Studien zur Bedeutung der Protein-Phosphorylierung im Glycogenstoffwechsel war bekannt, daß das Phosphorylierungsgeschehen an Glycogensynthase erheblich komplexer ist als an ihrer Gegenspielerin, der Phosphorylase-b. Während diese durch eine einzige Phosphorylierung in die aktive Phosphorylase-a-Form umgewandelt werden kann - eine Tatsache, die Edmond Fischer in seinem Nobel-Vortrag von 1992 als einen der großen Glücksfälle seiner wissenschaftlichen Laufbahn bezeichnet hat -, ist jene eines der klassischen Literaturbeispiele für eine Mehrfach-Phosphorylierung^{84,134}.

Daß auch CK2 zu den Phosphorylierungen der Glycogensynthase beiträgt, wurde Anfang der 80er Jahre entdeckt^{35,135,136}. Infolgedessen wurde 1982 der Name „Glycogensynthase-Kinase 5“ (GSK5) in die Literatur eingeführt³⁶. Er ist zwar mittlerweile längst wieder verschwunden, jedoch hat sich das Wissen über die Rolle der CK2 im Glycogenstoffwechsel verfestigt. Demnach wirkt sie als Initialisierungskinese („priming kinase“) der Glycogensynthase-Kinase 3 (GSK3).

Diese GSK3 wurde 1980 charakterisiert¹³⁷ und zeichnet sich durch eine besondere Substratspezifität aus. Sie benötigt an Position (p+4), also vier Positionen C-terminal von der Phosphorylierungsstelle eine negativ geladene Seitenkette und zwar am besten eine zuvor phosphorylierte Aminosäure. Diese initiale Phosphorylierung erfolgt im Falle der Glycogensynthase durch CK2, und zwar am Ser656. An-

schließlich kann GSK3 am Ser652, am Ser648, am Ser644 und schließlich am Ser640 fortfahren. Durch diese schrittweise, multiple Phosphorylierung wird die Glycogen-Synthase komplett inaktiviert, so daß der Glycogen-Abbau vollzogen werden kann.

Ein ähnlicher synergistischer Effekt zwischen CK2 und GSK3 wurde für den Typ-II der regulatorischen Untereinheit von CAPK¹³⁸ und für die Phosphoprotein-Phosphatase 1¹³⁹ als Substrate berichtet. Die Tatsache, daß die CK2 in diesen und vielleicht auch in vielen weiteren Fällen versteckt wirkt und die Aktivität einer exponierteren Proteinkinase gleichsam vorbereitet, hat zu der Vermutung geführt, daß sie eine Art „graue Eminenz“ der Stoffwechselregulation ist⁴³.

11.8 „Novikoff Ascites Tumor Proteinkinase II“: CK2 und Tumorforschung

11.8.1 Tumorzellen besitzen eine erhöhte CK2-Aktivität

Im Rahmen der Tumorforschung fanden um Mitte der 70er Jahre neben den Histonproteinen auch chromosomale Nicht-Histonproteine und die sie phosphorylierenden Proteinkinasen Beachtung, denn es mehrten sich in jener Zeit Hinweise darauf, daß der Phosphorylierungszustand derartiger Proteine für die Regulation der DNA-Transkription entscheidend sein könnte. So berichteten Dahmus & Natze³⁴ 1977 über die Reinigung und Charakterisierung einer Proteinkinase aus Tumorzellen, die aus Aszites, einer abnormalen Ansammlung von Flüssigkeit in der Bauchhöhle, stammten. Für diese Proteinkinase ermittelten sie eine relativ hohe Aktivität gegenüber den genannten Nicht-Histonproteinen.

Dieses von den Autoren „Novikoff Ascites Tumor Proteinkinase II“ genannte Enzym hatte alle charakteristischen Eigenschaften des CK2-Holoenzym (Acidophilie, Quartärstruktur, Gesamtmolmasse um 130 kDa, typische Molmassen der Untereinheiten, duale Cosubstratspezifität, Aktivierung durch Kaliumchlorid, chromatographisches Trennverhalten), d.h. sie war, wie auch von den Autoren bemerkt³⁴, identisch mit CK2. Eine Aktivierung der Transkriptionsenzyme RNA-Polymerase I, II oder III durch CK2 konnten sie nicht nachweisen. Daß sie trotzdem einen neuen Begriff benutzt haben, ist möglicherweise bewußt geschehen, um eine Nähe zur Tumorforschung zu suggerieren.

Erst in den 80er Jahren ist dann die CK2-Aktivität in Normal- und in Tumorgewebe sowie in schnell und langsam wachsenden Zellkulturen systematisch und vergleichend untersucht worden. Dabei ergab sich, daß sowohl embryonales Gewebe als auch festes, schnell wachsendes Tumorgewebe, also allgemein schnell proliferierende Gewebe eine erhöhte CK2-Aktivität aufweisen⁶⁰. Die ersten entsprechenden Literaturhinweise stammen aus den Jahren 1983/1984 für Tumorgewebe^{140,141} und 1986 für embryonales Gewebe¹⁴².

11.8.2 CK2-Autophosphorylierung an der CK2 β -Untereinheit

Die Publikation von Dahmus & Natze³⁴ aus dem Jahre 1977 ist m.W. die erste, in der über die Autophosphorylierung von CK2 berichtet wird. Genauer gesagt, stellten die Autoren fest, daß jeder Holoenzym-Komplex zwei Phosphogruppen übertragen bekommt, wobei die beiden CK2 β -Untereinheiten als Substrate dienen. Diese Autophosphorylierung des CK2-Holoenzym an den CK2 β -Untereinheiten erfolgt selbst bei niedrigen Temperaturen rasch und ist später wiederholt bestätigt worden⁴³.

Daß die Phosphorylierung ein wichtiger und für Regulationskaskaden sehr sinnvoller Mechanismus ist, um die Aktivität von Proteinkinasen zu regulieren, war erstmals im Falle der Phosphorylase-Kinase

offenbar geworden. Daß darüber hinaus eine Autophosphorylierung durch die jeweilige Proteinkinase selbst biologisch signifikant sein könnte, wurde bereits 1975 von Rubin & Rosen³¹ diskutiert, nachdem dieses Phänomen für CAPK mehrfach nachgewiesen worden war.

Heute wissen wir, daß Autophosphorylierung in der Tat in vielen Fällen ein wichtiger Regulationsmechanismus für Proteinkinasen ist. Vielfach sind sogar die molekularen Details bekannt und verstanden¹⁴³. Im Falle der CK2 jedoch blieben alle Versuche, der obengenannten Autophosphorylierung wie auch einer eventuellen Fremdphosphorylierung durch eine andere Proteinkinase eine regulatorische Funktion zuzuordnen, ohne positives Ergebnis¹⁴⁴.

11.8.3 Konstitutive Aktivität der CK2

Hinsichtlich der CK2-Regulation läßt sich zusammenfassend feststellen, daß alle bisher angesprochenen Regulationsmechanismen für Proteinkinasen (Variation der Quartärstruktur durch Assoziation/Dissoziation von Untereinheiten, Bindung von „second messenger“-Substanzen wie cAMP, cGMP oder Ca²⁺, Auto- oder Fremdphosphorylierung) auf CK2 nicht zutreffen. Anders ausgedrückt: Wann immer CK2 α *in vivo* synthetisiert wird, dann ist sie auch aktiv; ein inaktiver Zustand des Enzyms ist unter physiologischen Bedingungen nicht bekannt. Diese bemerkenswerte und unter Proteinkinasen ungewöhnliche Eigenschaft wird auch als „konstitutive Aktivität“ bezeichnet.

11.8.4 Proteinkinasen als Onkogen-Produkte: die Entdeckung der Protein-Tyrosinkinasen

Das markanteste Beispiel der 70er Jahre für Autophosphorylierung war das Produkt jenes bereits erwähnten *src*-Gens aus dem RSV-Virus. Dieses Gen stammt ursprünglich aus einer Wirtszelle¹⁴⁵, wo es u.a. an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt ist. Die virale Version des *src*-Gens ist leicht verändert und bewirkt in dieser Form die Transformation einer befallenen Zelle in eine Tumorzelle. Wegen seiner Molmasse (60 kDa) und seiner Phosphorylierung wurde dieses Protein mit dem Kürzel „pp60“ belegt¹⁴⁶.

Das *src*-Genprodukt besitzt Proteinkinaseaktivität und stellte somit die erste direkte Verbindung zwischen der Proteinkinaseforschung und der Tumorforschung her, jedoch auf eine völlig überraschende Weise. Während es nämlich zunächst so schien, als würde pp60 ähnlich wie alle bis dahin bekannten Proteinkinasen Serin- oder Threoninseitenketten als Phospho-Akzeptoren verwenden, wurde bald erkannt, daß es sich in Wahrheit um eine Protein-Tyrosinkinase^{147,148,149} handelt. Sie bzw. das homologe Enzym aus der Wirtszelle wird oft als „Src-Kinase“ bezeichnet.

Dieser Befund war zunächst proteinchemisch ein Meilenstein, denn Phosphotyrosin war bis dahin gänzlich unbekannt, weil es, wie sich später herausstellte, bei der Analyse von Proteinhydrolysaten immer durch das viel häufigere Phosphothreonin überlagert gewesen war¹⁵⁰. Vor allem aber war mit dieser Protein-Tyrosinkinase erstmals eine Proteinkinase als Produkt eines Onkogens identifiziert worden.

Nach der Src-Kinase wurden bald weitere virale Protein-Tyrosinkinasen mit onkogenem Potential sowie auch deren Homologe in den befallenen Wirtszellen gefunden¹⁵⁰. Die bekannteste von ihnen ist die sogenannte Abl-Kinase, die ebenfalls Autophosphorylierungsaktivität besitzt^{151,152}. Aus heutiger Sicht bilden Src- und Abl-Kinase den Kern der Gruppe der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen.

In engem zeitlichen und inhaltlichen Zusammenhang mit diesen Entwicklungen stand die Entdeckung, daß der „epidermal growth factor“-Rezeptor (EGF-Rezeptor), ein Membranprotein, an des-

sen extrazelluläre Domäne der epidermale Wachstumsfaktor bindet und dadurch Zellwachstum auslöst, ebenfalls eine Proteinkinase ist¹⁵³. Wie im Falle der Src-Kinase dachte man zunächst an eine normale Ser/Thr-Kinase; erst als dort der Fehler offenbar geworden war, fand man im Jahre 1980, daß auch die EGF-Rezeptorkinase Tyrosinseitenketten phosphoryliert¹⁵⁴. Zwei Jahre später wurde mit dem Insulinrezeptor die wohl bekannteste Rezeptor-Tyrosinkinase¹⁵⁵ entdeckt.

Damit war die Tür zur großen Gruppe der Rezeptor-Tyrosinkinasen und zum Verständnis eines der wichtigsten Prinzipien der Signaltransduktion durch die Zellmembran hindurch geöffnet, auch wenn sich - wie Edwin Krebs in seinem Nobelpreisvortrag später zugestehen mußte⁹⁴ - die detaillierte Ausarbeitung dieser Signalketten als überraschend schwierig herausstellen sollte. Trotzdem ist die Entdeckung der Protein-Tyrosinkinasen in ihrer wissenschaftsgeschichtlichen Bedeutung mit derjenigen der CAPK zu vergleichen, denn ebenso wie jene hat sie der Proteinkinase-Forschung eine neue Dimension gegeben.

Davon hat - wie die weitere Darstellung zeigen wird - auch die Erforschung der CK2 profitiert, auch wenn sie weiterhin nicht in vorderster Linie des Interesses stand. Ein erwähnenswertes Detail ist, daß sowohl die Src-Kinase¹⁵⁶ als auch die EGF-Rezeptorkinase¹⁵⁷ neben der CK2 zu den wenigen Proteinkinasen gehören, bei denen duale Cosubstratspezifität beobachtet worden ist.

11.9 Zusammenfassung

Während des überwiegenden Teils der 70er Jahre wurde Proteinkinaseforschung mit klassischen Methoden der Biochemie betrieben und stand inhaltlich unter dem Eindruck der CAPK-Entdeckung und des „Second-messenger“-Konzeptes. Proteinkinasen wurden aus diversen natürlichen Quellen gewonnen und hinsichtlich ihrer Substratspezifitäten und ihrer Abhängigkeit gegenüber cAMP und anderen sekundären Botenstoffen charakterisiert.

Parallel dazu und unabhängig davon wurden mehrere Gene entdeckt, die eng mit dem eukaryontischen Zellzyklus korreliert sind und die onkogenes Potential besitzen. Die Expressionsprodukte dieser Gene sollten sich Ende 70er und in den 80er Jahren als Proteinkinasen, und zwar teilweise als Protein-Tyrosinkinasen erweisen.

Die wichtigsten Neuerungen im Bereich der Caseinkinasen waren die chromatographische Trennung von CK1 und CK2 und deren getrennte Charakterisierung, die Entdeckung von CK2 α und CK2 β sowie die Identifizierung der ersten endogenen CK2-Substrate.

12 „Caseinkinase 2“: die CK2 der 80er Jahre

12.1 Sequenzen, Tendenzen und Konsequenzen

Aus dem CK2-Namenswarr der späten 70er und frühen 80er Jahre gingen die Bezeichnungen „Caseinkinase 2“ und „Caseinkinase II“ mit den Abkürzungen CK2 und CKII als Sieger hervor. Die Festlegung auf einen unspezifischen Namen mit geringer biochemischer Aussagekraft war insofern naheliegend, weil dadurch Festlegungen bezüglich des Regulationsverhaltens, einer zellulären Funktion oder eines physiologischen Substrates vermieden wurden. Sie paßte obendrein zum Trend einer Zeit, in

der die neuartigen, in den 70er Jahren entwickelten Methoden der molekularen Genetik eingesetzt wurden, mit denen sich Proteine eindeutig über ihre DNA- und Aminosäuresequenzen identifizieren ließen, ohne sie weitgehend biochemisch charakterisieren zu müssen.

Die molekulare Genetik hatte jedoch nicht nur eine analytische, sondern auch eine präparative Seite. Sie erlaubte den Einstieg in eine „synthetische Biologie“, d.h. die Möglichkeit, Proteine in geeigneten Wirtszellen in großer Menge zu produzieren und sie darüber hinaus gezielt zu verändern. Wie wir später sehen werden, kamen diese neuen präparativen Techniken im Falle der CK2 erst in den 90er Jahren zur Entfaltung.

Weitere methodische Meilensteine, die ab Ende der 70er die Proteinkinaseforschung und schließlich auch die CK2-Forschung ergriffen haben, waren:

- die moderne Immunologie, mit der Möglichkeit, poly- und monoklonale Antikörper zu erzeugen und mit ihrer Hilfe Proteine oder auch nur einzelne Bereiche wie z.B. Phosphoaminosäuren hochspezifisch und empfindlich zu detektieren
- die Festphasensynthese von Peptiden mit beliebigen Aminosäuresequenzen, also insbesondere auch von Peptidsubstraten für Proteinkinasen. Durch sequenz-optimierte Substratpeptide gelang es, die Empfindlichkeit und Spezifität von Proteinkinase-Aktivitätstesten erheblich zu steigern¹⁵⁸.
- die Zellkulturtechnik und die Entwicklung zellulärer Testsysteme, die sich als Voraussetzung für die Ausarbeitung von Signaltransduktionskaskaden erweisen sollte.

12.2 Die biochemische Ähnlichkeit und die Kreuzreaktivität von Antikörpern zeigen, daß CK2 evolutionär hochkonserviert ist

Nachdem man CK2 über katalytische Aktivitätsteste eindeutig identifizieren und chromatographisch reinigen konnte, war es vergleichsweise einfach, diese Prozeduren zu verwenden, um verschiedenste Organismen und Gewebe nach CK2 abzusuchen. So ist das Enzym bis Mitte der 80er Jahre aus mindestens zehn verschiedenen Säugetierquellen⁶¹, aber auch aus Insekten¹⁵⁹, Hefe¹⁶⁰ und Tabakpflanzenzellen¹⁶¹ isoliert und charakterisiert worden. Dabei fiel auf, daß die verschiedenen Präparationen hinsichtlich Molmasse, Quartärstruktur, Substrat- und Cosubstratspezifität sowie Hemmbarkeit durch Heparin verblüffend ähnlich waren.

Um diesen Befund zu untermauern, wurden 1984 - und damit deutlich vor den ersten Primärstrukturanalysen - erstmals CK2-spezifische polyklonale Antikörper benutzt, um die Verwandtschaft zwischen CK2-Enzymen aus verschiedenen Organismen zu überprüfen¹⁶². Die Herstellung derartiger Antikörper gegen CK2 war bereits 1981 publiziert worden¹⁶³. Nunmehr ergab sich bei Kreuzreaktivitätsstudien, daß Antikörper gegen CK2 aus Kalbsthymus und aus *Drosophila melanogaster* sowohl CK2 α als auch CK2 β aus dem jeweils anderen Organismus erkennen können¹⁶². 1987 wurde Hefe-CK2 mit ähnlichem Ergebnis in diese Studien einbezogen¹⁶⁴. Auf diese Weise wurde erstmals auf nicht-enzymologische Art und Weise gezeigt, daß CK2 - und zwar offensichtlich sowohl CK2 α als auch CK2 β - in der Evolution hochkonserviert ist.

Gegen Ende des Jahrzehnts wurden immunologische Methoden auch eingesetzt, um die subzelluläre Verteilung von CK2 zu untersuchen⁶⁰. Verstärkte Bedeutung erhielten sie aber erst in den 90er Jahren, nachdem CK2 α und CK2 β rekombinant produziert und zur Herstellung monoklonaler, untereinheiten-

spezifischer Antikörper verwendet worden waren.

12.3 CK2 α gehört zur Superfamilie der „eukaryontischen Proteinkinasen“

Der Name „Caseinkinase II“ war bereits voll etabliert, als 1987 die ersten Aminosäuresequenzen zweier CK2-Untereinheiten, nämlich der CK2 α und der CK2 β aus *Drosophila melanogaster* (*dmCK2 α* und *dmCK2 β*) publiziert wurden¹⁶⁵. Diese Arbeit bestätigte erstmals auf Sequenzebene die früheren Erkenntnisse, daß CK2 α die katalytisch aktive Untereinheit der CK2 ist, denn die CK2 α -Sequenz erwies sich als homolog zu derjenigen der CAPK und anderer Proteinkinasen.

Bereits fünf Jahre zuvor hatten Barker & Dayhoff¹⁶⁶ berichtet, daß CAPK und die in viralen *src*-Genen codierten Tyrosinkinase eine geringe, aber doch signifikante Ähnlichkeit in ihren Aminosäuresequenzen besitzen. Diese Erkenntnis war angesichts der unterschiedlichen Aminosäurespezifitäten (Serin/Threoninkinase einerseits, Tyrosinkinase andererseits) überraschend, verfestigte sich jedoch anschließend immer mehr.

In den Folgejahren wurden nach der Etablierung neuartiger molekulargenetischer Techniken zunehmend neue Sequenzen eukaryontischer Proteinkinasen veröffentlicht. So standen Hanks *et al.*¹⁶⁷ 1988 bereits 65 verschiedene EPK-Sequenzen - unter ihnen die von *dmCK2 α* - für einen multiplen Vergleich zur Verfügung. Das wichtigste Ergebnis dieses Vergleiches war, daß die EPKs einen „katalytischen Kern“ (oftmals auch „katalytische Domäne“ im Sinne von Sequenzdomäne genannt) mit einer Größe von ca. 250 bis 300 Aminosäuren besitzen.

Darüber hinaus definierten die Autoren elf sogenannte Subdomänen, in denen die Sequenzen besonders gut konserviert sind¹⁶⁷. Diese Einteilung, die 1995 von Hanks & Hunter² noch auf zwölf Subdomänen erweitert wurde, war seinerzeit nützlich, um variable und konservierte Regionen in den EPKs voneinander zu unterscheiden, und wurde in der Folgezeit viel benutzt. Gleichwohl ist sie mittlerweile, wo es möglich ist, eine EPK nach strukturellen Kriterien in Faltungsdomänen und Sekundärstrukturelemente aufzugliedern, strenggenommen überflüssig. Sie wird zwar vor allem für genomweite Sequenzanalysen noch immer benutzt, wird jedoch in dieser Arbeit nicht mehr verwendet.

12.4 CK2 β besitzt fast keine näheren Verwandten

Anders stellte sich die Situation bei der CK2 β dar: Bereits Saxena *et al.*¹⁶⁵ bemerkten 1987, daß *dmCK2 β* keine Homologen unter den damals bekannten Aminosäuresequenz besitzt. An diesem Befund, der in demselben Jahr für Rinder-CK2 β ¹⁶⁸ und 1989 für humane CK2 β ^{169,170} bestätigt wurde, hat sich bis heute nichts Grundlegendes geändert. Lediglich auf den Geschlechtschromosomen von *Drosophila* wurden später Gene entdeckt, die eine signifikante Homologie zu CK2 β aufweisen: Eines davon ist das sogenannte Stelat-Gen¹⁷¹, das in mehreren Kopien vorkommt und normalerweise inaktiv ist, dessen Expression jedoch in männlichen Tieren zu Abnormalitäten bei der Spermatogenese führt. Interessanterweise bildet dabei das Expressionsprodukt Kristalle, eines der wenigen Beispiele für die Kristallisation eines Proteins *in vivo*¹⁷². Im Normalfalle wird diese Expression des Stelat-Gens unterdrückt durch ein Suppressor-Protein¹⁷³, das ebenfalls homolog zur CK2 β ist.

12.5 CK2 α gehört zur CMGC-Familie der eukaryontischen Proteinkinasen

Aus der großen Übersicht von Hanks & Hunter² stammt auch eine erste sequenzbasierte Klassifizierung der EPKs in Familien. Die CK2 α wurde dabei der CMGC-Familie zugerechnet, deren Benennung auf vier ihrer Unterfamilien zurückgeht: die cyclinabhängigen Kinasen (CDK), die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen), die zur Glycogensynthase-Kinase-3 (GSK3) ähnlichen Kinasen und die CDK-ähnlichen Kinasen (CLK). Allerdings liegt die Sequenzidentität der CK2 α verglichen mit einzelnen Vertretern dieser Proteinkinasen bei höchstens 35 %.

Mit der GSK3 ist ein markantes Mitglied der CMGC-Familie bereits erwähnt worden, dessen zentrale Rolle im Stoffwechsel in den vergangenen Jahren immer offenkundiger geworden ist¹⁷⁴. In den folgenden Kapiteln sollen auch die cyclinabhängigen Kinasen und die MAP-Kinasen vorgestellt werden, die von ähnlich großer physiologischer Bedeutung sind. In jedem Falle bleibt festzuhalten, daß die nächsten Verwandten der CK2 α unter den eukaryontischen Proteinkinasen zu den physiologisch wichtigsten Vertretern dieser Enzym-Superfamilie gehören. Dieser Befund ist eines der Indizien, die für eine herausragende Rolle der CK2 sprechen.

12.6 Zellzykluskontrolle durch cyclinabhängige Proteinkinasen

Bei der intensiven genetischen Erforschung des Zellzyklus' von *Saccharomyces cerevisiae* und von *Schizosaccharomyces pombe* in den 70er Jahren waren zwei Gene als besonders wichtig aufgefallen: *CDC28* aus *S. cerevisiae* und *cdc2* aus *S. pombe*, die später als homolog zueinander und als gegeneinander austauschbar erkannt wurden. Der erste Hinweis, daß diese Gene Proteinkinasen codieren, wurde 1984 erbracht, und zwar ganz im Stile des neuen Zeitalters durch DNA-Sequenzierung und Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit den Sequenzen von CAPK und einer weiteren EPK¹⁷⁵. Erst ein Jahr danach folgte der biochemische Nachweis, nämlich die Detektion einer serin/threoninspezifischen Proteinkinaseaktivität¹⁷⁶. Das erste zu dieser Proteinkinase homologe Enzym im Menschen, die spätere CDK1, wurde 1987 entdeckt¹⁷⁷. Schließlich wurde 1988 gezeigt, daß der Anfang der 70er Jahre entdeckte „M-Phase-Promoting-Factor“ (MPF), eine *cdc2*-verwandte Proteinkinase enthält^{178,179}.

Unabhängig von diesen Entwicklungen wurden Anfang der 80er Jahre in befruchteten Seeigelleiern Proteine entdeckt, deren intrazelluläre Konzentrationen parallel zum Zellzyklus oszillieren und die daher den Namen „Cycline“ erhielten¹⁸⁰. In derselben Publikation aus dem Jahre 1983 wurde erstmals angedeutet, daß es möglicherweise eine enge Beziehung zwischen diesen Cyclinen und dem MPF geben könnte, denn der MPF ist ähnlichen Fluktuationen unterworfen. Diese damals sehr gewagte Spekulation erwies sich gleichwohl 1989 als korrekt, als nämlich gezeigt wurde, daß der MPF ein Heterodimer aus einer *cdc2*-verwandten Proteinkinase und einem Cyclinmolekül ist¹⁸¹.

Komplexbildung mit Cyclinen ist eine notwendige - allerdings nicht hinreichende - Bedingung zur Aktivierung aller *cdc2*-verwandten Proteinkinasen, die daher seit 1991 cyclinabhängige Proteinkinasen (CDKs) genannt werden. Die Inaktivierung des Komplexes im Zellzyklus erfolgt durch Ubiquitinierung des jeweiligen Cyclins und anschließende Proteolyse am Proteasom¹⁸². Eine Bedingung dafür ist die Existenz einer bestimmten Erkennungssequenz, der sogenannten „destruction box“¹⁸².

Die Entdeckung des CDK/Cyclinsystems und weiterer Komponenten der Zellzykluskontrolle war in zweierlei Hinsicht inspirierend für die CK2-Forschung. Erstens drängte sich die Frage auf, ob auch

die CK2 direkt am Zellzyklus mitwirkt, indem sie z.B. Zellzykluskomponenten phosphoryliert oder umgekehrt indem sie von den CDKs oder anderen zellzyklus-typischen Proteinkinasen phosphoryliert und reguliert wird und damit auch zellzyklus-parallelen Oszillationen unterliegt.

Und zweitens wurde mit den Cyclinen ein neues Prinzip für die Kontrolle einer Proteinkinaseaktivität offenbart: Denn wie gerade angedeutet, wird der aktive CDK/Cyclinkomplex nicht etwa durch einfache Dissoziation inaktiviert, sondern durch gezielte Proteolyse der regulatorischen Komponente. Dieses Beispiel war angesichts des latenten Rätsels der CK2-Regulation verständlicherweise anregend für die CK2-Forschung, denn es eröffnete die Möglichkeit, daß es einen ähnlichen Kontrollmechanismus auch im Falle des CK2-Holoenzym geben könnte. Um diese Möglichkeit genauer zu untersuchen, bedurfte es allerdings der gereinigten isolierten Untereinheiten CK2 α und CK2 β , die erst nach heterologer Expression ihrer Gene ab Anfang der 90er Jahre zur Verfügung standen.

12.7 MAP-Kinasen und ihre Auswirkung auf die CK2-Forschung

12.7.1 MAP-Kinase-Signalwege und das Phänomen der dualen Spezifität

Mit den Rezeptor-Tyrosinkinasen war zu Beginn der 80er Jahre ein neuer Typ von Membranrezeptoren gefunden worden (s. Kap. 11.8.4), der seine Signale nicht über „Second-messenger“-Substanzen weiterleitet, der aber im Endeffekt dennoch dazu führt, daß bestimmte Proteine durch Aktivierung entsprechender Serin/Threoninkinasen phosphoryliert werden. Die Hoffnung vieler Wissenschaftler, daß sich nun die den Rezeptor-Tyrosinkinasen nachgeschalteten, also „stromabwärts“ liegenden Glieder der Signalflüsse fast von selbst offenbaren würden⁸⁷, erfüllte sich nicht. So schrieben Hunter & Cooper¹⁵⁰ noch 1985, daß trotz gewisser Fortschritte bei der Identifizierung intrazellulärer Substrate von Protein-Tyrosinkinasen die Phosphorylierung in keinem Falle physiologisch signifikant gewesen sei.

Als erfolgreicher sollte sich dagegen der Blick „stromaufwärts“ von den Endgliedern der Ketten erweisen. Eines dieser Endglieder war das ribosomale Protein S6, von dem seit 1980 bekannt war, daß es nach Insulineinwirkung phosphoryliert wird¹⁸³. Die entsprechende „S6-Kinase“ wurde 1983 charakterisiert, und es wurde zunächst vermutet, daß sie identisch mit der CK1 sei¹⁸⁴. Ein Argument für diese später als falsch erkannte - Hypothese war, daß die S6-Kinase wie CK1 unabhängig gegenüber cAMP und anderen sekundären Botenstoffen ist. Vielmehr stellte sich bald heraus, daß diese und eine zweite identifizierte S6-Kinase selbst durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung kontrolliert werden^{185,186}, daß es also mindestens eine „S6-Kinase-Kinase“ geben muß.

Unabhängig von diesen Arbeiten wurde festgestellt, daß durch Insulinstimulation auch Muskelproteine wie das „Mikrotubuli-assoziierte Protein 2“ (MAP-2) phosphoryliert werden¹⁸⁷. Die zugehörige „MAP-2-Kinase“ wird einerseits selbst durch Phosphorylierung aktiviert¹⁸⁸, andererseits erwies sie sich als die gesuchte „S6-Kinase-Kinase“¹⁸⁹. Mit der MAP-2-Kinase wurde also der Kern einer über mehrere Phosphorylierungsstufen laufenden, insulinabhängigen Signaltransduktionskaskade sichtbar, die daher auch „MAPK-Signalkaskade“ genannt wird¹⁸⁶. In Abwandlung der ursprünglichen Namensgebung, steht dabei „MAPK“ für „mitogen-aktivierte Proteinkinase“, wobei Mitogene Hormone und Wachstumsfaktoren sind, die die Zellteilung (Mitose) anregen.

Nach der MAP-2-Kinase wurde später eine Vielzahl weiterer MAP-Kinasen entdeckt, die teilweise

auch auf andere extrazelluläre Signale als die klassischen Mitogene reagieren^a. Alle MAP-Kinasen sind auf Sequenzebene eng miteinander verwandt und wie CK2 α Mitglieder der CMGC-Familie der EPKs.

Zu den Besonderheiten der MAP-Kinasen gehört, daß sie zur vollen Aktivierung sowohl an einer Serin- als auch an einer Tyrosinseitenkette phosphoryliert sein müssen^{190,191}. Für diese doppelte Phosphorylierung ist jeweils eine bestimmte „MAP-Kinase-Kinase“ (MAPKK) zuständig. Diese MAPKKs genießen eine Sonderstellung unter den EPKs, weil sie erstens substratspezifisch sind und jeweils nur eine bestimmte MAP-Kinase phosphorylieren und weil sie zweitens „duale Spezifität“ besitzen. Sie sind nämlich sowohl für die Serin- als auch für die Tyrosinphosphorylierung der entsprechenden MAP-Kinase zuständig.

Die bisher angedeutete Phosphorylierungs- und Aktivierungskaskade „MAPKK \rightarrow MAPK \rightarrow S6-Kinase \rightarrow S6“ besitzt mindestens eine weitere Ebene¹⁸⁶. So müssen auch die MAPKKs durch Phosphorylierung aktiviert werden. Die zuständigen Enzyme werden „MAP-Kinase-Kinase-Kinasen“ (MAP3K) genannt. Zu ihren bekanntesten Vertretern gehören „c-Mos“ und „A-Raf“, die uns als potentielle, CK2 α -kompetitive Wechselwirkungspartner der CK2 β noch einmal begegnen werden (s. Kap. 13.6.6).

12.7.2 Duale Spezifität der CK2?

Die MAP-Kinase-Kinasen sind die Paradebeispiele für Proteinkinasen mit „dualer Spezifität“. Typischerweise werden die EPKs hinsichtlich ihrer Phosphoakzeptor-Spezifität in drei Gruppen eingeteilt: die Protein-Serin/Threonin-Kinasen, die Protein-Tyrosinkinase und eben die Proteinkinasen mit dualer Spezifität, die sowohl proteingebundene Serin- und Threonin- als auch Tyrosinreste phosphorylieren können, sofern die sequentiellen und strukturellen Determinanten in der Umgebung der Phosphorylierungsstelle stimmen.

Die EPKs mit dualer Spezifität sind bei weitem die kleinste der drei genannten Gruppen. Trotzdem ist das Phänomen möglicherweise weiter verbreitet als gemeinhin angenommen¹⁹². So wurde für die Insulinrezeptor-Kinase, eine EPK also, die als klassische Tyrosinkinase gilt, bereits 1982 die (Auto-)Phosphorylierung von Serinseitenketten berichtet¹⁵⁵, ein Befund, der in jüngerer Zeit bestätigt wurde^{193,194}.

Umgekehrt ist auch bei der CK2, die in der Literatur fast durchgängig als Serin/Threoninkinase bezeichnet wird, die Fähigkeit zur Tyrosin-Phosphorylierung beobachtet worden. Erstmals berichteten Chardot *et al.*¹⁹⁵ 1995 darüber. Sie hatten duale Spezifität für die Autophosphorylierung der CK2 aus der Hefe *Yarrowia lipolytica* gefunden, und zwar insbesondere in Gegenwart von Mn²⁺-Ionen. Die CK2 einer anderen Hefe, *Saccharomyces cerevisiae*, phosphoryliert einen spezifischen Tyrosinrest in einem nukleolaren Protein, dem Immunophilin Fpr3¹⁹⁶. In einer genaueren Analyse mit Fpr3-abgeleiteten Peptiden ist gezeigt worden, daß das Ausmaß der Tyrosin-Phosphorylierung von der genauen Sequenzumgebung abhängt¹⁹⁷. Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurde auch für die CK2 α -verwandten MAP-Kinasen berichtet, daß sie sich mit dualer Spezifität autophosphorylieren können⁸⁷.

Trotz dieser Befunde ist bis heute nicht klar, ob die duale Spezifität von CK2 ein *In-vitro*-Artefakt ist oder ob sie physiologische Bedeutung besitzt. In dem Zusammenhang ist wiederholt auf die Tatsache verwiesen worden, daß Hefezellen zwar Phosphotyrosin-Phosphatasen, jedoch keine typischen Protein-Tyrosinkinase besitzen¹⁹⁸, daß mithin CK2 die Aufgabe der Tyrosin-Phosphorylierung in Hefen

^aDie MAP-Kinasen werden daher auch „extrazellulär-regulierte Proteinkinasen“ (ERK) genannt.

zukommt. Das Fehlen echter Protein-Tyrosinkinasen in Hefen wird auch in neueren Analysen durchsequenzierter Genome bestätigt^{199,200}.

12.7.3 CK2-Stimulation durch Hormone und andere exogene Faktoren

Die Entdeckung der MAPK-Signalwege hatte Ende der 80er Jahre neue Hoffnungen erzeugt, daß auch CK2 in ähnlicher Weise in Signaltransduktionskaskaden eingebunden sein könnte. Dementsprechend wurde an einer Fülle von Testsystemen untersucht, wie sich die CK2-Aktivität in Zellkulturen oder in ganzen Organen nach der Einwirkung von Hormonen, Wachstumsfaktoren oder anderer exogener Faktoren verändert. Beispielhaft sei nur die - später allerdings zurückgezogene²⁰¹ - Arbeit von Sommercorn *et al.*²⁰² aus dem Jahre 1987 genannt. Die Autoren dieser Studie glaubten festgestellt zu haben, daß die Einwirkung von Insulin in physiologischen Konzentrationen zu einer raschen Steigerung der CK2-Aktivität im Cytosol der betreffenden Zellen führt. Diese Stimulierung wurde auf eine kovalente Modifizierung - möglicherweise eine Phosphorylierung - zurückgeführt²⁰².

Die Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten zur CK2-Stimulation durch exogene Faktoren sind von Tuazon & Traugh⁴⁴ und noch umfassender von Issinger⁶⁰ resümiert worden. In sehr vielen Fällen sind deutliche Effekte festgestellt worden, jedoch sind die Beobachtungen nicht immer konsistent. Zusammenfassend hat sich jedoch in der Literatur die Erkenntnis verfestigt, daß die Stimulierung der Zellproliferation durch mitogene Faktoren mit einer Hochregulation der CK2-Aktivität korreliert ist. Aus jenen Studien Ende der 80er Jahre stammt mithin die - heute in fast keinem CK2-Artikel fehlende - Feststellung, daß CK2 in die Zellproliferation involviert sei. Ein dazugehöriger geschlossener Signalweg, in der CK2 eine ähnliche Schlüsselposition wie die MAP-Kinasen in den MAPK-Signalwegen einnimmt, ist jedoch nie ausgearbeitet worden.

12.8 Die Konsensussequenz für CK2-Substrate

Wie wir im Kapitel 11.5.5 gesehen haben, wurden die frühen Befunde zur Substraterkennung durch CK2 bereits 1982 zu einer ersten Erkennungssequenz zusammengefaßt⁶¹. Sie beruhte noch gänzlich auf den bis dahin gefundenen Proteinsubstraten.

Ab 1984 jedoch wurden Studien mit synthetisch hergestellten Peptiden publiziert^{203,204,205}, deren Ziel es war, eine optimale CK2-Erkennungssequenz zu ermitteln. Ein Hintergrund dieser Bestrebungen war die Erkenntnis, daß das Standardsubstrat Casein nicht sehr spezifisch ist und von vielen der damals bekannten Proteinkinasen (u.a. CAPK, CK1, CK2, Phosphorylase-Kinase, Insulinrezeptorkinase) phosphoryliert werden kann. So entwarfen Kuenzel & Krebs²⁰⁵ ein Peptid mit der Sequenz Arg-Arg-Arg-Glu-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Glu, das hochspezifisch für CK2 ist.

Diese Studien mit Peptidsubstraten wurden zur Ermittlung einer minimalen CK2-Erkennungssequenz (Konsensussequenz) ausgeweitet^{206,207}. Als notwendige und gleichzeitig hinreichende Bedingung für die Phosphorylierung durch CK2 erkannten Marchiori *et al.*²⁰⁷ die Existenz einer einzigen negativ geladenen Aminosäure an der (p+3)-Position, d.h. der dritten Position C-terminal von der Phosphorylierungsstelle. Auf diesen Befunden beruht der Eintrag der Konsensussequenz für CK2-Substrate in

PROSITE²⁰⁸, einer vielbenutzten Datenbank mit biologisch signifikanten Sequenzprofilen^a. Er lautet:

[ST]-X-X-[DE]

Dabei ist das fett gedruckte, N-terminale Serin bzw. Threonin die Phosphorylierungsposition, die im folgenden auch mit dem Buchstaben „p“ symbolisiert wird.

Es muß freilich betont werden, daß dies lediglich die Minimalsequenz für die Substraterkennung durch CK2 ist. Generell sind die Aktivitäten höher, wenn N- und/oder C-terminal von der Phosphorylierungsstelle weitere Aminosäuren mit negativer Ladung vorkommen. Darüber hinaus kann die negativ geladene Seitenkette an Position (p+3) auch ein zuvor phosphoryliertes Serin oder Threonin sein.

Der obengenannte PROSITE-Eintrag stammt von 1991, d.h. an jenen Erkenntnissen aus den 80er Jahren hat sich seither wenig geändert. In der neuesten Analyse zu diesem Thema von Meggio & Pinna⁴⁶ aus dem Jahre 2003 wird allerdings neben der (p+3)-Position auch die (p+1)-Position herausgestellt. Von allen Positionen um die Phosphorylierungsstelle herum sind (p+1) und (p+3) die häufigsten mit negativer Ladung. In den wenigen bekannten Fällen, in denen die (p+3)-Seitenkette nicht negativ geladen ist, muß es die (p+1)-Position auf jeden Fall sein und umgekehrt.

12.9 Proteinphosphorylierung in Bakterien: die ersten Protein-Histidinkinasen

Während einerseits in den 80er Jahren jene Superfamilie der eukaryontischen Proteinkinasen etabliert wurde, setzte sich andererseits gegen Ende des Jahrzehnts die Erkenntnis durch, daß Proteinphosphorylierung kein rein eukaryontisches Phänomen ist. Erste Hinweise auf die Phosphorylierung von Serin und Threonin in bakteriellen Proteinen waren bereits 1978 geliefert worden²⁰⁹. 1985 kam der erste Bericht über bakterielles Phosphotyrosin und eine entsprechende Kinaseaktivität hinzu²¹⁰.

Phosphoserin, -threonin und -tyrosin sind bei der klassischen sauren Hydrolyse von Proteinen stabil. Wie bereits im Kapitel 5 erwähnt, gilt dies jedoch nicht für alle Phosphoaminosäuren, insbesondere nicht für Phosphohistidin, das daher erst 1962 entdeckt wurde²¹¹. Mit entsprechender Verzögerung wurden daher die ersten dazugehörigen Enzyme, die Protein-Histidinkinasen, erst in den Jahren 1986 bis 1988 beschrieben^{212,213,214}.

Inzwischen sind die Protein-Histidin-Kinasen mit mehr als 500 Vertretern - überwiegend, aber keineswegs ausschließlich bakteriellen Ursprungs - zu einer „Superfamilie“ herangewachsen²¹⁵. Typischerweise funktionieren diese Enzyme innerhalb eines Zweikomponenten-Regulationssystems. Die Histidinkinase phosphoryliert sich zunächst selbst an einer konservierten Histidinseitenkette. Die N-Phosphonogruppe wird anschließend auf ein „Response-Regulatorprotein“ übertragen, und zwar auf die Seitenkette eines ebenfalls konservierten Aspartates. Meistens besitzt dieses „Response-Regulatorprotein“ noch eine „Output“-Domäne zur Weiterleitung des Signals, die mitunter enzymatische Aktivität haben kann. Die erste biologische Funktion, bei der dieses Prinzip der Signaltransduktion als

^aIn PROSITE-Mustern beziehen sich Einbuchstabenkürzel in Klammern immer auf dieselbe Sequenzposition. Dabei bedeuten eckige Klammern ein logisches ODER, geschweifte Klammern dagegen ein logisches NICHT.

Schlüsselement erkannt wurde, war die bakterielle Chemotaxis, jedoch sind mittlerweile diverse andere Wirkungen identifiziert worden²¹⁵.

12.10 Zusammenfassung

Umfassende Sequenzierungen und Sequenzvergleiche offenbarten die wichtigste Erkenntnis der Proteinkinaseforschung in den 80er Jahren, daß nämlich alle bis dahin bekannten Proteinkinasen - unter ihnen CK2 α - evolutionär miteinander verwandt sind und eine Enzym-Superfamilie, die sogenannten „eukaryontischen Proteinkinasen“, bilden. Gleichzeitig jedoch erbrachten die späten 80er Jahre Ergebnisse, die die Proteinkinaseforschung über die EPK-Superfamilie hinauswiesen, als nämlich die Protein-Histidinkinasen entdeckt wurden.

Als engste Verwandte der CK2 α unter den eukaryontischen Proteinkinasen wurden die cyclinabhängigen Proteinkinasen und die MAP-Kinasen identifiziert. Die Entdeckung der letztgenannten als zentrale Glieder der MAP-Kinase-Signaltransduktionskaskaden war ein weiterer wesentlicher Fortschritt der Proteinkinaseforschung in den 80er Jahren.

Im Gegensatz zur reichhaltigen CK2 α -Verwandtschaft konnten nach Publikation der ersten CK2 β -Sequenzen fast keine Homologe gefunden werden.

13 „Proteinkinase CK2“: die CK2 der 90er Jahre

13.1 Das andauernde Schattendasein der CK2 bewirkt eine letzte Umbenennung

Mit der Verleihung des Nobelpreises für Medizin an Edmond Fischer und Edwin Krebs im Jahre 1992 wurden nicht nur die Lebenswerke zweier Pioniere der Proteinkinaseforschung gewürdigt, sondern es wurde gleichzeitig die Bedeutung eines Forschungsgebietes dokumentiert, das 40 Jahre zuvor noch unbekannt gewesen war. In der wachsenden Gemeinde aktiver CK2-Forscher stieß diese Auszeichnung auf positive Resonanz, aber sie verstärkte auch das latente Unbehagen darüber, daß die CK2 trotz diverser Indizien für ihre wichtige physiologische Funktion und trotz ihrer langen Forschungsgeschichte nach wie vor ein Schattendasein in der Proteinkinaseforschung führte. Bezeichnenderweise wurde sie im Nobelvortrag der beiden Preisträger mit dem Titel „Protein phosphorylation and cellular regulation“ lediglich von Edmond Fischer kurz erwähnt und das, obwohl Edwin Krebs die CK2 in den 80er Jahren zu einem eigenen Arbeitsschwerpunkt gemacht hatte²¹⁶.

Um hier zumindest begrifflich Abhilfe zu schaffen, wurde daher auf einem ersten CK2-spezifischen Symposium 1994 in Heidelberg vereinbart, künftig von „Proteinkinase CK2“ zu sprechen, um die durch „Caseinkinase 2“ suggerierte Nähe zur Lebensmittelchemie und zu einem nicht-physiologischen Substrat zu eliminieren²⁸. Obwohl dies die erste und einzige koordinierte Umbenennung der CK2 im Laufe ihrer Forschungsgeschichte war, muß man im Rückblick von 10 Jahren feststellen, daß sich dieser Nomenklaturvorschlag nicht wirklich durchgesetzt hat. Es erscheint keine Publikation, in der der alte Name „Caseinkinase 2“ nicht zumindest am Rande erwähnt wird. Neuere Publikationen von Wissenschaftlern, die nicht der engeren CK2-Forschergemeinde angehören, verzichten zumeist ganz auf die neue Begrifflichkeit.

13.2 Globale und lokale CK2-typische Sequenzmuster

13.2.1 Neue Einsichten durch Bioinformatik

In den späten 80er und frühen 90er Jahren wurden zunehmend mehr CK2 α - und CK2 β -Sequenzen veröffentlicht. Manche Besonderheiten dieser Sequenzen fielen quasi unmittelbar auf. Um jedoch aus ihnen auch etwas subtilere biochemische Information zu extrahieren, kamen neuartige Verfahren der Informationstechnologie zum Einsatz, die zum Kristallisationskeim für die neue Disziplin „Bioinformatik“ wurden. Mit diesen Methoden konnten wertvolle neue Einsichten gewonnen werden, die teilweise zuvor nie aufgefallen waren (s. vor allem Kap. 13.2.3).

13.2.2 CK2 α und CK2 β sind hochkonserviert

Als Dobrowolska *et al.*²¹⁷ 1991 mit der CK2 α aus Mais (*Zea mays*) die erste Aminosäuresequenz einer pflanzlichen CK2-Untereinheit publizierten, lagen bereits CK2 α -Sequenzen aus sieben anderen Spezies - darunter Säugetiere, Insekten und Hefen - vor. Ein systematischer paarweiser Vergleich dieser acht CK2 α -Sequenzen offenbarte, daß das Protein sehr hoch konserviert ist: In keinem Falle betrug die Sequenzidentität weniger als 60 %²¹⁷.

Ein für diese Schrift erstellter multipler Sequenzvergleich (Abb. 5) mit allen 23 CK2 α -Sequenzen, die zur Zeit in der SWISS-PROT-Datenbank²¹⁸ abgelegt sind, unterstreicht die hohe Konservierung der CK2 α während der Evolution, die offensichtlich Folge eines entsprechend hohen Selektionsdruckes war. Gleichzeitig verdeutlichen die in Abb. 5 aufgeführten Organismen die ubiquitäre Verbreitung der Enzyms im Eukaryontenreich. Tatsächlich hat eine neuere vergleichende Analyse der EPK-Gene mehrerer eukaryontischer Genome ergeben, daß nur 51 von 209 EPK-Subfamilien überall vorkommen²¹⁹ und daß CK2 α zu einer dieser 51 Subfamilien gehört. Auch dies zeigt die Bedeutung des Enzyms für eukaryontische Zellen.

Im Falle der CK2 β ist die Konservierung nicht ganz so hoch. Erstens beträgt die minimale Sequenzidentität nur 45 %, und zweitens gibt es mehr große Insertionen und im C- und im N-terminalen Bereich beträchtliche Unterschiede zwischen den einzelnen Sequenzen (Abb. 6). Gleichwohl kann wie bei CK2 α davon ausgegangen werden, daß alle CK2 β -Proteine einen Kern mit ähnlicher Faltung besitzen.

Ähnlich wie die Konservierung der Sequenzen ist auch der ubiquitäre Charakter von CK2 β weniger strikt als der von CK2 α . So sind im Gegensatz zu CK2 α eukaryontische Organismen wie die ständigen oder zeitweisen Einzeller *Theileria parva* und *Dictyostelium discoideum* bekannt, die nicht über CK2 β verfügen. Auch die Tatsache, daß in Abb. 6 überhaupt CK2 β -Sequenzen aus Pflanzen auftauchen, war bis Mitte der 90er Jahre keineswegs sicher. Denn - wie im Kapitel 13.4.5 genauer dargelegt werden wird - war CK2-Aktivität aus pflanzlichen Quellen in den 80er Jahren nur als reine CK2 α isoliert worden. Erst 1994 konnten mit CK2 β und CK2 β ' aus *Arabidopsis thaliana* die ersten beiden pflanzlichen CK2 β -Gene identifiziert und sequenziert werden²²⁰.

Die vier *Arabidopsis*-CK2 β -Sequenzen fallen in Abb. 6 durch ihren deutlich verlängerten N-Terminus auf. Gleiches gilt in eingeschränktem Maße für je eines von zwei paralogen CK2 β -Proteinen in den beiden Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*. Ein zweiter Extremfall ist das Stellat-Protein aus *Drosophila melanogaster* (*dmStellat*), dessen C-Terminus etwa 30 Aminosäuren kürzer ist als derjenige menschlicher CK2 β . Die Tatsache, daß dieses Stellat-Protein *in vivo* nicht mit CK2 α assoziiert ist, war der Grund, warum im C-terminalen Bereich die Determinanten für die

CK2 α /CK2 β -Assoziation vermutet wurden und warum dieser Bereich in ein umfangreiches CK2 β -Mutageneseprogramm einbezogen wurde²²¹. Auf diese Mutagenesestudie wird im Verlauf dieser Schrift noch ebenso eingegangen wie auf einige andere der Sequenzbereiche, die in Abb. 5 und Abb. 6 farblich markiert worden sind.

13.2.3 CK2 β besitzt ein Zinkbindungsmotiv

Zu den interessanten Sequenzmustern, die Anfang der 90er Jahre aufgedeckt wurden, gehören im Falle der CK2 β vier absolut konservierte Cysteine (Abb. 6), die auch heute noch den Kern des CK2 β -Erkennungsmusters in PROSITE²⁰⁸ bilden:

C-P-x-[LIVMYA]-x-C-x-x-x-x-x-[LI]-P-[LIVMC]-G-x-x-x-x-x-x-x-x-V-[KR]-x-x-C-P-x-C

Die Anordnung dieser vier Cysteine entspricht einer typischen Zinkbindungsstelle, wie sie von vielen Proteinen vorzugsweise zur Bindung an DNA, aber auch zur Wechselwirkung mit anderen Proteinen ausgebildet wird^{222,223,224}. Diese Tatsache wurde interessanterweise in keiner der frühen Publikationen über CK2 β -Sequenzen^{165,168,169,170} erwähnt. Den ersten flüchtigen Literaturvermerk²²⁵ findet man für das Jahr 1993, und erst 1994 wurde die potentielle Zinkbindung durch CK2 β und ihre Funktion zur Etablierung einer Wechselwirkungsdomäne etwas genauer diskutiert²²⁶. In den Übersichtsartikeln zur CK2 kommt dieses wichtige Detail erstmals 1995 bei Allende & Allende⁵⁸ vor.

Der Grund für die langsame Rezeption dieses Wissens ist wohl, daß es bis dahin nie einen experimentellen Hinweis auf eine Zinkabhängigkeit der CK2 β gegeben hatte. Insbesondere war auch bei den De- und Renaturierungsexperimenten von Cochet & Chambaz⁴² aus dem Jahre 1983 nicht aufgefallen, daß Zinkionen nötig sind, um entfaltete CK2 β wieder in die korrekte Konformation zu bringen.

Tatsächlich wurde die hohe Affinität von CK2 β gegenüber Zinkionen erst Ende der 90er Jahre experimentell bestätigt. Bis dahin blieb sie eine Hypothese, die allerdings durch die damals neuartigen bioinformatischen Methoden der Mustererkennung und Sequenzanalyse sehr gut gestützt war.

Kürzel	Spezies	Sequenzidentität zu hsCK2α		-----N-terminales Segment-----					
		↓	Num.	hsCK2α: 1	3	10	20	30	39
hsCK2α	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	100,0	~~~~~	~~~~~MS	GPVP.SRARV	YTDVNTHRPR	EYWDYE.SHV	VEWG.NQDDY	
ocCK2α	Kaninchen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	99,2	~~~~~	~~~~~MS	GPVP.SRVRV	YTDVNTHRPR	EYWDYE.SHV	VEWG.NQDDY	
rnCK2α	Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>)	98,5	~~~~~	~~~~~MS	GPVP.SRARV	YTDVNTHRPR	EYWDYE.SHV	VEWG.NQDDY	
ggCK2α	Huhn (<i>Gallus gallus</i>)	98,0	~~~~~	~~~~~MS	GPVP.SRARV	YTDVNTHRPR	EYWDYE.SHV	VEWG.NQDDY	
mmCK2α	Maus (<i>Mus musculus</i>)	97,4	~~~~~	~~~~~MS	GPAAGSRARV	YAEVNSLRSP	EYWDYE.SHV	VEWG.NQDDY	
xlCK2α	Krallenfrosch (<i>Xenopus laevis</i>)	95,1	~~~~~	~~~~~MS	GPVP.SRARV	YTDVNTHRPR	EYWDYE.SHV	VEWG.NQDDY	
sfCK2α	Eulenfalter (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	88,8	~~~~~	~~~~~MT	MAVP.SRARV	YADVNSQRPR	EYWDYE.SYV	VDWG.NQEDY	
dmCK2α	Taufliege (<i>Drosophila melanogaster</i>)	88,7	~~~~~	~~~~~	~TLP.SAARV	YTDVNAHKPD	EYWDYE.NYV	VDWG.NQDDY	
hsCK2α'	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	85,9	~~~~~	~~~~~MP	GPAAGSRARV	YAEVNSLRSP	EYWDYE.AHV	PSWG.NQDDY	
mmCK2α'	Maus (<i>Mus musculus</i>)	85,6	~~~~~	~~~~~MP	GPAAGSRARV	YAEVNSLRSP	EYWDYE.AHV	PSWG.NQDDY	
btCK2α'	Rind (<i>Bos taurus</i>)	85,6	~~~~~	~~~~~MP	GPAARSARV	YAEVNSLRSP	EYWDYE.AHV	PSWG.NQDDY	
ggCK2α'	Huhn (<i>Gallus gallus</i>)	84,9	~~~~~	~~~~~MP	GPAAGSRARV	YAEVNSLRSP	EYWDYE.AHV	PSWG.NQDDY	
ceCK2α'	Fadenwurm (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	78,6	~~~~~	~~~~~	MPPIPSRARV	YAEVNSLRSP	EYWDYE.AHM	IEWG.NQDDY	
zmCK2α	Mais (<i>Zea mays</i>)	77,6	~~~~~	~~~~~	~~~~~MSKARV	YADVNVLRPK	EYWDYE.ALT	VQWG.EQDDY	
atCK2α	Ackerschmalwand (<i>A.thaliana</i>)	75,7	~~~~~	~~~~~	~~~~~MSKARV	YTDVNVVRPK	EYWDYE.SLV	VQWG.HQDDY	
atCK2α'	<i>Arabidopsis thaliana</i>	74,4	~~~~~	~~~~~	~~~~~MSKARV	YTDVNVIRPK	DYWDYE.SLN	VQWG.EQDDY	
atCK2α''	<i>Arabidopsis thaliana</i>	73,9	~~~~~	~~~~~	~~~~~MSKARV	YTEVNVIRPK	EYWDYE.SLI	IEWG.NQDDY	
ncCK2α	Schimmelpilz <i>Neurospora crassa</i>	71,5	~~~~~	~~~~~	~~~~~MARV	YADVQNMPR	AYWDYD.SVN	ISWG.VLENY	
ddCK2α	Schleimpilz <i>Dictyostelium discooidum</i>	69,8	~~~~~	~MNHSSKKNK	NRIILRNKARI	YCDVNLHKPK	EYWNYE.ALN	VKWE.TQDDY	
tpCK2α	Protozoen <i>Theileria parva</i>	69,2	MI...	DTDKSRKYP	KDLKIILPKT	YADVNSKKGP	EYWDYE.NIT	LKWN.VPDSY	
sCK2α	Bäckerhefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	66,6	~~~~~	~~~~~	KCRVWSEARV	YTNINLQRTF	EYWDYENT.V	IDWSTNPKDY	
spCK2α	Spaltheife (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	66,3	~~~~~	~~~~~MNQTE	AAPVVSRSRV	YAHVNEEMPR	EYWDYE.NMQ	EVFG.YQDNY	
sCK2α'	Bäckerhefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	59,9	~~~~~	PLPPSTLNQK	SNRVYSVARV	YKNACEERPQ	EYWDYEQGVT	IDWG.KISNY	
Konsensus						Y-----	-YW-Y-----		-----Y

Num. hsCK2α:	glycinreiche Region			basischer Strang			90		
	40	50	60	70	80	80			
hsCK2α	QLVRKLRGK	YSEVFEAINI	TNNEKVVVKI	LKPVKKKKIK	REIKILENLR	GG		
ocCK2α	QLVRKLRGK	YSEVFEAINI	TNNEKVVVKI	LKPVKKKKIK	REIKILENLR	GG		
rnCK2α	QLVRKLRGK	YSEVFEAINI	TNNEKVVVKI	LKPVKKKKIK	REIKILENLR	GG		
ggCK2α	QLVRKLRGK	YSEVFEAINI	TNNEKVVVKI	LKPVKKKKIK	REIKILENLR	GG		
mmCK2α	QLVRKLRGK	YSEVFEAINI	TNNEKVVVKI	LKPVKKKKIK	REIKILENLR	GG		
xlCK2α	QLVRKLRGK	YSEVFEAINI	TNNEKVVVKI	LKPVKKKKIK	REIKILENLR	GG		
sfCK2α	QLVRKLRGK	YSEVFEAINI	TNNEKVVVKI	LKPVKKKKIK	REIKILENLR	GG		
dmCK2α	QLVRKLRGK	YSEVFEAINI	TTEKCVVKI	LKPVKKKKIK	REIKILENLR	GG		
hsCK2α'	QLVRKLRGK	YSEVFEAINI	TNNERVVVKI	LKPVKKKKIK	REVKILENLR	GG		
mmCK2α'	QLVRKLRGK	YSEVFEAINI	TNNERVVVKI	LKPVKKKKIK	REVKILENLR	GG		
btCK2α	QLVRKLRGK	YSEVFEAINI	TNNERVVVKI	LKPVKKKKIK	REVKILENLR	GG		
ggCK2α	QLVRKLRGK	YSEVFEAINI	TNNERVVVKI	LKPVKKKKIK	REVKILENLR	GG		
ceCK2α	QLVRKLRGK	YSEVFEAGPKM	STDEKVVVKI	LKPVKKKKIK	REIKILENLR	GG		
zmCK2α	EVVRKVRGK	YSEVFEAGPKM	NNNEKCIKI	LKPVKKKKIK	REIKILQNL	GG		
atCK2α	EVVRKVRGK	YSEVFEAGPKM	NTNERCVIKI	LKPVKKKKIK	REIKILQNL	GG		
atCK2α'	EVVRKVRGK	YSEVFEAGPKM	NNNEKCIKI	LKPVKKKKIR	REIKILQNL	GG		
atCK2α''	EVVRKVRGK	YSEVFEAGPKM	NSKEKCIKI	LKPVKKKKIR	REIKILQNL	GG		
ncCK2α	EVVRKVRGK	YSEVFEAGPKM	VNYQKCVIKI	LKPVKKKKIK	REIKILQNL	GG		
ddCK2α	EIRKIRGK	YSEVFEAGPKM	KNNEKCVIKV	LKPVKKKKIK	REIKILQNL	GG		
tpCK2α	EIVRKIRGK	FSEVFEAGPKM	VTKDKCVIKI	LKPVKKKKIK	REIKILQNL	GG		
sCK2α	EIRKIRGK	YSEVFEAGPKM	DSKVKIVIKV	LKPVKKKKIK	REIKILTDL	NEKVPPTTL	FQKDYQYNTQ	KEDVLKFI	YIFDQPHNGH
spCK2α	EIRKIRGK	YSEVFEAGPKM	LNSKCIKIV	LKPVKKKKIK	REIKILQNL	GG		
sCK2α'	EIRKIRGK	YSEVFEAGPKM	VNNQKCVIKV	LKPVKMKKIY	RELKILQNL	GG		
Konsensus	---K-GRGK	-SEVF-----	---K-GRGK	LKPVK-KKI-	RE-KIL--L-	-----	-----	-----	-----G-

Num. hsCK2α:	katalytische Schleife									
	100	110	120	130	140	150	160	170	180	
hsCK2α	PNIIITLADIV	KDPVSRTPAL	VFEHVNTDF	KQLYQTLTDY	DIRFYMYEIL	KALDYCHSMG	IMHRDVKPHN	VMIDHEHRKL	RLIDWGLAEF	
ocCK2α	PNIIITLADIV	KDPASRTPAL	AFEHVNTDF	KQLYQTLTDY	DIRFYMYEIL	KALDYCHSMG	IMHRDVKPHN	VMIDHEHRKL	RLIDWGLAEF	
rnCK2α	PNIIITLADIV	KDPVSRTPAL	VFEHVNTDF	KQLYQTLTDY	DIRFYMYEIL	KALDYCHSMG	IMHRDVKPHN	VMIDHEHRKL	RLIDWGLAEF	
ggCK2α	PNIIITLADIV	KDPVSRTPAL	VFEHVNTDF	KQLYQTLTDY	DIRFYMYEIL	KALDYCHSMG	IMHRDVKPHN	VMIDHEHRKL	RLIDWGLAEF	
mmCK2α	PNIIITLADIV	KDPVSRTPAL	VFEHVNTDF	KQLYQTLTDY	DIRFYMYEIL	KALDYCHSMG	IMHRDVKPHN	VMIDHEHRKL	RLIDWGLAEF	
xlCK2α	PNIIITLADIV	KDPVSRTPAL	VFEHVNTDF	KQLYQTLTDY	DIRFYMYEIL	KALDYCHSMG	IMHRDVKPHN	VMIDHEHRKL	RLIDWGLAEF	
sfCK2α	TNIIITLQAVV	KDPVSRTPAL	IFEHVNTDF	KQLYQTLSDY	DIRYYLYELL	KALDYCHSMG	IMHRDVKPHN	VMIDHHRKL	RLIDWGLAEF	
dmCK2α	TNIIITLAVV	KDPVSRTPAL	IFEHVNTDF	KQLYQTLTDY	EIRYYLFELL	KALDYCHSMG	IMHRDVKPHN	VMIDHEHRKL	RLIDWGLAEF	
hsCK2α'	TNIIKLIIDTV	KDPVSKTPAL	VFEYINNTDF	KQLYQILTFD	DIRFYMYELL	KALDYCHSKG	IMHRDVKPHN	VMIDHQQKL	RLIDWGLAEF	
mmCK2α'	TNIIKLIIDTV	KDPVSKTPAL	VFEYINNTDF	KQLYQILTFD	DIRFYMYELL	KALDYCHSKG	IMHRDVKPHN	VMIDHQQKL	RLIDWGLAEF	
btCK2α'	TNIIKLIIDTV	KDPVSKTPAL	VFEYINNTDF	KQLYQILTFD	DIRFYMYELL	KALDYCHSKG	IMHRDVKPHN	VMIDHQQKL	RLIDWGLAEF	
ggCK2α'	TNIIINLIDTV	KDPVSKTPAL	VFEYINNTDF	KQLYQILTFD	DIRFYMYELL	KALDYCHSMG	IMHRDVKPHN	VMIDHQQKL	RLIDWGLAEF	
ceCK2α	TNIIITLLDVV	KDPISRTPAL	IFEHVNSDF	KQLYQTLSDY	DIRYYLYELL	KALDFCHSQG	IMHRDVKPHN	VMIDAEKREL	RLIDWGLAEF	
zmCK2α	PNIVKLLDIV	RDQHSKTPSL	IFEYVNTDF	KVLYPPLTDY	DIRYYLYELL	KALDYCHSQG	IMHRDVKPHN	VMIDHELRL	RLIDWGLAEF	
atCK2α	PNIVKLLDIV	RDEHSKTPSL	VFEFVNSDF	KVLYPPLTDY	DIRYYLYELL	KALDFCHSQG	IMHRDVKPHN	VMIDHQLRL	RLIDWGLAEF	
atCK2α'	PNIVKLLDVV	RDQHSKTPSL	IFEYVNTDF	KVLYPPLTDY	DIRYYLYELL	KALDFCHSQG	IMHRDVKPHN	VMIDHELRL	RLIDWGLAEF	
atCK2α''	PNIVKLLDVV	RDQHSKTPSL	IFEYVNTDF	KVLYPPLTDY	DIRYYLYELL	KALDFCHSQG	IMHRDVKPHN	VMIDHELRL	RLIDWGLAEF	
ncCK2α	PNIVALLDVV	RDQHSKTPSL	IFEYVNTDF	RTLYPRFDF	DVRYLYFELL	KALDFCHSKG	IMHRDVKPHN	VMIDHENRL	RLIDWGLAEF	
ddCK2α	PNIIITLQAVV	RDQHSKTPSL	IFEYVNTDF	KHLSPTLTFD	DVRYLYFELL	KALDFCHSKG	IMHRDVKPHN	VMIDHQKRL	YLIDWGLAEF	
tpCK2α	PNIIKLLDIV	KDPQSRTPSL	IFEHVNTDF	KQLYQTLSDY	DIRYYLYELL	KALDYCHSMG	IMHRDVKPHN	VMIDHEKRL	RLIDWGLAEF	
sCK2α	ANIHLFDII	KDPIKTPAL	VFEYVNDVDF	RILYPKLTDL	EIRFYMFELL	KALDYCHSMG	IMHRDVKPHN	VMIDHKNKL	RLIDWGLAEF	
spCK2α	PNIIISLLDIV	RDQHSKTPSL	IFEYVNDVDF	RTLYPPLSDY	DIRYYLYELL	KALDFCHSRG	IMHRDVKPHN	VMIDHKKRL	RLIDWGLAEF	
sCK2α'	PNVVGLYDIV	QDADSKIPAL	IFEYVNDVDF	RTLYPPTFLP	DIQYFTQLL	IADYCHSMG	IMHRDVKPHN	VMIDPTERKL	RLIDWGLAEF	
Konsensus	-N---L----	-D--S--P-L	-FE-----	--L-----	---Y---L-	-A---CHS-G	IMHRD-KP-N	VMID-----	-LIDWGLAEF	

(P+1)-Schleife

Num. <i>hsCK2</i> α:	190	200	210	220	230	240	250	260	270
<i>hsCK2</i> α	YHPGQEYNVR	VASRYFKGPE	LLVDYQMYDY	SLDMWSLGCM	LASMI FRKEP	FFHGH DNYDQ	LVRIAKVLGT	EDLYDYIDKY	NIELDPRFND
<i>ocCK2</i> α	YHPGQEYNVR	VASRYFKGPE	LLVDYQMYDY	SLDMWSLGCM	LASMI FRKEP	FFHGH DNYDQ	LVRIAKVLGT	EDLYDYIDKY	NIELDPRFND
<i>rnCK2</i> α	YHPGQEYNVR	VASRYFKGPE	LLVDYQMYDY	SLDMWSLGCM	LASMI FRKEP	FFHGH DNYDQ	LVRIAKVLGT	EDLYDYIDKY	NIELDPRFND
<i>ggCK2</i> α	YHPGQEYNVR	VASRYFKGPE	LLVDYQMYDY	SLDMWSLGCM	LASMI FRKEP	FFHGH DNYDQ	LVRIAKVLGT	EDLYDYIDKY	NIELDPRFND
<i>mmCK2</i> α	YHPGQEYNVR	VASRYFKGPE	LLVDYQMYDY	SLDMWSLGCM	LASMI FRKEP	FFHGH DNYDQ	LVRIAKVLGT	EDLYDYIDKY	NIELDPRFND
<i>x1CK2</i> α	YHPGQEYNVR	VASRYFKGPE	LLVDYQMYDY	SLDMWSLGCM	LASMI FRKEP	FFHGH DNYDQ	LVRIAKVLGT	EDLYDYIDKY	NIELDPRFND
<i>sfCK2</i> α	YHPGQDYNVR	VASRYFKGPE	LLVDYQMYDY	SLDMWSLGCM	LASMI FRKEP	FFHGH DNYDQ	LVRIAKVLGT	EELFEYLDKY	HIELDPRFND
<i>dmCK2</i> α	YHPGQEYNVR	VASRYFKGPE	LLVDYQMYDY	SLDMWSLGCM	LASMI FRKEP	FFHGH DNYDQ	LVRIAKVLGT	EELYAYLDKY	NIDLDPHFND
<i>hsCK2</i> α'	YHPAQEYNVR	VASRYFKGPE	LLVDYQMYDY	SLDMWSLGCM	LASMI FRKEP	FFHGH DNYDQ	LVRIAKVLGT	EELYGYLKKY	HIDLDPHFND
<i>mmCK2</i> α'	YHPAQEYNVR	VASRYFKGPE	LLVDYQMYDY	SLDMWSLGCM	LASMI FRKEP	FFHGH DNYDQ	LVRIAKVLGT	EELYGYLKKY	HIDLDPHFND
<i>btCK2</i> α'	YHPAQEYNVR	VASRYFKGPE	LLVDYQMYDY	SLDMWSLGCM	LASMI FRKEP	FFHGH DNYDQ	LVRIAKVLGT	EELYGYLKKY	HIDLDPHFND
<i>ggCK2</i> α'	YHPAQEYNVR	VASRYFKGPE	LLVDYQMYDY	SLDMWSLGCM	LASMI FRKEP	FFHGH DNYDQ	LVRIAKVLGT	EELYGYLKKY	HIDLDPHFND
<i>ceCK2</i> α	YHPRQDYNVR	VASRYFKGPE	LLVDYQCYDY	SLDMWSLGCM	LASMI FRKEP	FFHGH DNYDQ	LVRIAKVLGT	DELYEYIARY	HIDLDPHFND
<i>zmCK2</i> α	YHPGKEYNVR	VASRYFKGPE	LLVDLQDYDY	SLDMWSLGCM	FAGMI FRKEP	FFYGH DNHQD	LVKIAKVLGT	DELFDYLDKY	HIDLDPHFND
<i>atCK2</i> α	YHPGKEYNVR	VASRYFKGPE	LLVDLQDYDY	SLDMWSLGCM	FAGMI FRKEP	FFYGH DNHQD	LVKIAKVLGT	NELDHYLNKY	QLDLDPQLEA
<i>atCK2</i> α'	YHPGKEYNVR	VASRYFKGPE	LLVDLQDYDY	SLDMWSLGCM	FAGMI FRKEP	FFYGH DNHQD	LVKIAKVLGT	DELNAYLNKY	QLELDTPQLEA
<i>atCK2</i> α''	YHPGKEYNVR	VASRYFKGPE	LLVDLQDYDY	SLDMWSLGCM	FAGMI FRKEP	FFYGH DNHQD	LVKIAKVLGT	DELNAYLNKY	QLELDTPQLEA
<i>ncCK2</i> α	YHPGKEYNVR	VASRYFKGPE	LLVDYQMYDY	SLDMWSLGCM	FAGMI FRKEP	FFYGH DNHQD	LVKIAKVLGT	DELFDYLDKY	HIDLDPHFND
<i>ddCK2</i> α	YHPNQDYNVR	VASRYFKGPE	LLVDMEDYDY	SLDMWSLGCM	FAGML FQKDP	FFHGH DNI DQ	LVKIVKILGT	EELFYAYLDKY	GIVVDHTILS
<i>tpCK2</i> α	YHPPEQYSVR	VATRYFKGPE	LLVDMRYDYDY	SLDIWSIGCM	LAGIIFKKEP	FFYGH DNYDQ	LVKIAKVLGT	EDLHRYFEKY	GLKFAPAYQE
<i>scCK2</i> α	YHVNMENVR	VASRYFKGPE	LLVDYRMYDY	SLDLWSFGTM	LASMI FRKEP	FFHGH DNYDQ	LVKIVKVLGT	SDFEKYLLKY	EITLPRFXYD
<i>spCK2</i> α	YHAGMEYNVR	VASRYFKGPE	LLVDYRMYDY	SLDIWSFGTM	FAALIFKDDT	FFHGH DNYDQ	LVKIAKVLGT	DELFDYLDKY	QIVLDRQYDN
<i>scCK2</i> α'	YHPGVDYNVR	VASRYFKGPE	LLVNLNQDYDY	SLDLWSVGCM	LAAIVFKKEP	FFHGH DNYDQ	LVKIATVLGT	KELLYGLGKY	GLHLPSEYDN
Konsensus	YH---Y-VR	VA-R--KGPE	LLV---YDY	SLD-WS-G-M	-A---F----	FF-G--N-DQ	LV-I---LGT	-----Y---Y	-----

Num. <i>hsCK2</i> α:	280	290	300	310	320	330	340	350	---- C-terminaler, leicht
<i>hsCK2</i> α	ILGRHSRKRW	ERFVHSENQH	LV.SPEALDF	LDKLLRYDHQ	SRLTAREAME	HPYFYTV.VK	DQARMGSSSM	P.GGSTPVSS	ANMMSGISSV
<i>ocCK2</i> α	ILGRHSRKRW	ERFVHSENQH	LV.SPEALDF	LDKLLRYDHQ	SRLTAREAME	HPYFYTV.VK	DQARMGSSSM	P.GGSTPVSS	ANMMSGISSV
<i>rnCK2</i> α	ILGRHSRKRW	ERFVHSENQH	LV.SPEALDF	LDKLLRYDHQ	SRLTAREAME	HPYFYTV.VK	DQARMGSSAGM	A.GGSTPVSS	ANMMSGISSV
<i>ggCK2</i> α	ILGRHSRKRW	ERFVHSENQH	LV.SPEALDF	LDKLLRYDHQ	SRLTAREAME	HPYFYPI.VK	DQARMGSSNM	P.GGSTPVSS	ASMMSGISSV
<i>mmCK2</i> α	ILGRHSRKRW	ERFVHSENQH	LV.SPEALDF	LDKLLRYDHQ	SRLTVREAME	HPFYFVTV.VK	NQARMSSTSM	A.GGSTPVSS	ANMMSGISSV
<i>x1CK2</i> α	ILGRHSRKRW	ERFVHSENQH	LV.SPEALDF	LDKLLRYDHQ	SRLTAREAMD	HPYFYPI.VK	DQSRMGSSNM	PSGSSTPVSS	ASMMSGISTV
<i>sfCK2</i> α	ILGRHSRKRW	ERFVHSENQH	LV.SPEALDF	LDKLLRYDHQ	ERYTAREAMD	HPYFYPI.VK	EQGRMVSSNS	PTPNALQGPI	STTE~~~~~
<i>dmCK2</i> α	ILQRHSRKRW	ERFVHSDNQH	LV.SPEALDF	LDKLLRYDHV	DRLTAREAMA	HPYFLPI.V.	.NGQMNPNNQ	Q~~~~~	~~~~~
<i>hsCK2</i> α'	ILGQHSRKRW	ENFIHSENRR	LV.SPEALDL	LDKLLRYDHQ	QRLTAKEAME	HPYFYPV.VK	EQSQPCADNA	VLSSGLTAAR	~~~~~
<i>mmCK2</i> α'	ILGQHSRKRW	ENFIHSENRR	LV.SPEALDL	LDKLLRYDHQ	QRLTAKEAME	HPYFYPV.VK	EQSQPCAENT	VLSSGLTAAR	~~~~~
<i>btCK2</i> α'	ILGQHSRKRW	ENFIHSENRR	LV.SPEALDL	LDKLLRYDHQ	QRLTAKEAME	HPYFYPV.VK	EQSQPCADNA	VLSSGLTAAR	~~~~~
<i>ggCK2</i> α'	ILGQHSRKRW	ENFIHSENRR	LV.SPEVLDL	LDKLLRYDHQ	QRLTAKEAME	HPYFYPV.VK	EQSQPSSENA	VLSSGLTTAR	~~~~~
<i>ceCK2</i> α	ILGRHSRKRW	ERFIHAENQH	LV.TPEALDF	LDKLLRYDHA	ERLTAQEAMG	HEYFRPV.VE	AHARANGTEQ	ADGGASNSA	SSQSSDAKID
<i>zmCK2</i> α	LVGRHSRKPW	LKFMNADNQH	LV.SPEAIDF	LDKLLRYDHQ	ERLTALEAMT	HPYFQVRAA	ENSRTRA~~	~~~~~	~~~~~
<i>atCK2</i> α	LVGRHVPKPW	SKFINADNQH	LV.SPEAIDF	LDKLLRYDHQ	DRLTAKEAME	HPYFAQVRAA	ESSRLRTQ~~	~~~~~	~~~~~
<i>atCK2</i> α'	LVGRHSRKPW	SKFINADNRH	LV.SPEAIDY	LDKLLRYDHQ	DRLTAKEAMA	HPYFAQVRAA	ESSRMRTQ~~	~~~~~	~~~~~
<i>atCK2</i> α''	LVGRHSRKPW	SKFINADNQH	LV.SPEAIDF	LDKLLRYDHQ	DRLTAKEAMA	HAYFAQVRAA	ETSRMRSQ~~	~~~~~	~~~~~
<i>ncCK2</i> α	ILGRFQRPKW	HSFINAENQR	FV.SNEAIDF	LDKLLRYDHN	ERLTAKEAMA	HPYFAPVR.D	EATRARYLAG	ETIN~~~~~	~~~~~
<i>ddCK2</i> α	IIGKHPKPPW	SRFITKENQH	LA.VPEAIDF	LEKLLRYDPA	ERLTTREAME	HPYFKPLSH~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>tpCK2</i> α	ILGNHSKPPW	TKFVHHENQH	LV.SPEVMDL	LDRMLRYDHT	KRITPLEAME	HPYFNEIKNN	SV~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>scCK2</i> α	.MDQYIRKPW	HRFINDGNKH	LSGNDEIIDL	IDNLLRYDHQ	ERLTAKEAMG	HPWFAPIREQ	IEK~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>spCK2</i> α	ILGQYPKRDW	YSFVNRDNRS	LA.NDEAIDL	LNRLRYDHQ	ERLTCQEAMA	HPYFQVLK~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>scCK2</i> α'	IMRDFTKKSW	THFITSETK.	LA.VPEVVDL	IDNLLRYDHQ	ERLTAKEAMD	HKFFKTKFE~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Konsensus	---F-----	---F-----	---E--D-	---L-YD--	-R-T--EAM-	H--F-----	-----	-----	-----

degradierbarer Schwanz -----

Num. <i>hsCK2</i> α:	360	370	380	390
<i>hsCK2</i> α	PTPSPGLPLA	GSPVIAAANP	LGMPVPAAG	AQQ
<i>ocCK2</i> α	PTPSPGLPLA	GSPVIAAANP	LGMPVPAAG	AQQ
<i>rnCK2</i> α	PTPSPGLPLA	GSPVIAAANS	LGIPVPAAG	AQQ
<i>ggCK2</i> α	PTPSPGLPLA	GSPVISATTT	LGMPVPAAG	AQQ
<i>mmCK2</i> α	PSPSPLGPLA	GSPVIAAANS	LGIPVQAAAG	AQQ
<i>x1CK2</i> α	PTPSALGSLA	GSPVISATNT	LGTPVAAAG	ATQ
<i>sfCK2</i> α	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>dmCK2</i> α	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>hsCK2</i> α'	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>mmCK2</i> α'	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>btCK2</i> α'	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>ggCK2</i> α'	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>ceCK2</i> α	GA~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>zmCK2</i> α	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>atCK2</i> α	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>atCK2</i> α'	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>atCK2</i> α''	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>ncCK2</i> α	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>ddCK2</i> α	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>tpCK2</i> α	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>scCK2</i> α	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>spCK2</i> α	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>scCK2</i> α'	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Konsensus	-----	-----	-----	-----

Abb. 5: Multipler Vergleich sämtlicher CK2α-Sequenzen der SWISS-PROT-Datenbank²¹⁸ (Version 43 vom 10. Okt. 2003). Die Zuordnung der Sequenzen wurde mit dem Programm PILEUP, die in Spalte 3 des ersten Blocks angegebenen Sequenzidentitäten wurden mit dem Programm GAP berechnet. Beide Programme stammen aus dem GCG-Paket²²⁷. Die CK2α-Sequenz aus *Theileria parva* (*tpCK2*α) besitzt am N-Terminus einen Überhang von etwa 80 Aminosäuren, der lediglich angedeutet wurde. Die Sequenzen wurden entsprechend ihrer Identität gegenüber *hsCK2*α geordnet.

Kürzel	Spezies	Sequenzidentität zu hsCK2β	Numerierung hsCK2β:				
		↓	1	10	20	30	
hsCK2β	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	100,0	~	~	~	~	
xlCK2β	Krallenfrosch (<i>Xenopus laevis</i>)	99,5	~	~	~	~	
brCK2β	Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>)	99,1	~	~	~	~	
dmCK2β	Taufliege (<i>Drosophila melanogaster</i>)	89,2	~	~	~	~	
sfCK2β	Eulenfalter <i>Spodoptera frugiperda</i>	87,9	~	~	~	~	
ceCK2β	Fadenwurm <i>Caenorhabditis elegans</i>	82,1	~	~	~	~	
dmCK2β'	Taufliege (<i>Drosophila melanogaster</i>)	66,3	~	~	~	~	
spCK2β	Spaltheefe (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	63,8	~	~	~	~	
atCK2β	Ackerschmalwand (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	58,3	MYRDR....	.GTVNSRPE	V...VDRKR	INDALE.RPS PSTSRQVNGK	
atCK2β'	Ackerschmalwand (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	58,3	MYRER....	.GMVGSKSE	V...VDRKR	INEIHDNRPS HSMSQPVNGK	
atCK2β''	Ackerschmalwand (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	58,3	MYKERSGG..	.GGGSSRSSE	ILGGADRKR	INDALNKKLE KSS.....	
atCK2β'''	Ackerschmalwand (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	57,8	MYKDRSGGGI	MGGGSSRSSE	ILGGADRKR	INDALDKHLK KSS.....	
ncCK2β	Schimmelpilz <i>Neurospora crassa</i>	57,5	~	~	~	~	
spCK2β'	Spaltheefe (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	54,2	~	~	~	~	
dmSSL	Taufliege (<i>Drosophila melanogaster</i>)	52,8	~	~	~	~	
ncCK2β	Schimmelpilz <i>Neurospora crassa</i>	52,5	~	~	~	~	
scCK2β	Bäckerhefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	49,7	~	~	~	~	
scCK2β	Bäckerhefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	47,8	~	~	~	~	
dmStellat	Taufliege (<i>Drosophila melanogaster</i>)	46,5	~	~	~	~	
caCK2β	Hefe <i>Candida albicans</i>	46,2	~	~	~	~	
Konsensus			~	~	~	~	

Autophosphorylierungsstelle

Num. hsCK2β:	1	10	20	30
hsCK2β	~MSS	SEEVS.WISW	FCGLRGNEFF	CEVDEDYIQD
xlCK2β	~MSS	SEEVS.WISW	FCGLRGNEFF	CEVDEDYIQD
brCK2β	~MSS	SEEVS.WISW	FCGLRGNEFF	CEVDEDYIQD
dmCK2β	~MSS	SEEVS.WVTW	FCGLRGNEFF	CEVDEDYIQD
sfCK2β	~MSS	SEEVS.WISW	FCGLRGNEFF	CEVDEDYIND
ceCK2β	~MSS	SEEVS.WITW	FCGLRGNEFF	CEVDEEYIQD
dmCK2β'	~MTD	SDESS.WIHW	FCKQRGNEFF	CEVDEEYIQD
spCK2β	~MQLYSSESE	SDDSQYWVDW	FLGLKGNEFF	CEVDEDYIQD
atCK2β	GKGTVTAATT TANLIGKQQS NNINHRDSRS ASLSKNNTVS D..D.ESDTE SEESDVSGSD GEDTS.WISW FCNLRGNEFF CEVDDDYIQD			
atCK2β'	GK....VTS TSVLMGKQQL H..DKESSRS GSISKTN.IS DAVD.ISDTE SEESEVSGSD GEDTS.WISW FCNLRGNEFF CEVDDDYIQD			
atCK2β''TSTTT SRVFSSK... ..DKDPFSF TST.KTQL.. .PDVESETD SEGSDVSGSE GDDTS.WISW FCNLRGNEFF CEVDEDYIQD			
atCK2β'''PS..T SRVFTSK... ..DKDSVPS TSTAKSQLHS RSPDVESDTE SEGSDVSGSE GDDTS.WISW FCNLRGNEFF CEVDEDYIQD			
ncCK2β	~MSS	SGVPESWIAS	FCSLLGHEYF	AEVSEEFIED
spCK2β'	~MSRK	NLIKLNHDPT	VTYSTKDDAD	ELFDDLSSSP LHENVSWISW FCSRPGREYF VEVKEDFIED
dmSSL	~MSCPRSI	EIPDGSWIDW	FLGIKGHEFS	CRVPNEYIQD
ncCK2β'	~MDDFVSESE	SDYASYWRDW	FISSRGNEYF	CEIDEDYITD
scCK2β	~MSQEFVEDY	SRTGSSDDED	SGAYDEWIPS	FCSRFGHEYF CQVPTEFIED
scCK2β'	~M	GSRSENVGTV	TREGSRVEQD	DVLMDDSDS SEYVDMWIDL FLGRKGHEYF CDVDPEYITD
dmStellat	~MSS	QNNNSWIDW	FLGIKGNQFL	CRVPTDYVQD
caCK2β	~MPSDPEE	D..YIPWIIQ	LCELFGHDYF	VQVSQDFIED
Konsensus	~	W	G	D

„destruct.box“ --saure Schleife--

Num. hsCK2β:	40	50	60	70	80	90
hsCK2β	KFNLTGLNEQ VPHYRQALDM IL...DLEP DEELEDNPNQ SD.....L IEQAAMLYG LIHARYILTN					
xlCK2β	KFNLTGLNEQ VPHYRQALDM IL...DLEP DEELEDNPNQ SD.....L IEQAAMLYG LIHARYILTN					
brCK2β	KFNLTGLNEQ VPHYRQALDM IL...DLEP DEELEDNPNQ SD.....L IEQAAMLYG LIHARYILTN					
dmCK2β	KFNLTGLNEQ VPNYRQALDM IL...DLEP EDELEDNPLQ SD.....M TEQAAMLYG LIHARYILTN					
sfCK2β	KFNLTGLNEQ VPHYRQALDM IL...DLEP DDDLDNPNQ SD.....L VEQAASEILY LIHARYILTN					
ceCK2β	RFNLTGLNEQ VPKYRQALDM IL...DLEP DD.IEDNATN TD.....L VEQAAMLYG LIHARYILTN					
dmCK2β'	KFNLNFLDSN VKNYKCALEV IL...DLNP GSASED.PAE PE.....L .EASAELYG LIHARFILTN					
spCK2β	RFNLTGLSHE VPHYSQSIDL IL...DV..LDLPEEEV QD.....E VEASARHLYG LIHARYILTA					
atCK2β	DFNLCGLSSL VPYYEYALDL IL...DVE S QGEMFTEEQ NE.....L IESAAELYG LIHARYILTS					
atCK2β'	DFNLCGLSHQ VPYYDYALDL IL...DVE SHGEMFTEEQ NE.....L IESAAELYG MIHARFILTS					
atCK2β''	DFNLCGLSGQ VPYYDYALDL IL...DVDA SNSEMFTDEQ HE.....M VESAAELYG LIHVRYILTT					
atCK2β'''	DFNLCGLSQT VPYYDYALDL IL...DVE SNGDMFTEEQ HE.....M VESAAELYG LIHVRYILTT					
ncCK2β	DFNLTGLQQT VAMYKEALEM ILDVEPEDDD DEEEDD..EE DEEDMSGGDG INKPHGERRH HSRIASDLVS IESSAELYG LIHQRFICSR					
spCK2β'	LFNLTGLNLA VPFYNEALDL ILD...RTAP DTLNFD... MD.....V IETSAQILY LIHQRYIITR					
dmSSL	KFNLTGLE...FDSQTELEV VLD...PEFD NEDWDC.AEEK KLYG MIHARYIVSP					
ncCK2β'	RFNLTGLNTE VQYYQYALDL IT...DV..FDLDCDDDM RE.....T IEKSARHLYG LVHARYIVTT					
scCK2β	DFNMTLSLQE VPHYRKALDL ILDLEAMSDE EDEEDDVHEE DEVDQEMQSN DGHDEGKRRN KSPVVK.SI IEHAAEQLYG LIHARFILTK					
scCK2β'	RFNLMNLQKT VSKFSYVVQY IVD...DLDD SILENMTHAR LE.....Q LESDGRKLYG LIHARYIITI					
dmStellat	TFNQMGLE...YFSEILDV ILK...PVID SSSGLLYGDEK KLYG MIHARYIRSE					
caCK2β	DFNLTGLSSQ VPYYREALYT ILDYQVETAE DHNTDNTTNT TS....NNN DSRNGTSKRN ASELPNK.AL LAHSAELLYG LIHARYIVSK					
Konsensus	-FN---L---	---	---	---	-----Y	--H-R-I---

-----Zinkbindungsmotiv-----

Num. <i>hsCK2</i> β:	100	110	120	130	140	150	160	170	180
<i>hsCK2</i> β	RGIAQMLEKY	QQGDFGYCPR	VYCENQPMLP	IGLSDIPGEA	MVKLYCPKCM	DVYTPKSSRH	HHTDGAYFGT	GFPHMLFMVH	PEYRPKRPA.
<i>x1CK2</i> β	RGIAQMLEKY	QQGDFGYCPR	VYCENQPMLP	IGLSDIPGEA	MVKLYCPKCM	DVYTPKSSRH	HHTDGAYFGT	GFPHMLFMVH	PEYRPKRPA.
<i>brCK2</i> β	RGIAQMLEKY	QQGDFGYCPR	VYCENQPMLP	IGLSDIPGEA	MVKLYCPKCM	DVYTPKSSRH	HHTDGAYFGT	GFPHMLFMVH	PEYRPKRPA.
<i>dmCK2</i> β	RGIAQMIEKY	QTGDFGHCP	VYCESQPMLP	LGLSDIPGEA	MVKTYCPKCI	DVYTPKSSRH	HHTDGAYFGT	GFPHMLFMVH	PEYRPKRPT.
<i>sfCK2</i> β	RGIGQMLEKF	QAGDFGHCP	VYCECQPMLP	LGLSDVPGEA	MVKLYCPRCM	DVYTPKSSRH	HHTDGAYFGT	GFPHMLFMVH	PEYRPKRPA.
<i>ceCK2</i> β	RGISQMVVEKW	RHDHFGVCP	VYCENQPMLP	IGLSDVPGEA	MVKLYCPRCN	MVFVPRSSRH	QHTDGSYFGT	GFPHMLFMVH	PDLRPRRPV.
<i>dmCK2</i> β'	RGIELMLDKY	NKGEFGT	AFCHSPVLP	IGLSDNPGED	MVRIYCPKCN	DVYIPKASRH	SNLDGAFFGT	GFPHMFMEK	PDARPKRAK.
<i>spCK2</i> β	QGLYKMLEKY	KKCDFGHCP	VLNCGQPMLP	VGLSDIAHTK	SVKLYCPRCE	DVYTPKSQRH	ASIDGAYFGT	SFPHMLFQVY	PELAVPKSQ.
<i>atCK2</i> β	KGLAAMLDKY	KNYDFGRCP	VYCCGQPCLP	VGQSDIPRSS	TVKIYCPKCE	DIYPRSKYQ	GNIDGAYFGT	TFPHLFLMTY	GHLKPAKAT.
<i>atCK2</i> β'	KGLASMLDKY	KNYDFGRCP	VYCCGQPCLP	VGQSDIPRAS	TVKIYCPKCE	DVYPRSKYQ	GNIDGAYFGT	TFPHLFLMTY	GHLKPKQAS.
<i>atCK2</i> β''	KGMAAMTEKY	KNCDFGRCP	VFCGQSCPLP	VGQSDIPRSS	TVKIYCPKCE	DISYPRSKFQ	GNIDGAYFGT	TFPHLFLMTY	GNLKPQKPT.
<i>atCK2</i> β'''	KGMAAMMEKY	KNYDFGRCP	VFCGQSCPLP	VGQSDIPRSS	TVKIYCPKCE	DIYPRSKYQ	GNIDGAYFGT	TFPHLFLMAY	GNMKPKQPA.
<i>ncCK2</i> β	AGIQQMSEKY	ELGHFGICPR	TNCNQTRTLP	VGLSDTPGED	TVKLFCPSC	DVYVPPNSRF	QTVDGAFFGT	TFGALFLMTF	PEYDLTKTGA
<i>spCK2</i> β'	TGLHQMAEKY	SMGIFGCCPR	VNCCYTHVLP	AGLSDIVGKM	PVMLFCPNCL	DLYAPSSSRY	KNIDGSFFGA	TFPHLFFESY	PELNPKRSIP
<i>dmSSL</i>	RGIEDMRLKY	ERGDGFGS	VFCRKRQVLP	VGLHDVWDKA	QVKIYCPSCN	NVYIPLPH.N	GMLDGAMFGT	SFPHMFQML	PSLIPSPPV.
<i>ncCK2</i> β'	RGLQKMFKEY	KKADFGKCP	VMCSSHPLLP	MGLSDVPNSK	PVKLYCARCE	DIYNPKSSRH	AAIDGAYFGT	SFHNIFFQVY	PTLVPAKSV.
<i>scCK2</i> β	PGLQAMAETF	DHKEFGT	YYCNGMQLLP	CGLSDTVGKH	TVRLYCPSCQ	DLYLPQSSRF	LCLEGAFFGT	SFPGVFLKHF	KELE....E
<i>scCK2</i> β'	KGLQKMYAKY	KEADFGRCPR	VYCNLQQLLP	VGLHDIPGID	CVKLYCPSC	DLYIPKSSRH	SSIDGAYFGT	SFPGMFLQAF	PDMVPKHTP.
<i>dmStellat</i>	RGLIAMHRKY	LRGDFGSCPN	ISCDRQNTLP	VGLSAVWGKS	ISCDRCPCK	SNFHP.KS.D	TQLDGAMFGT	SFPDIFESLL	PNL..TSPL.
<i>caCK2</i> β	QGLTAMASKF	ERNDFGSCPR	YFCDMHLLP	VGSDTVPGQE	TVRLFPCPCN	DIYIPSSSRY	LNIDGAFFGT	TFPGLLVKMF	PEIE....N
Konsensus	-G---M--K-	---FG-CP-	--C-----P	-G-----	-V---C--C-	----P----	---G---G-	-F-----	-----

Num. <i>hsCK2</i> β:	181	190	200	210	215
<i>hsCK2</i> β	. .NQFVPRLY	GFKIHPMAYQ	LQL.QA.ASN	FKSPVKTIR~	~~~~~
<i>x1CK2</i> β	. .NQFVPRLY	GFKIHPMAYQ	LQL.QA.ASN	FKSPVKTMR~	~~~~~
<i>brCK2</i> β	. .NQFVPRLY	GFKIHPMAYQ	LQL.QA.ASS	FKSPVKAIR~	~~~~~
<i>dmCK2</i> β	. .NQFVPRLY	GFKIHSLAYQ	IQL.QA.AAN	FKMPLRAKN~	~~~~~
<i>sfCK2</i> β	. .SQFVPRLY	GFKIHPMAYQ	IQQ.QA.AAN	FKAPLRSLSY	NNGKR~
<i>ceCK2</i> β	. .TQFVPKLY	GFKIHPVAYG	GQEGNS.GGN	TANNVAAAQN	NTTPAQQSG
<i>dmCK2</i> β'	. .QKFVPRLY	GFKIHPMAYQ	TAAEIQ.KDV	TMTVPGEIDS	PSHI~
<i>spCK2</i> β	. .ERYIPRIF	GFKVHSYSAT	FKKQDVYKEK	QKKRLQGAEA	ESKNKLAIT~
<i>atCK2</i> β	. .QNYVQRVF	GFKLHKP~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>atCK2</i> β'	. .QSYTQRVF	GFKLHKP~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>atCK2</i> β''	. .QSYVPKIF	GFKVHKP~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>atCK2</i> β'''	. .QNYVPKIF	GFKVHNKQ~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>ncCK2</i> β	ESVSNLFRSG	SDDTTVINGM	YARNIAPGLG	RGKIYQPKIY	GFKVSEIARS
<i>spCK2</i> β'	CGKIYQPRIY	GFKVSELSKT	GPRMQWLRM	LEDGSDSES	ESD~
<i>dmSSL</i>	. .EKYIPRIY	GFQLHKKALM	PPESAESPPI	KVESVSKSP	SWLRNVPNF~
<i>ncCK2</i> β'	. .ERYIPRCY	GFKVHAAAAL	VRWQNSQRDE	MRRRLRKLEV	ESGFKDAEDE
<i>scCK2</i> β	. . .YVERKS	KES.....YELKVF	GFRINDEAVS
<i>scCK2</i> β'	. .KRYVPKIF	GFELHKQAQL	TRWQELQRLK	LVEKLESKDV	DLTKSGGFKT
<i>dmStellat</i>	. .DD..PRT~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>caCK2</i> β	QCRIRITKFS	QND.....FGLKLF	GFKINELSAT
Konsensus	-----	-----	-----	-----	-----

<i>hsCK2</i> β	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>x1CK2</i> β	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>brCK2</i> β	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>dmCK2</i> β	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>sfCK2</i> β	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>ceCK2</i> β	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>dmCK2</i> β'	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>spCK2</i> β	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>atCK2</i> β	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>atCK2</i> β'	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>atCK2</i> β''	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>atCK2</i> β'''	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>ncCK2</i> β	DDEDESMGVS	SRTASRRRGP	PRRQKQNGSP	MAIEQNGAES	EL
<i>spCK2</i> β'	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>dmSSL</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>ncCK2</i> β'	ATGGVAAGGE	GVH~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>scCK2</i> β	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>scCK2</i> β'	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>dmStellat</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
<i>caCK2</i> β	DDEEEDEVEE	EEDDDRTMAS	E~~~~~	~~~~~	~~~~~
Konsensus	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

Abb. 6: Multipler Vergleich sämtlicher CK2β-Sequenzen der SWISS-PROT-Datenbank²¹⁸ (Version 43 vom 10. Okt. 2003). Die Zuordnung der Sequenzen wurde mit dem Programm PILEUP, die in Spalte 3 des ersten Blocks angegebenen Sequenzidentitäten wurden mit dem Programm GAP berechnet. Beide Programme stammen aus dem GCG-Paket²²⁷. Die Sequenzen wurden entsprechend ihrer Identität gegenüber *hsCK2*β geordnet. „*dmSSL*“ steht für „suppressor of stellate-like protein“ aus *Drosophila melanogaster*.

13.2.4 Autophosphorylierungsstelle und „saure Schleife“ in CK2 β

Im Gegensatz zur Zinkbindungsdomäne sind die Autophosphorylierungsstelle in CK2 β sowie eine recht ungleiche Verteilung der geladenen Aminosäuren relativ früh aufgefallen^{43,44}. Als bester Kandidat für die Autophosphorylierung wurde das N-terminale Sequenzstück MSSSEE postuliert⁴³, was bereits 1991 experimentell bestätigt wurde²²⁸. Tatsächlich ist das Ser2 die bevorzugte Aminosäure für die Autophosphorylierung²²⁹. Eine Funktion konnte der Autophosphorylierung allerdings in den 90er Jahren nicht zugeordnet werden. Erst neuere Arbeiten deuten an, daß es sich dabei um einen Schutz gegen Abbau durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg handeln könnte²³⁰.

Hinsichtlich der Aminosäureverteilung in CK2 β war bereits 1987 eine gewisse Polarität bemerkt worden¹⁶⁸: Während die C-terminale Hälfte mehr basische Aminosäuren enthält, weist die N-terminale Hälfte einen Überschuß an sauren Aminosäuren auf. Insbesondere stellten einige Autoren^{43,44} eine extreme Anhäufung negativer Ladungen um die Sequenzposition 60 herum fest. Diese „saure Schleife“ (roter Bereich in Abb. 6) wurde mit der lange bekannten Affinität der CK2 gegenüber Polylysin und anderen basischen Substanzen in Verbindung gebracht, auch wenn es keine Vorstellung gab, wie sich eine Polykationen-Bindungsstelle an CK2 β aktivitätssteigernd auf CK2 α auswirken kann.

13.2.5 Enthält CK2 β eine Signalsequenz zum proteolytischen Abbau?

Zu den wichtigsten Neuheiten des CDK/Cyclin-Systems gehörte die Entdeckung, daß die CDK-gebundenen Cycline in bestimmten Zellzyklusphasen nach Ubiquitinylierung am Proteasom abgebaut werden, was zur Inaktivierung der entsprechenden CDKs führt (s. Kap. 12.6). Ob dieses Prinzip auch im Falle des CK2 α /CK2 β -Komplexes wirksam ist, gehörte zu den interessantesten Fragen der 90er Jahre.

Im Jahre 1995 wiesen Allende & Allende⁵⁸ darauf hin, daß CK2 β ein Sequenzmotiv besitzt, das im Falle von *hs*CK2 β mit Arg47 beginnt und das der Signalsequenz zum proteolytischen Abbau („destruction box“) in den Cyclinen ähnlich ist (grüne Markierung in Abb. 6). Dabei räumten sie allerdings ein, daß die Hypothese einer Analogie zwischen CK2 β und den Cyclinen sehr spekulativ sei. Dies gelte, so die Autoren, umso mehr, als eine der damals bekannten CK2 β -Sequenzen, nämlich die von *Schizosaccharomyces pombe*, nicht das Arginin besitze, das in allen Cyclinen die „destruction box“ einleite und das das einzige absolut konservierte Kennzeichen dieses Sequenzmotives sei.

Die Zahl der Ausnahmen ist aus heutiger Sicht noch erheblich größer. Tatsächlich haben nicht einmal die Hälfte der in Abb. 6 aufgeführten Sequenzen ein Arginin an der Position, die zu Arg47 aus humaner CK2 β äquivalent ist. Abb. 6 spricht eher dafür, daß - wenn überhaupt - nur tierische Organismen eine CK2 β mit „destruction box“ besitzen. Zweifel sind auch insofern angebracht, weil der typischen „destruction box“ in Cyclinen ein Sequenzabschnitt mit einer signifikanten Häufung an Lysinen folgt, die als mögliche Ubiquitinylierungsstellen benannt wurden¹⁸², weil dieser lysinreiche Abschnitt in CK2 β jedoch fehlt. Ob also das von Allende & Allende⁵⁸ entdeckte Sequenzmotiv wirklich als Signal zum Abbau von CK2 β dient, muß offen bleiben.

Durch die neueste Arbeit zu diesem Thema wird zwar die Hypothese gestützt, daß CK2 β ubiquitinyliert und anschließend am Proteasom abgebaut wird, nicht aber daß die „destruction box“ eine Rolle dabei spielt²³⁰. Diese Befunde passen zu aktuellen Erkenntnissen, daß es verschiedene Signalsequenzen für die Ubiquitinylierung gibt und daß das ganze am Proteasom endende Geschehen erheblich komplexer ist, als es noch in den 90er Jahren den Anschein hatte²³¹.

13.2.6 Nukleotidbindung durch CK2 α

Wie alle anderen EPKs besitzt CK2 α im N-terminalen Bereich eine glycinreiche Sequenzregion (blaue Markierung in Abb. 5), die charakteristisch für nukleotidbindende Proteine ist. Das entsprechende, für alle EPKs gültige PROSITE-Muster²⁰⁸ lautet:



Typischerweise binden Pyrophosphatgruppen von Mono- oder Dinukleotiden an derartige Bereiche²³². Neben dieser unzweifelhaften Rolle der glycinreichen Region bei der ATP-Bindung in allen EPKs kommen ihr zumindest in Einzelfällen weitere Funktionen zu wie die Teilnahme an der Substraterkennung, am chemischen Katalysemechanismus und an der Regulation der Enzymaktivität²³³.

Im Falle der CK2 α war natürlich besonders interessant, bereits auf Sequenzebene Erklärungen für die markante duale Cosubstratspezifität des Enzyms zu finden. Erste Vermutungen dazu wurden 1992 geäußert²³⁴. Sie waren zwar insofern nicht völlig 3D-strukturunabhängig, weil zu der Zeit die Kristallstruktur der CAPK und damit der prinzipielle Aufbau der ATP-Bindungsstelle bereits bekannt war²⁶. Dennoch war es ein multipler Sequenzvergleich, durch den auffiel, daß das Val66 und das Trp176 in humaner CK2 α , zwei Aminosäuren in der Nähe jener Bindungsstelle, in anderen EPKs fast durchgängig durch Alanin bzw. Phenylalanin besetzt sind. Gezielte Mutationen von Val66 zu Alanin und von Trp176 zu Phenylalanin führten zwar tatsächlich zu einer stärkeren Differenzierung zwischen ATP und GTP durch das Enzym, jedoch konnte die duale Cosubstratspezifität durch diese Studien nicht wirklich erklärt werden.

13.2.7 CK2 α -Phosphorylierung an Tyr50 inmitten der glycinreichen Region?

Eine gewisse Aufmerksamkeit erregte das Tyr50, das Teil der ATP-bindenden Schleife ist (Abb. 5). Es gibt nicht viele EPKs, die an der topologisch äquivalenten Position ein Tyrosin tragen, und zu diesen wenigen zählen mit den cyclinabhängigen Proteinkinasen enge Verwandte der CK2 α . Mehr noch: Bei den CDKs ist dieses Tyrosin eine regulatorisch bedeutsame Phosphorylierungsstelle. Nur nach seiner Dephosphorylierung erreicht ein CDK/Cyclin-Komplex die volle katalytische Aktivität²³⁵.

Es versteht sich, daß vor diesem Hintergrund und angesichts der noch immer latenten Unklarheit über die Regulation der CK2 über das Tyr50 als möglicher CK2 α -Phosphorylierungsstelle mit regulatorischer Bedeutung spekuliert wurde. M.W. befindet sich die erste entsprechende Bemerkung in der CK2-Literatur im Übersichtsartikel von Allende & Allende⁵⁸ aus dem Jahre 1995. Sie ist allerdings vage formuliert worden, vermutlich weil den Autoren Ergebnisse aus den Jahren 1989/90 bekannt waren, wonach CK2 *in vivo* weder ohne Anregung der Zellen durch Wachstumsfaktoren noch nach Stimulierung durch EGF Phosphotyrosin enthält^{236,237}.

13.2.8 Der „basische Strang“ in CK2 α

Der markanteste Sequenzabschnitt der CK2 α ist der sogenannte „basische Strang“ Lys74-Lys-Lys-Lys-Ile-Lys-Arg80, eine Anhäufung positiver Ladungen, die es so in keiner anderen EPK gibt (rote Markierung in Abb. 5). Insbesondere wurde schon 1990 vermerkt, daß die cyclinabhängigen Proteinkinasen als engste CK2 α -Verwandte im gleichen Bereich eher saure Aminosäuren

besitzen⁴³. Folglich wurde diese basische Region unmittelbar mit der acidophilen Substratspezifität der CK2 in Verbindung gebracht²³⁸. Außerdem wurde bereits 1990 die Hypothese geäußert, daß die CK2 α /CK2 β -Wechselwirkung durch den basischen Strang der CK2 α auf der einen und den sauren Strang der CK2 β auf der anderen Seite vermittelt wird²³⁹.

13.2.9 NLS-Signale

Die späten 80er und frühen 90er Jahre waren eine Zeit, in der grundlegende Erkenntnisse zum Transport von Proteinen in den Zellkern gewonnen werden konnte. In dem Zusammenhang sind die „nuklearen Lokalisationssequenzen“ (NLS) aufgefallen, das sind kurze basische Sequenzstücke, mit denen ein Protein für den aktiven, energieverbrauchenden Import in den Zellkern adressiert wird²⁴⁰. Das klassische Beispiel für ein solches NLS-Signal ist die Sequenz Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val aus dem T-Antigen des SV40-Virus²⁴¹.

Angesichts der schon damals zahlreichen Berichte über CK2-Aktivität im Zellkern verwundert es nicht, daß die CK2 α - und CK2 β -Sequenzen nach solchen Bereichen abgesucht wurden. Der Übersichtsartikel von Issinger⁶⁰ aus dem Jahre 1993 ist die erste CK2-Publikation, in der die Anwesenheit von NLS-Signalen in den CK2-Untereinheiten diskutiert wird. Dabei fiel in CK2 α der zuvor erwähnte basische Strang auf, dessen Ähnlichkeit zu einem NLS-Signal unverkennbar ist.

Darüber hinaus benannte Issinger⁶⁰ das Sequenzstück Arg175-Pro-Lys-Arg-Pro179 als NLS-Signal in CK2 β . Während allerdings in späteren Publikationen zu diesem Thema^{53,242} die Anwesenheit eines NLS-Signals für CK2 α bestätigt wurde, wurde sie für CK2 β ausdrücklich bestritten.

13.3 Wichtige Eigenschaften der rekombinant hergestellten CK2-Untereinheiten

13.3.1 Herstellung der isolierten CK2-Untereinheiten durch heterologe Genexpression

Für die CK2-Forschung waren die bereits erwähnten präparativen Möglichkeiten der molekularen Genetik insofern revolutionär, weil das Enzym bis dahin aus natürlichen Quellen mit wenigen Ausnahmen nur als heterotetrameres Holoenzym gereinigt worden war, während die Präparation der isolierten Untereinheiten nur in Kleinstmengen durch mühsame Denaturierungen und Renaturierungen gelungen war⁴². Nunmehr jedoch ließen sich die Proteine in größeren Mengen herstellen und gezielt verändern.

Der Reigen heterologer Expressionen von CK2-Genen und Reinigungen der Proteine begann 1990 mit Hu & Rubin²⁴³ und der CK2 α aus *Caenorhabditis elegans*. Ihr folgten CK2 α aus *Drosophila melanogaster*²⁴⁴, CK2 α und CK2 β aus *Homo sapiens*⁸⁰ sowie weitere Fälle, die von Issinger⁶⁰ zusammenfassend dargestellt worden sind. Im Hinblick auf die im Teil IV dieser Schrift beschriebene Strukturbiologie der CK2 ist die 1993 publizierte Expression und Reinigung von CK2 α aus Mais²⁴⁵ besonders hervorzuheben. Es handelte sich dabei um die erste rekombinante Expression einer pflanzlichen CK2-Untereinheit, mit der die Voraussetzung für die erste CK2 α -Kristallstruktur geschaffen wurde.

Allgemein kann man festhalten, daß die „synthetische Biochemie“ im CK2-Gebiet die Tür zu ganz neuartigen Experimenten eröffnete wie zum Beispiel:

- biochemische und biophysikalische Charakterisierung der Untereinheiten

- Mutagenesestudien zu verschiedensten funktionellen Teilaspekten

Die erste und umfangreichste Arbeit dieser Art bezüglich CK2 β wurde 1992/93 vorgestellt und stammt aus der Arbeitsgruppe Issinger, in der zunächst neun²²¹ und später einundzwanzig²⁴⁶ Varianten von humaner CK2 β produziert wurden. Modifiziert wurden dabei die Autophosphorylierungsstelle nahe des N-Terminus', die saure Schleife im Bereich der Positionen 55 bis 70, die basischen Reste zwischen den Positionen 171 bis 180 sowie der C-Terminus, von dem mehr oder weniger große Teilstücke deletiert wurden. Auf diese Mutagenesestudie und ihre Folgearbeiten, deren wichtigste Ergebnisse die Arbeitsgruppe Allende im Jahre 1995 durch ein deutlich kleineres Mutageneseprogramm mit CK2 β aus *Xenopus laevis* bestätigt hat²⁴⁷, wird im folgenden wiederholt eingegangen, denn ihr entsprangen eine Fülle wertvoller Einsichten vor allem zur CK2 α /CK2 β -Wechselwirkung und zur CK2 β -Dimerisierung.

Die ersten CK2 α -Mutanten wurden 1990 publiziert und stammten wie die ersten rekombinanten CK2-Proteine von Hu & Rubin²⁴³. In den darauffolgenden Jahren verteilten sich die relevanten Mutagenesestudien mit CK2 α im Gegensatz zu CK2 β auf verschiedene Arbeitsgruppen. Dabei sticht allerdings eine Serie von drei aufeinander aufbauenden Publikationen aus der Arbeitsgruppe Pinna^{248,249,250} hervor, mit der die entscheidenden Aminosäuren zur Substraterkennung identifiziert wurden.

- Herstellung und Einsatz monoklonaler Antikörper

Basierend auf den rekombinant hergestellten Proteinen konnten nunmehr gut funktionierende Antikörper sowohl gegen CK2 α ²⁵¹ als auch gegen CK2 β ²⁵² gewonnen werden. Derartige Antikörper erlaubten wesentlich empfindlichere Lokalisierungs- und Expressionsstudien²⁵³, als sie zuvor mit klassisch-biochemischen Methoden möglich waren⁶⁰.

- Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse

Strukturanalytische Arbeiten mit CK2 α , CK2 β und dem CK2-Holoenzym setzten die Präparation relativ großer Mengen hochreinen Proteins voraus und wurden somit erst nach Etablierung heterologer Expressionssysteme möglich.

13.3.2 Isolierte CK2 α ist auch nach rekombinanter Herstellung katalytisch aktiv

Alle drei gerade genannten, frühen Originalarbeiten zur CK2 α -Expression^{243,244,80} bestätigten, daß CK2 α auch nach der Biosynthese in *Escherichia coli* allein aktiv ist. Dieses Ergebnis implizierte auch, daß CK2 α keiner externen Phosphorylierung durch ein anderes EPK-Enzym bedarf, um katalytisch aktiv zu werden. Auch einige andere vom CK2-Holoenzym bekannte Eigenschaften werden von isolierter CK2 α gezeigt: die Inhibierung durch Heparin etwa oder die duale Cosubstratspezifität²⁴⁴. Die Aktivierung durch Polylysin dagegen ist ausschließlich auf das CK2-Holoenzym beschränkt²⁴⁴.

Für CK2 α aus *Drosophila* und *Homo sapiens* wurde darüber hinaus beschrieben, daß das Enzym im Gegensatz zum Holoenzym keine Mindestkonzentration an monovalenten Kationen benötigt, um katalytisch aktiv zu sein. Ganz im Gegenteil bricht die katalytische Aktivität von CK2 α bei Salzkonzentrationen von über 300 mM NaCl oder KCl, bei denen diejenige des CK2-Holoenzym ein Maximum aufweist⁸⁰, zusammen.

13.3.3 CK2 α und CK2 β kombinieren sich *in vitro* spontan zum CK2-Holoenzym

Eine zentrale Frage war, ob sich die Beobachtung von Cochet & Chambaz⁴² aus dem Jahre 1983, wonach sich das CK2-Holoenzym zumindest teilweise spontan aus den zuvor getrennten Untereinheiten zurückbilden kann, mit den nunmehr rekombinant hergestellten Proteinen bestätigen ließ. Positiv beantwortet wurde diese Frage erstmals 1991 durch Grankowski *et al.*⁸⁰ für CK2 α und CK2 β aus *Homo sapiens*. Die Autoren konnten durch vergleichende Messungen der katalytischen Aktivität und biophysikalischer Parameter sicherstellen, daß das rekonstituierte Holoenzym mit einem Wildtyp-Holoenzym identisch ist.

Im Widerspruch dazu berichteten Filhol *et al.*²⁵⁴ im selben Jahr, daß die Coexpression beider Untereinheiten notwendige Voraussetzung zur erfolgreichen Bildung des CK2-Holoenzym sei. Dieser Befund konnte jedoch weder durch Birnbaum *et al.*²⁵⁵ noch durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden. Selbst im Falle einer CK2 aus Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*), in denen die Existenz von CK2 β und damit auch die eines CK2-Holoenzym lange Zeit als unsicher galt, wurde bereits 1995 berichtet, daß man aus den rekombinant hergestellten und sogar de- und anschließend renaturierten Untereinheiten ein CK2-Holoenzym rekonstituieren kann²⁵⁶. Somit hat sich insgesamt die Erkenntnis durchgesetzt, daß CK2 α und CK2 β unter physiologischen Bedingungen spontan ein stabiles Holoenzym bilden.

13.3.4 CK2 β stabilisiert CK2 α gegenüber thermischer und chemischer Denaturierung

1992 wurden zwei Arbeiten publiziert, in denen die Auswirkungen von CK2 β auf die Stabilität von CK2 α beschrieben wurden^{257,258}. Die wichtigste Erkenntnis war, daß CK2 β CK2 α deutlich stabilisiert und zwar sowohl gegen thermische als auch gegen chemische Denaturierung durch Harnstoff. So verliert isolierte CK2 α schon bei 40 bis 45 °C seine Struktur, in Gegenwart von CK2 β jedoch erst bei etwa 55 bis 60 °C²⁵⁷.

Bezüglich der Thermostabilisierung von CK2 α verhielten sich 19 der 21 von Boldyreff *et al.*²⁴⁶ hergestellten CK2 β -Mutanten wie der Wildtyp. Das betraf insbesondere die Varianten ohne Autophosphorylierungsstelle am N-Terminus und mit teilweise oder vollständig neutralisierter „saurer Schleife“ (Asp55 bis Asp70). Diese Bereiche konnten also als Determinanten für die Holoenzymbildung ausgeschlossen werden. Dagegen gab es zwei Deletionsmutanten am C-Terminus (CK2 $\beta^{\Delta 150-215}$, CK2 $\beta^{\Delta 171-215}$), die CK2 α so gut wie gar nicht mehr stabilisieren konnten. Folglich konnte man davon ausgehen, daß das C-terminale Segment in irgendeiner Weise zur Assoziation des Holoenzym und damit zur Stabilisierung von CK2 β beiträgt.

13.3.5 CK2 β moduliert die katalytische Aktivität und die Substratspezifität von CK2 α

Bei ihren Rekonstitutionstudien stellten Grankowski *et al.*⁸⁰ fest, daß die Komplexbildung zwischen CK2 α und CK2 β mit einer Steigerung der spezifischen katalytischen Aktivität gegenüber Casein als Testsubstrat um den Faktor 10 verbunden ist. Die maximale Aktivität war bei einem CK2 α /CK2 β -Verhältnis von 1:1 erreicht im Einklang mit der aus früheren Studien bekannten Stöchiometrie.

Diese Aktivierung von CK2 α durch CK2 β betrifft allerdings nicht jedes Substrat. So berichteten Lin *et al.*²⁴⁴, daß die katalytische Aktivität von CK2 α aus *Drosophila* gegenüber Glycogensynthase und der p120-Untereinheit aus dem eIF-3-Protein durch Bindung von CK2 β nicht beeinflußt wird. Mit eIF-2 β als Substrat hingegen ist die Aktivierung durch CK2 β noch viel stärker als im Falle von Casein. Später

dann wurden auch Proteinsubstrate gefunden, die praktisch nur durch CK2 α phosphoryliert werden, bei denen CK2 β also inhibierend wirkt. Das Paradebeispiel dafür ist das Calmodulin, das seit 1987 als CK2-Substrat bekannt ist²⁵⁹. 1992 wurde zweimal unabhängig voneinander berichtet, daß zwar isolierte CK2 α , nicht aber das CK2-Holoenzym zur Phosphorylierung von Calmodulin in der Lage ist^{260,261}. Zusammengefaßt kann man sagen, daß CK2 β generell aktivierend auf CK2 α wirkt, daß dieser Einfluß aber substratabhängig ist, so daß im Endeffekt die Substratspezifität verändert wird.

Im Zusammenhang mit der CK2 α -Aktivierung durch CK2 β erwiesen sich einige der von Boldyreff *et al.*²⁴⁶ erzeugten CK2 β -Mutanten als besonders aufschlußreich, nämlich vor allem diejenigen, bei denen Aspartat- oder Glutamatreste im Bereich der sauren Schleife zu Alanin mutiert und damit entladen worden waren. Wie oben ausgeführt, konnten derartige Mutanten nach wie vor an CK2 α binden, führten jedoch generell zu hyperaktiven Holoenzymen. Beispielsweise ließ sich die CK2 α -Aktivität gegenüber einem aus Calmodulin abgeleiteten Substratpeptid durch die Dreifachmutante CK2 β -Asp55Ala/Leu56Ala/Glu57Ala um den Faktor 30 steigern, während Wildtyp-CK2 β nur eine zehnfache Stimulierung bewirkte²⁴⁶.

Gleichzeitig erwies sich, daß sich derartige hyperaktive CK2-Holoenzyme nicht mehr durch 100 bis 200 mM NaCl stimulieren ließen, wie es für das normale CK2-Holoenzym typisch ist²⁴⁶. Obendrein besaßen sie, wie in einer Folgearbeit²⁶² gezeigt wurde, ein deutlich verändertes Verhalten gegenüber polybasischen Peptiden und Proteinen. Während das Wildtyp-Holoenzym durch derartige Polykationen aktiviert und sogar zur Phosphorylierung von Calmodulin angeregt wurde, war dieser Effekt bei den hyperaktiven Mutanten verschwunden.

Offenbar führte also eine „Entladung“ des sauren CK2 β -Stranges durch Austausch negativ geladener Aminosäuren oder seine Abschirmung in Wildtyp-CK2 β durch eine hohe Ionenstärke oder durch Polykationen zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung. Es hatte also den Anschein, als ob es zwei Einflüsse der CK2 β auf die CK2 α -Aktivität gibt: erstens den „normalen“ aktivierenden Einfluß auf die Phosphorylierung von Casein oder künstlicher Peptidsubstrate und zweitens eine Dämpfung, für die die saure Schleife der CK2 β (Abb. 6) verantwortlich ist.

In der Tat ließen sich diese beiden Effekte auch auf CK2 α -Seite auseinanderdividieren. So wurden 1997 CK2 α -Mutanten beschrieben, in denen nur die negative Kontrolle durch CK2 β , nicht jedoch die positive Kontrolle beeinträchtigt war²⁶³. Diese Mutanten betrafen den basischen Strang von Lys74 bis Arg80 (Abb. 5) sowie das Segment Arg191 bis Lys198, die sogenannte (p+1)-Schleife (grüne Markierung in Abb. 5), in der ebenfalls gehäuft basische Aminosäuren vorkommen. Der positiv geladene Charakter dieser Bereiche paßte naturgemäß hervorragend zu der sauren Schleife (Abb. 6), der auf CK2 β -Seite für die Negativkontrolle verantwortlich ist.

13.4 Studien zur Quartärstruktur der CK2

13.4.1 CK2 α bildet Monomere

Die spontane Bildung des CK2-Holoenzym aus den Untereinheiten *in vitro* hatte gezeigt, daß es starke Wechselwirkungen zwischen den Proteinketten geben muß. Deshalb war die Frage nach den Wechselwirkungspartnern und nach der Architektur des CK2-Holoenzym während der 90er Jahre sehr aktuell und wurde in kleinen Schritten beantwortet.

Ein Teilproblem dieser Fragestellung war, ob schon die beiden CK2 α -Untereinheiten des $\alpha_2\beta_2$ -Komplexes miteinander wechselwirken oder ob dazu die Anwesenheit der beiden CK2 β -Ketten nötig ist. Erstmals aufgeworfen und beantwortet haben diese Frage Hu & Rubin²⁴³ im Jahre 1990. Sie bestimmten für rekombinante CK2 α aus *Caenorhabditis elegans* sowohl unter denaturierenden als auch unter nativen Bedingungen eine Molmasse von ca. 40 kDa und schlossen daraus, daß CK2 α normalerweise als Monomer vorliegt. Zu dem gleichen Ergebnis kamen wenig später Grankowski *et al.*⁸⁰ und Birnbaum *et al.*²⁵⁵.

Dieser Befund wurde in den Jahren 1995/1996 dreimal unabhängig durch ein damals neuartiges genetisches System zur Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo*, das Hefe-2-Hybrid-system²⁶⁴, bestätigt: Sowohl Gietz *et al.*²⁶⁵ als auch Kusk *et al.*²⁶⁶ als auch Boldyreff *et al.*²⁶⁷ fanden, daß zwar CK2 β ein physiologischer Wechselwirkungspartner der CK2 α ist, nicht aber CK2 α selbst.

13.4.2 CK2 β bildet stabile Dimere

Aus ihren Ergebnissen mit CK2 α schlossen Hu & Rubin²⁴³ korrekterweise, daß CK2 β die entscheidende Rolle bei der Bildung des Holoenzym zukommen müsse, indem es homo- und heterotope Kontakte ausbilde. Um zu testen, ob die postulierte homotope CK2 β /CK2 β -Wechselwirkung zur Dimerisierung führt, war es naheliegend, die hydrodynamischen Eigenschaften der CK2 β unter nicht-denaturierenden Bedingungen zu untersuchen.

Dies geschah erstmals 1992 durch Issinger *et al.*²⁵⁷, die durch Gelfiltrationschromatographie feststellten, daß CK2 α und CK2 β aus *Homo sapiens* gleiche Stokes-Radien besitzen. Da die aus der Sequenz berechnete Molmasse von *hsCK2 α* knapp doppelt so groß ist wie die von *hsCK2 β* , gab es für dieses Ergebnis zwei Interpretationsmöglichkeiten: Entweder bildet CK2 β in der Tat Dimere, oder es liegen stark verzerrte CK2 β -Monomere vor. Da die Autoren das gleiche experimentelle Ergebnis auch unter stark denaturierenden Bedingungen (6 M Harnstoff, 14 mM Dithiothreitol) erhielten, entschieden sie sich zunächst für die zweite Möglichkeit.

Issinger⁶⁰ korrigierte dies in seinem Übersichtsartikel von 1993, in dem er Sedimentationskoeffizienten und molekülformunabhängige Molmassen präsentierte, die für die Existenz von CK2 β -Dimeren sprachen. Konsequenterweise deutete er jene unter denaturierenden Bedingungen gemessenen Stokes-Radien²⁵⁷ nun als Anzeichen für eine extrem feste Assoziation zweier CK2 β -Untereinheiten, was sich später in der Tat bewahrheitet hat.

Weitere Hinweise auf starke CK2 β /CK2 β -Wechselwirkungen und damit auf die Dimerisierung von CK2 β lieferten in den Jahren 1995 und 1996 die schon erwähnten Hefe-2-Hybridarbeiten durch Gietz *et al.*²⁶⁵, Kusk *et al.*²⁶⁶ und Boldyreff *et al.*²⁶⁷. Die letztgenannte Studie hatte vor allem deshalb einen besonderen Wert, weil in ihr Teilkonstrukte der CK2 β im Hefe-2-Hybridsystem eingesetzt wurden, die eine Aussage darüber zuließen, welche Bereiche des CK2 β -Monomers für die Dimerisierung verantwortlich sind. Dabei ergab sich, daß vom C-Terminus 50 Aminosäuren deletiert werden können, ohne daß das Dimerisierungspotential zerstört wird.

Zeitgleich zu diesen Arbeiten konnten Krehan *et al.*²⁶⁸ CK2 β -Dimere auch durch chemische Quervernetzung nachweisen. Dazu ließen sie das Vernetzungsgagens auf das komplette CK2-Holoenzym einwirken. Bei der anschließenden SDS-Gelelektrophorese konnten sie CK2 β -Dimere immunologisch detektieren.

13.4.3 CK2 β wechselwirkt mit CK2 α und bildet als Dimer den Kern des CK2-Holoenzym

Daß es, wie von Hu & Rubin²⁴³ vermutet, starke Wechselwirkungen zwischen CK2 α und CK2 β geben muß, bestätigte sich durch die bereits erwähnten Befunde, wonach CK2 β die Aktivität⁸⁰ und die Stabilität²⁵⁷ von CK2 α deutlich beeinflusst. Daß umgekehrt auch CK2 β durch CK2 α stabilisiert wird, konnten Lüscher & Litchfield²⁶⁹ 1994 zeigen. Sie untersuchten die Biosynthese von CK2 α und CK2 β

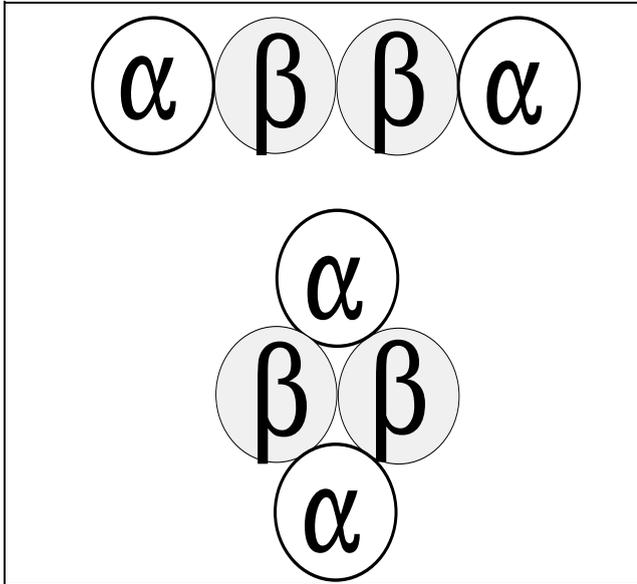


Abb. 7: Die beiden Möglichkeiten für die Organisation des CK2-Holoenzym nach den Vorstellungen Boldyreffs *et al.*²⁶⁷ im Jahre 1996.

in Zellkulturen und fanden, daß CK2 β zunächst im Überschuß produziert, daß freies CK2 β -Protein dann aber innerhalb einiger Minuten proteolytisch abgebaut wurde. Als dauerhaft erwiesen sich dagegen die CK2 α -gebundene CK2 β -Fraktion sowie CK2 α selbst, das sofort nach seiner Biosynthese von CK2 β komplexiert wurde. In den Folgejahren lieferten dann die drei Hefe-2-Hybridstudien von Gietz *et al.*²⁶⁵, Kusk *et al.*²⁶⁶ und Boldyreff *et al.*²⁶⁷ einen stichhaltigen Beweis für starke Kontakte zwischen CK2 α und CK2 β .

1996 faßten Boldyreff *et al.*²⁶⁷ die bis dahin gesammelten Erkenntnisse in einer Zeichnung ähnlich der in Abb. 7 zusammen. Klar war, daß ein CK2 β -Dimer im Zentrum des Holoenzym steht; offen war hingegen, ob jede CK2 α -Kette mit beiden CK2 β -Molekülen Kontakt hat oder nur mit einem.

Doch von diesen globalen Überlegungen abgesehen, wurden die CK2 α /CK2 β -Kontakte auch schon frühzeitig im Detail untersucht. Wiederum waren es die von Boldyreff *et al.*²⁴⁶ vorgestellten CK2 β -Mutanten, die die ersten Einsichten zuließen. Zwei dieser Mutanten, CK2 $\beta^{\Delta 171-215}$ und CK2 $\beta^{\Delta 150-215}$, zeigten in keiner Eigenschaft (Stabilisierung und Aktivierung von CK2 α , Sedimentationskoeffizient) irgendein Anzeichen von Assoziation mit CK2 α . Umgekehrt verhielt sich die Mutante CK2 $\beta^{\Delta 194-215}$ wie der Wildtyp. Der entscheidende Kontaktbereich war also zwischen den Aminosäuren 171 und 194 zu suchen. In der Tat verhielt sich die Mutante CK2 $\beta^{\Delta 181-215}$ intermediär: Hinsichtlich der Thermostabilisierung war sie identisch zum Wildtyp, obwohl Aktivierungs- und Sedimentationsstudien auf eine geschwächte Wechselwirkung mit CK2 α schließen ließen.

Für den Befund, daß der entscheidende CK2 α /CK2 β -Kontakt im C-terminalen Bereich zu suchen ist, sprach auch das bereits erwähnte Stellat-Protein aus *Drosophila*¹⁷². Unter den bekannten CK2 β -Homologen ist es das Kürzeste und reicht C-terminal nur bis zum Leu187 von *hsCK2 β* (Abb. 6). Bozzetti *et al.*¹⁷² konnten 1995 zeigen, daß es zwar *in vitro* mit *hsCK2 α* wechselwirken kann, jedoch erheblich schwächer als *hsCK2 β* . So bedurfte es eines mehr als 10-fachen Überschusses an *dmStellat*-Protein, um bei *hsCK2 α* die gleiche Stimulation zu erreichen, wie sei mit *hsCK2 β* im Verhältnis 1:1 möglich ist.

Verkompliziert wurden die Verhältnisse allerdings durch die bereits beschriebene Negativkontrolle, die CK2 β zusätzlich auf CK2 α ausübt. Diese Negativkontrolle war mutmaßlich auf die bereits 1990

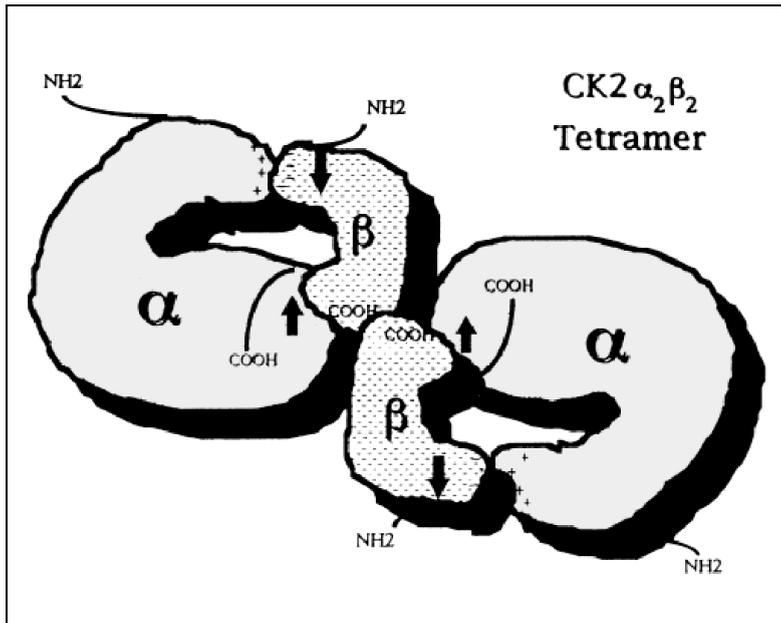


Abb. 8: Die Organisation des CK2-Holoenzym nach den Vorstellungen von Allende & Allende⁵⁶ aus dem Jahre 1998. Die Pfeile deuten an, welche Kontakte die CK2 α -Aktivität hoch- und welche sie herunterregulieren. Die Minuszeichen markieren die saure Schleife, die Pluszeichen den basischen Strang. Quelle: Allende & Allende (1998), *Promiscuous subunit interactions: a possible mechanism for the regulation of protein kinase CK2*. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 30/31, 129-136⁵⁶. Copyright (1998) Wiley-Liss, Inc., a subsidiary of John Wiley & Sons, Inc. Reproduziert mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons, Inc.

13.4.4 CK2-Holoenzymkomplexe können oligomere Aggregate bilden

Bei allen jenen Überlegungen zur Architektur des CK2-Holoenzym fehlte der Gedanke, daß die Existenz mehrerer Kontaktbereiche zwischen Proteinmolekülen im Prinzip dazu führen kann, daß sich komplexere Aggregate bis hin zu Filamenten bilden. Das ist insofern erstaunlich, als es Hinweise auf derartige Aggregate seit Ende der 70er Jahre gegeben hatte^{33,82} und weil dieses Aggregationsverhalten später in drei größeren Studien eingehend untersucht worden war^{270,271,272}.

So hatte Glover²⁷⁰ 1986 berichtet, daß CK2 aus *Drosophila* lineare Polymere mit etwa 100 Å Durchmesser bildet und daß sich die Länge dieser Filamente reziprok zur Ionenstärke verhält. Ähnliches hatte Mamrack²⁷¹ 1989 für CK2 aus Rinderherz beobachtet. Er hatte darüber hinaus entdeckt, daß die filamentöse CK2 nur noch eine Restaktivität besitzt, die sowohl durch Salz als auch durch die bekannten CK2-Aktivatoren Polylysin und Spermin restauriert werden kann.

1995 schließlich untersuchten Valero *et al.*²⁷² rekombinant hergestellte *Drosophila*-CK2 unter verschiedenen Salzkonzentrationen mittels Elektronenmikroskopie und verschiedener Techniken zur Charakterisierung hydrodynamischer Eigenschaften von Makromolekülen. Sie fanden dabei, daß das Holoenzym je nach Lösungsbedingungen zwischen drei verschiedenen filamentösen und ringförmigen Oligo-

postulierten²³⁹ ionischen Wechselwirkungen zwischen der sauren Schleife in CK2 β und den beiden basischen Segmenten in CK2 α zurückzuführen. Für diese Hypothese sprachen nicht nur die bereits besprochenen Mutageneseexperimente auf CK2 β -Seite^{246,262} und auf CK2 α -Seite²⁶³, sondern auch die von Krehan *et al.*²⁶⁸ publizierten Vernetzungsstudien.

Gegen Ende der 90er Jahre waren also neben der CK2 β /CK2 β -Wechselwirkung zwei getrennte Kontaktbereiche zwischen CK2 α und CK2 β identifiziert worden. Diese verwirrende Situation hat Allende & Allende⁵⁶ 1998 dazu veranlaßt, eine globale Organisation des CK2-Holoenzym vorzuschlagen, die scheinbar allen Befunden Rechnung trug (Abb. 8).

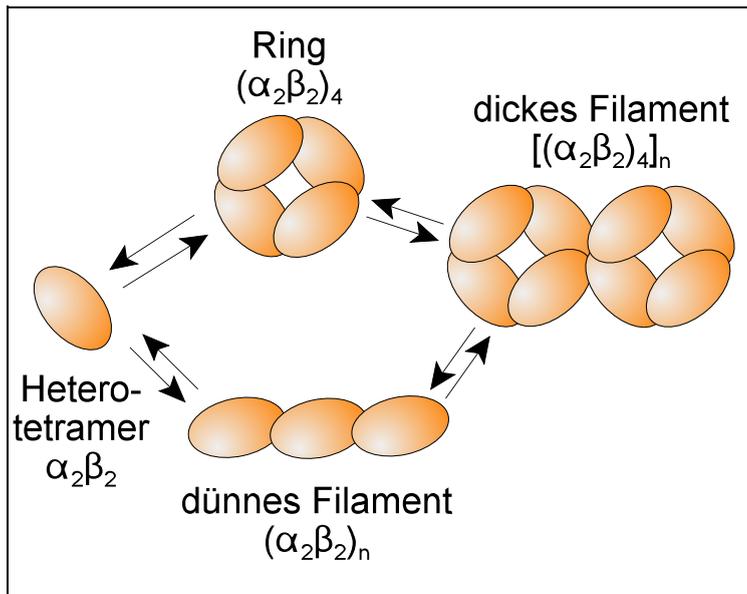


Abb. 9: Oligomere Aggregate der CK2 nach den Erkenntnissen und Modellvorstellungen Valeros *et al.*²⁷². Die Lage der Gleichgewichte hängt entscheidend von der NaCl- und von der Sperminkonzentration ab.

fanden sie, daß auch die altbekannten CK2-Aktivatoren Spermin sowie Mg^{2+} -Ionen den Übergang zur Ringstruktur begünstigen.

13.4.5 CK2 in Pflanzen: Variabilität in der Quartärstruktur

Im Zusammenhang mit der CK2-Quartärstruktur bieten sich ein paar Bemerkungen zu pflanzlicher CK2 an. Wie die bisherige Darstellung gezeigt hat, war die CK2-Forschung bis in die 90er Jahre hinein fast ausschließlich auf tierische Quellen und - mit einigen Abstrichen - Hefe fixiert. Über pflanzliche CK2 hingegen war nur sporadisch berichtet worden^{161,273}.

Dennoch hatten bereits diese frühen Arbeiten aus dem Jahre 1982 über CK2 aus Tabak¹⁶¹ und aus Weizen²⁷³ offenbart, daß CK2-Aktivität in Pflanzen nicht notwendigerweise an ein Holoenzym mit $\alpha_2\beta_2$ -Quartärstruktur gebunden ist. Für das Weizenenzym beispielsweise war eine native Molmasse von 38 kDa - passend zu einem CK2 α -Monomer - bei einer KCl-Konzentration von 0,5 M berichtet worden, während bei 0,1 M KCl eine Verschiebung zu Dimeren beobachtet worden war²⁷³. Auch die bei Tabak-CK2 festgestellte Molmasse paßte zu einer α_2 -Quartärstruktur¹⁶¹. In der ersten Publikation zur Mais-CK2, die 1986 erschien, blieb die Quartärstruktur zwar offen, jedoch besaß das Enzym sicher keine $\alpha_2\beta_2$ -Stöchiometrie²⁷⁴.

Wirklich von der Pflanzenphysiologie entdeckt wurde die CK2 jedoch erst zu Beginn der 90er Jahre. Nachdem 1991 mit dem Gen für *zmCK2 α* das erste pflanzliche CK2-Gen kloniert und sequenziert worden war²¹⁷, wurde 1992 Mais-CK2 aus natürlichen Quellen mit deutlich verbesserten Methoden erneut charakterisiert, wobei jedoch wiederum keine CK2 β -Untereinheiten gefunden werden konnten²⁷⁵. Im selben Jahr dagegen wurde in Zellkernen von Erbsen ein klassisches CK2-Heterotetramer mit $\alpha_2\beta_2$ -Stöchiometrie entdeckt²⁷⁶. Auch aus Zellkernen von Brokkoliköpfen wurde ein CK2-

merstrukturen wechselt und daß der Übergang zwischen ihnen vollständig reversibel und reproduzierbar ist (Abb. 9). Danach existieren saubere Heterotetramere nur bei hohen Salzkonzentrationen über 0,3 M NaCl, während bei ca. 0,2 M NaCl überwiegend ringförmige Strukturen mit einer Stöchiometrie von $(\alpha_2\beta_2)_4$ vorliegen.

Darüber hinaus diskutierten Valero *et al.*²⁷², ob das Aggregationsverhalten der CK2 die Basis für einen neuartigen Regulationsmechanismus darstellen könnte, nachdem sie festgestellt hatten, daß die spezifische Aktivität des Enzyms in der ringförmigen Struktur, wie sie unter mittleren Salzkonzentrationen vorliegt, am größten ist. Passend dazu und zu den Ergebnissen Mamracks²⁷¹

Komplex isoliert, dessen Molmasse mit 128 kDa im typischen Bereich für CK2-Holoenzyme lag²⁷⁷. Im Falle der Erbsen-CK2 wurden sowohl die α - als auch die β -Untereinheit auf Kreuzreaktivität mit entsprechenden Antikörpern gegen *Drosophila*-CK2 α bzw. -CK2 β geprüft. Dieser Test verlief im Falle der α -Untereinheit positiv, im Falle der β -Untereinheit jedoch negativ, so daß offen blieb, ob Erbsen-CK2 wirklich ein Protein aus der CK2 β -Familie enthält.

Unzweifelhaft bewiesen wurde die Existenz pflanzlicher CK2 β -Untereinheiten erst 1994, als zwei entsprechende Gene in *Arabidopsis thaliana* identifiziert und sequenziert werden konnten²²⁰. Im Folgejahr wurde berichtet, daß sich *atCK2 α* - und *atCK2 β* -Untereinheiten rekombinant in *Escherichia coli* exprimieren und anschließend *in vitro* zu einem Holoenzym kombinieren lassen²⁵⁶. Schließlich wurde 1997 gezeigt, daß in *Arabidopsis*-Rohmaterial eine monomere und eine heterotetramere CK2-Form koexistieren²⁷⁸.

Zusammengefaßt ergab sich für das Pflanzenreich ein viel heterogeneres Bild hinsichtlich der CK2-Quartärstruktur als bei Tieren und bei Hefe. Ob dafür der deutlich verlängerte N-Terminus, wie er an den vier *A.thaliana*-CK2 β -Sequenzen in Abb. 6 erkennbar ist, verantwortlich ist, ist bis heute unklar. Auf jeden Fall trugen diese Erkenntnisse mit dazu bei, das Bild vom undissoziierbaren CK2-Holoenzym zu relativieren, das sich nach den Rekonstitutionsexperimenten Cochets & Chambaz⁷⁴² aus dem Jahre 1983 festgesetzt hatte.

13.4.6 Nukleare CK2 aus *Chironomus tentans*: freie CK2 α und CK2 β neben dem CK2-Holoenzym
Nicht nur für *Arabidopsis thaliana* wurde nachgewiesen, daß CK2 α und das CK2-Holoenzym coexistieren können²⁷⁸, sondern 1993 erstmals auch für tierische Zellen. Stigare *et al.*¹²⁷ nämlich isolierten CK2-Aktivität aus Zellkernen der Zuckmücke *Chironomus tentans* und machten dabei eine überraschende Entdeckung: Mehr als 80 % der nuklearen CK2 α waren unlöslich in 0,35-molarer NaCl-Lösung, während CK2 β und das CK2-Holoenzym unter diesen Bedingungen komplett extrahiert werden und anschließend durch Ammoniumsulfatfällung voneinander getrennt werden konnten. Die schlechte Löslichkeit von CK2 α führten die Autoren auf die Bindung des Enzyms an andere nukleare Komponenten zurück.

13.5 Die Rolle der (Auto-)Phosphorylierung der CK2 auf ihre Aktivität und Quartärstruktur

Bei den geschilderten Untersuchungen zur Formierung des CK2-Holoenzym und zu den Wirkungen der CK2-Untereinheiten aufeinander stand immer die Frage im Raum, wie sich dabei die Autophosphorylierung an CK2 β oder andere Phosphorylierungen an CK2 α oder CK2 β auswirken. Hinzu kam, daß die seit 1987 angesammelten Berichte, wonach die CK2-Aktivität in Zellen nach Stimulation durch gewisse Hormone und Wachstumsfaktoren deutlich steigt (s. Kap. 12.7.3) mechanistisch nicht geklärt waren. Es war also durchaus möglich, daß in diesem Zusammenhang Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen eine ähnlich entscheidende Rolle spielen, wie es bei den MAP-Kinasen und den CDKs, also den nächsten Verwandten der CK2 α , etwa zur gleichen Zeit gezeigt werden konnte.

Hinsichtlich der Autophosphorylierung an CK2 β war schon vor 1987 klar, daß sie keinen größeren Einfluß auf die katalytische Aktivität hat²⁷⁹. Dieses Ergebnis wurde durch die Mutagenesestudien Boldyreffs *et al.*²⁴⁶ im großen und ganzen bestätigt. CK2 β -Mutanten ohne die N-terminale Autophos-

phorylierungsstelle konnten CK2 α bei der Phosphorylierung eines calmodulin-abgeleiteten Peptids mindestens genauso gut oder gar etwas besser aktivieren als der Wildtyp. Gleichzeitig zeigten diese Befunde sowie parallel durchgeführte Thermostabilisierungsstudien²⁴⁶, daß die Autophosphorylierungsstelle für die Bildung des CK2-Holoenzym nicht wichtig ist.

Während also die N-terminale Autophosphorylierungsstelle der CK2 β höchstwahrscheinlich kein Regulationsort der CK2-Aktivität war, deuteten Ergebnisse Ackermans *et al.*²⁸⁰ darauf hin, daß CK2 β mindestens eine weitere Phosphorylierungsstelle hat, die infolge eines EGF-Signals abgesättigt wird. Diese „Hyperphosphorylierung“ war nach den Beobachtungen jener Autoren mit einer Vervierfachung der Aktivität verbunden. Sie schlossen ihre Diskussion daher mit dem Satz, „daß dieses Enzym nun der wachsenden Zahl von Kinasen zugerechnet werden muß, deren zelluläre Funktion durch Phosphorylierung reguliert wird.“²⁸⁰

Diese optimistische Feststellung hat sich nicht bestätigt. Insbesondere war von einer „Hyperphosphorylierungsstelle“, die nach den Schätzungen Ackermans *et al.*²⁸⁰ etwa 5 bis 10 Positionen C-terminal von der Autophosphorylierungsstelle liegen sollte, in der späteren Literatur keine Rede mehr. Stattdessen wurde 1991 das Ser209 nahe des C-Terminus' der CK2 β als Phosphorylierungsstelle für die CDK1^a identifiziert²²⁸. Die Hoffnung, mit dem Ser209 einen Ansatzpunkt für eine CK2-Regulation gefunden zu haben, wurde jedoch durch die Mutagenesestudie Boldyreffs *et al.*²⁴⁶ gedämpft, denn C-terminale Deletionsmutanten, denen diese Phosphorylierungsstelle fehlte, erwiesen sich als voll funktionsfähig hinsichtlich Aktivierung und Stabilisierung von CK2 α .

Im Endeffekt gelang es in den 90er Jahren nicht, der markanten Autophosphorylierung der CK2 am N-Terminus von CK2 β eine zweifelsfreie Funktion zuzuordnen. Ob sich neuere Erkenntnisse, wonach über diese Phosphorylierung der ubiquitin-vermittelte CK2 β -Abbau am Proteasom gehemmt und reguliert wird²³⁰, besser etablieren und sie in den gesicherten Erkenntnisschatz über CK2 eingehen werden, bleibt abzuwarten.

Auch wenn die physiologische Bedeutung der N-terminalen CK2 β -Phosphorylierung unklar ist, so ist sie wenigstens seit den 70er Jahren durchgängig in der CK2-Literatur dokumentiert. Im Falle einer CK2 α -Phosphorylierung ist nicht einmal das gegeben, von einer gesicherten Funktionszuweisung ganz zu schweigen. Berichte über die (Auto-)Phosphorylierung von CK2 α sind sporadisch immer wieder in der Literatur aufgetaucht, angeregt nicht zuletzt durch die zunehmenden Erkenntnisse, wonach viele EPKs u.a. über Phosphorylierungen vor allem im Bereich der sogenannten Aktivierungsschleife reguliert werden²⁸¹. Als Beispiel wurde die hypothetische CK2 α -Phosphorylierung an Tyr50 inmitten der ATP-Bindungsschleife bereits erwähnt (s. Kap. 13.2.7), die zwar als Idee wegen der Analogie zu den cyclin-abhängigen Proteinkinasen sehr attraktiv ist, die jedoch nicht erhärtet werden konnte.

13.6 Funktionelle Studien

13.6.1 Die Ausgangslage

Die geschilderten Charakterisierungen des CK2-Holoenzym und seiner Untereinheiten leisteten zwar einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der chemischen Eigenschaften des Enzyms, gleichwohl

^adamals „p34^{cdc2}“ genannt

blieben die zentralen biologischen Fragestellungen nach wie vor offen: In welcher Weise greift CK2 in zentrale Lebensprozesse wie den Zellzyklus ein? Welche Rolle spielt CK2 bei der Tumorentstehung und -verbreitung? Welches sind die entscheidenden Substrate und Wechselwirkungspartner des Enzyms *in vivo*? Zusammengefaßt: Was sind die physiologischen Funktionen der CK2?

Ein Großteil der CK2-Forschung in den 90er Jahren betraf mehr oder weniger direkt diese Fragestellungen. Teilweise ging es dabei auch darum, Indizien aus der Vergangenheit zu überprüfen. Beispielhaft sei eine Arbeit von Litchfield *et al.*²⁰¹ genannt, in der berichtet wurde, daß viele der in den 80er Jahren beobachteten Effekte zur Stimulierung von CK2 durch Hormone und Wachstumsfaktoren einer kritischen Überprüfung nicht standgehalten hätten.

13.6.2 Knockout-Experimente: CK2 α ist überlebensnotwendig in allen eukaryontischen Zellen, CK2 β nur in höheren Eukaryonten

Die erste und meistzitierte Knockout-Studie für CK2 wurde bereits 1990 publiziert²⁸². Die Autoren stellten haploide Hefezellen her, in denen die Gene für *scCK2 α* und *scCK2 α '* zerstört waren, in denen also keine CK2-Aktivität mehr vorlag. Diese Zellen erwiesen sich als nicht lebensfähig, konnten jedoch durch Plasmide mit fremden CK2 α -Genen (darunter *dmCK2 α*) am Leben erhalten werden. Im Gegensatz dazu waren Hefezellen, in denen eines der beiden CK2 α -Gene intakt war, nicht nur lebensfähig, sondern unauffällig hinsichtlich ihres Phänotyps.

Diese Arbeit zeigte klar, daß CK2-Aktivität für das Überleben von Hefezellen unerlässlich ist. Da wenig später ähnliche Ergebnisse für *Schizosaccharomyces pombe*²⁸³ und für *Dictyostelium discoïdum*²⁸⁴ publiziert wurden, gilt diese Schlußfolgerung wohl allgemein für eukaryontische Zellen. Zwar gibt es keine Komplet-Knockout-Studien für CK2 α in höheren Eukaryonten, wohl aber Arbeiten mit kultivierten Zellen, bei denen die Genexpression durch Antisense-Oligonukleotide herabreguliert war, was ebenfalls zu schwerwiegenden Wachstumsstörungen führte (s. Übersicht bei Guerra & Issinger⁵⁴). Im Gegensatz zu Hefe konnte bei Mäusen durch eine Zerstörung des CK2 α '-Gens gezeigt werden, daß sich CK2 α und CK2 α ' nicht komplett ersetzen können. CK2 α '-defiziente Mäuse sind normal lebensfähig, jedoch sind die Männchen steril²⁸⁵.

Im Falle von CK2 β sind die Verhältnisse komplizierter. Schon das Beispiel *Dictyostelium discoïdum* beweist, daß es eukaryontische Zellen ohne CK2 β gibt. Bei Bäckerhefe konnte 1995 gezeigt werden, daß CK2 β nicht überlebensnotwendig ist: Eine Zerstörung beider CK2 β -Gene führte zu lebens- und vermehrungsfähigen Zellen, die allerdings salzempfindlich waren²⁸⁶. In jüngster Zeit hat sich freilich erwiesen, daß dieser nicht-essentielle Charakter von CK2 β nur niedere Eukaryonten betrifft. Bei einer CK2 β -Knockout-Studie mit Mäusen starben die CK2 β -defizienten Embryonen bereits nach 7 Tagen, also nach etwa der Hälfte der Schwangerschaft ab²⁸⁷.

13.6.3 CK2 und Zellzyklus

Zu Beginn der 90er Jahre standen mit den Cyclinen und den cyclinabhängigen Proteinkinasen die beiden Hauptkomponenten der Kontrolle des eukaryontischen Zellzyklus fest. Da beide Komponenten Homologien und Analogien zu CK2 aufweisen - die CDKs zu CK2 α , die Cycline zu CK2 β - ist verständlich, daß in dieser Zeit die wissenschaftliche Diskussion über eine Beteiligung der CK2 am Zellzyklusgeschehen aufkam.

Für eine solche Beteiligung gab es aber auch direkte Indizien. So wurde in den Jahren 1991 und 1992 publiziert, daß CK2 und CDK1 sich gegenseitig phosphorylieren^{228,288}. Über die Phosphorylierung von CK2 β am Ser209 durch CDK1 wurde schon im Kap. 13.5 berichtet, allerdings auch darüber, daß diese Phosphorylierung keine Auswirkungen auf die CK2-Aktivität hat. Im umgekehrten Falle ist die Lage ähnlich unklar: Zwar sind diverse Regulationsmechanismen für CDKs bekannt, aber die 1991 berichtete CDK1-Phosphorylierung durch CK2²⁸⁸ hat sich nicht als gesichertes Erkenntnis mit physiologischer Relevanz durchsetzen können.

Neben CDK1 gibt es aber auch andere Zellzykluskomponenten wie etwa die DNA-Topoisomerase II, die durch CK2 phosphoryliert werden und bei denen die Bedeutung dieser Phosphorylierung auch in der neueren Literatur besser manifestiert ist⁴⁷. Insbesondere aber ist die Bedeutung der CK2 für den Zellzyklus auch auf zellulärer Ebene, nämlich durch Injektion von Anti-CK2-Antikörper in menschliche Fibroblasten gezeigt worden²⁸⁹. Insofern kann die Beteiligung des Enzyms an diesem Geschehen als gesichert gelten, auch wenn die Einzelheiten unklar sind.

13.6.4 Noch mehr Substrate: Auch CK2 ist eine Breitbandkinase

Während bis Mitte der 70er Jahre kein potentiell *in-vivo*-Substrat der CK2 bekannt war, stieg die Zahl der literatur-belegten CK2-Substrate bereits in den 80er Jahren exponentiell an⁵⁹. In seiner Übersicht von 1990 führte Pinna⁴³ 49 Substratproteine auf, und 1997 nannten Pinna & Meggio⁵⁷ bereits 160 identifizierte CK2-Substrate. Dieselben Autoren listen in ihrer neuesten Zusammenfassung⁴⁶ sogar 307 Substrate auf. CK2 ist damit die EPK mit dem breitesten bekannten Substratspektrum.

Wichtiger aber noch als die Quantität ist die Qualität dieser Proteinsubstrate. Auf diesen Aspekt sind erstmals Allende & Allende⁵⁸ in ihrem Übersichtsartikel von 1995 eingegangen, indem sie 55 der damals bekannten etwa 100 CK2-Substrate in sechs Gruppen eingeteilt haben: erstens Enzyme der DNA-Replikation und der DNA-Transkription, zweitens Transkriptionsfaktoren, drittens Signaltransduktionsproteine, viertens Translationsfaktoren, fünftens Proteine des Cytoskeletts und sechstens sonstige Proteine des Zellkerns und des Nucleolus. Mit anderen Worten: Mehr als die Hälfte der damals bekannten CK2-Substrate hatte mit Schlüsselprozessen der Zellteilung und -proliferation zu tun, während die typischen Enzyme des Zentralstoffwechsels fast gar nicht vertreten waren. Auch diese qualitative Tendenz hat sich seither bestätigt.

13.6.5 Mutagenesestudien zur Substratspezifität

In den Jahren 1994 bis 1997 erschienen eine Reihe von Mutagenesestudien, mit denen die entscheidenden Aminosäuren der CK2 α zur Substraterkennung identifiziert werden sollten. Den Anfang machten dabei jene beiden Arbeitsgruppen Krebs und Pinna, die sich bereits in den 80er Jahren auf Peptidseite mit diesem Problem befaßt und optimierte CK2-Substratpeptide entwickelt hatten (s. Kap. 12.8). Nunmehr publizierten sie gemeinsam eine Arbeit, in der sie die Rolle des Histidins an Position 160 untersuchten²⁹⁰. Dieser Position entspricht in CAPK das Glu170, das dort eine wesentliche Rolle bei der Erkennung der (p-2)-Position des Substrates spielt. In der Tat wurde in dieser Studie festgestellt, daß His160 mit der Aminosäure an Position (p-2) des Substrates wechselwirkt.

Die Kontakte zu der für CK2 wichtigeren Erkennungsregion C-terminal von der Phosphorylierungsstelle wurden 1995 bis 1997 in drei aufeinander aufbauenden Mutagenesearbeiten^{248,249,250} untersucht.

Als Grundlage der Mutantenplanung diente dabei der markante basische Strang von CK2 α zwischen Lys74 und Arg80 (s. Kap. 13.2.8) sowie die strukturbasierten Erkenntnisse zur Substraterkennung durch CAPK. CAPK beispielsweise bevorzugt eine hydrophobe Seitenkette an der (p+1)-Position ihrer Substrate, weil der entsprechende Kontaktbereich, die bereits erwähnte „(p+1)-Schleife“, durch drei hydrophobe Aminosäuren geprägt wird. CK2 α trägt an diesen drei Positionen positiv geladene Seitenketten, nämlich Arg191, Arg195 und Lys198, die konsequenterweise in das Mutageneseprogramm einbezogen wurden. Tatsächlich war ein zentrales Ergebnis, daß diese drei Aminosäuren für die hohe Präferenz der CK2 für negativ geladene Seitenketten an der (p+1)-Position verantwortlich sind.

Wie aber wird die wichtigste Position der Konsensussequenz, nämlich die negativ geladene Aminosäure an der (p+3)-Position erkannt? Drei CK2 α -Mutanten erwiesen sich in dieser Hinsicht als besonders empfindlich²⁵⁰: die Einzelmutante Lys77Ala, die Tripelmutante Lys79Ala/Arg80Ala/Arg83Ala sowie die Vierfachmutante Lys74-Lys77Ala. Demgegenüber hatte die Mutante Lys83Ala fast keine Auswirkung, während die Mutante Lys79Ala eher die Substratposition (p+4) beeinflusste. Die Interpretation war, daß Arg80 und Lys77 die wichtigsten Determinanten zur Erkennung der (p+3)-Position sind. Schließlich konnte gezeigt werden, daß die Zwischenposition (p+2) mit Lys49 aus der ATP-bindenden Schleife wechselwirkt.

13.6.6 Suche nach Wechselwirkungspartnern

Im Laufe der 90er Jahre etablierten sich immunologische, molekulargenetische, chromatographische und biophysikalische Techniken zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen. Diese Techniken gaben nicht nur, wie im Kap. 13.4 geschildert, Aufschluß über die Grundarchitektur des CK2-Holoenzym, sondern sie lieferten darüber hinaus Informationen über Wechselwirkungen des Enzyms zu anderen Proteinen, und zwar Wechselwirkungen, die über die typischen Enzym-Substrat-Interaktionen hinausgehen.

Ein frühes Beispiel dafür schon aus den 80er Jahren ist das im Nucleolus ansässige „Nucleolin“, eines der besten CK2-Substrate²⁹¹, das aber gleichzeitig einen stabilen Komplex mit CK2 bildet²⁹². Betraf dieses Beispiel noch das CK2-Holoenzym, so wurde spätestens 1993 mit den Berichten Stigares *et al.*¹²⁷ über holoenzym-unabhängige CK2 α - und CK2 β -Populationen deutlich, daß das ganze Thema viel komplexer ist: Nicht nur das Holoenzym, sondern jeweils CK2 α und CK2 β für sich genommen gehen physiologisch relevante Wechselwirkungen zu anderen Proteinen ein.

Im Falle der CK2 β waren in dem Zusammenhang Berichte über CK2 α -kompetitive Interaktionen mit anderen Proteinkinasen wie den beiden MAP-Kinase-Kinase-Kinasen A-Raf^{293,294} und c-Mos²⁹⁵ sowie der Proteinkinase p90^{fsk} am Ende des MAPK-Signalweges²⁹⁶ besonderes interessant. Denn durch derartige Befunde wurde CK2 β eine Rolle als ein nicht auf CK2 α beschränkter EPK-Wechselwirkungspartner von allgemeiner Bedeutung zugewiesen.

Das meistzitierte Beispiel für eine autonome Wechselwirkung von CK2 α ist die mit der Protein-Phosphatase 2A, die 1997 publiziert wurde²⁹⁷. Dieses Enzym spielt eine zentrale Rolle bei der Deaktivierung der MAP-Kinase-Kaskaden, indem es MAP-Kinasen und MAP-Kinase-Kinasen dephosphoryliert. Infolge Bindung und Phosphorylierung durch CK2 α wird die Phosphatase aktiviert, so daß CK2 α im Endeffekt (und im Gegensatz zum CK2-Holoenzym) MAP-Kinase-Kaskaden und damit die Zellproliferation herabreguliert.

Gegen Ende der 90er Jahre hatten die Berichte über Nicht-Substratwechselwirkungen von CK2, CK2 α und CK2 β ein solches Gewicht erhalten, daß die Autoren der letzten Übersichtsartikel jenes Jahrzehntes dem Thema eigene Kapitel widmeten. Die umfassendste Übersicht über CK2-Interaktionspartner präsentierten Guerra & Issinger⁵⁴, kommentiert allerdings auch durch kritische Anmerkungen zu den Methoden und allzu weitreichenden und voreiligen Schlußfolgerungen. Im Gegensatz zu dieser vorsichtigen Haltung übernahmen Allende & Allende⁵⁶ die „Promiskuität“ von CK2 α und CK2 β sogar in den Titel ihrer Zusammenfassung und interpretierten sie bereits als Schlüssel zum Verständnis der CK2-Regulation.

13.6.7 *Theileria parva*: Zelltransformation durch CK2?

Nachdem in den 70er Jahren mit der Src-Kinase das erste Onkoprotein entdeckt worden war, waren diverse weitere virale und zelluläre Proteinkinasen sowie andere Glieder zellulärer Signalketten als Produkte von Onkogenen und Protoonkogenen identifiziert worden. Folglich stellte sich die Frage, ob auch CK2 ein onkogenes Potential aufweist, zumal verschiedene Untersuchungen der 80er Jahre gezeigt hatten, daß neoplastische Gewebe der verschiedensten Art und Herkunft eine erhöhte CK2-Aktivität besitzen⁶⁰. Ob diese allerdings eine Folge der verstärkten Proliferationstätigkeit in Tumorgewebe ist oder ob umgekehrt die höhere CK2-Aktivität ursächlich für die Transformation normaler Zellen zu Tumorzellen ist, war unklar.

Für die Annahme, daß CK2 onkogenes Potential besitzt, sprachen Berichte über *Theileria parva*, einen pathogenen eukaryontischen Einzeller. Ähnlich wie der Rous-Sarcoma-Virus kann dieser Parasit bestimmte Zellen höherer Eukaryonten zu Tumorzellen transformieren. Genauer gesagt, befällt *Theileria parva* Rinder-Lymphozyten und verursacht bei den infizierten Tieren die leukämie-ähnliche, tödliche Krankheit Theileriose. Befallene Lymphozyten können permanent kultiviert werden und zeigen weitere typische Kennzeichen von Tumorzellen²⁹⁸.

Als wahrscheinliche molekulare Verursacherin der Theileriose wurde 1989 die CK2 vorgeschlagen²⁹⁹. Dafür sprachen insbesondere der Befund, daß die CK2-Aktivität in den transformierten Lymphozyten deutlich erhöht ist, sowie die Tatsache, daß *Theileria parva* selbst CK2 α besitzt, die - im Unterschied zu allen bekannten Homologen - mit einem N-terminalen Signalpeptid ausgestattet ist und somit vom Erreger in die Wirtszelle transportiert werden kann²⁹⁸.

Weitere Unterstützung für die „CK2-Hypothese“ zur Theileriose brachte 1995 ein Bericht Seldins & Leders³⁰⁰ über transgene Mäuse, denen CK2 α -cDNA mit einem speziellen Promotor zur Erhöhung der Expression in Lymphozyten übertragen worden war. Etwa 6 bis 15 % dieser Mäuse erkrankten innerhalb von neun Monaten an Lymphomen, wobei allerdings die Expression an CK2 α kaum erhöht war. Die Krankheit trat sogar erheblich schneller und häufiger in bi-transgenen Mäusen auf, in deren Lymphozyten zusätzlich zu CK2 α auch das Proto-Onkogen *c-myc* überexprimiert wurde, dessen Produkt ein Transkriptionsfaktor ist. Seldin & Leder³⁰⁰ schlossen daraus, daß CK2 bei der Tumorentstehung eventuell mit anderen Onkogenen kooperiert und deren Wirkung verstärkt.

Hinsichtlich der Theileriose selbst freilich wurde die geringe CK2 α -Überexpression in den transgenen Mäusen³⁰⁰ sowie die lange Latenzzeit bei der Tumorentstehung als Einwand gegen die Rolle der CK2 α als transformierendes Agens vorgebracht³⁰¹. Bezeichnenderweise wird denn auch im neuesten Übersichtsartikel zu dieser Krankheit die CK2 als möglicher Faktor gar nicht mehr erwähnt³⁰².

13.7 Einige allgemeine Tendenzen der Proteinkinaseforschung in den 90er Jahren

13.7.1 Erste 3D-Strukturen von Proteinkinasen

Da die Tertiärstrukturen von Proteinen stärker konserviert sind als die Aminosäuresequenzen, liegt dem „katalytischen Kern“ der EPKs eine gemeinsame Proteinfaltung zugrunde. Sie wurde erstmals 1991 durch Röntgenstrukturanalyse von CAPK aufgeklärt und beschrieben²⁶ und wird in dieser Arbeit gemeinsam mit den katalytischen Schlüsselpositionen am Beispiel von *zmCK2α*, der katalytischen Untereinheit der CK2 aus *Zea mays*, vorgestellt (s. Kap 15.1).

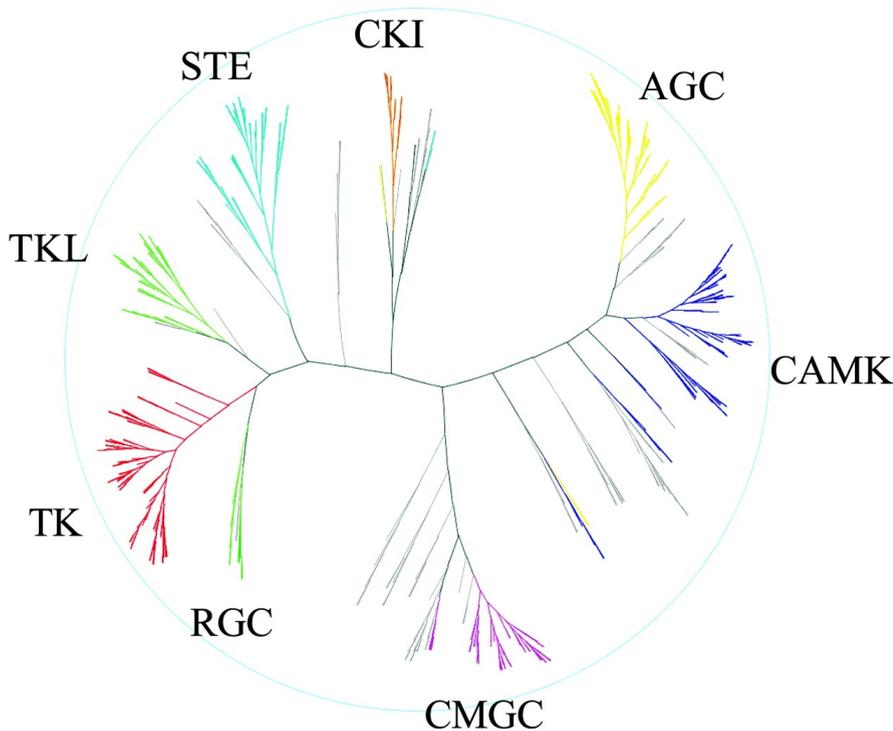


Abb. 10: Dendrogramm der 491 EPK-Sequenzdomänen aus den 478 EPK-Genen des Humangenoms. Die neun EPK-Hauptgruppen sind durch Beschriftung und Färbung gekennzeichnet, wobei folgende Abkürzungen verwendet werden: CKI, Caseinkinase-1-Gruppe; AGC, Verwandtschaftsgruppe von CAPK, cGMP-abhängiger Proteinkinase und Proteinkinase C; CAMK, Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinasen; CMGC, Definition s. Kap. 12.5; RGC, Rezeptor-Guanylatzyklase; TK, Tyrosinkinase; TKL, tyrosinkinase-ähnliche Proteinkinasen; STE, nach „STERile“, Kürzel für die MAP-Kinase-Kinase-Familie. Entnommen aus: Manning, G. *et al.* (2002), The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934²⁰⁰; Copyright (2002) American Association for the Advancement of Science (AAAS).

Zu den nächstfolgenden EPK-Strukturen zählten dann bereits die der nahen CK2α-Verwandten aus der CMGC-Gruppe, nämlich die der MAP-Kinasen ERK2³⁰³ und p38γ³⁰⁴ sowie der cyclinabhängigen Kinase 2 (CDK2)³⁰⁵. Bei diesen und weiteren EPK-Strukturaufklärungen hat sich die Ähnlichkeit der EPK-Grundfaltung bestätigt. Obendrein hat sich dabei gezeigt, daß die katalytische Aktivität von EPKs an ein komplexes Zusammenspiel struktureller Randbedingungen gebunden ist. Dies eröffnet die Möglichkeit zu einer umfassenden und mehrstufigen Aktivitätskontrolle, was für die Einbindung dieser Enzyme in Regulations- und Signaltransduktionswege bedeutsam ist.

13.7.2 „Atypische“ Proteinkinasen

Die erste „atypische Proteinkinase“ wurde bereits 1969 beschrieben: Es war die im Kap. 10.7 erwähnte Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase, die in der Mitochondrienmatrix vorkommt. Doch erst 1993 mit der Veröffentlichung der Aminosäuresequenz wurde klar, daß es sich hierbei um eine Nicht-EPK-Proteinki-

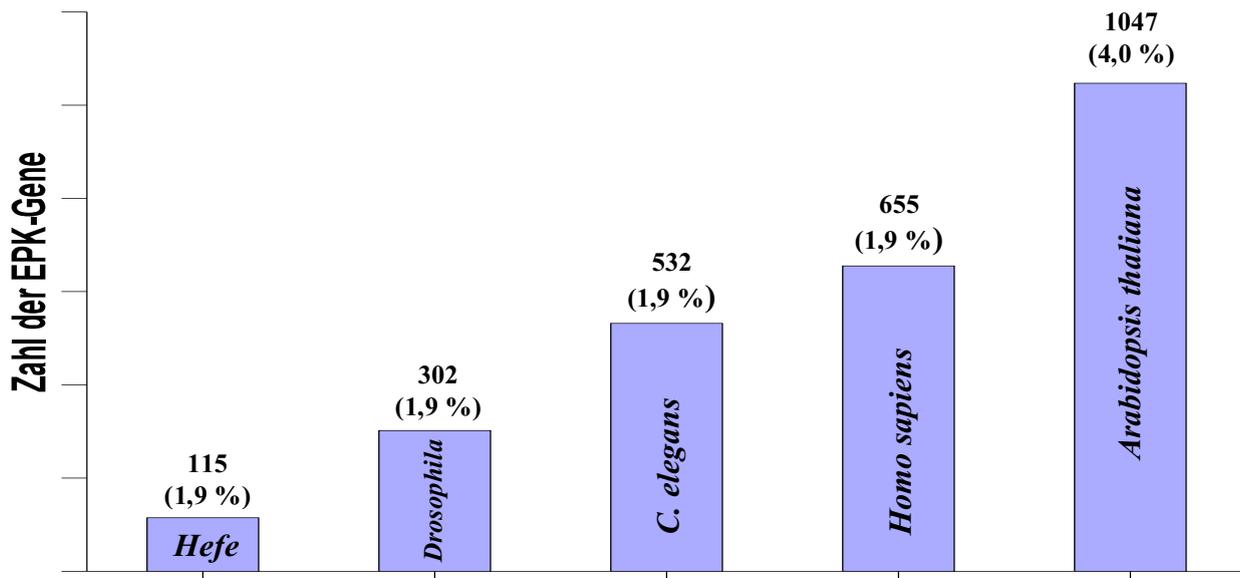


Abb. 11: Übersicht über fünf eukaryontische Kinome. Die Zahlen wurden der Proteomdatenbank des „European Bioinformatics Institute“ (EBI) entnommen. In Klammern: EPK-Anteil am Gesamtgenom.

nase handelt⁹⁸. Gemeinsam mit anderen homologen Proteinkinasen aus Mitochondrien bildet sie eine eigene Sequenzfamilie, die als „mitochondriale Proteinkinasen“ bezeichnet wurden³⁰⁶.

Obwohl es sich bei diesen Enzymen um Protein-Serin-Kinasen handelt, haben sie eine signifikante Sequenzhomologie zu den Protein-Histidin-Kinasen³⁰⁷ (s. Kap. 12.9). Weitere Beispiele für atypische Proteinkinasen sind die Alpha-Kinasen³⁰⁸, das sind Serin/Threoninkinasen, die keinerlei Sequenzhomologie zu den EPKs zeigen und die nach bisherigem Kenntnisstand wohl tatsächlich nur in Eukaryonten existieren. In einer Analyse sämtlicher Proteinkinasen des menschlichen Genoms zählen Manning *et al.*²⁰⁰ nicht weniger als 13 Gruppen von atypischen Proteinkinasen auf.

13.7.3 Das Kinom: Proteinkinasen sind die häufigsten Proteine in eukaryontischen Organismen

1996 wurde die erste Totalsequenzierung eines eukaryontischen Organismus', der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, abgeschlossen³⁰⁹, was erstmals eine globale Übersicht über das gesamte genetische Inventar eines eukaryontischen Organismus' gestattete. Hefe enthält 115 EPKs, die wegen der hohen Konservierung ihrer Sequenzen und insbesondere bestimmter funktioneller Schlüsselreste gut identifiziert und klassifiziert werden konnten¹⁹⁸. Für die Gesamtheit der Proteinkinasen, die im Genom eines Organismus' kodiert sind, hat sich mittlerweile der Begriff „Kinom“ eingebürgert. Inzwischen sind eine Reihe weiterer vergleichender Analysen innerhalb und zwischen Kinomen publiziert worden z.B. für den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*³¹⁰, für den Menschen^{311,200}, für den Vergleich zwischen Hefe und *Arabidopsis thaliana*³¹² oder für den Vergleich aller bis zum Jahr 2002 vorliegenden Kinome²¹⁹.

Durch derartige genomweite Analysen ist zunächst einmal klar geworden, daß EPK-Gene ca. 1,5 bis 2,5 % aller eukaryontischen Gene umfassen, womit die EPKs die größte Proteinfamilie in Eukaryonten sind. Darüber hinaus ist durch jene Analysen die etablierte EPK-Klassifizierung von Hanks & Hunter² erweitert worden. Manning *et al.*²⁰⁰ definieren für das menschliche Kinom neun Gruppen von EPKs mit 120 Familien und 179 Unterfamilien. Während nach dieser Gruppierung die CK1 Namensgeber für eine

der 9 EPK-Gruppen ist (Abb. 10), ist die CK2 nach wie vor Mitglied der CMGC-Gruppe.

Wie bereits im Kap. 13.2.2 erwähnt, hat ein Vergleich der Kinome verschiedener Organismen ergeben²¹⁹, daß von den 179 EPK-Unterfamilien des Menschen 51 auch in Hefe, der Fruchtfliege sowie dem Nematoden *C. elegans* vorkommen. Diese 51 Unterfamilien umfassen somit den „harten Kern“ der EPKs. Daß CK2 α in eine dieser Unterfamilien fällt, unterstreicht ihr evolutionäres Alter und ihre Bedeutung für eukaryontische Zellen.

Abb. 11 zeigt, daß das Kinom mit steigender Komplexität des Organismus' immer größer wird, auch wenn der prozentuale Anteil der EPKs am Genom ungefähr gleich bleibt. Die absolute Zahl der EPK-Gene im Menschen ist zwar mit ca. 500^{311,200} (655 nach der Proteomdatenbank des „European Bioinformatic Institute“) kleiner als lange Zeit vermutet wurde³¹³, jedoch ist ihr relativer Anteil am Genom mit ca. 2,3 % nach wie vor sehr hoch und liegt im Bereich früherer Schätzungen.

13.7.4 Nomenklaturprobleme: Sowohl „eukaryontische“ als auch „prokaryontische“ Proteinkinasen sind ubiquitär verbreitet

Die fast ausschließliche Fokussierung der Proteinkinaseforschung der 80er Jahre auf die CAPK-ähnlichen Enzyme hatte zu dem Eindruck geführt, Proteinphosphorylierung sei im wesentlichen ein Phänomen in Eukaryonten, das mit der gegenüber Prokaryonten viel höheren Komplexität dieser Organismen zusammenhängt. Dementsprechend wurden - und werden vielfach noch immer - Begriffe wie „Proteinkinase“ oder „eukaryontische Proteinkinase“ synonym verwendet und obendrein gleichgesetzt mit der CAPK und ihren Homologen.

Durch die Entdeckung der Protein-Histidin-Kinasen in den 80er Jahren (s. Kap. 12.9) wurde dieses Bild zwar im Prinzip widerlegt, in veränderter Form jedoch sogar verfestigt: Es entstand nunmehr der Eindruck, daß es eine relativ scharfe Grenze zwischen der Proteinphosphorylierung an Serin, Threonin und Tyrosin in Eukaryonten und derjenigen an Histidin in Prokaryonten gebe.

Wir wissen heute, daß auch diese Auffassung falsch ist. Beide Superfamilien, die EPKs und die Protein-Histidin-Kinasen, sind ubiquitär verbreitet, d.h. sie kommen in allen drei Organismenreichen (Eukaryonten, Bakterien und Archebakterien) vor. So wurden die ersten EPKs mittlerweile auch in Prokaryonten gefunden, und zwar sowohl in Bakterien als auch in Archebakterien³¹⁴. Die Ergebnisse dieser Sequenzanalysen sind inzwischen auch strukturanalytisch bestätigt worden³¹⁵. Nimmt man noch die diversen „atypischen“ Proteinkinasen hinzu, so offenbart sich die ganze Komplexität des Gebietes und gleichzeitig die Zweifelhaftigkeit eines Begriffes wie „eukaryontische Proteinkinasen“.

14 Zusammenfassung: CK2 ist eine unorthodoxe Proteinkinase

Die bisherige Darstellung hat gezeigt, daß CK2 ein seit 1954 intensiv untersuchtes Enzym ist, das trotz oder gerade wegen der Fülle der zusammengetragenen und teilweise widersprüchlichen Ergebnisse ein verwirrendes Bild abgibt. Es ist daher sinnvoll, die wichtigsten gesicherten Eigenschaften, wie sie vor den Strukturaufklärungen bekannt waren und zu denen die Strukturbiochemie eine Aussage machen kann, noch einmal zusammenzufassen:

- Quartärstruktur

CK2 bildet Heterotetramere mit $\alpha_2\beta_2$ -Stöchiometrie, d.h. sie liegt als Komplex zweier katalytischer Untereinheiten (CK2 α) und zweier nicht-katalytischer Untereinheiten (CK2 β) vor. Dieses sogenannte CK2-Holoenzym wird im Kern aus einem stabilen CK2 β -Dimer aufgebaut, an das zwei CK2 α -Monomere gebunden sind, und zwar so, daß sie untereinander keinen Kontakt haben. Das CK2-Holoenzym bildet sich spontan aus den Untereinheiten und ist sehr stabil. Isolierte CK2 α liegt in Lösung als Monomer, isolierte CK2 β dagegen als Dimer vor.

- Primärstruktur

CK2 α gehört zur CMGC-Familie der eukaryontischen (d.h. CAPK-ähnlichen) Proteinkinasen. Seine nächsten Verwandten sind die cyclinabhängigen Kinasen, die MAP-Kinasen und die Glycogensynthase-Kinase 3 (GSK3). Von CK2 β dagegen sind mit Ausnahme des Stelat-Proteins aus *Drosophila melanogaster* keine Homologen bekannt.

- Metallbindung

Die CK2 β -Sequenz besitzt ein typisches Zinkbindungsmotiv.

- Aggregation

Das CK2-Holoenzym bildet bei niedrigen Salzkonzentrationen ringförmige und filamentöse Aggregate. Höhere Salzkonzentrationen und Polykationen wie Spermin lösen diese Aggregate auf.

- Autophosphorylierung

Das CK2-Holoenzym besitzt je eine Autophosphorylierungsstelle nahe der N-Termini seiner beiden CK2 β -Untereinheiten.

- Regulation/konstitutive Aktivität

CK2 ist konstitutiv aktiv. Es ist weder ein „second messenger“-Molekül als Aktivator noch irgendein anderer Regulationsmechanismus bekannt. Weder Phosphorylierungen noch Autophosphorylierungen des Enzyms haben einen Einfluß auf seine katalytische Aktivität. Ein Zerfall des CK2-Holoenzym führt nicht zur Inaktivierung des Enzyms, weil auch die isolierte CK2 α -Untereinheit katalytisch aktiv ist. Mit ihrer konstitutiven Aktivität stehen CK2 (und CK2 α) in bemerkenswertem Gegensatz zu den übrigen eukaryontischen Proteinkinasen der CMGC-Gruppe, deren katalytische Aktivitäten durch Phosphorylierungen und andere Mechanismen streng kontrolliert werden.

- Einfluß von CK2 β auf CK2 α

Zwar ist CK2 α allein katalytisch aktiv, jedoch wirkt CK2 β als Modulator dieser Aktivität. Gegenüber vielen Substraten wird die Aktivität durch CK2 β gesteigert, gegenüber manchen jedoch wird sie vermindert. Somit modifiziert CK2 β das Substratprofil von CK2 α . Darüber hinaus erhöht CK2 β die Thermostabilität von CK2 α drastisch.

- Aktivatoren und Inhibitoren

Polybasische Substanzen wie Spermin oder Polylysin sind Aktivatoren des CK2-Holoenzym. Demgegenüber sind Polyanionen wie Heparin oder 2,3-Diphosphoglycerat substratkompetitive Inhibitoren, die sowohl auf CK2 α als auch auf das CK2-Holoenzym wirken. Als ATP-kompetitive Inhibitoren sind Ribofuranosyl-Benzimidazol- und Antrachinonderivate beschrieben worden.

- Substraterkennung/Acidophilie

CK2 und CK2 α sind acidophil, d.h. sie sind spezifisch für saure, negativ geladene Proteine bzw. Proteinregionen. Die minimale Konsensussequenz lautet (S/T)-X-X-(D/E/Sp/Tp), d.h. mindestens in der Position (p+3) muß sich eine negativ geladene Aminosäureseitenkette befinden. Weitere negative Ladungen, insbesondere an der (p+1)-Position, sind förderlich.

- Substratspektrum/Pleiotropie

CK2 ist pleiotrop und akzeptiert zumindest *in vitro* Hunderte verschiedene Proteine als Substrate.

- (duale) Substratspezifität

CK2 besitzt möglicherweise duale Substratspezifität. Das heißt, sie kann neben Serin- und Threoninresten auch Tyrosinreste phosphorylieren, sofern diese zugänglich und in eine negativ geladene Sequenzumgebung eingebunden sind.

- duale Cosubstratspezifität

CK2 und CK2 α akzeptieren GTP ebenso gut als Phosphorylierungsagens wie ATP.

Bei der strukturellen Untersuchung der CK2 seit 1998 ging es in erster Linie darum, zumindest einige strukturelle Hintergründe dieser Eigenschaften aufzudecken. Das gilt insbesondere für Eigenschaften wie die konstitutive Aktivität oder die duale Cosubstratspezifität, die CK2 als eine ungewöhnliche Proteinkinase ausweisen.

IV Strukturbiologie der CK2

15 Die Schlüsselstrukturen der CK2 - eine Übersicht

15.1 Kristallstruktur von CK2 α aus Mais: erste 3D-Struktur einer pflanzlichen Proteinkinase

Das „Strukturzeitalter“ der CK2 begann 1998 mit der Kristallstruktur der CK2 α aus *Zea mays* (*zmCK2 α*) (Abb. 12A/B; PDB-Code 1A6O, später ersetzt durch 1LR4)²⁷ (s. Anhang 2). Diese

Struktur war gleichzeitig die erste 3D-Struktur einer pflanzlichen Proteinkinase.

Angesichts der Tatsache, daß die damalige CK2-Literatur stark auf Wirbeltiere, *Drosophila* und Hefe fokussiert war, war die Auswahl des Mais-Enzyms für strukturelle Arbeiten kurios. Proteinchemisch jedoch war sie konsequent, denn erstens ist *zmCK2 α* im C-terminalen Bereich kürzer als Säugetier-CK2 α (Abb. 5) und wird daher im Gegensatz zu dieser auch nicht spontan C-terminal degradiert. Und zweitens deutete schon damals vieles - u.a. die relativ hohe spezifische Aktivität - darauf hin, daß *zmCK2 α* nicht unbedingt mit einem CK2 β -Protein assoziiert ist. Für die Kristallisation einer isolierten CK2 α -Untereinheit bot sie sich daher an³¹⁶ (s. Anhang 1).

Die Strukturaufklärung von *zmCK2 α* brachte sowohl erwartete als auch überraschende Ergebnisse. Den Erwartungen entsprach der Grundaufbau des Moleküls, der von CAPK und einigen weiteren EPKs bekannt war:

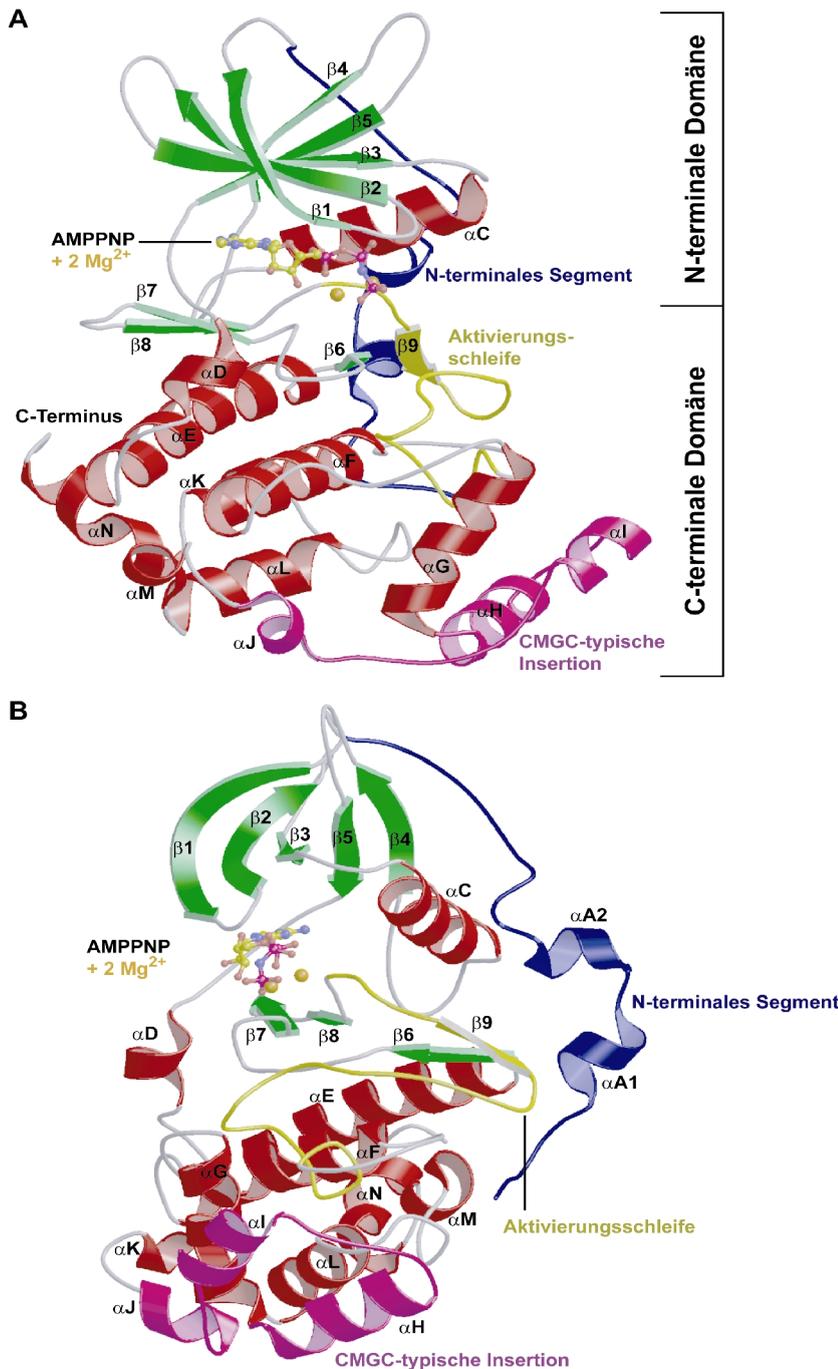


Abb. 12: Globale Struktur der CK2 α aus Mais (*zmCK2 α*) in der Standardansicht für EPK-Strukturen (A) und 90° dazu gedreht (B), so daß der Kontakt zwischen N-terminalem Segment einerseits und Aktivierungsschleife und Helix α C andererseits sichtbar wird.

Sie alle besitzen einen katalytischen Kern aus zwei Faltungsdomänen, die durch einen Gelenkbereich (um Asn118 bei CK2 α) miteinander verbunden sind und zwischen denen das aktive Zentrum lokalisiert ist (Abb. 12A). Die Strukturaufklärung erlaubte 3D-Strukturvergleiche zwischen CK2 α und jenen EPKs und auf dieser Basis eine verbesserte Zuordnung äquivalenter Sequenzpositionen. Abb. 13 zeigt ein solches Vergleichsschema („Alignment“) als Ergebnis eines multiplen Strukturvergleiches mit dem Programm STAMP³¹⁷.

Die N-terminale ist die kleinere der beiden Faltungsdomänen und umfaßt bei CK2 α etwa 80 Aminosäuren. Sie gehört zum (α + β)-Faltungstyp mit einem zentralen fünfsträngigen antiparallelen β -Faltblatt, das auf der zur C-terminalen Domäne gewandten Seite durch die Helix α C flankiert wird (Abb. 12). Bei vielen EPKs geht der Helix α C eine kurze Helix α B voran. Ihr Fehlen in *zmCK2 α* belegt, daß sie für den Grundaufbau des katalytischen Kerns nicht essentiell ist. Demgegenüber ist Helix α C immer vorhanden und für alle EPKs ein funktioneller Schlüsselbereich.

Die C-terminale Hauptdomäne ist hinsichtlich der Sekundärstruktur genau umgekehrt aufgebaut wie die N-terminale: Sie gehört zum α -helikalen Grundfaltungstyp, besitzt jedoch im Interdomänenbereich (d.h. der Helix α C zugewandt) zwei kleine zweisträngige Faltblattmotive (Abb. 12). Die meisten Helizes der C-terminalen Domäne von *zmCK2 α* sind in allen bekannten EPK-Strukturen konserviert.

Eine Ausnahme bilden die Helizes α H, α I und α J, die in Abb. 12 violett markiert sind. Bei ihnen handelt es sich um eine Art „Subdomäne“, die für die Faltung der C-terminalen Domäne nicht essentiell ist und die z.B. bei CAPK nicht vorhanden ist (Abb. 13). Als Spezialität der sogenannten CMGC-Gruppe, kommt diese Insertion auch bei den CDKs, den MAP-Kinasen und in GSK3 vor. Ihre Funktion ist weitgehend unbekannt; lediglich im Falle der inaktiven, nicht-phosphorylierten Form der MAP-Kinase ERK2 wurde gezeigt, daß dieser Bereich mit der sogenannten Aktivierungsschleife wechselwirkt, daß er also die inaktive Form des Enzyms stabilisiert^{303,318}. Die Existenz dieser Insertion in *zmCK2 α* zeigt, daß die Mitgliedschaft der CK2 α zu dieser funktionell bedeutenden Gruppe von Proteinkinasen nicht nur auf Sequenzähnlichkeiten beruht, sondern auch eine strukturelle Grundlage besitzt.

Die Funktionen der konservierten Helizes in der C-terminalen Domäne sind nicht unmittelbar ersichtlich, denn keine der katalytischen Schlüsselaminosäuren ist in ihnen lokalisiert. Es sieht vielmehr so aus, als ob der helikale Grundkörper der Domäne in seiner Gesamtheit als stabilisierende Basis für die mechanistischen Schlüsselteile dient, die sich im Bereich der kleinen Faltblattmotive und der Aktivierungsschleife (gelber Strukturbereich in Abb. 12) befinden. Nach der Helix α C ist diese Aktivierungsschleife ein zweites funktionelles und regulatorisches Schlüsselement, das schon an dieser Stelle erwähnt werden soll.

Völlig unbekannt von anderen EPKs und daher unerwartet war dagegen, daß in CK2 α das N-terminale Segment mit den zwei kleineren Helizes α A1 und α A2 (blaue Farbe in Abb. 12) eine enge Wechselwirkung mit der Helix α C und mit der Aktivierungsschleife eingeht (gelbe Farbe in Abb. 12). Auf diese Besonderheit und seine funktionelle Bedeutung wird im Kap. 17.2.2 näher eingegangen.

Num. <i>hsCK2α</i>	2	10	20	30	40	50	60
<i>hsCK2α¹⁻³³⁵ (1PJK)</i>	SGPVPSRARV	YTDVNTHRPR	EYWDYESHVV	EWGNQDDYQL	VRKLGRGKYS	EVFEAINITN	
<i>zmCK2α (1LP4)</i>	~~~~~SKARV	YADVNVLRPK	EYWDYEALTV	QWGEQDDYEV	VRKVGRGKYS	EVFEGINVNN	
<i>GSK3 (1H8F)</i>	~~~~~	~~~~~SKVT	TVVATPGQGP	DRPQEVSYTD	TKVIGNGSFG	VVYQAKLCDS	
<i>p38γ (1CM8)</i>	~~~~~	~~~~~RS	GFYRQEVTKT	AWEVRAVYRD	LQPV.....	AVCSAVDGRT	
<i>ERK2 (2ERK)</i>	~~~~~	~~~~~	AAGPEMVRGQ	VFDVGPRTN	LSYIGEGAYG	MVCSAYDNLN	
<i>CDK2 (1JST)</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~MENFQK	VEKIGEGTYG	VVYKARNKLT	
<i>CAPK (1ATP)</i>	~~~~~V	KEFLAKAKED	FLKKWETPSQ	NTAQLDQFDR	IKTLGTGSFG	RVMLVKHKES	
Sek.-Str. <i>CK2α</i>		<- α A1><- α A2->			<--- β 1--->	<--- β 2--->	

Val66 Lys68 bas.Strang/RE-Motiv

Num. <i>hsCK2α</i>	70	80	90	100	110
<i>hsCK2α¹⁻³³⁵ (1PJK)</i>	NEKVVVKILK	P.....VKK KIKREIKIL	ENLRGGPNII	TLADIVK...	.DPVSRTPAL
<i>zmCK2α (1LP4)</i>	NEKVIKILK	P.....VKK KIKREIKIL	QNLGGPNIV	KLLDIVR...	.DQHSKTPSL
<i>GSK3 (1H8F)</i>	GELVAIKKVLQGK AFKNRELQIM	R.KLDHCNIV	RLRYFFYSSG	EKKDEVYLN
<i>p38γ (1CM8)</i>	GAKVAIKKLY	RPF.QSELFA KRAYRELRL	K.HMRHENVI	GLLDVFTPDE	TLDDFTDFYL
<i>ERK2 (2ERK)</i>	KVRVAIKKIS	PFE..HQTYC QRTLREIKIL	L.RFRHENII	GINDIIRAP.	TIEQMKDVYI
<i>CDK2 (1JST)</i>	GEVVALKKIR	LDT.ETEGVP STAIREISLL	K.ELNHPNIV	KLLDVI....	..HTENKLYL
<i>CAPK (1ATP)</i>	GNHYAMKILD	KQKVVKLKQI EHTLNEKRIL	Q.AVNFPFLV	KLEFSF....	..KDNSNLYM
Sek.-Str. <i>CK2α</i>	<-- β 3-->	<----- α C----->		<- β 4->	<-- β 5

RD-Motiv M163

Num. <i>hsCK2α</i>		120	130	140	150	160	
<i>hsCK2α¹⁻³³⁵ (1PJK)</i>	VFEHV....N	NTDFKQ...L	YQTLTDYDIR	FYMYEILKAL	DYCHSMGIMH	RDVKPHNVM	
<i>zmCK2α (1LP4)</i>	IFEYV....N	NTDFKV...L	YPTLTDYDIR	YYIYELLKAL	DYCHSQGIMH	RDVKPHNVM	
<i>GSK3 (1H8F)</i>	VLDYVPE.TV	YRVARHYSRA	KQTLPIYVK	LYMYQLFRSL	AYIHSFGICH	RDIKPQNLL	
<i>p38γ (1CM8)</i>	VMPFMGT.DL	GKLMK....	HEKLGEDRIQ	FLVYQMLKGL	RYIHAAGIIH	RDLKPGNLAV	
<i>ERK2 (2ERK)</i>	VQDLMET.DL	YKLLK....	TQHLSNDHIC	YFLYQILRGL	KYIHSANVLH	RDLKPSNLL	
<i>CDK2 (1JST)</i>	VFEFLHQ.DL	KKFMDAS..A	LTGIPLPLIK	SYLFQLLQGL	AFCHSHRVLH	RDLKPNLLI	
<i>CAPK (1ATP)</i>	VMEYVAGGEM	FSHLRR....	IGRFSEPHAR	FYAAQIVLTF	EYLHSLDLIY	RDLKPENLLI	
Sek.-Str. <i>CK2α</i>	β 5>	<-- α D-->	<----- α E----->	< β 6>		< β 7>	

kat. Schl.

Ile174

Num. <i>hsCK2α</i>	170	180	190	200	210	220
<i>hsCK2α¹⁻³³⁵ (1PJK)</i>	DHEHRKLRLI	DWGLAEFYHP	G....QEYNV	RVASRYFKGP	ELLVDYQMYD	YSLDMWSLGC
<i>zmCK2α (1LP4)</i>	DHELRKLRLI	DWGLAEFYHP	G....KEYNV	RVASRYFKGP	ELLVDLQDYD	YSLDMWSLGC
<i>GSK3 (1H8F)</i>	DPDTAVLKLC	DFGSAKQLVR	G....EPNV	YICSRYYRAP	ELIFGATDYT	SSIDVWSAGC
<i>p38γ (1CM8)</i>	.NEDCELKIL	DFGLARQADSEMTG	YVVTRWYRAP	EVILNWMRYT	QTVDIWSVGC
<i>ERK2 (2ERK)</i>	.NTTCDLKIC	DFGLARVADP	DHDHTGFLTE	YVATRWYRAP	EIMLNSKGYT	KSIDIWSVGC
<i>CDK2 (1JST)</i>	.NTEGAIKLA	DFGLARAFGV	P...VRTYTH	EVVTLWYRAP	EILLGCKYYS	TAVDIWSLGC
<i>CAPK (1ATP)</i>	.DQQGYIQVT	DFGFARVKGRTWT.	LCGTPEYLAP	EIILSK.GYN	KAVDWWALGV
Sek.-Str. <i>CK2α</i>	< β 8>	< β 9>		(p+1)-Schl.		<---- α F---

-----Aktivierungsschleife-----

Num. <i>hsCK2α</i>	230	240	250	260	270	
<i>hsCK2α¹⁻³³⁵ (1PJK)</i>	MLASMIFRKE	PFFHGHNDYD	QLVR..IAKV	LGTELDYDYI	DKYNIELDPR	FNDILGRHSR
<i>zmCK2α (1LP4)</i>	MFAGMIFRKE	PFFYGHNDHD	QLVK..IAKV	LGTDGLNVYL	NKYRIELDPQ	LEALVGRHSR
<i>GSK3 (1H8F)</i>	VLAELL.LGQ	PIFPGDSGVD	QLVE..IIKV	LGTPTREQIR	EMPNYNT...EFAFP
<i>p38γ (1CM8)</i>	IMAEMIT.GK	TLFKGSDHLD	QLKE..IMKV	TGTPPAEFVQ	RLQSDEAK..NYMKGL
<i>ERK2 (2ERK)</i>	ILAEMLS.NR	PIFPGKHYLD	QLNH..ILGI	LGSPSQEDLN	CIINLKAR..NYLLSL
<i>CDK2 (1JST)</i>	IFAEMVT.RR	ALFPGDSEID	QLFR..IFRT	LGTPDEVVWP	GVTSMPD...YKPSF
<i>CAPK (1ATP)</i>	LIYEMAA.GY	PPFFADQPIQ	IYEKIVSGKV	R.....
Sek.-Str. <i>CK2α</i>	-- α F-->	<----- α G----->	<---- α H---->	<---- α I---->		

Num. <i>hsCK2α</i>	280	290	300	310	320	
<i>hsCK2α¹⁻³³⁵ (1PJK)</i>	KRWERFVHSE	NQHLVSPEAL	DFLDKLLRYD	HQSR.....L	TAREAMEHPY	FYTVVK~~~~
<i>zmCK2α (1LP4)</i>	KPWLKFMNAD	NQHLVSPEAI	DFLDKLLRYD	HQER.....L	TALEAMTHPY	FQQVRAAENS
<i>GSK3 (1H8F)</i>	QIKAHPWTKV	FRPRTPEAI	ALCSRLEYT	PTAR.....L	TPLEACAHSF	FDELDPNVK
<i>p38γ (1CM8)</i>	PELEKKDFAS	ILTNASPLAV	NLLEKMLVLD	AEQR.....V	TAGEALAHPY	FESLHQVQKY
<i>ERK2 (2ERK)</i>	PHKNKVPWNR	LFPNADSKAL	DLLDKMLTFN	PHKR.....I	EVEQALAHPY	LEQYYDPSDE
<i>CDK2 (1JST)</i>	PKWARQDFSK	VVPLDEDGR	SLLSQMLHYD	PNKR.....I	SAKAALAHPF	FQDVTKPVPH
<i>CAPK (1ATP)</i>	FPSHFSSDLK	DLLRNLLQVD	LTKRFGNLKN	GVNDIKNHKW	FATTDWIAIY
Sek.-Str. <i>CK2α</i>	<-- α J->	<- α K-><---- α L-->		<- α M>	<- α N->	

Abb. 13: Strukturgenauer Sequenzvergleich von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* mit *zmCK2 α* , *CAPK* und den CMGC-Kinasen *CDK2*, *GSK3*, *ERK2* und *p38 γ* . Met1 wurde in *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* weggelassen, außerdem die Aminosäuren Asp330 bis Gly335, die in der Elektronendichte nicht lokalisiert werden konnten. Die Zuordnung wurde auf der Basis der Strukturen (s. PDB-Codes) mit dem Programm STAMP³¹⁷ errechnet.

15.2 Kristallstruktur von CK2 β^{1-182} aus Mensch: CK2 β dimerisiert über einen Zinkfinger

Die zweite Kristallstruktur einer CK2-Untereinheit erschien 1999 und gehörte zu *hsCK2 β^{1-182}* , das ist eine C-terminal verkürzte Variante von CK2 β aus *Homo sapiens*³¹⁹ (PDB-Code 1QF8). *HsCK2 β^{1-182}*

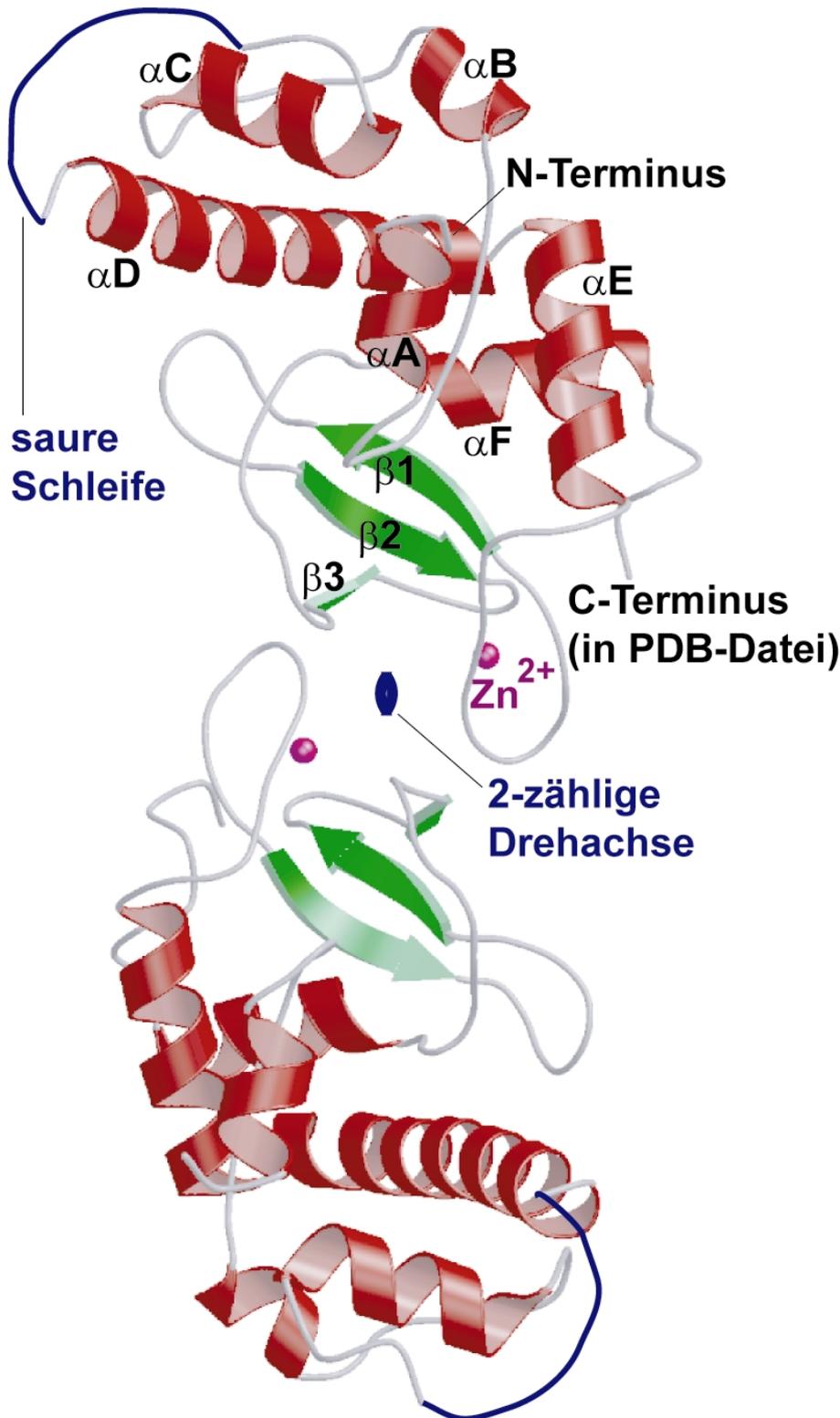


Abb. 14: Dimer von *hsCK2 β^{1-182}* aus der PDB-Datei 1QF8³¹⁹ in einer Sicht entlang der zweizähligen Drehachse. Die „saure Schleife“ (blau) ist ungeordnet und wurde zur Orientierung schematisch eingezeichnet.

reichte von Met1 bis Gln182 und umfaßte die potentielle Zinkbindungsstelle sowie den Dimerisierungsbereich, nicht jedoch die vollständige CK2 α /CK2 β -Wechselwirkungsregion. Die Verkürzung von *hsCK2 β* auf diesen Kernbereich hatte sich als notwendig erwiesen, um das Protein proteinchemisch handhabbar und kristallisierbar zu machen³²⁰. Obendrein erwiesen sich die saure Schleife und die Autophosphorylierungsstelle nahe dem N-Terminus als hochflexibel und als nicht sichtbar in der Elektronendichte.

Die fehlenden Teile der CK2 β -Struktur wurden später - wenn auch in erheblich schlechterer Auflösung - durch die Struktur des CK2-Holoenzym ergänzt. Aufgrund der genannten Einschränkungen soll daher an dieser Stelle nur die wichtigste Erkenntnis der *hsCK2 β^{1-182}* -Struktur angesprochen werden, die Chantalat *et al.*³¹⁹ bereits im Titel ihrer Strukturpublikation betont haben: CK2 β besitzt tatsächlich, wie 1993 erstmals vermutet²²⁶, eine Zinkbindungsstelle und nutzt sie zu einem seiner intermoleku-

laren Kontakte, nämlich zur Dimerisierung.

Jedes CK2 β -Monomer beginnt N-terminal mit einer größeren α -helikalen Domäne (Abb. 14). Ihr folgt eine kleinere Domäne, die im wesentlichen aus einem dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt besteht und deren Schleifen das Zinkbindungsmotiv bilden. Diese β -Faltblattdomäne und der ihr zugehörige Zinkfinger sind für die Dimerisierung von CK2 β zuständig.

15.3 Die Kristallstruktur des CK2-Holoenzym offenbarte dessen globale Architektur

15.3.1 Degradations- und Aggregationsprobleme bei der Kristallisation

Als dritte Schlüsselstruktur ist die Kristallstruktur von $(hsCK2\alpha^{2-337})_2(hsCK2\beta)_2$ zu bewerten, die im Jahre 2001 publiziert wurde³²¹ (PDB-Code 1JWH) (s. Anhang 6). Obwohl die CK2 α -Ketten des kristallisierten Komplexes C-terminal verkürzt waren, handelte es sich hinsichtlich der biochemischen Charakteristika um ein vollkommen intaktes CK2-Holoenzym aus *Homo sapiens*³²² (s. Anhang 5).

Die C-terminale Verkürzung von *hsCK2 α* war das Resultat jener spontanen Degradation, die - wie im Kapitel 11.5.3 erwähnt - erstmals 1982 von Hathaway & Traugh⁶¹ beschrieben worden war. Auch bei rekombinanter Herstellung erwies sich *hsCK2 α* als degradationsanfällig. Um dieses Stabilitätsproblem zu umgehen, versuchten Guerra *et al.*³²³ (s. Anhang 7) zunächst, ein chimäres CK2-Holoenzym aus Mensch und Mais, nämlich aus *zmCK2 α* und *hsCK2 β* zu kristallisieren. In der Tat ergaben biochemische Charakterisierungen zunächst, daß *hsCK2 β* in gleicher Weise aktivierend und stabilisierend auf *zmCK2 α* wirkt wie auf *hsCK2 α* ³²³ und daß beide Komponenten des chimären Komplexes stabil sind. Dennoch blieben nachfolgende Kristallisationsversuche erfolglos. Als wahrscheinlichste Ursache konnten Aggregationseffekte identifiziert werden, die zu unsauberen Gelfiltrationschromatogrammen und diffusen Präzipitaten beim Kristallisieren führten³²².

Dieses Aggregationsproblem war erst behoben, nachdem *hsCK2 β* mit *hsCK2 α* kombiniert worden war. Das dabei entstehende Holoenzym eluierte als sauberes Maximum von einer Gelfiltrationssäule. Um auch hinsichtlich der spontanen C-terminalen Degradation von *hsCK2 α* zu einem einheitlichen Zustand zu gelangen, wurde gewartet, bis dieser Vorgang abgeschlossen war und der Komplex stabil war. Massenspektrometrische Untersuchungen ergaben anschließend eine Molmasse, die mit einer Peptidkette von Ser2 bis Ser337 in Einklang stand³²².

15.3.2 Quartärstruktur von CK2: ein zentrales CK2 β -Dimer vernetzt zwei CK2 α -Monomere

Die Kristallstruktur des CK2-Holoenzym³²¹ offenbarte mehrere bedeutsame Details, auf die in den folgenden Kapiteln näher eingegangen wird. Der zentrale globale Befund aus dieser Struktur war, daß jene erstmals von Hu & Rubin²⁴³ im Jahre 1990 geäußerte Hypothese, wonach CK2 β durch Dimerisierung und Wechselwirkung mit CK2 α für die Bildung des CK2-Holoenzym verantwortlich ist, in der Tat korrekt ist (Abb. 15): Im Einklang mit den Hefe-2-Hybrid-Studien der Jahre 1995/96^{265,266,267} bildet ein CK2 β -Dimer den Kern des Holoenzym, während die beiden CK2 α -Untereinheiten keinen direkten Kontakt zueinander haben, sondern mindestens 30 Å voneinander entfernt sind (Abb. 15a).

Von den beiden in Abb. 7 genannten Kombinationsmöglichkeiten trifft diejenige zu, bei der jede CK2 α -Untereinheit zu beiden CK2 β -Ketten Kontakt hat. Die langgestreckte Form des CK2 β -Dimers (Abb. 14b) hätte das nicht unbedingt erwarten lassen. Das Arrangement wird jedoch ermöglicht durch

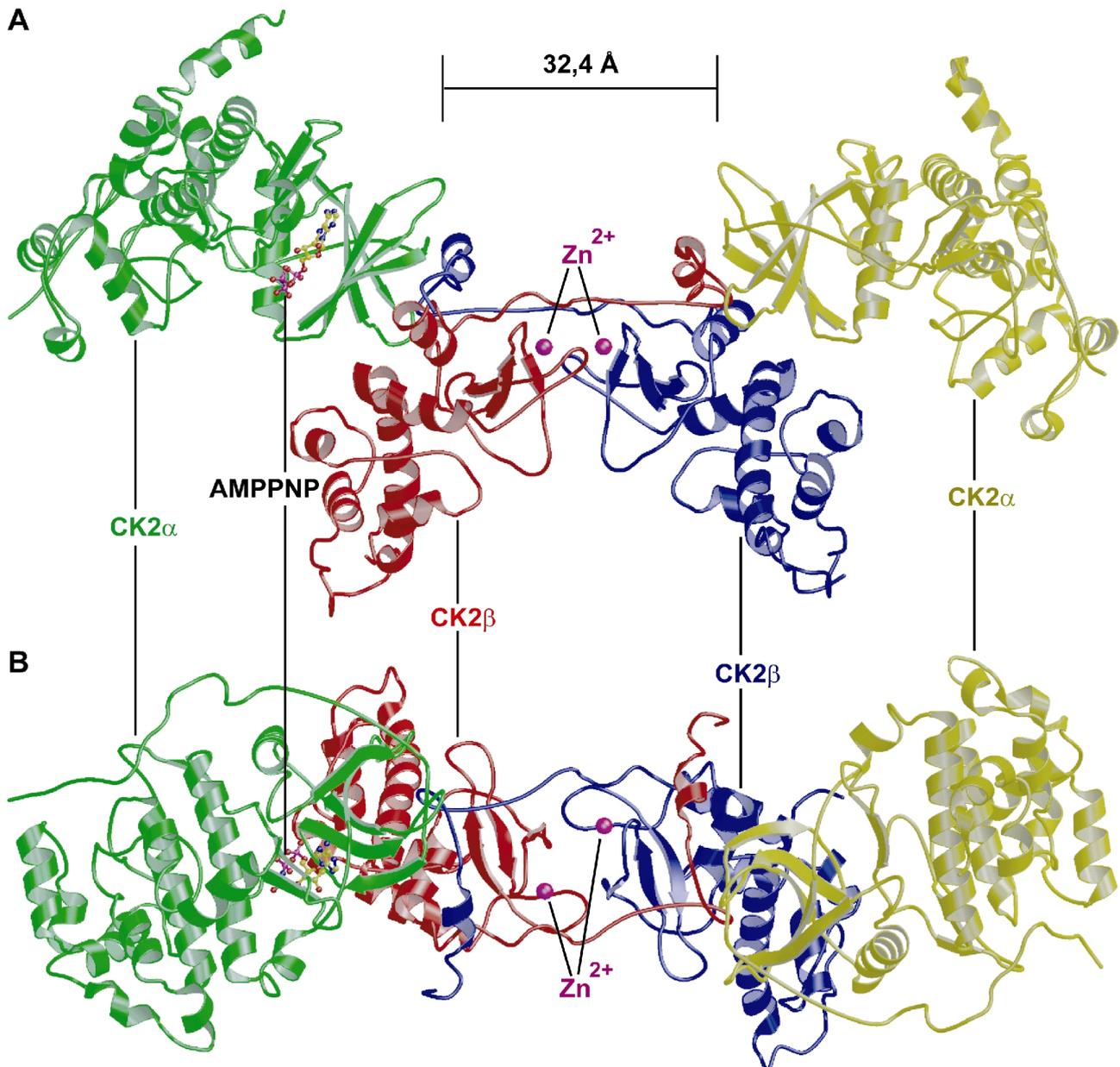


Abb. 15: Globale Ansicht des CK2-Holoenzym (PDB-Code 1JWH) senkrecht zur zweizähligen Drehachse (A) und entlang der zweizähligen Drehachse (B). Die hochaffine CK2 α -Kette (grün) hat ein AMPPNP-Molekül gebunden, während die ATP-Bindungsstelle in der niedrigaffinen CK2 α -Kette (gelb) unbesetzt ist.

eine ungewöhnliche Form des in der *hsCK2 β ¹⁻¹⁸²*-Struktur fehlenden C-terminalen Segmentes. Dieses hat nämlich keinen direkten Kontakt zum Grundkörper des CK2 β -Monomers (Abb. 28), sondern kreuzt hinüber zur benachbarten CK2 β -Kette (Abb. 15).

In der analysierten Kristallform sind die beiden katalytischen Untereinheiten (*hsCK2 α ²⁻³³⁷*) des Komplexes strukturell und hinsichtlich des Zustandes des aktiven Zentrums etwas unterschiedlich. Bei einer der Ketten (grün in Abb. 15) ist die Cosubstratbindungsstelle mit dem ATP-Analogen AMPPNP besetzt, weshalb sie im weiteren Verlauf als „hochaffine“ Untereinheit bezeichnet wird. Dagegen wird die in Abb. 15 gelb gezeichnete Kette „niedrigaffine“ Untereinheit genannt, weil in ihr kein AMPPNP gebunden ist.

Tab. 3: Publierte Kristallstrukturen der Proteinkinase CK2

Die Einträge wurden für Mais und Mensch jeweils getrennt nach Erscheinungsdatum der Strukturpublikation sortiert (Ausnahmen: Die PDB-Einträge 1LPU und 1LP4, die noch nicht regulär publiziert sind, wurden nach 1LR4 bzw. 1DAW eingeordnet, da sie sich lediglich durch verbesserte Auflösungen von jenen unterscheiden). Die aus meiner eigenen Arbeit stammenden Einträge (s. Liste auf Seite 3 sowie die Publikationen im Anhang) wurden grau unterlegt.

Protein	Organismus	Liganden	Auflösung [Å]	Meßtemperatur [K]	PDB-Code	Bemerkungen	Ref.
<i>zmCK2α</i>	Mais	vermutlich Benzamidin	2,0	283	1LR4	früher 1A6O	27
<i>zmCK2α</i>	Mais	vermutlich Benzamidin	1,86	100	1LPU	Tieftemperaturstruktur zu 1LR4	---
<i>zmCK2α</i>	Mais	AMPPNP + 2 Mg ²⁺	2,2	100	1DAW		77
<i>zmCK2α</i>	Mais	AMPPNP + 2 Mg ²⁺	1,86	100	1LP4		---
<i>zmCK2α</i>	Mais	GMPPNP + 2 Mg ²⁺	2,2	100	1DAY		77
<i>zmCK2α</i>	Mais	<i>hsCK2β</i> ¹⁸¹⁻²⁰³ AMPPNP/Mg ²⁺	3,15	100	1DS5	4 CK2α-Ketten pro asymmetr. Einheit; <i>hsCK2β</i> -Peptid nur sichtbar ab Arg186	324
<i>zmCK2α</i>	Mais	Emodin	2,63	100	1F0Q		325
<i>zmCK2α</i>	Mais	4,5,6,7-Tetrabromo-2-benzotriazol (TBB)	2,19	100	1J91		326
<i>zmCK2α</i>	Mais	---	2,18	100	1JAM		326
<i>zmCK2α</i>	Mais	1,8-Dihydroxy-4-nitro-anthrachinon	2,0	100	1M2P		327
<i>zmCK2α</i>	Mais	1,8-Dihydroxy-4-nitro-xanthen-9-on	1,79	100	1M2Q		327
<i>zmCK2α</i>	Mais	5,8-Diamino-1,4-dihydroxyanthrachinon	1,7	100	1M2R		327
<i>zmCK2α</i>	Mais	[5-Oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-a)quinazolin-7-yl]-Essigsäure	1,68	100	1OM1		328
<i>hsCK2β</i> ¹⁻¹⁸²	Mensch	---	1,74	100	1QF8	Aminos. 1 bis 5 und 180 bis 182 in beiden Ketten fehlgeordnet	319
CK2-Holoenzym aus <i>hsCK2α</i> ²⁻³³⁷ und <i>hsCK2β</i>	Mensch	AMPPNP	3,1	100	1JWH	CK2β-C-Terminus (Aminos. 206-215) fehlgeordnet	321
<i>hsCK2α</i> ¹⁻³³⁵	Mensch	AMPPNP	2,5	283	1PJK	AMPPNP nur schwach sichtbar	329
<i>hsCK2α</i> , Tripelmutante K10S, E27A, K76N	Mensch	---	2,4	100	1NA7	C-Terminus (62 Aminosäuren) nicht sichtbar und offenbar degradiert; Kristalle isomorph zu 1PJK	330

15.4 Weitere CK2 α -Strukturen

Neben den drei genannten Schlüsselstrukturen wurden weitere Strukturen von CK2 α publiziert, und zwar überwiegend von CK2 α aus Mais und in zwei Fällen von C-terminal verkürzter CK2 α aus Mensch. Es handelte sich dabei um Komplexstrukturen der CK2 α -Moleküle mit ATP- oder GTP-Analoga, mit ATP-kompetitiven Inhibitoren und einem aus humaner CK2 β abgeleitetem Peptid. Alle im Januar 2004 über die PDB verfügbare CK2-Strukturen sind in Tab. 3 aufgelistet und werden teilweise in den folgenden Abschnitten besprochen.

16 Katalytische Schlüsselemente

16.1 Die ATP-bindende Schleife

Wie für Kinasen üblich, halten CK2 α und andere EPKs für alle drei Elemente des Cosubstrates ATP - für die Purinbase Adenin, für den Fünfringzucker Ribose und für die energiereiche Triphosphogruppe, die eigentliche reaktive Einheit - spezielle Bindungselemente bereit. Die Bindungspartner der Ribose und des Adenins werden im Zusammenhang mit der dualen Cosubstratspezifität besprochen. Hier soll es zunächst um die Fixierung und korrekte Ausrichtung der Triphosphogruppe gehen - angesichts vierer negativer Ladungen und einer hohen Flexibilität dieser chemischen Einheit keine leichte Aufgabe, für die das Enzym mehrere Strukturelemente aus beiden Hauptdomänen bereitstellt und obendrein zwei

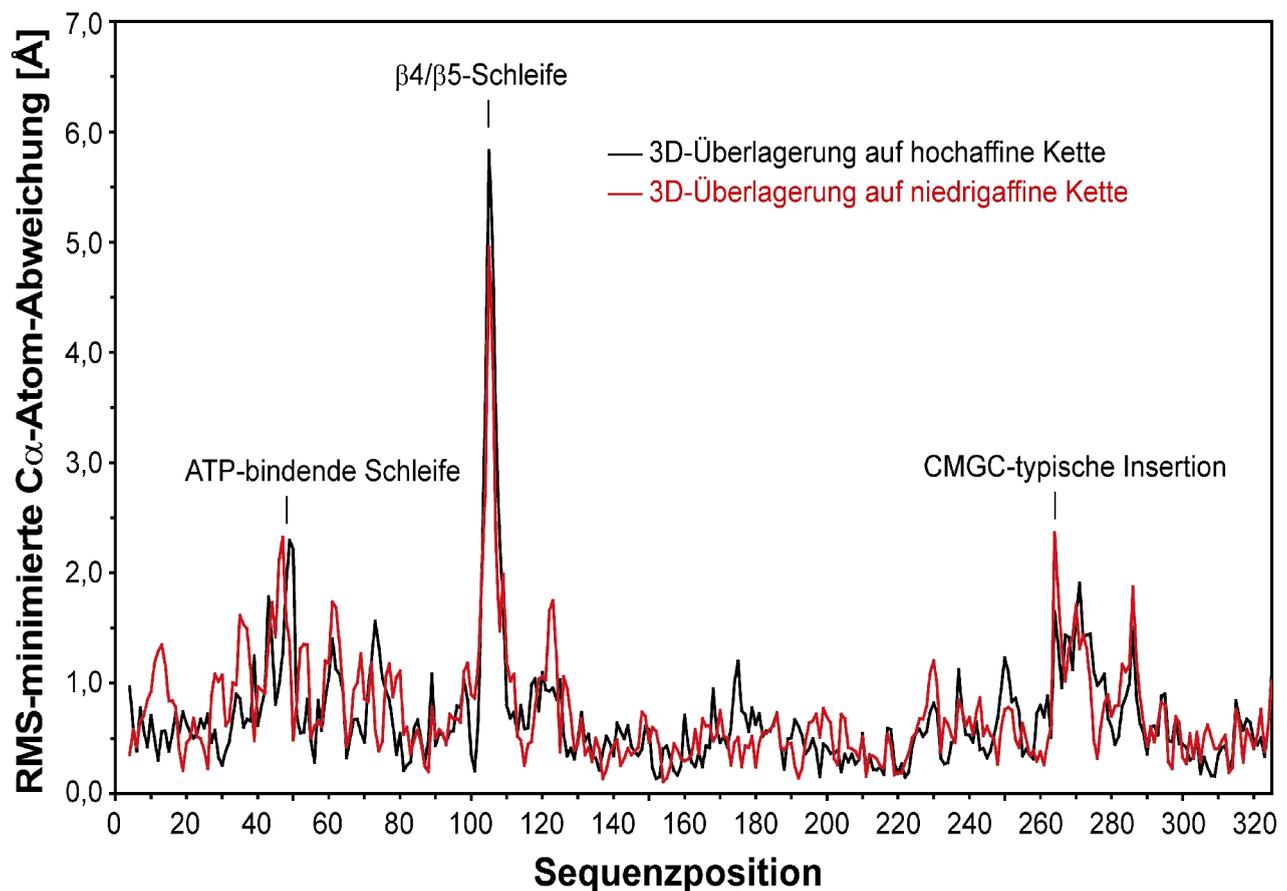


Abb. 16: Dreidimensionale Überlagerung von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* (PDB-Code 1PJK) mit den beiden *hsCK2 α ²⁻³³⁷*-Ketten des CK2-Holoenzym (PDB-Code 1JWH).

Magnesiumionen zur Hilfe nimmt.

Die N-terminale Domäne steuert zur Cosubstratbindung die sogenannte ATP-bindende Schleife bei, die die β -Stränge 1 und 2 zwischen Val45 und Val53 (Abb. 13) verbindet und die bereits im Kap.

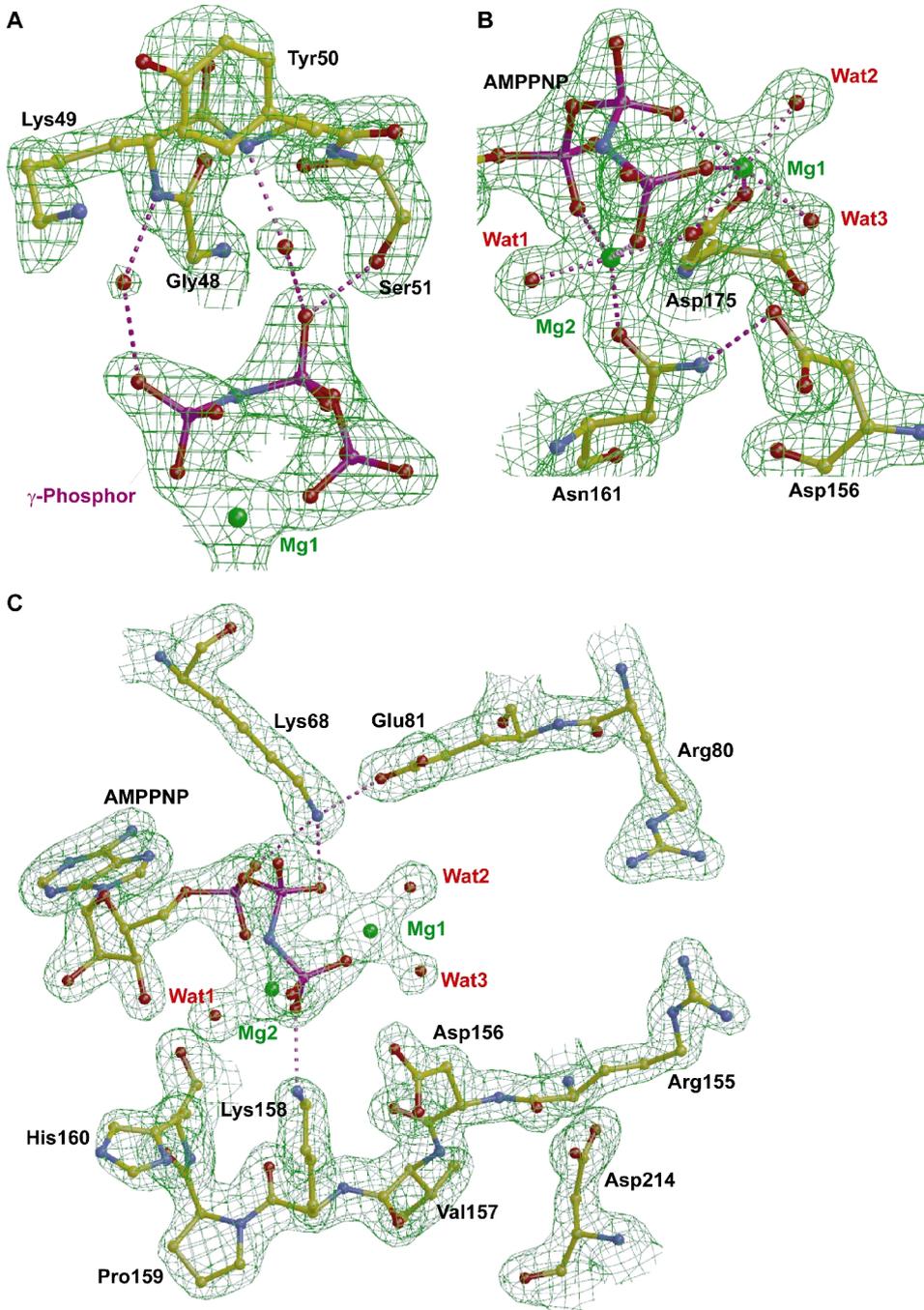


Abb. 17: Fixierung der Triphosphogruppe des Cosubstrates durch die ATP-bindende Schleife (A), durch die zwei Mg^{2+} -Ionen (B/C) und durch die beiden hochkonservierten Lysinreste Lys68 und Lys158 (C). Einige Wasserstoffbrückenbindungen und koordinative Bindungen zu Mg^{2+} sind gestrichelt und violett eingezeichnet. Dem Bild liegt die PDB-Datei 1LP4 zugrunde. Die Elektronendichte wurde mit einem Schwellenwert von $1,5 \sigma$ über dem Mittelwert dargestellt.

13.2.6 als markantes Sequenzmotiv vorgestellt wurde. Wir haben es hier mit einer glycinreichen Region zu tun, wie sie für nukleotidbindende Domänen üblich ist^{232,233}. Im allgemeinen ist es die Aufgabe der sterisch anspruchslosen Glycinreste, erstens eine gewisse Beweglichkeit des Strukturelementes zu gewährleisten und zweitens eine Annäherung und Bindung des Pyrophosphateteils des Nukleotids an die Proteinhauptkette zuzulassen. Deswegen wird diese Schleife oft auch als „Phosphatanker“ oder als „P-Schleife“ (P-loop) bezeichnet.

Bei den verschiedenen Strukturuntersuchungen mit CK2 α (Tab. 3) hat sich in der Tat mehrfach gezeigt, daß die ATP-bindende Schleife zu den flexibelsten Molekülteilen gehört. Beispielsweise führt die Bindung des ATP-kompetitiven Inhibitor Emodin an *zmCK2 α* zu einer deutlichen Konformationsänderung³²⁵.

Ein anderes Beispiel wird durch Abb. 16 illustriert: Das C-terminal verkürzte *hsCK2 α* ist bisher das einzige CK2 α -Enzym, dessen Struktur isoliert und gebunden an CK2 β ermittelt worden ist. Überlagert man diese Strukturen, so findet man drei Bereiche größerer Abweichung, darunter die ATP-bindende Schleife. Vor allem aber ist dies der einzige unter den drei Bereichen, der nicht in Kristallkontakte eingebunden ist. Das heißt, bei den in Abb. 16 angedeuteten Veränderungen der ATP-bindenden Schleife handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit wirklich um Veränderungen von *hsCK2 α* , die mit der Bindung von *hsCK2 β* und nicht mit der kristallinen Umgebung zu tun haben.

Wie die ATP-bindende Schleife ihre namensgebende Aufgabe, nämlich den Kontakt zum Triphosphoschwanz von ATP, erfüllt, ist unter allen in Tab. 3 aufgeführten Strukturen am besten in 1LP4 zu sehen und wird in Abb. 17A illustriert. Für 1DAW, die Vorgängerstruktur von 1LP4 mit etwas geringerer Auflösung, wurde gezeigt⁷⁷, daß die Konformation des Triphosphoschwanzes und insbesondere die Positionen der γ -Phosphogruppe und der beiden anhängenden Mg^{2+} -Ionen genau dem aktiven Zustand entsprechen, wie er in einem ternären Komplex von CAPK mit ATP und einem Inhibitorpeptid gefunden worden war²⁶.

Zwischen Triphosphoschwanz und ATP-bindender Schleife bilden sich drei Wasserstoffbrücken aus, von denen zwei über Wassermoleküle vermittelt werden, während an der dritten die für EPKs ungewöhnliche Serinseitenkette in Position 51 beteiligt ist (Abb. 17A). In *zmCK2 α* sind also keine direkten H-Brücken zwischen Pyrophosphat-Sauerstoffatomen und Peptid-Stickstoffatomen der Enzymhauptkette zu finden.

Dieser eher untypische Befund spricht dafür, daß die Konformation des Enzyms in diesem Bereich und damit auch die genaue Lage der zu übertragenden γ -Phosphatgruppe zu einem gewissen Grade an das jeweilige Substrat angepaßt werden kann. Vielleicht ist dies der strukturelle Hintergrund für die vereinzelt Berichte^{195,196,197}, daß CK2 nicht nur Serin- und Threonin-, sondern auch Tyrosinseitenketten phosphorylieren kann.

16.2 Magnesiumbindungsstellen

Das Gegenstück zur ATP-Bindungsschleife aus der N-terminalen Domäne stellen die beiden hochkonservierten Mg^{2+} -Anker Asn161 und Asp175 dar (Abb. 17B), die zusammen mit den beiden Magnesiumionen Mg1 und Mg2 die Triphosphogruppe von „unten“, d.h. seitens der C-terminalen Domäne stabilisieren. Während Mg2 fünffach koordiniert ist und α - und γ -Phosphogruppe verbrückt, besitzt Mg1 eine Koordinationssphäre aus sechs Sauerstoffatomen, darunter je eines aus der β - und γ -Phosphogruppe (Abb. 17B).

Alle EPKs besitzen nahe der γ -Phosphogruppe zwei absolut konservierte Aspartatseitenketten. Während Asp156 in CK2 α und seinen Äquivalenten in anderen EPKs (Asp166 in CAPK) - vermutlich fälschlicherweise (s. dazu Kap. 16.7.3) - die Rolle einer katalytischen Base zugeschrieben wird, wird Asp175 auch als Mg^{2+} -bindendes Aspartat bezeichnet, denn seine Seitenkette wirkt als zweizähliger Ligand für Mg1 und ist gleichzeitig koordinativ an Mg2 gebunden (Abb. 17B). Auch Asn161, die zweite Mg^{2+} -koordinierende Aminosäure, ist in EPKs absolut konserviert. Sie bildet gleichzeitig eine Wasserstoffbrücke zu Asp156 (Abb. 17B).

Die Numerierung der beiden Magnesiumionen ist übrigens nicht zufällig so gewählt worden: Im Ein-

klung mit der besseren Geometrie seiner Koordinationssphäre hat Mg1, wie Untersuchungen an CAPK gezeigt haben, eine um zwei Größenordnungen geringere Dissoziationskonstante als Mg2³³¹. Das bedeutet, daß unter physiologischen Bedingungen die Mg2-Bindungsstelle allenfalls partiell besetzt ist. Ihre vollständige Besetzung in der *zmCK2α*/AMPPNP-Komplexstruktur⁷⁷ ist lediglich darauf zurückzuführen, daß die Cryoschutzlösung für die Diffraktionsmessung des Proteinkristalls eine sehr hohe Mg²⁺-Konzentration (60 mM) enthalten hatte.

Auch in funktioneller Hinsicht ist die Mg1-Bindungsstelle viel wichtiger als diejenige für Mg2. Dies haben Untersuchungen an CAPK mit Manganionen gezeigt³³²: Deren Aktivität wächst mit steigender Mn²⁺-Konzentration zunächst so lange, bis ein molares Verhältnis von 1:1 zwischen Mn²⁺ und ATP erreicht ist. In diesem Zustand ist die Mg1-Bindungsstelle durch Mn²⁺ abgesättigt. Steigert man die Mn²⁺-Konzentration weiter, so nimmt die Aktivität des Enzyms wieder ab.

Ähnliches wurde mit CK2α aus der Hefe *Yarrowia lipolytica* (*ylCK2α*) beobachtet³³³ (s. Anhang 4). Als deren Aktivität gegenüber einem optimierten Substratpeptid bei steigenden Magnesiumkonzentrationen bestimmt wurde, stieg die spezifische Aktivität zunächst im Bereich zwischen 0 mM und 2 mM MgCl₂ linear auf knapp 80 % des Maximums an. Jenseits von 2 mM MgCl₂ wuchs die spezifische Aktivität dagegen nur noch sehr langsam, um schließlich erst bei etwa 10 mM ein Maximum zu erreichen³³³.

Aufgrund derartiger funktioneller Unterschiede hat man das an der Mg1-Bindungsstelle gebundene Metallion auch als „aktivierendes“ Metallion bezeichnet im Gegensatz zum „inhibitorischen“ Metallion an der Mg2-Bindungsstelle³³¹.

16.3 Lys68 und seine Salzbrücke zur Helix αC

Neben der ATP-bindenden Schleife stellt die N-terminale Domäne der EPKs eine weitere Aminosäure für die Fixierung des ATP-Triphosphoschwanzes zur Verfügung. Es handelt sich um ein absolut konserviertes Lysin (Lys68 in *zmCK2α*; grüne Markierung in Abb. 13) aus dem Strang β3 (Abb. 17C). Die Aufgabe dieses Lysins ist es, die α- und die β-Phosphogruppe des Cosubstrates zu binden und sie miteinander zu verbrücken. Dies wird durch zwei enge Wasserstoffbrücken erreicht (Abb. 17C).

Wie kritisch diese Funktion ist, ist daran erkennbar, daß bisher alle Versuche mit verschiedenen EPKs, diese Aminosäure chemisch zu modifizieren oder gar auszutauschen, zur totalen Inaktivierung des jeweiligen Enzyms geführt haben¹⁶⁷. Selbst ein Austausch gegen Arginin führt zuverlässig zu einer Totmutante, was z.B. im Falle von *hsCK2α* von Sarno *et al.*³³⁴ gezeigt wurde.

Die besagte Lysinseitenkette kann ihre genannte Aufgabe jedoch nur erfüllen, wenn sie gleichzeitig an ein ebenfalls absolut konserviertes Glutamat innerhalb der Helix αC gebunden ist. In *zmCK2α* handelt es sich um Glu81 (Abb. 17C). Diese Salzbrücke ist eine notwendige Bedingung für den aktiven Zustand einer EPK. Da Glu81 inmitten der Helix αC angesiedelt ist, hängt die Existenz der Salzbrücke entscheidend von der Lage und der Orientierung der Helix αC ab. Diese Helix ist somit ein Schalter, um die Aktivität einer EPK von außen zu kontrollieren.

16.4 Die katalytische Schleife

Genau wie die ATP-bindende Schleife besitzt auch das Lys68 ein Gegenstück in der C-terminalen Domäne. Es handelt sich um das Lys158 (Abb. 17C), das im aktiven Zustand an die γ -Phosphogruppe durch eine Wasserstoffbrücke gebunden ist, das in allen EPKs konserviert ist und dem vermutlich die Rolle zukommt, den Übergangszustand der Reaktion zu stabilisieren.

Lys158 ist Teil der sogenannten „katalytischen Schleife“, wie das Verbindungsstück zwischen den β -Strängen 6 und 7 auch genannt wird. Die Bezeichnung geht auf das schon erwähnte Asp156 und seine mögliche Rolle als allgemeine Base zurück, die die katalytische Reaktion einleitet. Als weiteres Mitglied der katalytischen Schleife wurde das Asn161 bereits genannt.

Schließlich soll noch das Arginin vorgestellt werden, das dem katalytischen Aspartat vorangeht (Arg155 in CK2 α), und zwar nicht nur bei CK2 α , sondern generell bei der großen Mehrheit aller EPKs. Diese EPKs wurden nach jenem zentralen Dipeptid Arg-Asp 1996 erstmals als „RD-Kinasen“ bezeichnet²⁸¹. Wie Abb. 17C verdeutlicht, weist die Seitenkette dieses Arginins aus dem aktiven Zentrum heraus, so daß es auf den ersten Blick merkwürdig erscheint, warum es eine größere Bedeutung haben soll.

Tatsächlich hat sich jedoch wiederholt gezeigt, daß RD-Kinasen nur dann voll aktiv sind, wenn dieses Arginin durch eine negative Ladung neutralisiert wird, ein Umstand, der für regulatorische Zwecke ausgenutzt wird²⁸¹. Oft muß sich sogar ein doppelt geladenes Anion an dieses Arginin binden, weil sich in direkter Nähe ein oder zwei weitere positiv geladene Aminosäuren befinden. Im Falle der CK2 α ist es das Arg80 aus der Helix α C (Abb. 17C), der Sequenzvorgänger jenes entscheidenden Glu81, das gemeinsam mit Arg155 diese Anionenbindungsstelle formt. Dieses „RE-Motiv“ (Arg80-Glu81) ist eine wichtige Gemeinsamkeit fast aller EPKs der CMGC-Familie, über die noch zu sprechen sein wird.

Wie sensibel die katalytische Schleife für die Funktion der EPKs ist, wird auch dadurch angezeigt, daß sie an der Hauptkette durch ein nahezu absolut konserviertes Aspartat stabilisiert wird. Bei CK2 α handelt es sich um Asp214 (Abb. 17C), das zwei Wasserstoffbrücken zu den beiden von His154 gebildeten Peptidgruppen ausbildet

16.5 Die Aktivierungsschleife

Während bisher nur von der Bindung des Cosubstrates die Rede war, kommen wir über das Arg155 auf das Thema „Substratbindung“. Denn jene Anionenbindungsstelle, an der Arg155 bzw. seine Äquivalenzen in anderen EPKs beteiligt ist, liegt im Zentrum der Aktivierungsschleife (Abb. 12), die - bildlich gesprochen - eine Platte darstellt, auf der eine EPK ein Proteinsubstrat für die Reaktion zurechtlegt.

Die Aktivierungsschleife wurde mitunter auch als Phosphorylierungsschleife bezeichnet, denn bei dem besagten Anion, das zur Aktivierung nötig ist, handelt es sich in vielen Fällen um eine Phosphogruppe, die auf eine phosphorylierbare Aminosäure in der Aktivierungsschleife übertragen wird. Der damit verbundene Regulationsmechanismus wurde von Johnson *et al.*²⁸¹ zusammenfassend dargestellt und kommt in Kap. 17.3 noch einmal zur Sprache.

Bei CK2 α umfaßt die Aktivierungsschleife den Sequenzbereich von Asp175 bis Glu201^a. Beides

^aDiese Definition, derzufolge die (p+1)-Schleife dann Teil der Aktivierungsschleife ist, folgt der Praxis von Johnson *et al.*²⁸¹ und von Huse & Kuriyan³⁵⁰. Andere Autoren definieren die Aktivierungsschleife so, daß sie vor oder gar inmitten der (p+1)-Schleife endet.

sind hochkonservierte Aminosäuren, wobei Asp175 bereits im Zusammenhang mit der Mg^{2+} -Bindung vorgestellt worden ist (Abb. 17B). Glu201 bildet mit dem ebenfalls hochkonservierten Arg312 eine Salzbrücke (Abb. 18B), die offenbar wichtig ist, obwohl ihr keine unmittelbare Funktion im Rahmen des EPK-Reaktionsmechanismus' zugeordnet werden kann. Scheinbar handelt es sich ähnlich wie beim Asp214 um ein Strukturelement, durch das unmittelbar am Reaktionsgeschehen beteiligte Schlüsselbereiche stabilisiert werden. Im Falle des Asp214 war dies das RD-Motiv zu Beginn der katalytischen Schleife (Abb. 17C), beim Glu201 handelt es sich vermutlich um die sogenannte (p+1)-Schleife, mit der die Aktivierungsschleife abschließt.

Die Existenz der Aktivierungsschleife als Schlüsselement der Substratbindung und EPK-Regulation sowie ihr Sequenzanfang und ihr Sequenzende sind zwar hochkonserviert, jedoch gibt es im Zwischenbereich diverse - oftmals funktionell wichtige - Variationen hinsichtlich der Länge, der Aminosäuresequenz und der strukturellen Details. Dementsprechend gehören diese Details zu den üblichen Diskussionspunkten in EPK-Strukturpublikationen.

Im Falle der $CK2\alpha$ - und zwar in allen bisher aufgeklärten $CK2\alpha$ -Strukturen (Tab. 3) - besteht die Besonderheit der Aktivierungsschleife, wie sie nicht einmal ansatzweise in irgendeiner anderen der bisher strukturell charakterisierten EPKs vorkommt, in ihrer engen Bindung an das N-terminale Segment. Dieses $CK2\alpha$ -Kennzeichen, auf das bereits im Zusammenhang mit Abb. 12 hingewiesen worden ist, wird in Abb. 18A für *zmCK2 α* genauer illustriert. Man sieht dort, wie das N-terminale Ende der Peptidkette die Spitze der Aktivierungsschleife weitgehend umfaßt. Durch eine Fülle nicht-kovalenter

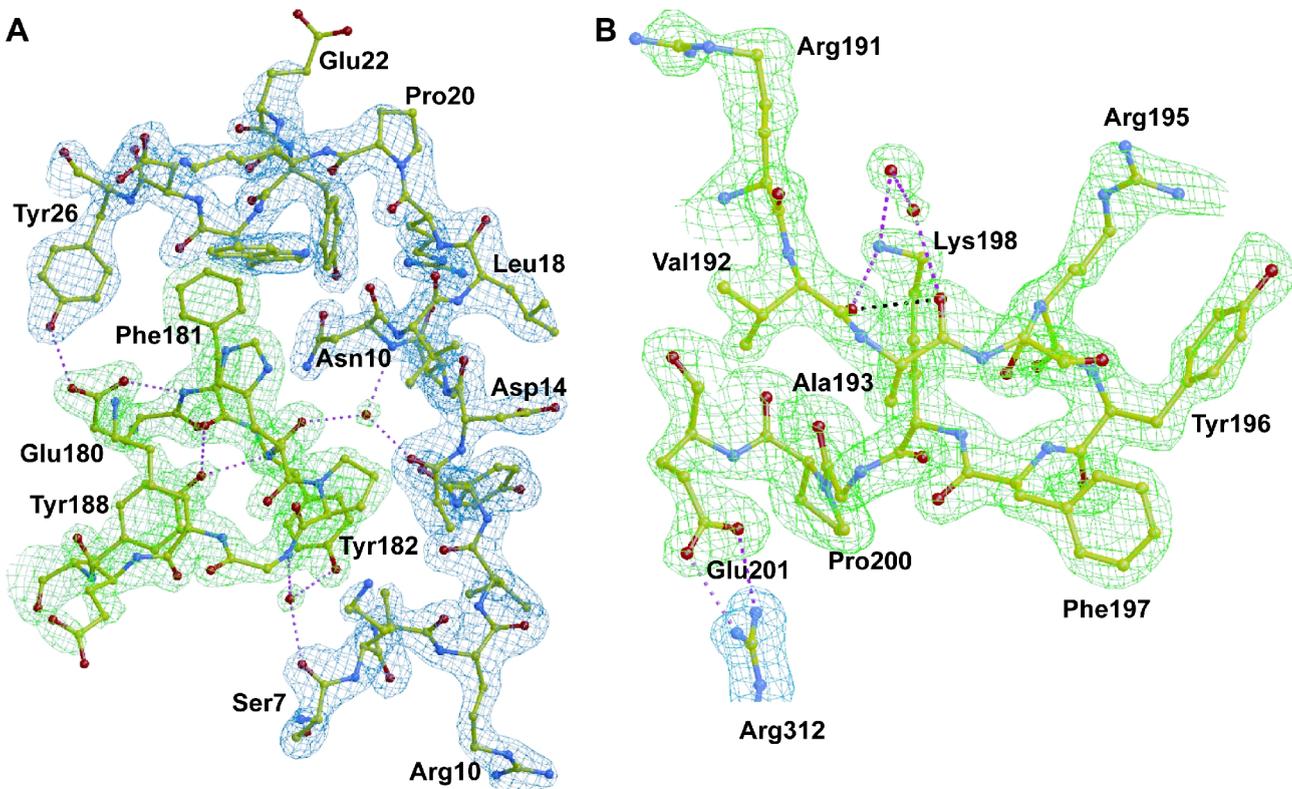


Abb. 18: Die Aktivierungsschleife von *zmCK2 α* (PDB-Code 1LP4). **A)** Spitze der Aktivierungsschleife (grüne Elektronendichte), umfaßt durch das N-terminale Segment (blaue Elektronendichte). **B)** (p+1)-Schleife am Ende der Aktivierungsschleife (grüne Elektronendichte) mit hochkonservierter Salzbrücke zum Arg312 (blaue Elektronendichte). Schwellenwert der Darstellung: 1,5 σ über dem Mittelwert.

Wechselwirkungen, darunter viele sowohl direkte als auch H₂O-vermittelte Wasserstoffbrückenbindungen, werden beide Kontaktpartner so stark stabilisiert und fixiert, daß sie in der Elektronendichtefunktion hervorragend zu erkennen sind. Ein markantes Beispiel ist die Wasserstoffbrücke zwischen Glu180 und Tyr26 (Abb. 18A).

Darüber hinaus ist die Aktivierungsschleife auch in sich selbst stärker stabilisiert, als es bei anderen EPKs üblich ist. So ist das Tyr188 mit seinen zwei starken Wasserstoffbrücken zu Hauptkettenatomen (Abb. 18A) eine Ausnahmeerscheinung unter den EPKs. Insgesamt vermittelt die Aktivierungsschleife von CK2 α nicht den Eindruck, als ob sie Gegenstand größerer regulatorisch bedeutsamer Konformationsänderungen sein könnte. Auf diesen Punkt wird im Kap. 17.2.2 näher eingegangen.

16.6 Die (p+1)-Schleife

Den C-terminalen Teil der Aktivierungsschleife in EPKs bezeichnet man auch als „(p+1)-Schleife“. Der Name geht auf die Tatsache zurück, daß in diesem Bereich die Seitenkette der (p+1)-Aminosäure bindet, die auf das zu phosphorylierende Serin, Threonin oder Tyrosin (Position „p“) folgt. Diese (p+1)-Aminosäure ist bei allen EPKs wichtig für die Substraterkennung, während es für die anderen Determinanten keine einheitliche Regel gibt. So wird die Substraterkennung durch CAPK vor allem durch mehrere positiv geladene Aminosäuren C-terminal von der Phosphorylierungsstelle [an (p-3) und (p-2)] bestimmt, während bei den EPKs der CMGC-Gruppe die entscheidenden Positionen N-terminal von der Phosphorylierungsstelle liegen.

Wie genau die (p+1)-Schleife die (p+1)-Seitenkette eines Substrates bindet, wurde erstmals im Falle der CAPK ermittelt³³⁵. CAPK-Substrate tragen an der (p+1)-Stelle bevorzugt eine hydrophobe Aminosäure. Dementsprechend stellt die (p+1)-Schleife der CAPK mit Leu198, Pro202 und Leu205 drei hydrophobe Aminosäuren als Wechselwirkungspartner zur Verfügung (Abb. 13).

Die topologischen Äquivalente zu diesen drei Aminosäuren in CK2 α sind Arg191, Arg195 und Lys198 (Abb. 13). In Sequenzvergleichen waren sie schon Anfang der 90er Jahre aufgefallen. Daraufhin wurden sie Gegenstand jener großen Mutagenesestudie zur Substraterkennung^{248,249,250}, auf die bereits im Kap. 13.6.5 hingewiesen wurde und durch die ihre kritische Rolle bei der Erkennung der (p+1)-Position sichergestellt wurde.

Abb. 18B zeigt, daß sich die Seitenketten von Arg191, Arg195 und Lys198 von *zmCK2 α* tatsächlich zumindest potentiell (d.h. nach Kontakt zu einer negativ geladenen Substratseitenkette) nahekommen. Lys198 bildet zudem eine direkte und eine H₂O-vermittelte Wasserstoffbrückenbindung zu den Peptidgruppen, die Ala193 flankieren (Abb. 18B). Ala193 wird so in einer spannungsreichen und damit ungünstigen Hauptkettenkonformation gehalten. Es ist die einzige Aminosäure in *zmCK2 α* und auch in *hsCK2 α* ²⁻³³⁵, die in einem „unerlaubten“ Bereich des Ramachandran-Diagramms liegt (Abb. 24D). Auf diesen Befund kommen wir im Kap. 17.3.6 noch einmal zurück.

16.7 Der Reaktionsmechanismus eukaryontischer Proteinkinasen

16.7.1 Übersicht

Wie die nachfolgende Darstellung zeigen wird, kann anhand der vorliegenden Strukturdaten erklärt werden, warum CK2 konstitutiv aktiv ist. Zum Verständnis ist es allerdings nötig, neben den bereits vorgestellten katalytischen Schlüsselementen des Enzyms (s.a. Abb. 19) auch seinen Reaktionsmechanismus in den Grundzügen zu kennen. Die Konserviertheit jener Schlüsselemente spricht dafür, daß der Mechanismus aller von EPKs katalysierten Reaktionen im großen und ganzen gleich ist. Insofern können, da es direkte mechanistische Studien mit CK2 oder CK2 α nicht gibt, die an CAPK und anderen EPKs (s. Übersicht bei Adams³³¹) gewonnenen Erkenntnisse auf CK2 übertragen werden.

Die aktuellste und umfassendste Übersicht zum EPK-Reaktionsmechanismus ist von Adams³³¹ ver-

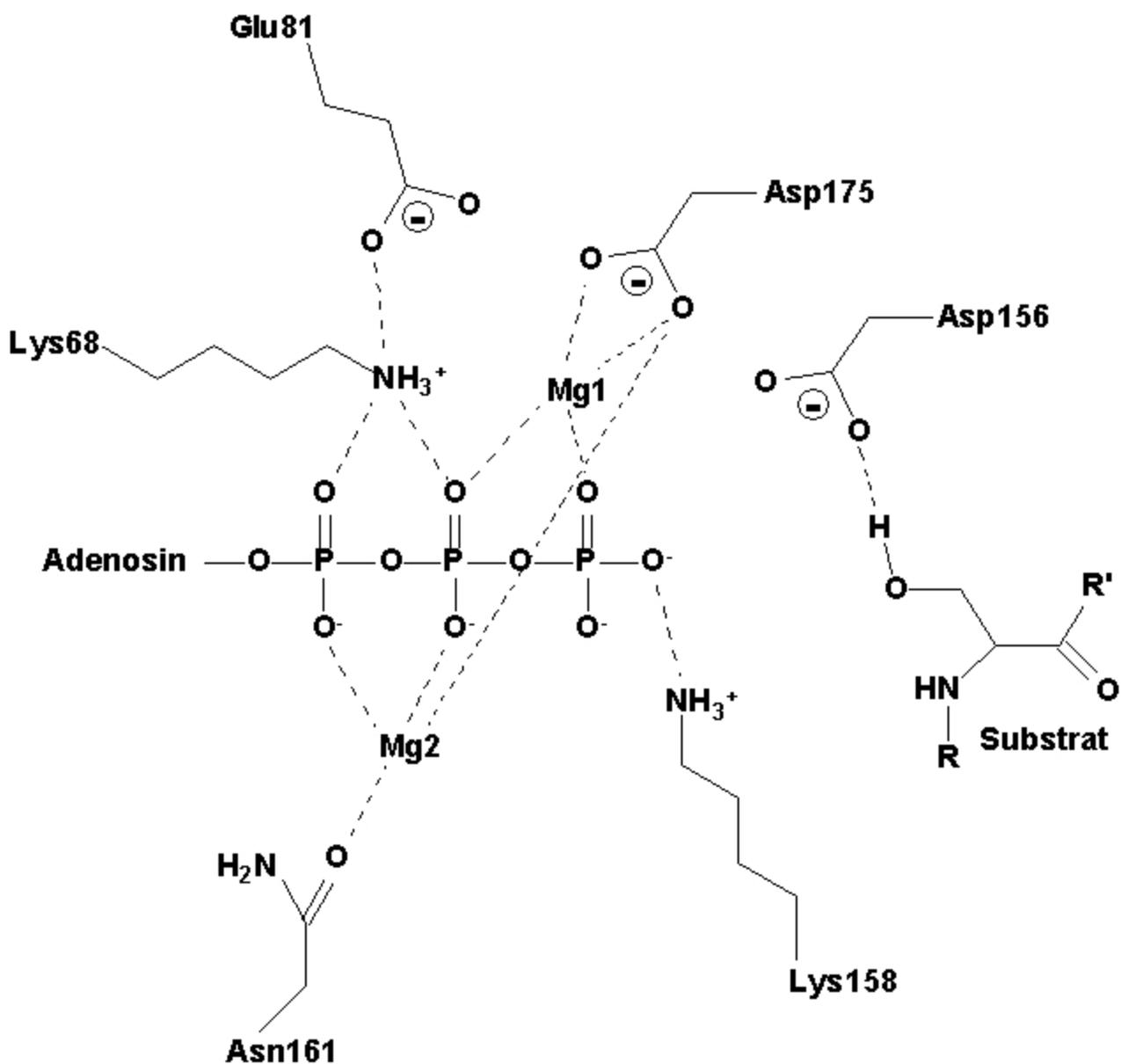


Abb. 19: Die für den Phosphotransferschritt wesentlichen katalytischen Schlüsselemente in CK2 α . Die vier negativen Ladungen und die Doppelbindungen der Triphosphogruppe sind im Gegensatz zu der Zeichnung delokalisiert.

öffentlich worden. Während sich viele Publikationen zu diesem Thema auf dessen Kern, nämlich den Phosphotransferschritt, beschränken, liegt ein besonderer Wert jenes Artikels darin, daß ein umfassender Bogen gespannt wird von der Substraterkennung über die Reaktionsordnung und aktivierende Einflüsse bis hin zur Produktfreisetzung und zur Rolle langsamer Konformationsänderungen des Enzyms. An dieser Stelle sollen nur wenige Punkte angesprochen werden. Die Zusammenfassung der zentralen katalytischen Komponenten in Abb. 19 möge dabei als Hilfestellung dienen.

16.7.2 Der Phosphotransfer von ATP auf das Substrat ist eine nukleophile Substitution

Im Falle von CAPK wurde noch vor der Strukturaufklärung festgestellt, daß die Übertragung der γ -Phosphogruppe des ATP auf ein Substratpeptid mit einer Inversion der stereochemischen Konfiguration am zentralen Phosphoratom verbunden ist³³⁶. Die einfachste Erklärung dafür war, daß die Phosphogruppe ohne Bildung eines Phosphoenzym-Intermediates direkt in einem Schritt durch nukleophile Substitution vom ATP auf das Substrat übertragen wird und daß das angreifende und das abgehende Sauerstoffatom sowie des Phosphoratom im Übergangszustand linear angeordnet sind. Alle nachfolgenden Komplexstrukturen von EPKs mit ATP(-Analoge) und Peptidsubstraten oder -inhibitoren standen im Einklang mit diesem Modell, das daher unstrittig ist.

Umstritten sind jedoch die genaueren Details dieses „in-line“-Mechanismus, wie etwa die Rolle der Magnesiumionen, die Natur des Übergangszustandes oder die Existenz und Bedeutung einer katalytischen Base. Sicher ist, daß die zu phosphorylierende Seitenkette, einerlei ob sie zu Serin, Threonin oder zu Tyrosin gehört, im Laufe der Reaktion ein H^+ -Ion abgeben muß, das im Endeffekt auf Wasser übertragen wird. Es ist daher eine naheliegende, wenn auch nicht zwingende Annahme, daß das Enzym eine Base zur Verfügung stellt, die dieses Proton zwischenzeitlich übernimmt. Und ebenso naheliegend ist die Vermutung, daß diese Deprotonierung die Reaktion beschleunigt, indem sie nämlich als erster Schritt erfolgt und eine negativ geladene Substratseitenkette hinterläßt, die als starkes Nukleophil wirken kann.

16.7.3 Ist Asp156 eine katalytische Base?

Tatsächlich offenbarte die erste Struktur eines ternären Komplexes aus CAPK, ATP und einem Inhibitorpeptid³³⁵, daß mit Asp166 eine in der EPK-Superfamilie absolut konservierte Aminosäure, deren kritische Rolle für die Katalyse zudem durch Mutagenese sichergestellt worden war³³⁷, in räumlicher Nähe zur Phosphorylierungsstelle lag. Dieses Aspartat, das zum Asp156 in CK2 α äquivalent ist, war somit ein plausibler Kandidat für die vermutete allgemeine Base, wie es in Abb. 19 für CK2 α angedeutet ist.

Trotz der Attraktivität dieser Hypothese ist sie immer wieder mit guten Gründen bezweifelt worden (s. Diskussion bei Adams³³¹). Beispielsweise könnte - so wurde argumentiert³³⁸ - die negative Ladung einer deprotonierten Seitenkette angesichts der negativen Ladung der γ -Phosphogruppe eher hinderlich sein. Obendrein wurde festgestellt, daß die Geschwindigkeit des Phosphotransferschrittes weder pH-abhängig ist noch einen Isotopeneffekt in deuteriertem Lösungsmittel zeigt³³⁹. Auch auf der Basis theoretischer Arbeiten ist die Rolle des konservierten Aspartates als allgemeine katalytische Base bezweifelt worden³⁴⁰.

Zusammengefaßt, lautet der gegenwärtige Erkenntnisstand also, daß Asp166 in CAPK (Asp156 in CK2 α) zwar möglicherweise als Base fungiert, aber sicherlich nicht zu einem frühen Zeitpunkt, so daß

diese Protonenübertragung keine beschleunigende Wirkung hat. In diesem Sinne ist also Asp166 keine „katalytische“ Base. Als Alternativerklärungen für seinen essentiellen Charakter im Rahmen der Katalyse sind vorgeschlagen worden, daß es die Substratseitenkette auf das passende Rotamer fixiert³³⁹ oder daß es die Freisetzung des phosphorylierten und damit negativ geladenen Substrates fördert³⁴¹.

16.7.4 Dissoziativer oder assoziativer Mechanismus?

Die Erkenntnisse über die Rolle des konservierten, zu Asp166 in CAPK äquivalenten Aspartates beeinflussen auch die Diskussion um einen anderen offenen Punkt, ob nämlich der Phosphotransfer einem assoziativen, d.h. S_N2 -artigen oder einem dissoziativen, d.h. S_N1 -artigen Verlauf folgt. Die beiden Alternativen sind in Abb. 20 schematisch dargestellt: Bei einem assoziativen Mechanismus entsteht ein hochgeladener Übergangszustand mit einem pentakoordinierten Phosphoratom und einem Abstand zwischen angreifendem und Abgangsgruppen-Sauerstoff, der in der Größenordnung zweier kovalenter Bindungslängen liegt; die initiale Wirkung einer katalytischen Base könnte diesen Verlauf stark beschleunigen, indem ein starkes Oxyanionen-Nukleophil entsteht.

Im Gegensatz dazu ist ein dissoziativer Mechanismus durch allgemeine Basenkatalyse kaum zu be-

einflussen, denn er beginnt mit dem Bindungsbruch zur Abgangsgruppe ADP, während der Angriff des Nukleophils erst später erfolgt. Bei diesem Mechanismus ist der Abstand zwischen Nukleophil-Sauerstoff und Abgangsgruppensauerstoff im Übergangszustand so groß, daß fast ein planares, einfach-negativ geladenes Metaphosphatanion, ein Homologes zum Nitrat anion, entsteht (Abb. 20). Tatsächlich wurden bei der Strukturaufklärung eines Komplexes aus CDK2/Cyclin A, ADP, Mg^{2+} , Nitrat und einem Peptidsubstrat Atomabstände gefunden, die für einen dissoziativen Mechanismus sprechen³⁴². Diese Komplexstruktur, die Erkenntnisse zur Rolle der CAPK-Aminosäure Asp166 sowie wei-

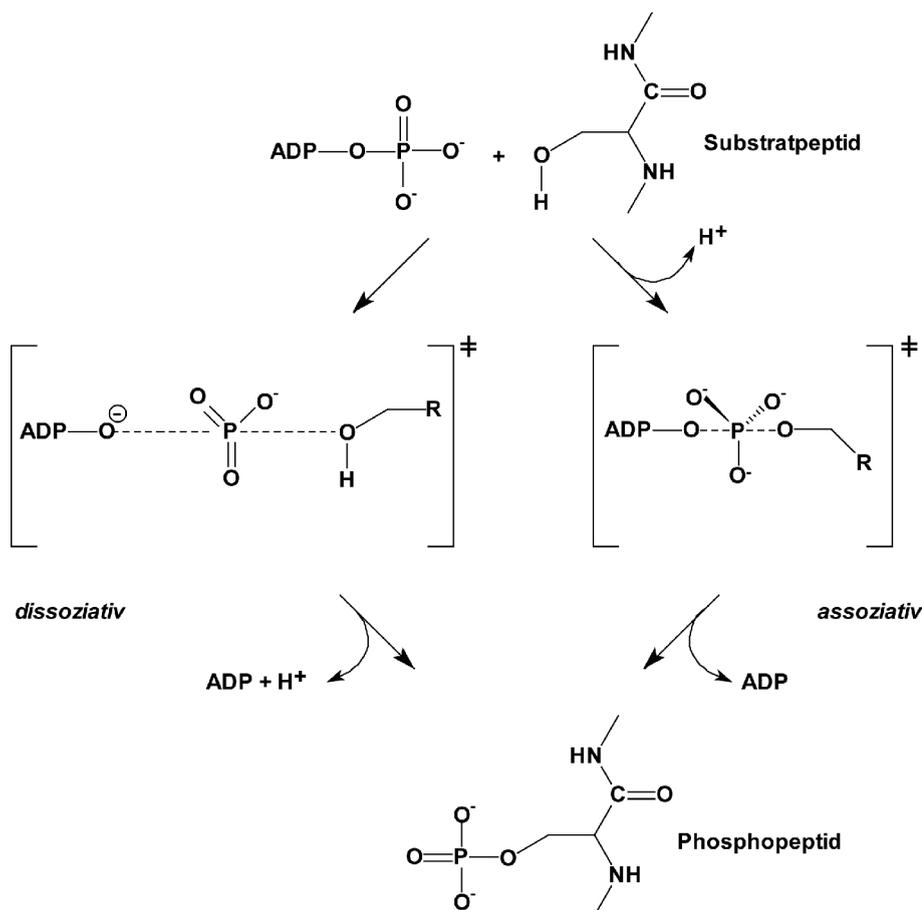


Abb. 20: Zwei mögliche Mechanismen für die Phosphotransferreaktion: links der dissoziative Verlauf über einen metaphosphatanion-ähnlichen Zwischenzustand und mit spätem Protonenabgang, rechts der assoziative Verlauf über ein pentakoordiniertes Phosphoratom und mit früher Abspaltung des Protons.

tere Indizien³³¹ sprechen also für einen dissoziativen Verlauf der von EPKs katalysierten Phosphotransfer-Reaktion.

Ein etwas modifiziertes Bild ergibt sich jedoch durch eine neuere Kristallstruktur von CAPK im Komplex mit ADP, Mg^{2+} , einem Substratpeptid sowie Aluminiumfluorid (AlF_3) als Analogon des Metaphosphatanions³⁴³. Die in dieser Struktur gefundenen Abstände zwischen dem zentralen Aluminiumatom sowie den Sauerstoffatomen des Nukleophils und der Abgangsgruppe betragen etwa 2,3 Å und sind damit zwar größer als typische kovalente Bindungslängen, aber eben auch deutlich kleiner als van-der-Waals-Abstände. Dieser Befund wie auch Argumente der Ladungsverteilung³⁴³ sprechen für einen zumindest deutlichen assoziativen Anteil am Übergangszustand. Bedenkt man noch die generelle Leichtigkeit, mit der Phosphor pentakoordinierte Zustände eingehen kann, sowie die Tatsache, daß kürzlich erstmals eine Kristallstruktur eines Phosphotransfer-Enzyms (β -Phosphoglucomutase) mit einem gebundenen pentakoordinierten Phosphorintermediat, also einem assoziativen Zwischenzustand, in atomarer Auflösung beschrieben wurde³⁴⁴, so kann man davon ausgehen, daß das heute überwiegend akzeptierte Modell eines dissoziativen Verlaufes der durch EPKs katalysierten Phosphotransferreaktion in Zukunft nicht unangefochten bleiben wird.

16.7.5 Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in EPK-katalysierten Reaktionen

Ebenso kontrovers wie über den Mechanismus des Phosphotransferschrittes wurde lange Zeit darüber diskutiert, ob dieser Schritt geschwindigkeitsbestimmend für die Gesamtkatalyse ist. Für diese Annahme sprach im Falle der CAPK die Tatsache, daß das Enzym eine basale ATPase-Aktivität besitzt, deren Wechselzahl k_{cat} um drei Größenordnungen kleiner als die der Phosphorylierung eines typischen Substratpeptides ist. Dieser Unterschied sei, so wurde argumentiert, nur zu erklären, wenn der Phosphotransfer selbst und nicht etwa (Co-)Substratbindung oder Produktfreisetzung geschwindigkeitsbestimmend sei.

Eine Alternative dazu schlugen Cook *et al.*³⁴⁵ vor, und zwar basierend auf zwei miteinander korrelierten Beobachtungen an CAPK: erstens auf der bereits im Kap. 16.2 genannten Tatsache, daß nämlich Mg^{2+} nur in submillimolaren Konzentrationen aktivierend, in millimolaren Konzentrationen dagegen inhibierend wirkt, und zweitens auf dem Befund, daß die Affinität des Enzyms gegenüber ADP durch zunehmende Mg^{2+} -Konzentrationen auf jeden Fall steigt. Wenn aber, so die Argumentation, eine wachsende Affinität der CAPK gegenüber ADP zu einer sinkenden Wechselzahl führe, dann müsse die ADP-Freisetzung geschwindigkeitsbestimmend sein.

Bis Mitte der 90er Jahre hat sich keine der beiden Sichtweisen durchsetzen können, denn sie beruhten letzten Endes beide auf Kinetikmessungen im Fließgleichgewicht, bei denen einzelne Katalyseschritte nicht getrennt voneinander beobachtet werden können. 1996 konnten dann Grant & Adams³⁴⁶ für CAPK durch Vor-Gleichgewichtskinetik im Millisekundenbereich zeigen, daß der Phosphotransfer so schnell ist, daß er sicherlich nicht geschwindigkeitsbestimmend für das Gesamtgeschehen sein kann. Die Autoren schlugen deshalb die ADP-Freisetzung als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt vor.

Nach der Einschätzung von Adams³³¹ ist nach diesen und anderen neueren Erkenntnissen die Frage des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes zumindest für CAPK entschieden. Auch für Phosphorylase-Kinase sprechen neuere Ergebnisse dafür, daß die Produktfreisetzung geschwindigkeitsbestimmend ist³⁴⁷. Adams³³¹ nennt jedoch auch ein Gegenbeispiel, nämlich die CDK-aktivierende Proteinkinase aus

Bäckerhefe, bei der gezeigt worden ist, daß der Phosphotransferschritt sehr langsam und wahrscheinlich geschwindigkeitsbestimmend ist³⁴⁸. Nun ist diese Kinase allerdings ein sehr exotisches Beispiel für eine EPK, denn ihr fehlt beispielsweise das kanonische glycinreiche Motiv zur ATP-Bindung³⁴⁹. Insofern darf die Aussage, daß die Freisetzung von ADP und möglicherweise auch des Phosphoproteins der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim EPK-katalysierten Phosphotransfer ist, zumindest eingeschränkte Allgemeingültigkeit beanspruchen.

16.7.6 Der Ladungszustand der ATP-bindenden Schleife ist entscheidend für die katalytische Effizienz von CK2 α

Wie bereits erwähnt, gibt es bisher keine über Gleichgewichtskinetik hinausgehende Kinetikstudien mit CK2 oder CK2 α . Die einschlägigen CK2 α -Mutagenesearbeiten betrafen, sofern sie für den Reaktionsmechanismus im weitesten Sinne relevant waren, Themen wie Substrat- oder Cosubstraterkennung.

Eine der wenigen, wenn nicht gar die einzige CK2 α -Forschungsarbeit, die auf den Reaktionsmechanismus im engeren Sinne abzielte, haben wir in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Chardot vom „Institut National de la Recherche Agronomique“ (INRA) in Grignon bei Paris publiziert³³³ (s. Anhang 4). Untersucht wurde dabei CK2 α aus der Hefe *Yarrowia lipolytica* (γ CK2 α), und es handelte sich um eine Folgearbeit der ersten *zm*CK2 α -Struktur²⁷, denn diese diente beim homologiebasierten Modellbau für γ CK2 α als Ausgangsstruktur. Ausgehend von einem modellierten ternären Komplex wurden γ CK2 α -Mutanten mit drastisch verändertem Ladungszustand in der ATP-bindenden Schleife geplant, hergestellt und charakterisiert. Zwei dieser Mutanten betrafen mit Gly48 (s. Abb. 17A für *zm*CK2 α) eines der hochkonservierten Glycine.

Die Mutante G48K erwies sich als nahezu inaktiv, während bei der Mutante G48D die katalytische Effizienz ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) im Vergleich zum Wildtyp deutlich gesteigert war, und zwar um den Faktor 4,2 bezogen auf ATP (und auf dephosphoryliertes Casein als Substrat), um den Faktor 6,7 bezogen auf das Peptidsubstrat mit der Sequenz RREEETEEE und um den Faktor 10,6 bei Verwendung eines Peptides der Sequenz RRRADDSDDDDDD. Ohne Kenntnis der strukturellen Details wirkt dieses Ergebnis überraschend, denn bei einer acidophilen Proteinkinase hätte man intuitiv das Umgekehrte erwartet: Effizienzsteigerung durch eine zusätzliche positive Ladung an Position 48, also neben einer Position (Lys49), deren Bedeutung für Erkennung negativ geladener Determinanten im Substrat gesichert war, und dementsprechend Deaktivierung durch Einführung einer negativen Ladung.

Tatsächlich beeinflußt die neue negative Ladung in der Mutante G48D die Substratbindung fast gar nicht, wie an den kaum veränderten K_{M} -Werten ablesbar ist³³³. Die Effizienzsteigerungen beruhen vielmehr auf deutlichen Erhöhungen der Wechselzahlen k_{cat} . Dieser Befund ist nicht zu erklären, wenn der Phosphotransfer der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, wohl aber, wenn es die Produktfreisetzung ist. Offenbar bewirkt die zusätzliche negative Ladung infolge elektrostatischer Abstoßung, daß die Produkte, nämlich ADP und das Phosphopeptid, beschleunigt abdissoziieren können.

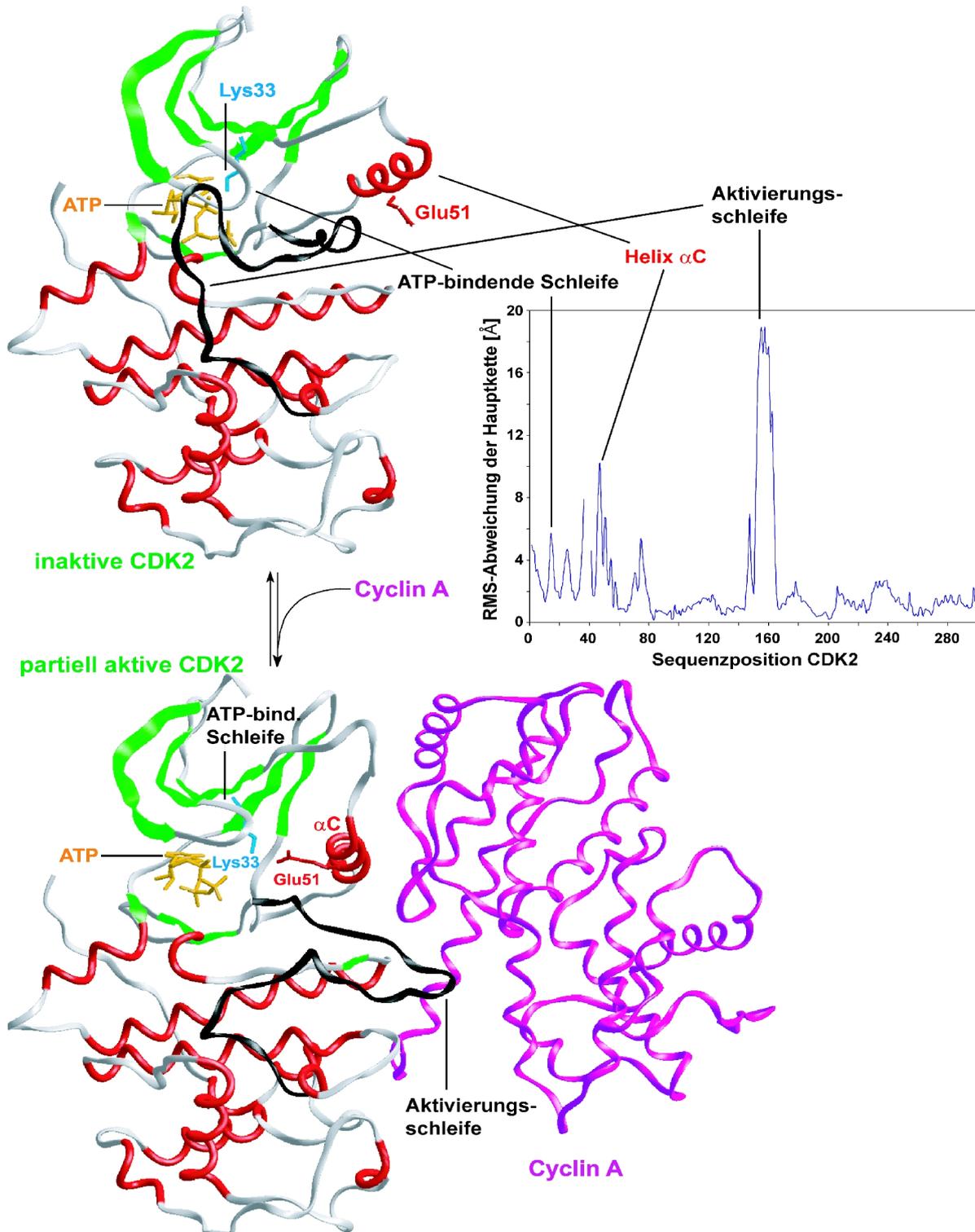


Abb. 21: Partielle Aktivierung von CDK2 durch Cyclin A. CDK2 wurde allein (obere Bildhälfte, PDB-Code 1HCK) und im Komplex mit einem Cyclin-A-Fragment (untere Bildhälfte, PDB-Code 1FIN) kristallisiert. Im isolierten Zustand ist CDK2 inaktiv, weil die Aktivierungsschleife (schwarz) mit der ATP-bindenden Schleife interagiert und das aktive Zentrum blockiert und weil die Helix αC so verdreht ist, daß Glu51 keine ionische Wechselwirkung mit dem hochkonservierten, ATP-bindenden Lys33 eingehen kann. Durch Cyclin A wird die Helix αC in einer aktiven und die Aktivierungsschleife in einer partiell aktiven Konformation arretiert. Nach Phosphorylierung der Aktivierungsschleife vollzieht diese eine weitere Konformationsänderung, durch die der Komplex voll aktiv wird.

17 Die 3D-Strukturen von CK2 α stehen im Einklang mit ihrer konstitutiven Aktivität

17.1 Strukturelle Plastizität von EPK-Enzymen in der Aktivierungsschleife und in der Helix αC

In den 90er Jahren wurden verschiedene EPKs in aktiven und inaktiven Zuständen kristallisiert, um die strukturellen Grundlagen der Regulation dieser Enzyme zu verstehen. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse wurden von Huse & Kuriyan³⁵⁰ in folgender Weise zusammengefaßt:

- Üblicherweise besitzt eine eukaryontische Proteinkinase zwei Extremzustände mit maximaler und minimaler Aktivität. Dabei ist der „Aus“-Zustand der normale Ruhezustand, und nur durch spezifische Signale wird der „An“-Zustand erreicht.
- Alle bekannten aktiven Konformationen von EPKs sind einander ähnlich, während sich die „Aus“-Zustände deutlich voneinander unterscheiden.
- Die Ähnlichkeit der aktiven Konformationen beruht darauf, daß alle EPKs die Übertragung der γ -Phosphogruppe von ATP auf die Hydroxygruppe von Serin, Threonin oder Tyrosin nach einem einheitlichen Mechanismus katalysieren (Abb. 20). Somit gibt es starke chemische Zwänge, katalytische Schlüsselpositionen absolut zu konservieren und in ähnlichen Konformationen zu halten. Im Gegensatz dazu unterliegen die „Aus“-Zustände keinen derartigen Zwängen.
- Wegen der Verschiedenheit der „Aus“-Zustände unterscheiden sich auch die Aktivierungswege der EPKs deutlich voneinander. Die Aktivierung kann mit der Bindung (CDKs) oder der Freisetzung (CAPK) von Kontrollproteinen, mit Phosphorylierungen (MAP-Kinasen, Insulinrezeptor-Kinase) oder mit Dephosphorylierungen (Src-Kinase, GSK3) verbunden sein.
- Wie auch immer die Aktivierung vollzogen wird: Als entscheidende Schaltelemente sind immer die Helix αC und die Aktivierungsschleife beteiligt.

Das Musterbeispiel für eine EPK-Aktivierung ist die CDK2, denn sie wurde sowohl im inaktiven³⁰⁵, als auch in einem partiell aktiven³⁵¹ und schließlich im voll aktiven Zustand³⁵² kristallisiert. Beide Aktivierungsschritte sind mit Konformationsänderungen verbunden. Das gilt insbesondere für den Übergang vom inaktiven in den partiell aktiven Zustand (Abb. 21), der durch Bindung von Cyclin A bewirkt wird und der im folgenden als „Grobregulation“ bezeichnet wird. Dagegen ist die sich anschließende „Feinregulation“ mit einer Phosphorylierung und einer kleineren Konformationsänderung verbunden.

Es sei allerdings vermerkt, daß nicht alle EPKs diese klare Trennung in zwei Regulationsebenen aufweisen. Obendrein gibt es weitere Regulationsmechanismen für Proteinkinasen, die zu keinen Konformationsänderungen führen und die daher nicht von Huse & Kuriyan³⁵⁰ erfaßt wurden. Trotzdem bietet es sich an, auf den Fall der CDK2 genauer einzugehen, weil an ihm wesentliche Prinzipien deutlich werden und weil es sich bei ihr um eine nahe Verwandte der CK2 α aus der CMGC-Gruppe handelt.

17.2 Grobregulation durch Umfaltung der Aktivierungsschleife und der Helix αC

17.2.1 Die Bindung von Cyclin A erzwingt in CDK2 die aktiven Konformationen der Aktivierungsschleife und der Helix αC

Wie andere cyclinabhängige Proteinkinasen ist CDK2 im isolierten Zustand inaktiv. Durch Bindung von Cyclin A wird das Enzym partiell aktiviert. Strukturaufklärungen von CDK2 im isolierten³⁰⁵ und im cyclin gebundenen Zustand³⁵¹ ergaben, daß das Cyclin A u.a. an die Helix αC und an die Aktivierungsschleife bindet und dadurch drei größere Konformationsänderungen bewirkt (Abb. 21):

- Die Helix αC , die im Falle der CDK2 nach der Aminosäuresequenz auch PSTAIRE-Helix genannt wird, wird zum Rest des Moleküls geschwenkt und um ca. 90° um ihre Längsachse gedreht. Diese Bewegung bewirkt, daß die Aminosäure Glu51 (äquivalent zu Glu81 in CK2 α), die zuvor nach außen gerichtet war, nun in das aktive Zentrum hineingedreht wird und so eine Salzbrücke mit Lys33 (äquivalent zu Lys68 in CK2 α) ausbilden kann. Lys33 kann nur in diesem arretierten Zustand die α - und β -Phosphogruppen des ATPs koordinieren, wie es in Abb. 17C für *zmCK2 α* und deren Lys68 gezeigt worden ist. Ein solches Arrangement ist, wie bereits im Kap. 16.3 erwähnt wurde, eine notwendige Bedingung für die Aktivität einer EPK.
- Korreliert mit dieser Bewegung der Helix αC ist eine völlige Umfaltung der Aktivierungsschleife (s. schwarzer Bereich in Abb. 21). In isolierter CDK2, in der die Aktivierungsschleife nicht durch Cyclin A fixiert wird, blockiert sie das aktive Zentrum partiell. In diesem Zustand kann zwar noch ATP, jedoch nicht mehr ein Substratprotein gebunden werden (Abb. 21 oben).
- Neben der Helix αC und der Aktivierungsschleife, die direkt durch Cyclin A beeinflusst werden, vollziehen sämtliche Schleifenbereiche der N-terminalen Domäne größere Konformationsänderungen, erkennbar an den regelmäßig auftretenden Maxima in der Auftragung der RMS-Abweichungen in Abb. 21. Teilweise sind diese Maxima nicht aussagekräftig, weil in der Struktur von isolierter CKD2 ungeordnete Bereiche vorhanden sind. Signifikant jedoch ist die Veränderung der ATP-bindenden Schleife, deren Spitze in isolierter CDK2 so in Richtung C-terminaler Domäne gebogen ist, daß sie mit der Aktivierungsschleife in seiner inaktiven Konformation wechselwirken kann. Nach Öffnung der Aktivierungsschleife durch Cyclin A nimmt die ATP-bindende Schleife eine gestreckte Konformation ein. Das bedeutet also: Während die offene und aktive Konformation der Aktivierungsschleife durch den Kontakt zu Cyclin A stabilisiert wird, wird die geschlossene und inaktive Konformation durch ihre Wechselwirkung mit der ATP-bindenden Schleife begünstigt.

Aus diesen Beobachtungen an CDK2 ergeben sich Grundbedingungen für den aktiven Zustand, die sich im Falle anderer eukaryontischer Proteinkinasen bestätigt haben³⁵⁰. Als Regel kann festgehalten werden, daß eukaryontische Proteinkinasen nur dann aktiv sind, wenn erstens die Aktivierungsschleife geöffnet ist und wenn zweitens die Helix αC so arretiert ist, daß das in ihr eingebettete entscheidende Glutamat zum aktiven Zentrum zeigt und eine Salzbrücke mit jener Lysinseitenkette ausbildet, die gleichzeitig die α - und die β -Phosphogruppe des ATP-Moleküls fixiert.

17.2.2 In CK2 α fixiert das N-terminale Segment die Aktivierungsschleife und die Helix αC in ihren aktiven Konformationen

Durch die gerade geschilderten Zusammenhänge wird ersichtlich, welche Bedeutung im Falle der CK2 α der in Abb. 12B und Abb. 18A illustrierten Wechselwirkung zwischen N-terminalem Segment einerseits und Aktivierungsschleife und Helix αC andererseits zukommt: Durch diesen intramolekularen Kontakt stabilisiert das Enzym seinen aktiven Zustand selbst. Diese Beobachtung paßt hervorragend zur konstitutiven Aktivität der CK2. Tatsächlich wurde durch Mutagenesestudien die kritische Rolle des N-terminalen Segmentes für die Aktivität von CK2 α bestätigt³³⁴.

Allerdings muß einschränkend gesagt werden, daß die Tatsache allein, daß die aktivierende Wechselwirkung intramolekular anstatt wie bei CDK2 intermolekular erfolgt, noch keine strukturbasierte Erklärung der konstitutiven Aktivität liefert. So beschreiben Huse & Kuriyan³⁵⁰ mehrere Fälle von

EPKs (u.a. die CK2 α -verwandte MAP-Kinase ERK2), bei denen intramolekulare Wechselwirkungen bei der Aktivierung des jeweiligen Enzyms entscheidend sind. Grundsätzlich ist also denkbar, daß auch CK2 α in inaktiven Zuständen vorkommt, z.B. wenn die N-terminale Region umgefaltet und sein Kontakt zu Helix α C und Aktivierungsschleife gestört ist. Ein solches Szenario ist jedoch aus folgenden Gründen unwahrscheinlich:

- Der Kontakt zwischen N-terminaler Region und den Schaltelementen ist sehr intensiv, erkennbar an den vorzüglichen Elektronendichten in Abb. 18A.
- Man findet diesen Kontakt in allen bisher bekannten CK2 α -Strukturen (Tab. 3), insbesondere auch in der Struktur von *hsCK2 α* ²⁻³³⁵. Nach der Publikation der *zmCK2 α* -Struktur war die Spekulation erlaubt, daß *zmCK2 α* ein untypischer Fall von CK2 α sein könnte, weil es nach damaligen Kenntnisstand natürlicherweise ohne CK2 β vorkommt und vergleichsweise sehr aktiv ist. Die Strukturaufklärung von *hsCK2 α* ²⁻³³⁵ jedoch hat gezeigt³²⁹ (s. Anhang 8), daß die Strukturunterschiede minimal sind und daß *zmCK2 α* somit strukturell repräsentativ auch für CK2 α anderer Spezies' ist.
- Obwohl es substratabhängige Sonderfälle gibt, ist CK2 α in isolierter Form weniger aktiv als eingebunden in das Holoenzym. Wenn also CK2 α schon in dieser Form intramolekular aktiv gehalten wird, dann ist es unwahrscheinlich, daß sich daran im Holoenzym durch CK2 β etwas ändert. Diese Vermutung ist tatsächlich durch die Strukturaufklärung des CK2-Holoenzym bestätigt worden³²¹: Die Konformationen von Aktivierungsschleife, Helix α C und N-terminaler Region ändern sich durch die Einbindung in das Holoenzym nicht (Abb. 16).

Nachdem bis heute keine inaktiven physiologischen Zustände von CK2 α bekannt sind, muß zusammenfassend festgehalten werden, daß auch auf struktureller Ebene kein inaktiver Zustand gefunden werden konnte. Konstitutive Aktivität scheint eine grundlegende Eigenschaft dieses Enzyms zu sein. Diese Tatsache ist sehr bemerkenswert, weil CK2 damit aus dem von Huse & Kuriyan³⁵⁰ gezeichneten Rahmen fällt und offenbar eine Ausnahmeerscheinung unter den EPKs ist.

17.3 *Feinregulation durch Anionenbindung in der Aktivierungsschleife*

17.3.1 RD-Kinasen benötigen eine negative Ladung im Bereich der Aktivierungsschleife

Nach den genannten großen Konformationsänderungen ist in CDK2 die für die ATP-Fixierung entscheidende Salzbrücke Lys33-Glu50 vorhanden, d.h. das Enzym ist nun für die Bindung von ATP optimal eingerichtet. Dennoch ist der CDK2/Cyclin-A-Komplex nur partiell aktiv und muß zunächst am Thr160 innerhalb der Aktivierungsschleife phosphoryliert werden, um die volle Aktivität zu erlangen.

Bei dieser Phosphorylierung handelt es sich um eine Art Feinregulation²⁸¹: CDK2 gehört wie alle Kinasen der CMGC-Gruppe zu den bereits im Kap. 16.4 vorgestellten „RD-Kinasen“, ein Begriff, der von Johnson *et al.*²⁸¹ für diejenigen EPKs eingeführt wurde, bei denen dem katalytisch entscheidenden Aspartat ein Arginin vorangeht. Voll aktiv wird eine RD-Kinase erst, wenn das Arginin des RD-Motives (Arg125 in CDK2, Arg155 in CK2 α) mit einer negativen Ladung im Bereich der Aktivierungsschleife Kontakt hat, und zwar üblicherweise mit einer Phospho- oder einer Carboxylatgruppe.

Welche Auswirkungen hat die Etablierung einer negativen Ladung in diesem Bereich? Wodurch genau wird die volle Aktivität der Kinase erreicht? Johnson *et al.*²⁸¹ diskutieren dafür mehrere Möglichkeiten, wie z.B. Konformationsänderungen in der Aktivierungsschleife, durch die sie für die Substrat-

bindung optimiert wird, oder eine korrekte Fixierung der beiden Hauptdomänen des Enzyms zueinander. Als eine weitere Möglichkeit nennen sie, daß durch die Interaktion der negativen Ladung mit dem Arginin des RD-Motives die richtigen strukturellen und elektrostatischen Verhältnisse am katalytischen Aspartat eingestellt werden.

17.3.2 Die Aktivierungsschleifen der CDK2 und der MAP-Kinasen ERK2 und p38 γ rasten nach Phosphorylierung in die aktiven Konformationen ein

Im Falle der CDK2 ist das Arg125 bereits im partiell aktiven Zustand an eine negative Ladung, nämlich an die Carboxylatgruppe von Glu161 gebunden (Abb. 22A). Wie ein Vergleich von Abb. 22A mit Abb. 22B zeigt, ändert sich dann nach der Phosphorylierung an Thr160 die Konformation der Aktivierungsschleife deutlich: Glu161 und Thr160 tauschen die Plätze, und die Anionenbindungsstelle wird für ein Dianion optimiert, indem Arg50 aus dem RE-Motiv der Helix α C (Abb. 13) eine gestreckte Konformation annimmt (Abb. 22B).

Daß diese neue Konformation tatsächlich etwas mit der Substratbindung zu tun hat, wurde durch die Strukturaufklärung eines Komplexes aus phosphorylierter CDK2, einem Cyclin-A-Fragment, einem Substratpeptid mit der Sequenz HHASPRK, dem ATP-Analogen AMPPNP und zwei Mg²⁺-Ionen bewiesen³⁵³. Das Lysin am C-Terminus des Peptides, also an seiner (p+3)-Position, bindet an die Phosphogruppe des Thr160, d.h. die Phosphorylierung wirkt sich auf die Substratspezifität des Enzyms aus.

Auch die MAP-Kinasen ERK2 und p38 γ , zwei weitere Mitglieder der CMGC-Familie, rasten jeweils erst nach Phosphorylierung an einem Threonin (Thr183), das zu Thr160 in CDK2 äquivalent ist, in eine aktive Konformationen ein. Allerdings benötigen sie zur vollen Aktivierung jeweils noch eine weitere Phosphorylierung an einem zwei Positionen entfernten Tyrosin (Tyr185, Abb. 22C/D). Diese doppelte Phosphorylierung an einem Threonin- und einem Tyrosinrest - katalysiert durch hochspezifische MAP-Kinase-Kinasen - ist eine Besonderheit der MAP-Kinasen, durch die sichergestellt wird, daß sich die verschiedenen MAP-Kinase-Signalwege nicht überschneiden und gegenseitig stören.

17.3.3 Die Aktivierungsschleifen von GSK3 und CK2 α liegen auch ohne Phosphorylierung in aktiven Konformationen vor

Es liegt nahe, neben der CK2 α auch die GSK3 als weitere Proteinkinase der CMGC-Familie in diese Übersicht einzubeziehen. Weder GSK3 (Abb. 22E) noch CK2 α (Abb. 22F) besitzen eine zu Thr160 in CDK2 äquivalente Phosphorylierungsstelle. Doch auch ohne Phosphorylierung sind ihre Aktivierungsschleifen „aktiv“: Sie sind untereinander sehr ähnlich (Abb. 22E/F), und sie sind insbesondere ähnlich zu der von voll aktiver, phosphorylierter CDK2, was in Abb. 22B für CK2 α gezeigt wird.

Wie stabilisieren diese beiden Proteinkinasen ihre aktiven Konformationen? Und spielen auch dabei negative Ladungen eine Rolle? Diese Fragen wurden für GSK3 im Jahre 2001 durch zwei Röntgenstrukturanalysen des unphosphorylierten Enzyms^{354,355}, durch eine Kristallstruktur des an Tyr216 phosphorylierten Enzyms³⁵⁶ sowie durch eine strukturbasierte Mutagenesestudie³⁵⁷ ansatzweise geklärt. Für CK2 α werden sie im Rahmen dieser Schrift erstmals beantwortet.

Doch bleiben wir zunächst bei der GSK3: In allen drei GSK3-Kristallstrukturen ist die Anionenbindungstasche durch ein externes Anion aus der Kristallisationslösung gefüllt, nämlich einmal durch ein Phosphation³⁵⁵, einmal durch ein Sulfation³⁵⁶ und einmal durch die Sulfogruppe eines HEPES-Puffer-

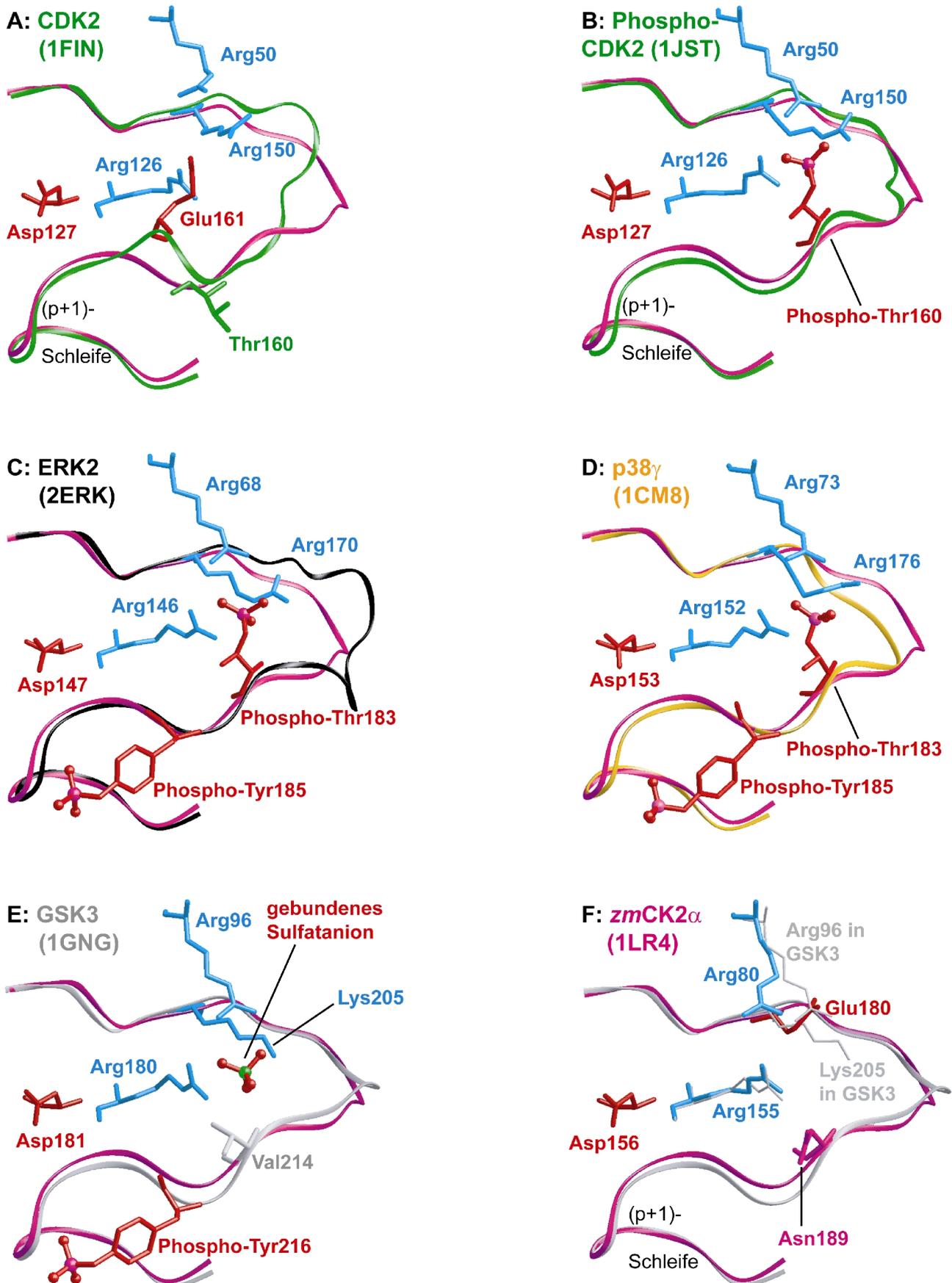


Abb. 22: Vergleich der Aktivierungsschleifen verschiedener CMGC-Kinasen mit *zmCK2* α . Die Hauptkette von *zmCK2* α ist überall als violettes Band gezeichnet. Die Seitenketten und Heteroatome stammen aus CDK2/Cyclin-A (**A**), Phospho-CDK2/Cyclin-A (**B**), ERK2 (**C**), p38 γ (**D**) und GSK3 (**E**). In (**F**) stammen die farbigen Seitenketten aus *zmCK2* α und die grauen aus GSK3. Auffällig hier die Konformationsänderung von Arg80 verglichen mit Arg96 in GSK3.

moleküls³⁵⁴. Außerdem ist in allen Fällen die Anionenbindungstasche hinsichtlich der umgebenden positiven Ladungen sehr ähnlich zu der von CDK2, ERK2 und p38 γ (Abb. 22): GSK3 besitzt ebenfalls in der Helix α C ein „RE“-Motiv, das heißt ein Arginin (Arg96), das dem Arginin des RD-Motives (Arg180) nahekommen und mit ihm eine Anionenbindungstasche bilden kann. Darüber hinaus hat GSK3 mit Lys205 ein positiv geladenes Äquivalent zu Arg150 in CDK2 (Abb. 22E).

Eine Vermutung Dajani *et al.*³⁵⁴, daß nämlich GSK3 ohne anionische Stabilisierung ähnlich wie CDK2, ERK2 oder p38 γ eine erkennbar inaktive Konformation annehmen würde, lag somit zunächst nahe. Die Verhältnisse sind jedoch komplizierter: Zwar gibt es seit dem vergangenen Jahr GSK3-Strukturen ohne gebundenes Anion, in ihnen liegt die Aktivierungsschleife aber trotzdem in der aktiven Konformation vor^{358,359}. Diese Strukturen liefern dennoch keinen Beweis gegen eine anionische Stabilisierung von aktiver GSK3, denn paradoxerweise ist trotz „aktiver“ Aktivierungsschleife der Gesamtzustand des Enzyms inaktiv und daher von begrenzter Aussagekraft. Das Enzym kristallisierte nämlich als ein Dimer, und durch diese Dimerisierung wird zwar die offene Form der Aktivierungsschleife stabilisiert, gleichzeitig aber das aktive Zentrum blockiert.

Als voll aktives Monomer konnte GSK3 erst nach Phosphorylierung an Tyr216, dem Äquivalent zu Tyr185 in ERK2 und p38 γ , kristallisiert werden³⁵⁶. In diesem Zustand ist jedoch nicht nur das aktive Zentrum zugänglich, es sind obendrein beide von den MAP-Kinasen bekannten Anionenbindungsstellen (Abb. 22C/D) besetzt, nämlich durch eine Sulfation und durch die Phosphogruppe an Tyr216 (Abb. 22E). Eine Struktur von monomerer GSK3 ohne ein an Arg96, Arg180 und Lys205 gebundenes Anion, eine Struktur also, die erkennen ließe, welche strukturellen Konsequenzen für die Aktivierungsschleife das Fehlen eines solchen Anions bei gleichzeitiger Abwesenheit einer externen Stabilisierung hat, existiert bis heute nicht. Es kann sogar sein, daß im Falle von GSK3 nicht wie bei CDK2 oder den MAP-Kinasen Strukturänderungen an der Aktivierungsschleife, sondern die auffällige Bildung inaktiver Dimere ein physiologisch wichtiger Kontrollmechanismus ist.

Insofern ist es auch schlüssig, daß sowohl Dajani *et al.*³⁵⁴ als auch ter Haar *et al.*³⁵⁵ die Anionenbindungsstelle an Arg96 primär nicht als regulatorisches Zentrum, sondern als Grund für die ungewöhnliche Substratspezifität des Enzyms deuten: Die Konsensussequenz für GSK3-Substrate lautet S/T-X-X-X-S_p/T_p, d.h. das Enzym hat eine besondere Vorliebe für Substrate mit einer zuvor phosphorylierten Aminosäure an der (p+4)-Position. Das Substrat - so die plausible Hypothese - bindet sich so an das Enzym, daß diese primär vorhandene Phosphogruppe die Anionenbindungstasche in der Aktivierungsschleife besetzt. Die Modellierung eines Peptidsubstrates durch ter Haar *et al.*³⁵⁵ an das Enzym zeigte, daß der Abstand zwischen aktivem Zentrum und Anionenbindungstasche sehr gut zu einem solchen „substrat-unterstützten Aktivierungsmechanismus“³⁵⁴ paßt.

Erst über den Umweg der Substraterkennung erhält die Anionenbindungsstelle dann doch wieder eine regulatorische Bedeutung: Durch die GSK3-Arbeiten von ter Haar *et al.*³⁵⁵, Dajani *et al.*³⁵⁴ und Frame *et al.*³⁵⁷ wurde nämlich gezeigt, daß nach Phosphorylierung des Enzyms an Ser9 durch die Proteinkinase B die eingeführte Phosphogruppe an der (p+4)-Anionenbindungsstelle bindet und sie für Proteinsubstrate blockiert. GSK3 gehört damit zu den wenigen Beispielen für Proteinkinasen, die erst nach Dephosphorylierung aktiv werden.

17.3.4 Anionenbindung an CK2 α und ihre Bedeutung für die Substratspezifität und die konstitutive Aktivität

Wie in Abb. 22 durch Vergleich mit Phospho-CDK2, Phospho-ERK2, Phospho-p38 γ und GSK3 illustriert, liegt CK2 α auch ohne Phosphorylierung in der voll aktiven Konformation vor, die im übrigen auch in phosphorylierter CAPK gefunden worden ist³⁶⁰. Im Gegensatz zu GSK3, in deren Kristallstrukturen die aktive Konformation der Aktivierungsschleife entweder durch eine externe negative Ladung oder durch Bildung eines insgesamt inaktiven Dimers stabilisiert wird, ist im Falle der CK2 α beides nicht nötig: In keiner der bekannten *zmCK2 α* -Strukturen, insbesondere nicht in derjenigen, die für Abb. 22 verwendet wurde, ist die Aktivierungsschleife durch Dimerisierung oder durch ein an Arg155 gebundenes Anion begünstigt. Für die entscheidende Stabilisierung einer hochaktiven Enzymkonformation sorgt vielmehr der enge Kontakt zwischen N-terminalem Segment und Aktivierungsschleife.

Die Unabhängigkeit der Konformation der CK2 α -Aktivierungsschleife von einer negativen Ladung sowie die Abwesenheit dort gebundener Anionen in den Strukturen von *zmCK2 α* und des CK2-Holoenzymen könnten zu der Hypothese führen, daß CK2 α gar keine entsprechende Anionenbindungstasche mehr besitzt. In der Tat ist in CK2 α , wie Abb. 22F verdeutlicht, eine der drei positiv geladenen Aminosäuren dieses Motives, nämlich Lys205 in GSK3 (entsprechend Arg150 in CDK2) gegen ein Glutamat (Glu180) ausgetauscht worden. Dieses Glu180 kommt in allen bekannten CK2 α -Sequenzen vor (Abb. 5); seine Seitenkette ist sehr gut in Elektronendichten erkennbar (Abb. 18A), denn sie wird durch zwei Wasserstoffbrücken mit Tyr26 und mit dem Peptidstickstoff von Phe181 fixiert und dadurch vom Arg155 weggebogen (Abb. 22F).

Der positive Ladungsschwerpunkt ist durch diesen Austausch also abgeschwächt, aber er ist nicht völlig verschwunden. Denn CK2 α besitzt wie die anderen CMGC-Kinasen das Arginin im „RE“-Motiv der Helix α C. Dieses Arg80 kommt, wie in Abb. 17C gezeigt wurde, dem Arg155 nahe, so daß ein Zentrum positiver Ladung entsteht. Mehr noch: Arg80 bildet nicht etwa mit dem gerade erwähnten Glu180 eine Salzbrücke, denn während dieses in der beschriebenen Weise vom Arg155 weggeneigt ist, ist Arg80 ihm zugeneigt. Deutlich erkennbar ist das in Abb. 22F: Die Arg80-Seitenkette nimmt im Vergleich zu Arg96 in GSK3 (und den äquivalenten Argininen in Phospho-CDK2, Phospho-p38 γ und Phospho-ERK2) eine veränderte Konformation ein.

Das Fazit aus diesen Beobachtungen lautet also: Da in CK2 α die Anionenbindungsstelle an der Aktivierungsschleife offensichtlich abgeschwächt ist, ist es plausibel, daß sie in den *zmCK2 α* -Strukturen nicht besetzt ist, aber sie sollte dennoch vorhanden sein. Die erste Kristallstruktur, die diese Vermutung bestätigt hat, war die von *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵ (PDB-Code 1PJK, Anhang 8)³²⁹. Bei der Verfeinerung dieser Struktur stießen wir auf ein Elektronendichtemaximum nahe Arg155 und Arg80, das für ein Wassermolekül zu intensiv war und daher durch ein Chloridion interpretiert wurde.

Noch informativer jedoch ist eine noch nicht publizierte Folgearbeit, die Teil der Doktorarbeit Frau Inessa Ermakovas ist. Für diese Struktur sind *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵-Kristalle bei 100 K vermessen worden. In der verfeinerten Struktur konnten wir dann ein noch deutlicher ausgeprägtes Elektronendichtemaximum nahe Arg80 und Arg155 entdecken und darüber hinaus ein weiteres, umrahmt von der (p+1)-Schleife (Abb. 23). Beide Elektronendichtebereiche wurden mit Sulfationen gefüllt, denn sie stimmen in Form und Intensität mit der Bindung von Sulfationen überein, die in der Tat in 0,2-molarer Konzentration in der Kristallmutterlauge anwesend gewesen waren (Inessa Ermakova, persönliche Mitteilung).

Auffällig ist, daß das erste Sulfation (Sul1) exakt an der Stelle sitzt, die aus den Vergleichen mit den anderen CMGC-Kinasen erwartet werden konnte, nämlich erstens gebunden an Arg155 und an Arg80 und zweitens - wegen dessen veränderter Seitenkettenkonformation (Abb. 22F) - ein Stück in Richtung zum aktiven Zentrum verschoben im Vergleich zu den gebundenen Phospho- oder Sulfoanionen der anderen Kinasen. Abb. 23 zeigt diese Verschiebung gegenüber Phospho-Thr160 in CDK2.

Die Bindung eines Anions an Arg155 und Arg80 hat keinen nennenswerten strukturellen Einfluß im Bereich der Aktivierungsschleife, wie auch durch Abb. 16 dokumentiert wird. Analog zur GSK3 hängt diese Bindung vielmehr höchstwahrscheinlich mit dem acidophilen Substratprofil der $CK2\alpha$ zusammen.

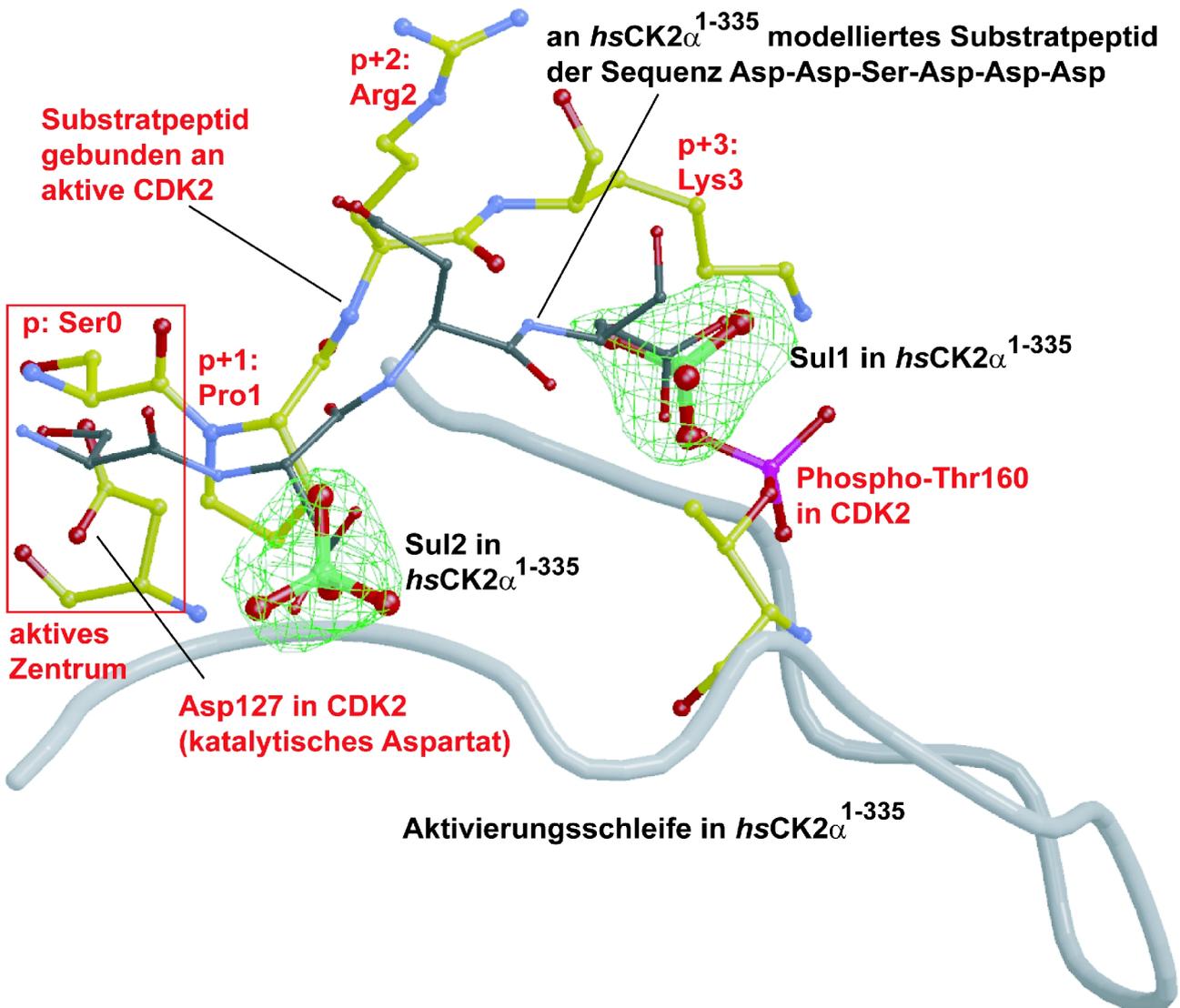


Abb. 23: Zwei Sulfationen (grüne Elektronendichte) gebunden an $hsCK2\alpha^{1-335}$. Gezeigt wird ein Ausschnitt aus einer noch nicht publizierten $hsCK2\alpha^{1-335}$ -Struktur mit einer Auflösung von 1,8 Å. Überlagert wurde die Struktur eines Komplexes aus Phospho-CDK2, einem Cyclin-A-Fragment, AMPPNP sowie einem Substratpeptid (PDB-Code 1QMZ). Das Bild zeigt Elemente dieses Komplexes, nämlich die katalytische Base, das Phospho-Thr160 sowie einen Teil des Substratpeptides. Basierend auf diesem CDK2-Substratpeptid und den Positionen der beiden Sulfatanionen wurde ein $CK2\alpha$ -Substratpeptid mit der Sequenz Asp-Asp-Ser-Asp-Asp-Asp anstelle der beiden Sulfate in die $hsCK2\alpha^{1-335}$ -Struktur modelliert und anschließend verfeinert.

So wie für GSK3 die Koordination der Phosphoaminosäure an Position (p+4) eines Proteinsubstrates postuliert worden ist^{354,355,357}, so liegt die Vermutung nahe, daß die typische negativ geladene (p+3)-Aminosäure in CK2-Substraten die Anionenbindungsstelle besetzt.

Die Ladungs- und Ortsverschiebung der Anionenbindungsstelle paßt sehr gut zu der Tatsache, daß GSK3 eine zweifach negative Ladung an Position (p+4), CK2 α jedoch eine einfach negative Ladung an Position (p+3) bevorzugt. Dies wird in Abb. 23 durch ein CDK2-Substratpeptid gezeigt, das nach Überlagerung der Enzymstrukturen gezeichnet worden ist. CDK2 bevorzugt Arginin oder Lysin an der (p+3)-Position, deren Seitenketten dann mit dem Phosphoanion an Thr160 wechselwirken. Ein Aspartat oder ein Glutamat anstelle von Lys3 in Abb. 23 würde gut in die durch Sul1 markierte Anionenbindungsstelle von CK2 α passen. Diese Vermutung wurde bestätigt, indem ein CK2 α -Substratpeptid mit der Sequenz Asp-Asp-**Ser**-Asp-Asp-Asp an die *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*-Struktur modelliert wurde. Nach Verfeinerung stimmen die Carboxylatgruppen an der (p+3)- und an der (p+1)-Position mit den beiden Sulfationen (Sul1 und Sul2 in Abb. 23) überein. Welche weitergehende Bedeutung die Sul2-Anionenbindungsstelle an der (p+1)-Schleife hat, wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

17.3.5 Anionenbindung an der (p+1)-Schleife: erneutes Zusammenspiel zwischen Substraterkennung und Regulation

Wie gezeigt, wird die Anionenbindungsstelle an der Spitze der Aktivierungsschleife von den CMGC-Kinasen entweder zur Substraterkennung (CK2 α) oder zur Regulation (MAP-Kinasen) oder für beides (CDK2, GSK3) benutzt. Ein ähnliches Zusammenspiel ist für die zweite Anionenbindungsstelle, nämlich die an der (p+1)-Schleife zu beobachten, die in der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*-Struktur durch das Sulfation Sul2 besetzt ist (Abb. 23). Die große Bedeutung der (p+1)-Schleife für die Substraterkennung bei eukaryontischen Proteinkinasen wurde bereits im Kap. 16.6 erwähnt und wird durch Abb. 24A vertieft: Im Falle der CAPK bilden die drei hydrophoben Aminosäuren Leu198, Pro202 und Leu205 eine Tasche, in die die hydrophobe Seitenkette der (p+1)-Aminosäure eines CAPK-Substrates aufgenommen wird (Ile22 in Abb. 24A). Im folgenden wird deutlich werden, daß auch in den CMGC-Kinasen die Äquivalente dieser drei Aminosäuren (s. rot markierte Positionen in Abb. 13) für die Bindungseigenschaften der (p+1)-Schleife entscheidend sind.

Daß die (p+1)-Schleife über die Substraterkennung hinaus regulatorisch wichtig sein kann, ist an den beiden MAP-Kinasen ERK2 und p38 γ in Abb. 22C/D erkennbar: MAP-Kinasen benötigen zur vollen Aktivierung neben der schon besprochenen Phosphorylierung an einem Threonin (Thr187 in ERK2 und p38 γ) eine zweite Phosphorylierung an einer Tyrosinseitenkette in enger Nachbarschaft, die äquivalent zu Leu198 in CAPK ist (Tyr189 in ERK2 und p38 γ). Dieses Tyrosin richtet sich dann so aus, daß seine terminale Phosphogruppe an der (p+1)-Schleife gebunden ist und in dieser Form die aktive Konformation der gesamten Aktivierungsschleife stabilisiert.

Im Falle der MAP-Kinasen führen die beiden Phosphorylierungen an Thr187 und Tyr189 zu umfassenden Umstrukturierungen an der Aktivierungsschleife³⁵⁰. Um die Bedeutung der einzelnen Phosphorylierung an Tyr189 zu verstehen, ist daher die GSK3 ein besseres Beispiel. Wie oben dargelegt, besitzt GSK3 zwar keine zu Thr187 in ERK2 und p38 γ äquivalente Phosphorylierungsstelle, wohl aber ein Tyrosin (Tyr216), das ebenfalls zu Leu198 in CAPK äquivalent ist (Abb. 13) und dessen Phosphorylierung aktivitätssteigernd wirkt³⁵⁶ (Abb. 22E). Ohne Phosphorylierung ist dieses Tyrosin über die

Aktivierungsschleife geschwenkt^{354,355}, nimmt an der inaktivierenden Dimerisierung von GSK3 teil und behindert höchstwahrscheinlich die Substratbindung, während es nach Phosphorylierung in genau der gleichen Weise an die (p+1)-Schleife gebunden wird, wie es von den beiden MAP-Kinasen bekannt ist³⁵⁶ (Abb. 22C-E).

Woher stammt das Anionenbindungspotential der (p+1)-Schleife in den CMGC-Kinasen? Im Zentrum dieses Strukturmotives, d.h. topologisch äquivalent zu dem für die Substraterkennung entscheidenden Leu205 in CAPK (Abb. 13), besitzen alle CMGC-Kinasen eine positiv geladene Aminosäure, nämlich CK2 α ein Lysin (Lys198, Abb. 13, Abb. 18b) und CDK2, die MAP-Kinasen und GSK3 jeweils ein Arginin. Diese eine positive Grundladung wird nun mehr oder weniger deutlich verstärkt durch die zu Leu198 und Pro202 in CAPK (s. Abb. 13) äquivalenten Aminosäuren. Die Tabelle 4 verdeutlicht diese Zusammenhänge.

Tab. 4: Aminosäurebesetzung der (p+1)-Schleife in CAPK und in verschiedenen CMGC-Kinasen

Enzym	Position 1	Position 2	Position 3	Charakter	Bevorzugte Substrat-AS
CAPK	Leu198	Pro202	Leu205	hydrophob	Ile, Leu
CDK2	Glu162	Leu166	Arg169	hydrophob/neutral	Pro
ERK2	Tyr185	Arg189	Arg192	nach Phospho-Tyr185-Bindung neutral/regulatorisch	Pro
p38γ	Tyr185	Arg189	Arg192	nach Phospho-Tyr185-Bindung neutral/regulatorisch	Pro
GSK3	Tyr216	Arg220	Arg223	nach Phospho-Tyr216-Bindung neutral/regulatorisch	Pro (mit Einschränkungen)
CK2α	Arg191	Arg195	Lys198	dreifach positiv und acidophil	Asp, Glu

Innerhalb der CMGC-Familie nimmt also der positiv geladene Charakter der (p+1)-Schleife von CDK2 bis hin zu CK2 α erkennbar zu. In CDK2 wird die positive Grundladung (Arg169) molekulintern, nämlich durch Glu162 - oder auch durch Glu208 (Abb. 24C) - ausgeglichen. Bei den MAP-Kinasen und GSK3 wird die positive Grundladung durch ein weiteres Arginin an Position 2 zunächst verstärkt, dann aber durch Phosphorylierung der Tyrosinseitenkette an Position 1 neutralisiert (s. auch Abb. 22C/D), was als regulatorischer Schalter benutzt wird. Allerdings ist die aktivierende Wirkung einer Phosphorylierung an jenem Tyrosin im Falle der GSK3 geringer als bei den MAP-Kinasen, was auch mit einer breiteren Substratspezifität an der (p+1)-Position korreliert.

Bei CK2 α schließlich ist jeglicher hydrophobe und regulatorische Charakter der (p+1)-Schleife verschwunden: Sie ist eindeutig acidophil, passend zur Substratspezifität des Enzyms und zu der in Abb. 23 illustrierten Bindung des Sulfations Sul2. Allerdings wird die positive Ladung durch Konformationsänderungen an Arg191 modifiziert: Während diese Seitenkette in der *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵-Struktur eindeutig mit dem Sulfation Sul2 assoziiert ist, ist sie in den vorliegenden *zmCK2 α* -Strukturen von der

(p+1)-Schleife weggebogen. Offenbar kann Arg191 je nach Ladung des zu bindenden Anions hinzugezogen werden oder nicht. Diese Beobachtung paßt zu dem Befund, daß die (p+1)-Position für die spezifische Erkennung von CK2-Substraten weniger wichtig als die (p+3)-Position ist⁴⁶.

Daß die drei in Tab. 4 genannten Aminosäuren der CK2 α für die Erkennung der (p+1)-Position von Substraten entscheidend sind, ist bereits 1995 auf der Basis des Wissens über CAPK postuliert und durch eine Mutagenesestudie belegt worden²⁴⁸ (s. a. Kap. 13.6.5). Der Zusammenhang mit den übrigen CMGC-Kinasen und mit dem konstitutiv aktiven Charakter des Enzyms allerdings wird in dieser Schrift erstmals hergestellt.

17.3.6 War CK2 α ursprünglich eine prolindirigierte Proteinkinase?

Die bisherigen Betrachtungen erklären zwar, warum CDK2, die MAP-Kinasen und GSK3 an der (p+1)-Position keine geladenen Aminosäuren bevorzugen, jedoch nicht die - zumindest im Falle der CDKs und der MAP-Kinasen - ausgeprägte Präferenz für Prolin. In dieser Hinsicht ist ein Vergleich der Abb. 24A mit Abb. 24B aufschlußreich: Bei der Bindung (p+1)-Aminosäure spielt nämlich in CAPK auch eine Hauptketten-Wasserstoffbrücke eine wichtige Rolle, durch die deren Peptidstickstoff mit dem Peptidsauerstoff von Glu200 des Enzyms verbunden wird. Im Falle der aktiven CDK2 dagegen ist eine äquivalente Wasserstoffbrücke nicht möglich: Bei ihr ist die Carbonylgruppe von Val164 durch eine starke Wasserstoffbrücke zu Arg169 weggebogen (Abb. 24B/C). Dadurch wird das Prolin bevorzugt, weil bei ihm als einziger Aminosäure keine Wasserstoffbrücke zum Peptid-Stickstoffatom möglich ist.

Das Fixieren der Carbonylgruppe von Val164 durch Arg169 ist energetisch aufwendig, denn die O-Atome der beiden Val164 flankierenden Peptidgruppen kommen sich bis auf 3,1 Å nahe, was deutlich unter dem optimalen Van-der-Waals-Abstand liegt. Val164 ist damit - von Verfeinerungsartefakten abgesehen - die einzige Aminosäure in aktiver CDK2 mit einer ungünstigen Position in einem Ramachandran-Graphen (Abb. 24D).

Wie sterisch anspruchsvoll diese Position ist, wird auch daran erkennbar, daß die meisten EPKs - u.a. CAPK, CK1 und Phosphorylase-Kinase - hier mit Glycin besetzt sind. Sie vermeiden so eine Spannung in der Hauptkette, wie sie in CDK2 offenbar gezielt aufgebaut wird, um sie in zweierlei Hinsicht zu nutzen: erstens um in der geschilderten Weise eine Prolinspezifität zu erzeugen und zweitens aus regulatorischen Gründen. Auffällig ist nämlich, daß Val164 in freier und inaktiver CDK2 spannungsfrei ist, d.h. durch die in Abb. 21 illustrierte Umfaltung der Aktivierungsschleife nach Cyclin-A-Bindung wird die Spannung aufgebaut, wodurch die Rückfaltung in den inaktiven Zustand erleichtert wird.

Dieser an CDK2 erläuterte Zusammenhang zwischen struktureller Spannung in der (p+1)-Schleife einerseits und Prolinspezifität und Regulation andererseits ist auch für die MAP-Kinasen und GSK3 gültig. Auch sie besitzen im inaktiven Zustand eine Hauptkettenspannung an den zu Val164 in CDK2 äquivalenten Positionen, die durch das Arginin im Zentrum der (p+1)-Schleife unterstützt wird und die beim Übergang in den inaktiven Zustand entriegelt wird. Letzteres gilt zumindest für die beiden MAP-Kinasen, während im Falle von GSK3 keine Struktur mit inaktiver Konformation an (p+1)- und Aktivierungsschleife bekannt ist.

Was bedeuten diese Befunde nun für CK2 α ? Wenig, könnte man meinen, weil CK2 α weder prolin-spezifisch an der (p+1)-Position ist noch regulatorische Konformationsänderungen wie CDK2 oder die MAP-Kinasen zeigt. Umso interessanter ist es, daß CK2 α trotzdem eine Hauptkettenspannung in der

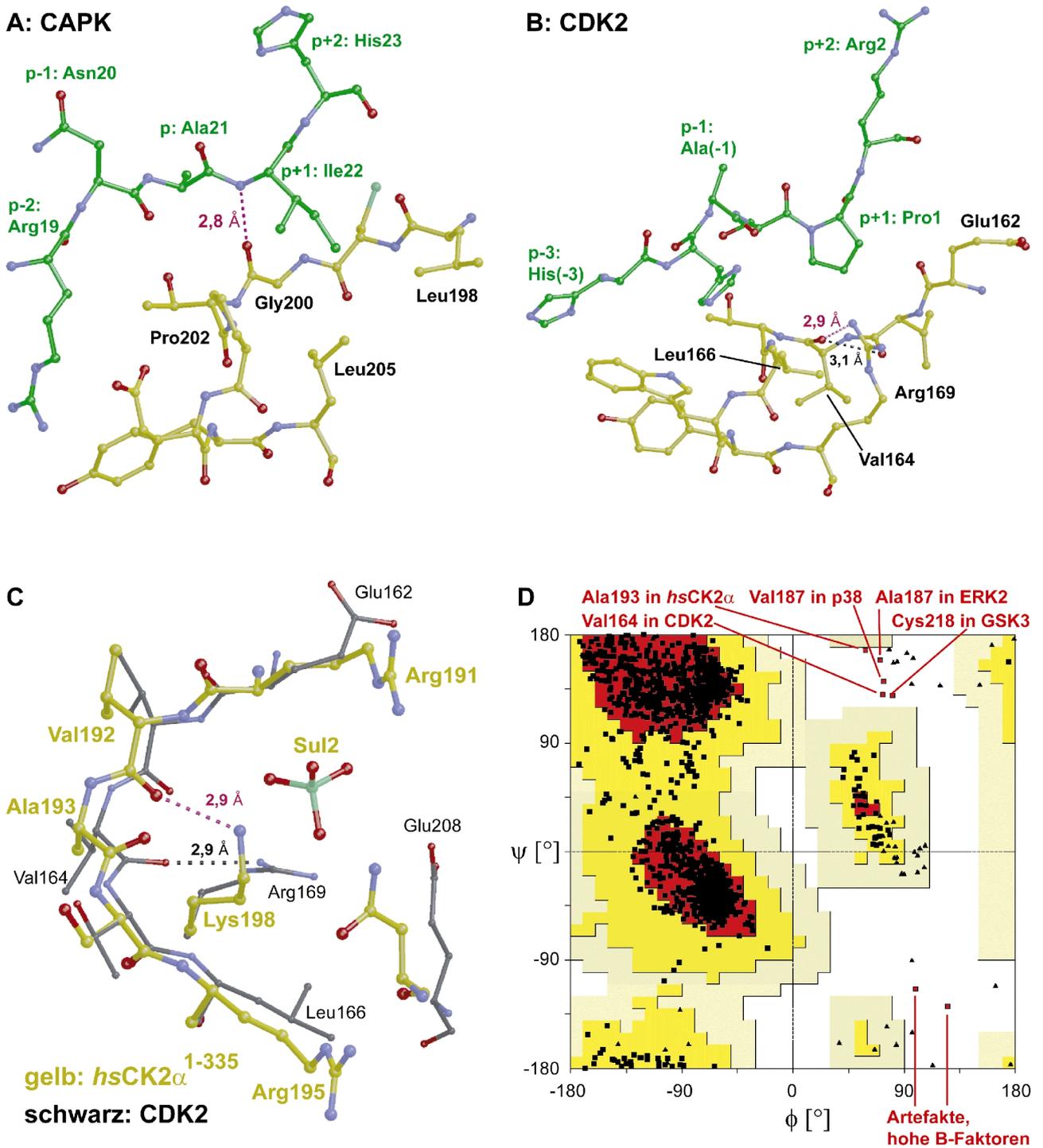


Abb. 24: Substraterkennung und strukturelle Spannung an der (p+1)-Schleife. **A)** Ausschnitt aus dem ternären Komplex von CAPK, ATP und einem Inhibitorpeptid (PDB-Code 1ATP). Erkennbar ist die Bindung der (p+1)-Aminosäure des Peptids an die hydrophobe Tasche der (p+1)-Schleife und über eine Wasserstoffbrücke an Gly200. **B)** Ausschnitt aus dem quaternären Komplex aus CDK2, Cyclin-A, AMPPNP und einem Substratpeptid (PDB-Code 1QMZ). Erkennbar ist, wie Arg169 die Carbonylgruppe von Val164 fixiert und so Platz für Prolin an der (p+1)-Position des Peptids schafft. **C)** Vergleich der (p+1)-Schleifen von *hsCK2α*¹⁻³³⁵ (gelbe C-Atome) und CDK2 (schwarze C-Atome). Die Carbonylgruppe von Ala193 genießt mehr Freiheiten als die äquivalente von Val164 in CDK2, weil sie im Gegensatz zu dieser nicht direkt fixiert wird. **D)** Gemeinamer Ramachandran-Graph von fünf CMGC-Kinasen: CDK2, p38, ERK2, GSK3 und *hsCK2α*¹⁻³³⁵. Es wird deutlich, daß in jeder dieser Strukturen die Spitze der (p+1)-Schleife der einzige Bereich mit struktureller Spannung ist.

(p+1)-Schleife besitzt. Ort dieser Spannung, die eindeutig durch Elektronendichten belegt ist²⁷ (Abb. 18B), ist Ala193, das Äquivalent zu Val164 in CDK2. Wie der Ramachandran-Graph in Abb. 24D zeigt, ist sie allerdings geringer als bei den anderen CMGC-Kinasen. Der Grund dafür ist, daß sich in CK2 α Lysin (Lys198) anstelle von Arginin im Zentrum der (p+1)-Schleife befindet und daß dieses Lysin zwar den Carbonylsauerstoff von Val192, aber nicht den entscheidenden von Ala193 über eine direkte H-Brücke fixiert (Abb. 24C; s.a. Abb. 18B und die dazugehörige Diskussion in Kap. 16.6).

Auf die Hauptkettenspannung bei Ala193 haben wir erstmals 1998 bei der Publikation der *zmCK2 α* -Struktur²⁷ hingewiesen, ohne eine schlüssige Erklärung dafür liefern zu können (Anhang 2). Später griffen Sarno *et al.*³⁶¹ das Thema wieder auf und postulierten, daß die Spannung bei Ala193 möglicherweise durch Bindung von CK2 β abgebaut werde und daß darauf der aktivitätsmodulierende Einfluß von CK2 β beruhen könne. Diese Idee beruhte auf einem Vergleich von *zmCK2 α* -Strukturen in freiem Zustand und gebunden an ein *hsCK2 β* -Peptid³²⁴. Allerdings ist der Konformationsunterschied bei genauere Betrachtung marginal und möglicherweise - wie Sarno *et al.*³⁶¹ korrekt anmerkten - lediglich eine Folge der geringen Auflösung (3,16 Å) der an das *hsCK2 β* -Peptid gebundenen *zmCK2 α* -Struktur.

Durch den in dieser Schrift erstmals dargelegten Zusammenhang mit den anderen CMGC-Kinasen bietet sich eine andere, und zwar plausible Erklärung an: Bei der Spannung an Ala193 könnte es sich um ein Rudiment im Sinne der Evolutionsbiologie handeln, also um ein ehemals wichtiges Strukturelement, das im Laufe der Stammesgeschichte jedoch erstens verkümmert (Spannungsverlust durch Lys198 anstelle von Arginin bei den anderen CMGC-Kinasen) und zweitens funktionslos geworden ist. Nach dieser Hypothese war CK2 α ursprünglich wie die CDKs und die MAP-Kinasen eine durch strukturelle Plastizität regulierbare, prolindirigierte Proteinkinase, die diese Eigenschaften jedoch verloren hat und zu einer acidophilen und konstitutiv aktiven Proteinkinase geworden ist.

Alternativ könnte man postulieren, daß CK2 α die ursprünglichste CMGC-Kinase ist und dem gemeinsamen Vorläufer am nächsten steht. In diesem Vorläuferprotein wäre dann, so die Annahme, erstmals eine Spannung in (p+1)-Schleife aufgetreten, die zunächst funktionslos war, die aber später bei der Entwicklung der CDKs und der MAP-Kinasen eine große Bedeutung erhielt.

Zwischen diesen beiden Entwicklungsmodellen mit CK2 α als frühe oder als späte Erscheinung unter den CMGC-Kinasen läßt sich nicht entscheiden. Festzuhalten bleibt jedoch - und das ist die wichtigste Botschaft aller Strukturarbeiten mit CK2 α -, daß es in eukaryontischen Zellen einen Selektionsdruck zur Entstehung oder Erhaltung einer dezidiert unregulierten und acidophilen Proteinkinase wie der CK2 α gegeben haben muß.

18 Strukturelle Basis der Substratspezifität von CK2

Der vorangegangene Abschnitt hat gezeigt, daß die konstitutive Aktivität von CK2 α auf das engste mit ihrer Acidophilie zu tun hat: Im Vergleich zu den anderen CMGC-Kinasen sind in CK2 α die beiden typischen Anionenbindungsstellen ausschließlich auf Substraterkennung hin optimiert, während sie ihre regulatorischen Eigenschaften - am ausgeprägtesten erkennbar an den MAP-Kinasen - verloren haben.

Hier nun sollen noch einmal die Erkenntnisse zur Substratspezifität der CK2 zusammengefaßt werden. Im Gegensatz zu CAPK, CDK2, Phosphorylase-Kinase, Insulinrezeptorkinase und „Insulin-like

growth factor"-Rezeptorkinase gibt es von CK2 α bis heute keine experimentell bestimmte Struktur eines ternären Komplexes aus Enzym, Cosubstrat und Substratpeptid, die unmittelbar über die Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat Aufschluß gibt. Es hat daher nicht an Versuchen gefehlt, ein theoretisches Modell für einen solchen ternären Komplex zu bauen^{250,362,363}. Als Vorlage diente dabei entweder ausschließlich oder u.a. die Struktur des ternären Komplexes von CAPK. Als Nachteil wurde dabei in Kauf genommen, daß CAPK im Gegensatz zu CK2 α - von der (p+1)-Position abgesehen - vornehmlich Positionen N-terminal von der Phosphorylierungsstelle erkennt. Die Folge war, daß die Modellierung des für CK2 α so wichtigen C-terminalen Bereiches des Substratpeptides unsicher und vermutlich sogar falsch war.

Sarno *et al.*²⁵⁰ beispielsweise postulierten, daß die Aminosäuren Lys74 bis Lys77 eine positiv geladene Tasche bilden und darin die entscheidende negativ geladene (p+3)-Seitenkette von CK2-Substraten binden. Rekha & Srinivasan³⁶³ wiederum bemerkten, daß in ihrem ersten Modell die negativ geladene

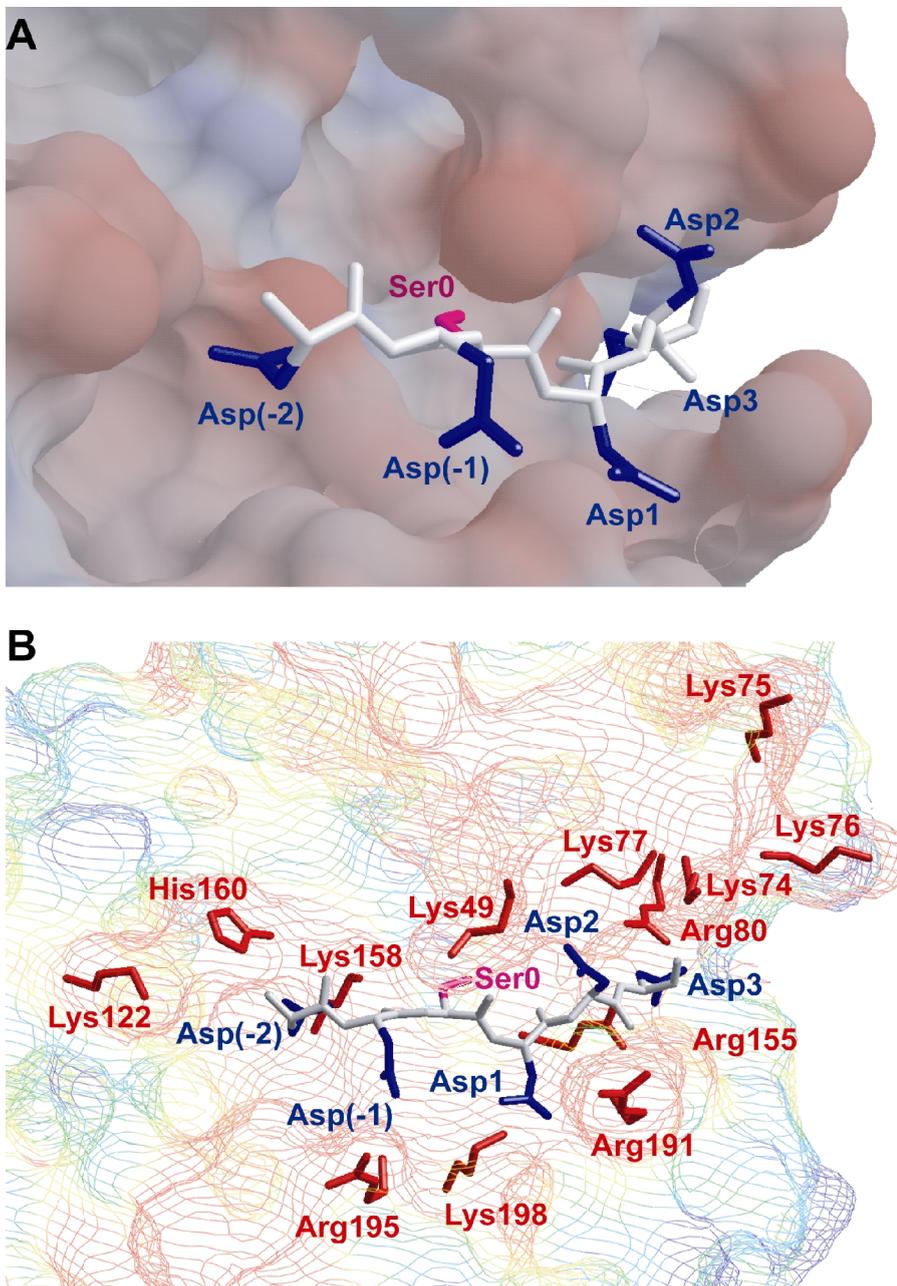


Abb. 25: Substratbindung an CK2 α , illustriert durch einen Komplex von *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵ mit einem modellierten Peptid der Sequenz DDSDDD. Farbkodierung: Blau entspricht negativer Ladung, Rot steht für positive Ladung; Ser0 an der Phosphorylierungsstelle ist rosa gefärbt. **A)** geschlossene Oberfläche, um zu zeigen, daß das Peptid in einer langgestreckten Konformation am besten in die Substratbindungsspalte paßt. **B)** Darstellung der Kontakte zwischen den Erkennungsregionen des Peptides und des Enzyms.

dene (p+3)-Seitenkette nach außen Richtung Lösungsmittel weist und keinen Kontakt zu hochkonservierten basischen Aminosäuren des Enzyms hat. Um die (p+3)-Seitenkette in Kontakt mit der (p+1)-Schleife zu bringen, schlugen sie daher eine helikale Konformation des Substrates vor, wie sie allerdings bislang noch nie in einem ternären Komplex einer EPK gefunden wurde. In keinem der bisher vorgestellten Modelle für einen ternären CK2 α -Komplex wurde der in dieser Schrift erstmals vorgestellte Befund berücksichtigt, daß es neben der (p+1)-Schleife eine weitere Anionenbindungsstelle an der Aktivierungsschleife gibt.

Somit stellen die beiden in Abb. 23 gezeigten Sulfationen die erste experimentell gesicherte Modellierungsgrundlage dar. Wie bereits in Kap. 17.3.4 erwähnt, wurde auf ihrer Grundlage ein ternärer Komplex modelliert, und zwar so, daß die negativ geladenen (p+1)- und (p+3)-Seitenketten die Plätze der beiden Sulfationen einnehmen. Der resultierende Komplex (Abb. 25) wurde mit dem kristallographischen Verfeinerungsprogramm REFMAC³⁶⁴ optimiert und kann dazu dienen, zumindest einige Ergebnisse der in Kap. 13.6.5 vorgestellten Mutagenesestudien zu rationalisieren.

So zeigt Abb. 25A, daß das Substratpeptid sterisch gut in die Bindungsspalte zwischen den beiden Hauptdomänen des Enzyms paßt. Abb. 25B illustriert darüber hinaus die Kontakte zwischen den Erkennungsdeterminanten des Enzyms und des Peptids. Insgesamt fällt der ausgesprochen positiv geladene Charakter der Substratbindungsspalte von CK2 α auf. Er paßt zum generell acidophilen Charakter des Enzyms und macht die Tatsache plausibel, daß es keine absolut essentielle Position auf CK2-Substraten gibt, sondern daß Abweichungen von der Konsensussequenz durch negative Ladungen in der Umgebung kompensiert werden können⁴⁶.

Betrachtet man einzelne Aminosäuren, so ist festzuhalten, daß Asp1 und Asp3 an den wichtigsten Positionen des Peptides von Lys198 und Arg191 bzw. von Arg80 und Arg155 erkannt werden (Abb. 25B). Bis auf Arg155 entspricht das dem Vorwissen aus den Mutagenesearbeiten²⁵⁰. Daß jedoch Arg155 vermutlich ebenfalls zur Substraterkennung beiträgt, wurde bisher in keiner CK2-Publikation erwähnt, folgt jedoch aus der Tatsache, daß Arg155 integraler Bestandteil der Sull1-Anionenbindungsstelle ist (Abb. 22F, Abb. 23). Diese Rolle von Arg155 ist obendrein konsistent mit den bei GSK3 gewonnenen Erkenntnissen, wonach das äquivalente Arg180 (Abb. 22E) als essentieller Bestandteil der Anionenbindungsstelle in der Aktivierungsschleife die primär phosphorylierte (p+4)-Position von GSK3-Substraten kontaktiert³⁵⁷.

Gemäß Sarno *et al.*²⁵⁰ dient Lys77 ebenfalls zur Erkennung der (p+3)-Position, in gleicher Weise jedoch auch der (p+4)-Position, die im modellierten Peptid nicht berücksichtigt wurde. Tatsächlich kommt aus dem Viererblock von Lys74 bis Lys77 nur Lys77 dem Asp3 des Peptids so nahe, daß eine solche Funktion realistisch erscheint. Allerdings müßte die Seitenkette im Vergleich zu ihrem Status in der *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵-Struktur eine Konformationsänderung vollziehen, was plausibel ist, denn hohe Temperaturfaktoren und eine leicht diffuse Elektronendichte lassen auf eine gewisse Flexibilität schließen.

Die (p+2)-Position von CK2-Substraten ist für ihre Erkennung weniger wichtig als (p+1) und (p+3). Die Seitenketten an (p+1) und (p+3) müssen, wie die beiden Sulfationen in Abb. 23 klar anzeigen, zur C-terminalen Domäne weisen. Somit kann die Seitenkette der Zwischenposition (p+2) aus sterischen Gründen nur durch die N-terminale Domäne gebunden werden. Klarer Favorit dafür ist Lys49 an der Spitze der ATP-bindenden Schleife (Abb. 25B), dem die Asp2-Seitenkette zugeneigt ist. Zwar ist die Seitenkette von Lys49 in der *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵-Struktur partiell fehlgeordnet, aber umso plausibler ist die

Annahme, daß sie nach Bindung eines Substrates mit negativer Ladung an (p+2) fixiert wird. Nach den Mutagenesergebnissen von Sarno *et al.*²⁵⁰ gibt es tatsächlich eine eindeutige Beziehung zwischen Lys49 auf Enzymseite und der (p+2)-Position des Substrates, d.h. beide Determinanten spielen für Nachbarpositionen keine Rolle.

An der Seitenkette von Arg195 fällt auf, daß ihre geladene Guanidiniumgruppe in der *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵-Struktur nicht dem Sul2-Ion in der (p+1)-Schleife zugeneigt ist. Vielmehr könnte Arg195 bei Bedarf zur Erkennung saurer (p-1)-Seitenketten herangezogen werden (Abb. 25B). Daß His160 bei der Bindung negativer Ladungen an der (p-2)-Position eine Rolle spielt, entspricht den ersten Mutagenesestudien zur CK2 α -Spezifität²⁹⁰. Abb. 25B offenbart jedoch darüber hinaus, daß die (p-2)-Seitenkette zu Lys158 Kontakt hat, also zu einer der Schlüsselseitenketten der katalytischen Schleife. Sie wurde naturgemäß in den Mutagenesestudien zur Substratspezifität unverändert gelassen, um die Aktivität des Enzyms nicht zu gefährden.

Schließlich ein paar Bemerkungen zu den N- und C-terminalen Extrempositionen: Die (p-4)- und die (p-3)-Position in CK2-Substraten haben nach der neuesten Statistik von Meggio & Pinna⁴⁶ immer noch eine leichte, aber signifikante Präferenz, mit negativ geladenen Seitenketten besetzt zu sein. Dies könnte auf den Einfluß der Seitenkette von Lys122 zurückzuführen sein (Abb. 25B). Bei den C-terminalen Extrempositionen ist die Situation weniger vage: Negative Ladungen an (p+4) und an (p+5) tragen klar zur Substratbindung bei⁴⁶ und werden dabei von den vier Lysinen der Positionsnummern 74 bis 77 erkannt²⁵⁰. Zwar wurde hier nicht versucht, die Substratpositionen (p+4) und (p+5) zu modellieren, dennoch zeigt Abb. 25B, daß eine C-terminale Verlängerung des Substratpeptides in den Einflußbereich dieses basischen Stranges geraten würde.

19 Strukturelle Basis der dualen Cosubstratspezifität von CK2

19.1 Kristallstrukturen binärer Komplexe aus *zmCK2 α* mit Cosubstratanaloga

Neben der Substratspezifität war die besondere duale Cosubstratspezifität eine weitere CK2-Eigenschaft, deren strukturelle Basis mit Hilfe der katalytischen Untereinheit allein geklärt werden konnte. Hierzu publizierten wir 1999 die Kristallstrukturen binärer Komplexe aus *zmCK2 α* mit dem ATP-Analogon AMPPNP einerseits und dem GTP-Analogon GMPPNP andererseits, jeweils in Gegenwart relativ hoher Magnesiumkonzentrationen⁷⁷ (s. Anhang 3).

Zu der Zeit waren bereits mehrere Strukturen von EPKs in Komplex mit ATP und Mg²⁺- oder Mn²⁺-Ionen bekannt. Die erste dieser Strukturen bezog sich auf den ternären Komplex aus CAPK, ATP, Mn²⁺-Ionen sowie einem Inhibitorpeptid³³⁵, der sich daher als Prototyp für die funktionell korrekte Bindung von ATP an eine EPK etabliert hat. In diesen und anderen Komplexstrukturen war durchgängig zu erkennen, daß das Adenin, die heteroaromatische Purinbase des ATP, zwar von hydrophoben Seitenketten flankiert wird, daß sie aber obendrein durch zwei Wasserstoffbrücken an das Proteinerückgrat gebunden ist. Und zwar bindet die N6-Aminogruppe des Adenins, also ein H-Brückendonator, an den Carbonylsauerstoff einer Peptidgruppe (Glu121 in CAPK) und das Ringstickstoffatom N1, ein H-Brückenakzeptor, an den Amidstickstoff der nächstfolgenden Peptidgruppe (Val123 in CAPK). Diese Aminosäuren sind im Gelenkbereich zwischen den beiden Hauptdomänen des Enzyms lokalisiert. Durch

jene Wasserstoffbrücken kann normalerweise eindeutig zwischen ATP und GTP unterschieden werden, denn das Verteilungsmuster von H-Brückenakzeptoren und -donatoren des GTPs ist dem des ATPs gerade entgegengesetzt, d.h. die genannten Wasserstoffbrücken können in dieser Weise nicht durch GTP gebildet werden. Umso interessanter war die Frage, wie es CK2 gelingt, GTP praktisch ähnlich gut wie ATP zu binden und zu verwerten.

Die beiden genannten Komplexstrukturen⁷⁷ sind in dieser Hinsicht sehr aussagekräftig, denn erstens sind die Cosubstratanaloga und die Mg^{2+} -Ionen klar durch Elektronendichten belegt (Abb. 26A/B), und zweitens sind in beiden Fällen die γ -Phosphogruppen und die beiden koordinierten Metallionen praktisch identisch mit der γ -Phosphogruppe in der CAPK-Referenzstruktur (s. schwarz gezeichnetes ATP-Molekül in Abb. 26A/B), d.h. die Nukleotide sind in funktionell aktiven Konformationen gebunden. Bis heute sind diese beiden Komplexstrukturen die einzigen CK2-Strukturen geblieben, in der Cosubstratnukleotide in funktionell korrekter Weise an eine CK2 α -Untereinheit gebunden sind. Sie haben sich damit als Referenzzustände für eine Reihe von Protein- und Inhibitor-designstudien etabliert, die zu einem guten chemischen Verständnis der CK2 α -Affinität an der Cosubstratbindungstasche geführt haben.

Ein Vergleich des AMPPNP/*zmCK2 α* -Komplexes mit dem ATP/CAPK-Komplex (Abb. 26A) zeigt ferner, daß auch die Adenosinteile der Nukleotide im großen und ganzen in äquivalenter Weise gebunden werden. Zumindest werden die beiden obengenannten Wasserstoffbrücken von den Stickstoffatomen N1 und N6 des Adenins zum Peptidrückgrat bei *zmCK2 α* genauso ausgebildet wie bei CAPK. Unterschiedlich ist hingegen die Verankerung des Riboseringes: In CAPK ist er durch Wasserstoffbrücken an die Seitenkette von Glu127 gebunden, während eine äquivalente Fixierung in *zmCK2 α* fehlt; das zu Glu127 äquivalente Glu120 in *zmCK2 α* ist weit vom Ribosering entfernt (Abb. 26A).

Die Abwesenheit eines solchen Riboseankers ist eine der strukturellen Voraussetzungen für die duale Cosubstratspezifität. Dadurch nämlich wird Platz geschaffen für eine gewisse Freiheit des Nukleotidmoleküls in der Adeninringebene. Ein Vergleich von Abb. 26A mit Abb. 26B verdeutlicht nämlich, daß das Guanin des GMPPNP weiter von der Phe113-Seitenkette entfernt ist als das Adenin des AMPPNP, d.h. insgesamt steckt AMPPNP tiefer in der Cosubstratbindungstasche als GMPPNP, was auch durch das jeweils überlagerte ATP aus dem CAPK-Komplex illustriert wird.

Hinsichtlich der Wasserstoffbrückenbindungen ist dieser Unterschied nicht nur sinnvoll, sondern geradezu zwingend: Anstelle der Aminogruppe um das N6-Atom des Adenins trägt das Guanin an der äquivalenten Stelle ein Carbonyl-Sauerstoffatom (Abb. 26B), das keine H-Brücke zum Carbonyl-Sauerstoff von Glu114 bilden kann. Um dieses Sauerstoffatom hinsichtlich seines Wasserstoffbrückenpotentials abzusättigen, wird das gesamte Guanin in der genannten Weise verschoben, so daß das O6-Atom ein Peptid-Stickstoffatom und damit einen H-Brückendonator als Partner erhält.

Insgesamt bleibt also das Raster an Wasserstoffbrückenbindungen erhalten; lediglich die Purinbase wird so verschoben, daß wieder korrekte Akzeptor-Donatorpaare zusammenkommen. Interessant ist die Rolle, die verschiedene Wassermoleküle bei dieser Adaption einnehmen. Wie die beiden Wassermolekülpaare Wat1/Wat2 und Wat3/Wat4 in Abb. 26(A/B) zeigen, werden sie nämlich so verschoben, daß das H-Brückenpotential optimal abgesättigt wird, sofern die sterischen Verhältnisse es zulassen. Am eindrucksvollsten ist diese Verschiebung am Wassermolekül Wat1 zu sehen: Wenn GMPPNP an *zmCK2 α* gebunden ist (Abb. 26B), nimmt Wat1 nämlich genau die Position ein, die im Falle der Bindung von AMPPNP dem Stickstoffatom N6 vorbehalten ist (Abb. 26B).

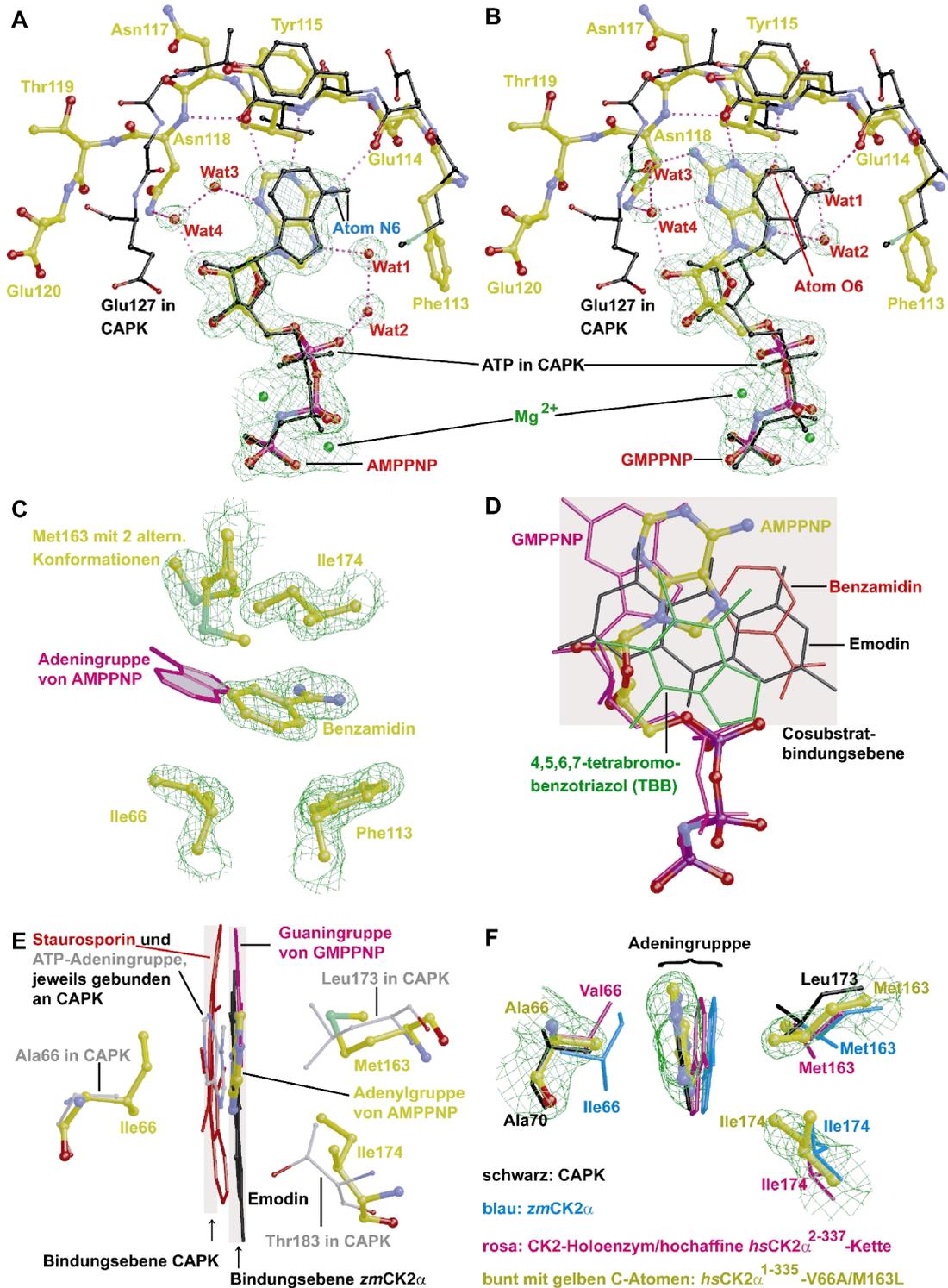


Abb. 26: Cosubstratbindung an CK2 α . **A/B/C)** AMPPNP (**A**), GMPPNP (**B**) und Benzamidin (**C**) gebunden an zMCK2 α . In **A** und **B** ist jeweils zum Vergleich ein Ausschnitt aus dem ternären Komplex von CAPK, ATP und einem Inhibitorpeptid (PDB-Code 1ATP) gezeichnet worden. **D)** Cosubstratbindungsebene: fünf verschiedene (partiell) planare Liganden im Komplex mit zMCK2 α nach Überlagerung der Enzymmatrices. **E)** Die Cosubstratbindungsebene in einer Blickrichtung 90° gedreht gegenüber **D**. Zum Vergleich wurde die Cosubstratbindungsebene in CAPK gezeichnet. **F)** Verschiebung und Verkippung der Cosubstratbindungsebene (markiert durch die Adenylgruppe) in der hsCK2 α ¹⁻³³⁵-Doppelmutante V66A/M163L, die einen deutlich erhöhtem K_M-Wert für GTP besitzt, gegenüber dem Zustand in zMCK2 α (PDB-Code 1LP4) und im CK2-Holoenzym (Kette A der PDB-Datei 1JWH).

19.2 Die Purinbindungsebene: Freiheit im 2D-Raum

19.2.1 Benzamidin und die Rolle von Met163 und Ile/Val66 bei der Cosubstratbindung

Die in Abb. 26A/B gezeigten, sehr guten Elektronendichten für die beiden Nukleotide waren keine Selbstverständlichkeit. Denn auch für die erste *zmCK2 α* -Struktur war das Enzym in Gegenwart von ATP und Mg^{2+} -Ionen kristallisiert worden, trotzdem hatte sich nur ein flaches Stück Restelektronendichte im Bereich der erwarteten Bindungstasche abgezeichnet, das dementsprechend zunächst als Adenylgruppe des ATPs interpretiert worden war²⁷ (s. Anhang 2). Erst die Strukturaufklärungen jener binären Komplexe mit AMPPNP und GMPPNP⁷⁷ legten nahe, daß diese Interpretation falsch gewesen war. Endgültig widerlegt wurde sie durch eine noch unpublizierte Folgearbeit, bei der *zmCK2 α* kristallisiert worden war, ohne mit ATP in Kontakt gekommen zu sein, bei der sich aber trotzdem an der gleichen Stelle ein Stück Elektronendichte ähnlicher Form abzeichnete (Abb. 26C, PDB-Code 1LPU).

Es ist zwar bis heute nicht endgültig geklärt, auf welches gebundene Molekül jenes rätselhafte Stück Elektronendichte zurückzuführen ist, die plausibelste Erklärung ist jedoch, daß es sich um Benzamidin handelt. Benzamidin ist eine typische Proteaseinhibitorsubstanz und paßt in Form und Größe perfekt zu der Elektronendichte (Abb. 26C); möglicherweise war es Bestandteil der kommerziellen Proteaseinhibitormischung, die für die Reinigung von *zmCK2 α* benutzt worden war (O.-G. Issinger, pers. Mitteilung).

Wichtiger als die genaue Identität dieser Substanz sind jedoch drei Dinge, die sich aus dem Vergleich der Struktur des AMPPNP/*zmCK2 α* -Komplexes mit derjenigen des Benzamidin/*zmCK2 α* -Komplexes ergeben. Erstens liegt die Ringebene des Benzamidin-Phenylringes coplanar zum Adenin des AMPPNP (und damit auch zum Guanin des GMPPNP) (Abb. 26C/D), und zweitens ist bei der benachbarten Seitenkette von Met163 eine interessante Konformationsänderung zu beobachten: Während diese Seitenkette im Benzamidin/*zmCK2 α* -Komplex mit zwei alternativen Konformationen vorliegt (Abb. 26C), wird sie bei der Bindung eines Nukleotids eindeutig fixiert. Dieser Übergang ist mit einem negativen, d.h. für die Bindung ungünstigen entropischen Beitrag verbunden, wie er für die Substratbindung bei der enzymatischen Katalyse nicht ungewöhnlich ist. Umgekehrt ist dann die Freisetzung von ADP entropisch begünstigt, was zu der Tatsache paßt, daß dies höchstwahrscheinlich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion ist³³¹.

Die dritte wichtige Beobachtung ist, daß Benzamidin zwar coplanar zur Adeningruppe gebunden wird, aber dennoch fast gar nicht mit AMPPNP überlappt (Abb. 26C/D). Benzamidin markiert damit eine hydrophobe Tasche, die in *CK2 α* von den Seitenketten Ile174 und Phe113 umrahmt wird (Abb. 26C) und die gegenwärtig die wichtigste Zielregion bei der pharmakologischen Inhibitorentwicklung gegen EPKs ist³⁶⁵. In den binären Komplexen aus *zmCK2 α* und AMPPNP bzw. GMPPNP⁷⁷ ist diese Bindungstasche mit dem Wasserpärchen Wat1/Wat2 gefüllt (Abb. 26A/B).

Lange Zeit galt es als wenig sinnvoll, ATP-kompetitive EPK-Inhibitoren für pharmazeutische Zwecke zu entwickeln, weil die Aussicht auf spezifisch wirkende und damit nebenwirkungsarme Hemmstoffe gering war. Durch die Einbeziehung jener hydrophoben Tasche jedoch hat sich das grundlegend verändert³⁶⁶, denn im Gegensatz zur ATP-Bindungsstelle selbst gibt es hier reichlich Unterschiede zwischen den EPKs. Abb. 26E zeigt dies andeutungsweise für den Vergleich zwischen *zmCK2 α* und CAPK: Letztere trägt an der zu Ile174 äquivalenten Position das Thr183 mit einer anderen Konformation und Polarität. Auch „Glivec“ (auch „Gleevec“, „Imantinib“ oder „STI-571“ genannt), ein Anti-Leukämie-Wirkstoff⁶⁷ und gleichzeitig der erste auf den Markt gebrachte EPK-Hemmstoff, bindet an diese

hydrophobe Tasche³⁶⁵. Es blockiert die ATP-Bindung an die Abl-Tyrosinkinase, stabilisiert allerdings auch gleichzeitig eine inaktive Konformation der Aktivierungsschleife dieses Enzyms. Wegen der Individualität der inaktiven EPK-Konformationen³⁵⁰ ist deren Fixierung eine weitere aktuelle Strategie, um beim EPK-gerichteten Wirkstoff-Design Spezifität zu erlangen³⁶⁸.

19.2.2 Komplexstrukturen von *zmCK2α* mit ATP-kompetitiven Inhibitoren

Die Coplanarität von Guanin- und Adeningruppe sowie der Phenylgruppe des Benzamidin wurde noch auffälliger, als verschiedene Komplexstrukturen von *zmCK2α* mit ATP-kompetitiven Inhibitoren, u.a. mit Emodin³²⁵, einem Anthrachinonderivat, und mit den beiden spezifischsten der derzeit bekannten CK2-Inhibitoren, nämlich mit 4,5,6,7-Tetrabromo-2-benzotriazol (TBB)^{326,369} und mit [5-Oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-a)quinazolin-7-yl]-essigsäure (IQA)³²⁸ veröffentlicht wurden. Diese teilweise lange bekannten CK2-Inhibitoren sind wie die Purinbasen durch planare Molekülgerüste gekennzeichnet, und diese planaren Gruppen werden ziemlich genau in der Adenin/Guanin-Ebene gebunden (Abb. 26D/E).

Diese Coplanarität, auf die erstmals Battistutta *et al.*³²⁶ hingewiesen haben, ist umso bemerkenswerter, als Emodin, TBB und IQA nicht etwa wie AMPPNP und GMPPNP durch Wasserstoffbrücken am Proteinrückgrat fixiert werden und als sie teilweise erhebliche Konformationsänderungen in der Proteinmatrix (insbesondere in den Schleifenbereichen der N-terminalen Domäne) induzieren. Battistutta *et al.*³²⁶ vertreten die Auffassung, daß die Coplanarität und die mit ihr zusammenhängende Spezifität von CK2 darauf zurückzuführen sei, daß die Bindungstasche durch die drei großen hydrophoben Seitenketten Ile66, Met163 und Ile174 relativ klein sei. So sei die Ile66-Position bei den meisten EPKs mit Alanin, die Ile174-Position durch eine kleinere Aminosäure wie Alanin, Glycin oder Threonin und die Met163-Position sehr oft mit dem - nach Meinung der Autoren - kleineren Leucin besetzt (siehe die violett markierten Positionen in Abb. 13).

Abb. 26E hingegen zeigt einen Vergleich der Cosubstratbindungsebenen von *zmCK2α* und CAPK und verdeutlicht einen anderen Aspekt: Durch den gleichzeitigen Austausch der flankierenden Aminosäuren Ile66 gegen das kleinere Alanin und Met163 gegen das weniger flexible und damit sterisch anspruchsvollere Leucin ist die Cosubstratbindungsebene in CAPK zu jenem Alanin hin geneigt. Die Tatsache, daß CAPK nicht die markante duale Cosubstratspezifität von *CK2α* besitzt, könnte also darauf zurückzuführen sein, daß nach Verkippung der Bindungsebene, wie sie in Abb. 26E dargestellt ist, die zweidimensionale Freiheit eingeschränkt wird.

19.2.3 Rationales Protein-Design: die Mutante *hsCK2α*¹⁻³³⁵-V66A/M163L

Um die zuletzt geschilderte Hypothese zu überprüfen, lag es nahe, die *CK2α*-Positionen 66 und 163 CAPK-ähnlich zu machen, d.h. eine *CK2α*-Doppel-Punktmutante mit Alanin an Position 66 und Leucin an Position 163 herzustellen, ihr Spezifitätsprofil hinsichtlich des Cosubstrates zu überprüfen und die Lage der Cosubstratbindungsebene durch Strukturaufklärung eines binären Komplexes mit AMPPNP zu ermitteln. Dieses Vorhaben ist von den *CK2*-Arbeitsgruppen an den Universitäten in Köln und Odense (Dänemark) umgesetzt worden, wobei allerdings von *hsCK2α*¹⁻³³⁵ anstelle von *zmCK2α* ausgegangen wurde. Die experimentellen Arbeiten haben Frau Christina Westmose Yde (Mutagenese, Proteinreinigung, enzymkinetische Messungen) und Frau Inessa Ermakova (Kristallisation, Röntgendiffraktionsmessungen, Strukturaufklärung und -verfeinerung) im Rahmen ihrer Doktorarbeiten durch-

geführt. Die dabei erzielten Ergebnisse sind noch nicht publiziert und sollen nachfolgend lediglich grob skizziert werden.

Schon im Falle des C-terminal deletierten Wildtyps *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* lagen die K_M -Werte mit 9,5 μM für ATP und 45,6 μM für GTP relativ weit auseinander, zumindest gemessen an den publizierten Werten für *zmCK2 α* [$K_M(\text{ATP}) = 13 \mu\text{M}$, $K_M(\text{ATP}) = 22 \mu\text{M}$]⁷⁷. Trotzdem ließ sich die Differenz durch den zweifachen Austausch weiter erhöhen. Für *hsCK2 α ¹⁻³³⁵-V66A/M163L* wurden gemessen: $K_M(\text{ATP}) = 3,7 \mu\text{M}$ und $K_M(\text{GTP}) = 92,1 \mu\text{M}$. Der Quotient $K_M(\text{GTP})/K_M(\text{ATP})$ wurde also von 4,8 auf 24,9 gesteigert, was einen deutlichen Affinitätsverlust gegenüber GTP durch die eingefügten Mutationen beweist. Betont werden muß, daß diese Differenzierungen im K_M -Wert durch moderate Veränderungen im k_{cat} -Wert begleitet wurden, d.h. das Enzym blieb voll aktiv.

Nimmt man anstelle des K_M -Wertes das k_{cat}/K_M -Kriterium, so ist die Spreizung nicht ganz so ausgeprägt: Der Quotient $[k_{\text{cat}}/K_M]_{\text{ATP}}/[k_{\text{cat}}/K_M]_{\text{GTP}}$ beträgt 5,8 $\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ für *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* und 19,2 $\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ für die Mutante *hsCK2 α ¹⁻³³⁵-V66A/M163L*. Trotzdem zeigt sich auch an diesen Werten, daß die duale Cosubstratspezifität abgenommen hat und daß das Ziel der Mutagenese erreicht wurde. Diese Bewertung wird auch durch einen Vergleich mit Studien, die ein ähnliches Ziel verfolgt hatten, unterstrichen. So betrug der Quotient $K_M(\text{GTP})/K_M(\text{ATP})$ bei der erfolgreichsten α /CK2-Mutante, die Srinivasan *et al.*³⁷⁰ erzeugt hatten (Deletionsmutante ΔAsn118), lediglich 3.

Nach dieser kinetischen Charakterisierung konnte durch eine Strukturaufklärung der Mutante *hsCK2 α ¹⁻³³⁵-V66A/M163L* im Komplex mit AMPPNP gezeigt werden, daß die Mutantenplanung auch in struktureller Hinsicht zu einem korrekten Ergebnis geführt hat. Das Nukleotid wird tatsächlich so gebunden, daß die Adeningruppe coplanar zur Adeningruppe von CAPK-gebundenem ATP liegt und gegenüber der Cosubstratbindungsebene in *zmCK2 α* wie auch im humanen CK2-Holoenzym verkippt ist (Abb. 26F). Die Verkipfung fällt gegenüber dem Holoenzym etwas weniger kraß aus als gegenüber *zmCK2 α* : Hier wirkt sich die Tatsache aus, daß das Ile66 in *zmCK2 α* noch etwas voluminöser ist als das Val66 in *hsCK2 α* .

Interessant wäre es, zu prüfen, ob *hsCK2 α ¹⁻³³⁵-V66A/M163L* damit auch ähnlich sensibel gegenüber Staurosporin ist wie CAPK, d.h. ob es stärker als *zmCK2 α* , *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* oder das CK2-Holoenzym durch Staurosporin inhibiert wird. Staurosporin ist ein hochwirksamer, aber relativ unspezifischer EPK-Inhibitor³⁷¹, der auffälligerweise jedoch eine recht geringe Affinität zu CK2 besitzt³⁷². Das ausgedehnte planare Ringsystem des Staurosporins wird coplanar zur ATP-Adeningruppe an CAPK gebunden (Abb. 26E), also in der Cosubstratbindungsebene, die nach dem Protein-Design auch die Mutante *hsCK2 α ¹⁻³³⁵-V66A/M163L* auszeichnet. Sollte *hsCK2 α ¹⁻³³⁵-V66A/M163L* deutlich stärker durch Staurosporin gehemmt werden als *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*, so wäre das ein weiterer Beleg dafür, daß die besonderen Bindungseigenschaften der Cosubstratbindungsebene von CK2 α weniger durch deren Größe als vielmehr durch ihre Orientierung bestimmt werden.

20 Strukturelle Details von CK2 β

20.1 Das zinkbindende Motiv

Bereits im Kap. 15.2 wurde auf das erste zentrale Ergebnis der Strukturaufklärung von CK2 β hingewiesen, daß es sich nämlich um ein zinkhaltiges Protein handelt, das über seine Zinkbindungsdomäne dimerisiert (Abb. 14)³¹⁹. In Abb. 27 ist die Zinkbindungsstelle, wie sie sowohl in *hsCK2 β* ¹⁻¹⁸²³¹⁹ als auch später im CK2-Holoenzym³²¹ gefunden wurde, im Detail zu sehen. Zn²⁺ bildet koordinative Bindungen zu vier Schwefelliganden, die in geometrisch idealer Weise um das Zentralatom angeordnet sind. Allem Anschein nach bleibt der Komplex auch unter denaturierenden Bedingungen erhalten und das Zink somit an das Protein gebunden, so daß es bei proteinchemischen Arbeiten mit CK2 β nie aufgefallen ist.

Die Stabilität des Zink/Cystein-Komplexes korreliert mit der bekannt hohen Stabilität des CK2 β -Dimers. Nach Chantalat *et al.*³¹⁹ bildet das von ihnen zur Kristallisation verwendete Konstrukt *hsCK2 β* ¹⁻¹⁸² auch in Lösung unter Hochsalzbedingungen Dimere. Das ist umso bemerkenswerter, als die Kontaktfläche zwischen den Monomeren mit 540 Å² relativ klein und weit unter dem Durchschnittswert für stabile Homodimere von 1685 Å² liegt³⁷³. Die Stabilität des Dimers wurde daher mit einer Häufung hydrophober Seitenketten im Kontaktbereich erklärt³¹⁹. Chantalat *et al.*³¹⁹ schlußfolgerten zurecht aus diesen Ergebnissen, daß die Existenz isolierter CK2 β -Monomere nun endgültig ausgeschlossen werden könne.

Das in Abb. 27 gezeigte zinkbindende Motiv besitzt im Gegensatz zu den klassischen „Zinkfingern“ keine α -Helix und wurde bisher nur im Transkriptions-Elongationsfaktor TFIIS und bei der Untereinheit RPB9 der RNA-Polymerase II gefunden³¹⁹. Diese lokale Ähnlichkeit zu zwei DNA-bindenden Proteinen könnte darauf hindeuten, daß auch CK2 β ursprünglich ein reines Zellkernprotein gewesen ist.

Die Beschreibung der Zinkbindungsstelle in CK2 β ³¹⁹ induzierte eine Mutagenesestudie, bei der zwei der in Abb. 27 gezeichneten Cysteinreste, nämlich Cys109 und Cys114 gegen Serin ausgetauscht wurden³⁷⁴. Ziel dieser Maßnahme war es, den Zinkfinger zu zerstören, um zu sehen, welche Konsequenzen das für die Dimerisierung und CK2-Holoenzym-Bildung hat. Mit Hilfe des Hefe-2-Hybridsystems konnten die Autoren zeigen, daß eine solche CK2 β -Doppelmutante tatsächlich nicht mehr in der Lage ist zu dimerisieren³⁷⁴. Noch wichtiger aber war ihre Erkenntnis, daß auch die CK2-Holoenzymbildung gestört war, und zwar sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Dieser Befund zeigte noch einmal sehr deutlich, daß die CK2 β -Dimerisierung eine notwendige Bedingung für die Formierung des CK2-Holoenzym ist. Im Einklang damit besaß die zinkfinger-defiziente CK2 β -Mutante auch keinerlei Anzeichen der N-terminalen Phosphorylierung, die für den in das Holoenzym eingebundenen Wildtyp so typisch ist³⁷⁴.

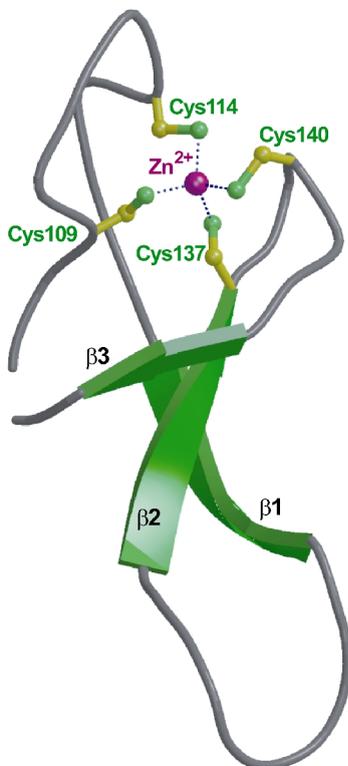


Abb. 27: Das zinkbindende Motiv in *hsCK2 β* , entnommen der Struktur des CK2-Holoenzym³²¹ (PDB-Datei 1JWH).

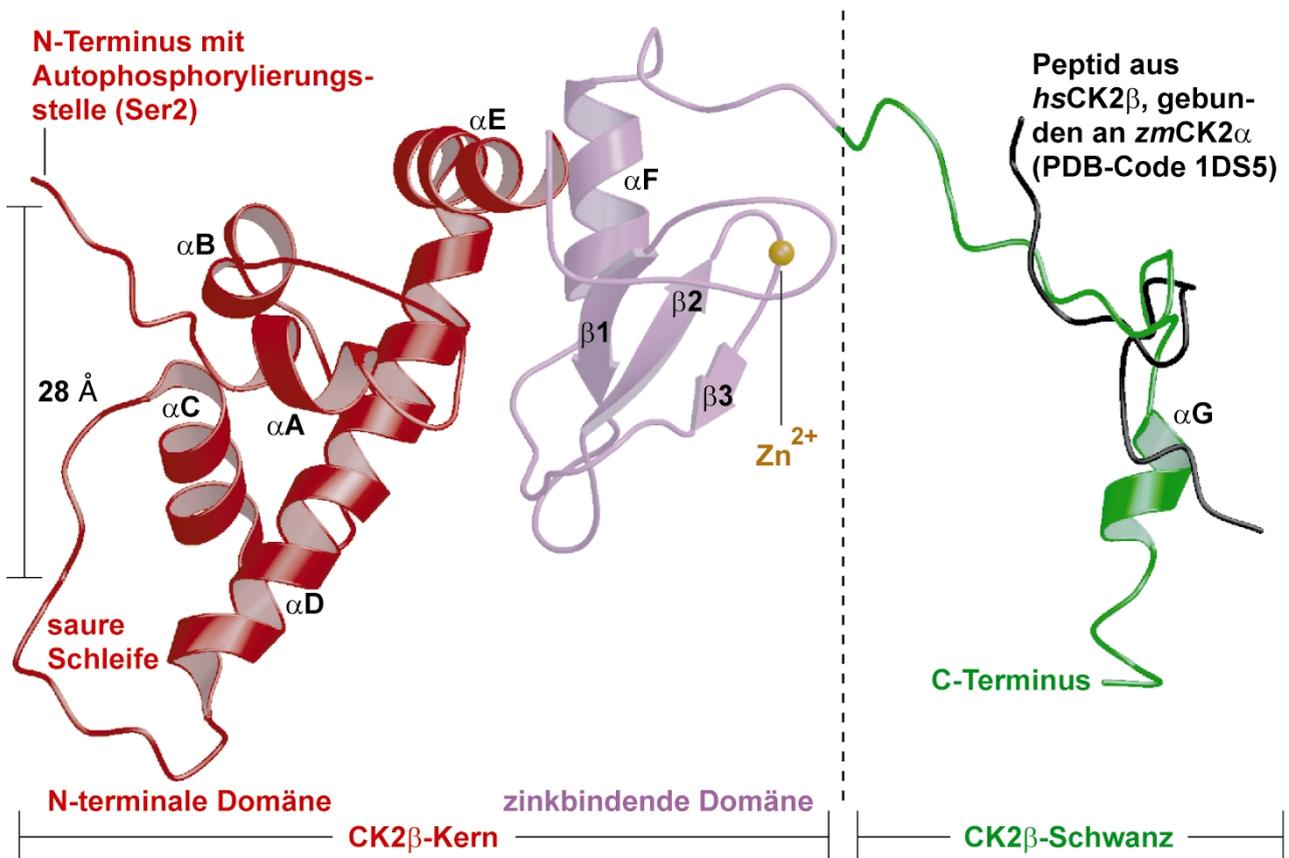


Abb. 28: Aufbau des CK2 β -Monomers. Die von Chantalat *et al.*³¹⁹ publizierte Struktur umfaßte nur den „CK2 β -Kern“, der für die Dimerisierung ausreicht, der aber zur Bildung eines funktionsfähigen Holoenzym ungeeignet ist. Der fehlende und für den Kontakt zu CK2 α entscheidende „CK2 β -Schwanz“ wurde durch die Strukturaufklärung des CK2-Holoenzym erstmals sichtbar³²¹ (s. Anhang 6).

20.2 CK2 β ist auch auf Strukturebene ein einzigartiges Protein

Das zweite zentrale Ergebnis der Strukturaufklärung von *hsCK2 β* ¹⁻¹⁸² durch Chantalat *et al.*³¹⁹ war, daß die Struktur in ihrer Gesamtheit - also abgesehen von jener lokalen Strukturähnlichkeit um die Zinkbindungsstelle herum - einzigartig ist, also einer neuen Faltung angehört. Angesichts früherer Sequenzvergleiche^{165,168,169,170} war dieser Befund nicht überraschend. Er hatte aber ein größeres Gewicht, da 3D-Strukturen generell in der Evolution stärker als Aminosäuresequenzen konserviert und daher sensiblere Objekte sind, um entfernte Ähnlichkeiten aufzuspüren. In kristallographischer Hinsicht war die *hsCK2 β* ¹⁻¹⁸²-Struktur somit die einzige „neue“ CK2-Struktur, deren Aufklärung somit die Anwendung von *de-novo*-Methoden der Proteinkristallographie erforderte³¹⁹.

Wie bereits im Kap. 15.2 erwähnt, fehlten der *hsCK2 β* ¹⁻¹⁸²-Struktur entweder aufgrund einer gezielten Mutagenese oder wegen Flexibilitäten im Kristall wesentliche Bereiche, nämlich der N-Terminus mit der Autophosphorylierungsstelle, die saure Schleife und das für den Kontakt zu CK2 α wesentliche C-terminale Segment. Diese Bereiche konnten durch die Strukturaufklärung des CK2-Holoenzym teilweise ergänzt werden. Die in Abb. 28 gezeigte Struktur eines CK2 β -Monomers aus dem Holoenzym ist daher trotz einer geringen Auflösung von 3,1 Å das derzeit vollständigste Bild, das wir von der CK2 β -Struktur haben.

Wesentlich an Abb. 28 ist die Dreiteilung der Struktur in zwei Domänen, die den CK2 β -Kern ausmachen, und in einen C-terminalen Schwanz. Dieser Schwanz ist offenbar die Ursache für Stabilitäts- und Präzipitationsprobleme bei der Präparation von reiner CK2 β , und er mußte im Falle von *hsCK2 β* von vornherein weggelassen werden, um ein stabiles, gut lösliches und kristallisierbares Protein zu erhalten³⁷⁵. In der strukturierten Form wie Abb. 28 ist er nur denkbar im Zusammenhang mit dem Holoenzym, wie es in Abb. 15 zu sehen ist.

Abb. 28 läßt auch erkennen, daß die N-terminale Autophosphorylierungsstelle und die saure Schleife relativ weit voneinander entfernt sind. Der von Boldyreff *et al.*³⁷⁶ aufgrund von Mutagenese- und Autophosphorylierungsstudien geäußerte Gedanke, daß sich diese beiden Bereiche nahe kommen müßten, wird somit nicht gestützt. Angesichts der Flexibilität sowohl der sauren Schleife als auch des N-Terminus' ist allerdings auch nicht auszuschließen, daß es lokale Konformationsänderungen gibt, die zu einer Nachbarschaft beider Strukturelemente führen.

21 Architektur des CK2-Holoenzym

21.1 Die Kristallstruktur von *zmCK2 α* mit einem *hsCK2 β* -Peptid: Identifizierung des Kontaktbereiches der CK2 α mit CK2 β

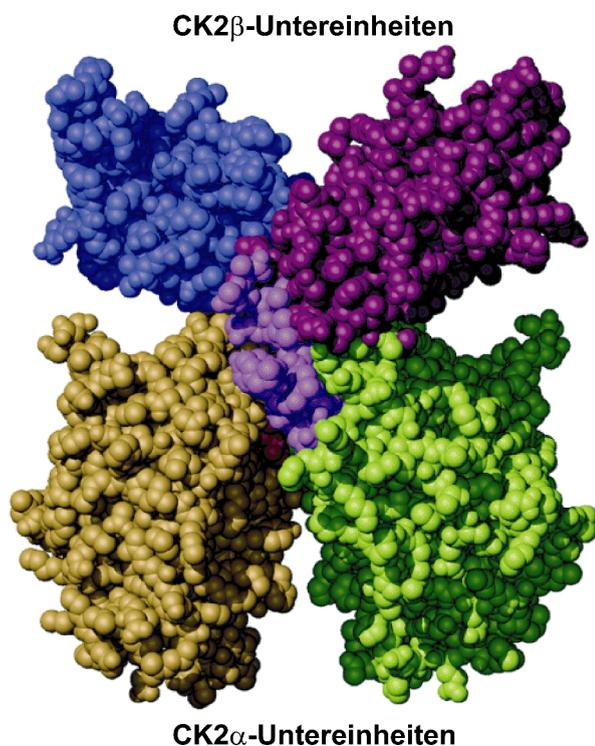


Abb. 29: Modell des CK2-Holoenzym von Battistutta *et al.*³²⁴. Das Bild wurde deren Publikation mit freundlicher Genehmigung des Verlages Blackwell Publishing, Oxford, England, entnommen.

Nach den Kristallstrukturen von *zmCK2 α* und *hsCK2 β* ¹⁻¹⁸² war die Zeit reif für eine Strukturaufklärung des kompletten CK2-Holoenzym. An diesem Problem arbeiteten in den Jahren 1998 bis 2000 mindestens vier kristallographische Arbeitsgruppen in Padua, Grenoble, Cambridge und Köln mit ihren zellbiologischen Kooperationspartnern.

Wie kompetitiv das Feld war, zeigt die Tatsache, daß im Jahre 2000 das erste Strukturmodell des CK2-Holoenzym publiziert wurde³²⁴ (Abb. 29), das jedoch von vornherein zweifelhaft war, weil es allen gesammelten Erkenntnissen über die Architektur des CK2-Holoenzym widersprach. Insbesondere wurden die beiden katalytischen Untereinheiten in enge räumliche Nähe gerückt im Gegensatz zu den experimentell gut gegründeten Modellvorstellungen der 90er Jahre (s. Abb. 7 und Abb. 8).

Zweifelhaft war das in Abb. 29 gezeigte Modell jedoch auch aufgrund seines Zustandekommens. Battistutta *et al.*³²⁴ hatten nämlich zwei Strukturen zusammenmodelliert: die von *hsCK2 β* ¹⁻¹⁸² und die von ihnen selbst aufgeklärte Komplexstruktur aus *zmCK2 α* und *hsCK2 β* ¹⁸¹⁻²⁰³, also einem Peptid aus

dem C-terminalen Segment von *hsCK2β*, das für seine Wechselwirkung mit *CK2α* bekannt war. In der Tat band dieses Peptid an *zmCK2α*, und zwar - wie sich später zeigen sollte - an der richtigen Stelle und weitgehend in der richtigen Konformation (s. dazu das schwarze Peptid im *CK2β*-Schwanzbereich in Abb. 28). Allerdings - und das machte die nachfolgende Modellierung des Holoenzym so zweifelhaft - waren die ersten Aminosäuren dieses Peptids nicht durch Elektronendichte definiert, so daß diese Peptidstruktur überhaupt nicht mit der *hsCK2β*¹⁻¹⁸²-Struktur überlappte. Genau dies jedoch suggerierten die Autoren, indem sie wörtlich schrieben:

„As previously mentioned, in the crystal structure of the β dimer recently solved..., the β chains are truncated at residue 182, whereas the β peptide used in our structure starts at position 181. These two complementary structures can be easily combined together without any evident spatial or sterical hindrances to give rise to a plausible hypothetical model of the full holoenzyme.“

Lediglich in der Legende zu dem in Abb. 29 wiedergegebenen Bild heißt es dann etwas genauer: *„The model was assembled in such a way to minimize the distances between the C-terminal ends of the β-dimer and the N-terminal ends of the β peptides.“*

Wohlgermerkt: Das Bemühen der Autoren, aus einem begrenzten Informationsbestand die Architektur eines schwer kristallisierbaren Protein-Protein-Komplexes abzuleiten, war grundsätzlich legitim und entspricht einem Trend der Strukturbiologie, der in Zukunft wahrscheinlich noch viel wichtiger werden wird³⁷⁷. Zu kritisieren ist nur, daß dabei die vorhandenen Strukturinformationen - obwohl erkennbar unzureichend - überbewertet und stattdessen Erkenntnisse, die mit molekular- und zellbiologischen Methoden gewonnen worden waren, nicht angemessen einbezogen worden sind.

Obwohl somit die von Battistutta *et al.*³²⁴ gezogenen, weitreichenden Schlußfolgerungen hinsichtlich des *CK2*-Holoenzym schon aus methodischen Gründen zurückgewiesen werden müssen, lieferte die von diesen Autoren publizierte Kristallstruktur des *zmCK2α/hsCK2β*¹⁸¹⁻²⁰³-Komplexes eine wichtige neue Erkenntnis: Während nämlich der *CK2α/CK2β*-Kontaktbereich auf der *CK2β*-Seite durch die im Kap. 13.4.3 erwähnten Mutagenesestudien gut bekannt war, war dies auf der *CK2α*-Seite nicht der Fall. Nunmehr jedoch konnte erstmals der Oberflächenbereich der *CK2α* zur Wechselwirkung mit *CK2β* lokalisiert werden. Es handelt sich um die äußere Oberfläche des zentralen *β*-Faltblattes der N-terminalen Domäne von *CK2α*, wo sich auffällig viele hydrophobe Seitenketten häufen, nämlich u.a. Val41, Phe54, Ile67 und Ile69³²⁴.

21.2 Die erste Kristallstruktur eines *CK2*-Holoenzym

21.2.1 Die zentralen Befunde zur Architektur des *CK2*-Holoenzym werden bestätigt

Die erste Kristallstruktur eines *CK2*-Holoenzym - nämlich des Komplexes aus *hsCK2β* und C-terminal degradiertes *hsCK2α* - wurde im Jahre 2001 von Niefind *et al.*³²¹ vorgelegt und ausführlich besprochen (s. Anhang 6). Im Gegensatz zum *CK2*-Holoenzymmodell von Battistutta *et al.*³²⁴ stand diese Kristallstruktur, im großen und ganzen im Einklang mit dem etablierten Wissen über Kontakte der Untereinheiten (s.a. Kap. 15.3.2): Ein *CK2β*-Dimer bildet den Kern des Komplexes und bindet zwei *CK2α*-Monomere, die weit voneinander entfernt sind (Abb. 15). Es gab allerdings auch überraschende Befunde, wie die Kleinheit der Kontaktflächen zwischen *CK2α* und *CK2β* und die große räumliche Distanz zwischen saurer *CK2β*-Schleife und basischem *CK2α*-Strang, auf die später noch eingegangen wird.

Eine zweite zentrale Erkenntnis war, daß sich durch die Einbindung in den Holoenzymkomplex weder CK2 α noch der CK2 β -Kern in größerem Maße strukturell verändern. „In größerem Maße“ heißt, daß es, wie in Abb. 16 für CK2 α gezeigt, durchaus lokale Veränderungen gibt, auf die auch noch eingegangen werden muß, daß jedoch die funktionell kritischen Bereiche wie etwa die Helix α C und die Aktivierungsschleife von CK2 α mit ihrer Bindung an das N-terminale Segment unverändert bleiben. Dieser Befund war einerseits nicht überraschend, denn es war ja lange bekannt, daß CK2 α mit und ohne Bindung an CK2 β aktiv ist. Andererseits widersprach er einer Publikation von Sarno *et al.*³⁷⁸, die berichtet hatten, daß CK2 β und das N-terminale Segment von CK2 α funktionell gegeneinander austauschbar seien, indem CK2 β im Holoenzym an die Aktivierungsschleife gebunden sei und die gleiche Rolle wie das N-terminale Segment in der isolierten CK2 α übernehme.

Elektronendichteausschnitte aus dem CK2-Holoenzymkristall sind in Abb. 30 zu sehen. Sie illustrieren die relativ schlechte Qualität der CK2-Holoenzymstruktur. Mit einer Auflösung von 3,1 Å, mit End-R-Werten von 26,7 % (R_{work}) und 33,8 % (R_{free}) und mit einem durchschnittlichen Temperaturfaktor von 91 Å² liegt sie am unteren Rand des Akzeptablen. Trotzdem sind die genannten zentralen Erkenntnisse unzweifelhaft.

21.2.2 Protein-Protein-Wechselwirkungen und ihre Klassifizierungen

Im CK2-Holoenzym existieren zwei Arten von Interaktionsflächen: Die β/β -Kontaktfläche verbindet zwei identische Protomere und ist damit typisch für ein „Homooligomer“, während die α/β -Kontaktfläche unterschiedliche Protomere vereint, was charakteristisch für „Heterooligomere“ ist^{373,379}.

Die Unterscheidung zwischen Homo- und Heterooligomeren ist nur eine von mehreren üblichen und sinnvollen Klassifizierungen für Proteinkomplexe. Gängig sind weiterhin die Differenzierungen nach funktionellen Kriterien in „obligatorische“ und „nicht-obligatorische“ Komplexe sowie nach der Lebenszeit in „permanente“ und „transiente“ (d.h. „nicht-permanente“) Komplexe³⁷⁹. Obligatorische Komplexe sind nur in der assoziierten Form funktionsfähig. Nach dieser Definition ist das CK2-Holoenzym ein nicht-obligatorischer Komplex, weil CK2 α auch in isolierter Form katalytisch aktiv ist.

Obligatorische Komplexe sind immer permanent, während nicht-obligatorische Komplex sowohl permanent als auch transient sein können³⁷⁹. Das heißt also, daß das CK2-Holoenzym trotz seines funktionell nicht-obligatorischen Charakters permanent sein kann. Oder anders ausgedrückt: Die Tatsache, daß CK2 α katalytisch aktiv ist, ist kein Beweis dafür, daß es auch wirklich neben dem CK2-Holoenzym *in vivo* existiert.

Bei den transienten Komplexen unterscheiden Nooren & Thornton³⁸⁰ aufgrund von physikalisch-chemischen und geometrischen Parametern zwischen schwachen und starken transienten Komplexen. Letztere zeichnen sich durch größere und hydrophobere Kontaktflächen aus und dissoziieren oft erst nach Konformationsänderungen, die durch Bindung kleinerer Ligandmoleküle induziert werden, während bei schwachen transienten Komplexen echte dynamische Gleichgewichte zwischen den Komplexen und ihren jeweiligen Komponenten vorliegen³⁷⁹.

Aus physikalisch-chemischer Sicht gibt es keinen Grund, zwischen Homo- und Heterokomplexen streng zu unterscheiden, und in der Tat sind bei den wichtigsten Parametern zur Charakterisierung von Kontaktflächen wie der Größe, der Hydrophobizität oder der Planarität gleiche Tendenzen zu beobachten³⁷⁹. In biologisch-evolutionärer und funktioneller Hinsicht dagegen ist die Unterscheidung durch-

aus sinnvoll. Tendenziell nämlich sind Homooligomere eher permanent und im Laufe der Evolution auf Stabilität ihrer Quartärstruktur hin optimiert. Strukturelle und funktionelle Faktoren wie Kooperativität oder allosterische Regulierbarkeit begünstigen diesen Selektionsdruck³⁷⁹. Demgegenüber sind Heterooligomere eher transient, denn sie benötigen diesen instabilen Charakter auch für ihre biologischen

Funktionen z.B. bei der Signaltransduktion.

Als wichtigste Größe zur bioinformatischen Untersuchung einer Protein-Protein-Interaktion hat sich die Ausdehnung der Kontaktfläche herausgestellt. In einer jüngst publizierten Analyse fanden Nooren & Thornton³⁸⁰ Durchschnittswerte von 720 Å² für schwache Homodimere und 1211 Å² für solche Heterodimere, deren transients Charakter sicher experimentell bewiesen worden war. Diese Werte sind aufschlußreich bei der nachfolgenden Beurteilung der Kontaktflächen im CK2-Holoenzym.

Auf die Tatsache, daß der durch die C-terminale Deletion reduzierte, aber dennoch stabile β/β -Kontakt im $hsCK2\beta^{1-182}$ -Dimer nur 540 Å² beträgt, wurde bereits im Kap. 20.1 hingewiesen. Dieser Wert liegt sogar noch

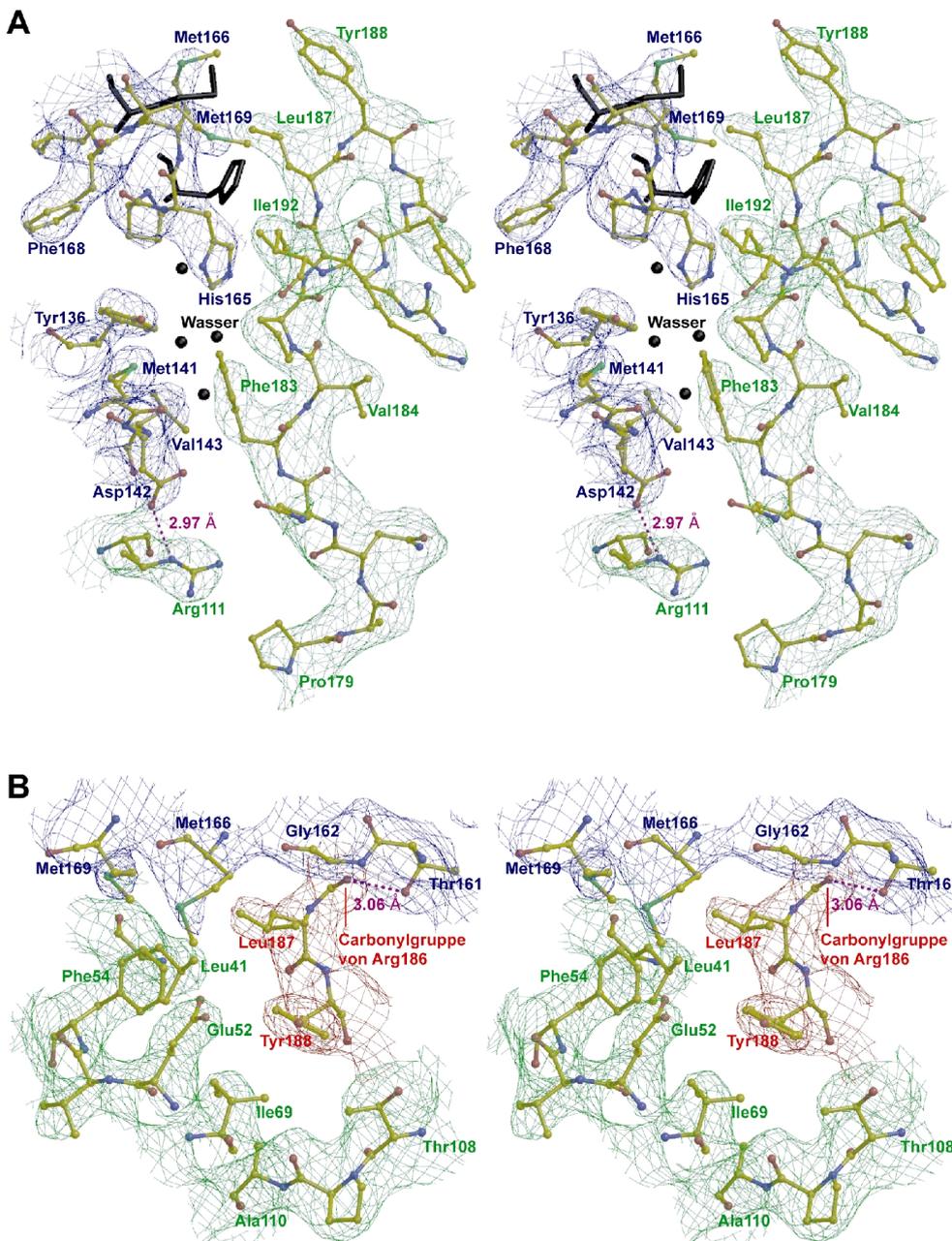


Abb. 30: Stereobilder mit Teilen des CK2 β -Schwanzes im CK2-Holoenzym (PDB-Code 1JWH). **A)** Einbindung in den β/β -Kontaktbereich. Die beiden $hsCK2\beta$ -Ketten sind durch verschiedene Farben (grün/blau) der Elektronendichten und Beschriftungen unterschieden. Met169, His165 und einige Wassermoleküle aus der überlagerten $hsCK2\beta^{1-182}$ -Struktur (PDB-Datei 1QF8) sind schwarz gezeichnet. **B)** Einbindung in den α/β -Kontaktbereich. Grün: $hsCK2\alpha^{2-337}$; blau/rot: die beiden $hsCK2\beta$ -Monomere. Die Elektronendichte wurde ab einer Schwelle von 1σ oberhalb des Mittelwertes gezeichnet.

deutlich unter dem Durchschnittswert für nicht-permanente Homodimere, was unterstreicht, daß die Stabilität dieses Kontaktes auf der hohen Hydrophobizität der Grenzfläche beruhen muß³¹⁹.

21.2.3 Der β/β -Kontakt

Zu den unerwarteten Erkenntnissen der CK2-Holoenzymstruktur gehörte, daß das in der *hsCK2 β ¹⁻¹⁸²*-Struktur fehlende C-terminale CK2 β -Segment vom Zentralkörper des CK2 β -Monomers losgelöst ist. Auf diesen Befund wurde schon im Zusammenhang mit Abb. 28 hingewiesen. Hier nun soll die Funktion dieses CK2 β -Schwanzes erläutert werden.

Zur Dimerisierung von CK2 β ist jener C-terminale Schwanz, wie die Struktur von *hsCK2 β ¹⁻¹⁸²* gezeigt hat³¹⁹, offenbar nicht nötig. Trotzdem intensiviert er den Kontakt zwischen den beiden CK2 β -Monomeren erheblich, so daß ihre Kontaktfläche von 540 Å² auf 1766 Å² wächst³²¹. Diese Verdreifachung resultiert aus der Tatsache, daß sich der CK2 β -Schwanz in seiner gesamten Ausdehnung (d.h. soweit man ihn in der Elektronendichte verfolgen kann, nämlich bis zum Ser205) am jeweils anderen CK2 β -Monomer entlang schlängelt (Abb. 15). Abb. 30A beispielsweise zeigt einen Ausschnitt aus dem β/β -Kontakt, der verdeutlicht, wie His165 und Met169 ihre Seitenkettenkonformationen ändern und wie mehrere vom isolierten *hsCK2 β ¹⁻¹⁸²*-Dimer gebundene Wassermoleküle verdrängt werden.

21.2.4 Der α/β -Kontakt

Während der CK2 β -Schwanz den β/β -Kontakt zwar intensiviert, aber nicht bewirkt, ist er das entscheidende Strukturelement für den α/β -Kontakt, also für die Bindung von CK2 α an das CK2 β -Dimer. Diese Erkenntnis aus Mutagenesestudien²⁴⁶ wurde durch die Holoenzymstruktur vollauf bestätigt. Zur Erinnerung: Boldyreff *et al.*²⁴⁶ hatten die wichtigste Kontaktzone zwischen CK2 α und CK2 β auf den CK2 β -Sequenzbereich zwischen 170 und 194 eingegrenzt. In der Tat überstreicht dieser Bereich eine Kehre des CK2 β -Schwanzes, an dessen Spitze Leu187 und Tyr188 liegen, die in engem Kontakt zu CK2 α stehen (Abb. 30B). Diese α/β -Kontaktschleife wurde auch von Battistutta *et al.*³²⁴ in dem an *zmCK2 α* gebundenen Peptid *hsCK2 β ¹⁸¹⁻²⁰³* gefunden (Abb. 28), wobei sie allerdings die Aminosäuren His193 und Pro194 an die Spitze der Kehre gelegt haben. Um die Ursache dieses Widerspruches aufzuklären, bedarf es einer höher aufgelösten Struktur des CK2-Holoenzym.

Abb. 30B zeigt auch, wie gleichzeitig mit Leu187 und Tyr188 die CK2 β -Aminosäuren Met166 und Met169 aus der Helix α F mit CK2 α wechselwirken, die allerdings aus der anderen Kette des CK2 β -Dimers stammen. Mit anderen Worten: Der Gesamtkontakt des CK2 β -Dimers zu einem CK2 α -Monomer verteilt sich auf beide CK2 β -Ketten. Die eine Kette hat ihre Kontaktzone um Position 170 (Helix α F) herum und die andere um Position 188 herum. Aus Symmetriegründen ist die Zuordnung gegenüber dem zweiten CK2 α -Monomer genau umgekehrt. Diese Befunde, die auch durch Abb. 31 illustriert werden, passen zu den Beobachtungen Boldyreffs *et al.*²⁴⁶, daß die Mutante CK2 β ¹⁻¹⁸⁰, die also nur noch eine dieser beiden Kontaktzonen besitzt, zwar keine stabilen Tetramere mehr mit CK2 α bilden kann, daß sie aber dennoch in der Lage ist, CK2 α wie Wildtyp-CK2 β zu aktivieren.

21.2.5 Flexibilität im α/β -Kontaktbereich: die „Gelenkpfanne“ von CK2 α

Seitens der CK2 α wird der α/β -Kontaktbereich durch die äußere Oberfläche des β -Faltblattes im Zentrum der N-terminalen Domäne gebildet (Abb. 31), wie es auch Battistutta *et al.*³²⁴ an ihrer Kom-

plexstruktur beobachtet hatten. Dieser Bereich zeichnet sich durch eine Häufung hydrophober Seitenketten an der Oberfläche aus, namentlich Leu41, Phe54, Val67 und Ile69 (Abb. 31).

Von außen betrachtet, besitzt der Kontaktbereich der CK2 α -Oberfläche eine konkave Wölbung (Abb. 31), d.h. das CK2 β -Dimer stößt mit seiner Interaktionszone in eine Mulde, so daß sich der Eindruck eines Gelenkes aufdrängt. Diese Anschauung wird dadurch verstärkt, daß die beiden α/β -Kontaktbereiche des im Kristall identifizierten CK2-Holoenzym nicht ganz identisch sind. Überlagert man die N-terminalen Domänen der beiden CK2 α -Ketten strukturell und führt bei dieser Bewegung das assoziierte CK2 β -Dimer mit, so ergibt sich ein Bild wie in Abb. 32A. Berechnet man zwischen den

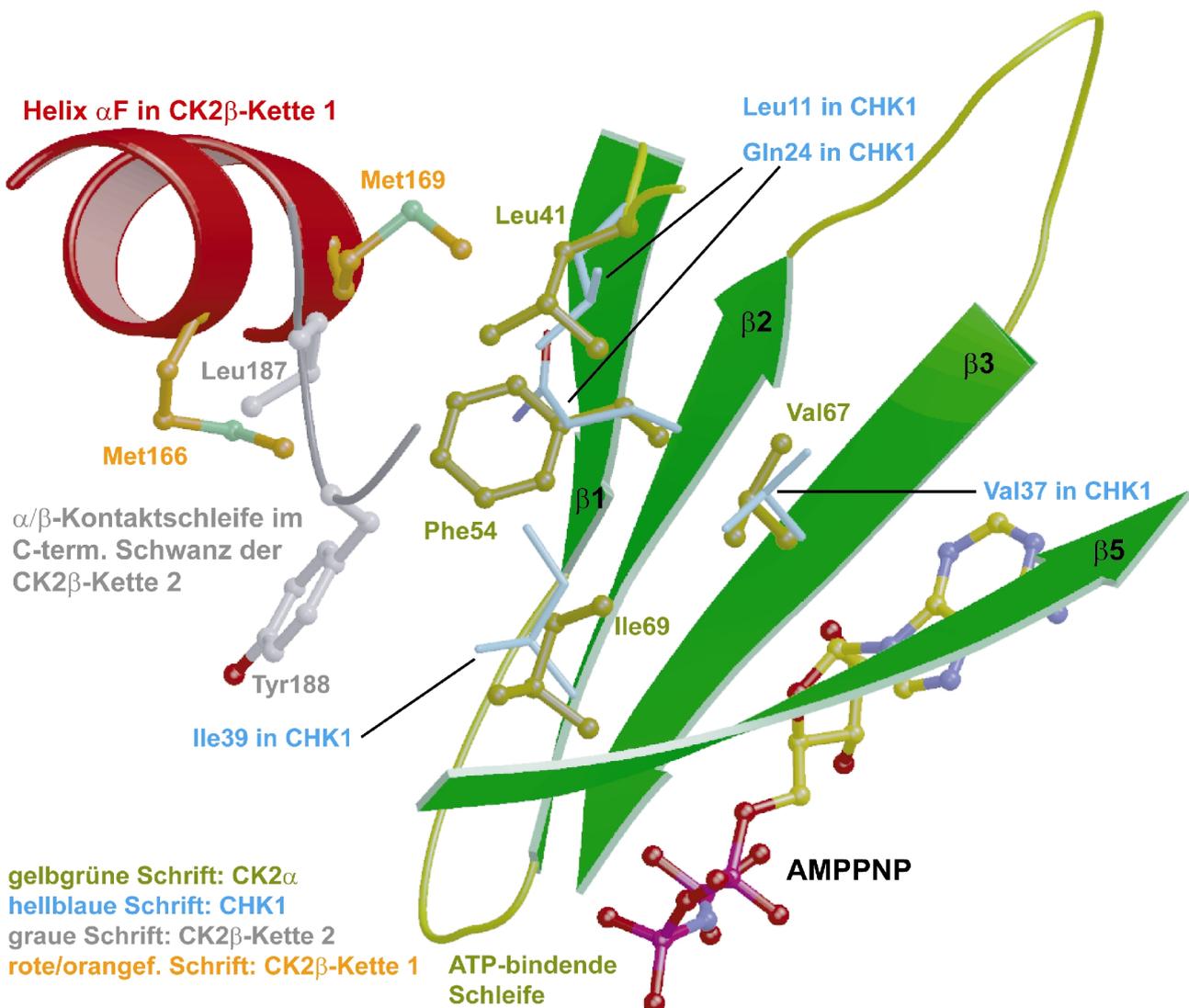


Abb. 31: Der α/β -Kontakt. Das CK2 β -Dimer bindet mit der α/β -Kontaktschleife aus der einen Kette und der Helix α F aus der anderen Kette in eine hydrophobe Mulde auf Oberfläche von CK2 α . Die Mulde wird durch die Außenseite des β -Faltblattes im Zentrum der N-terminalen Domäne geformt. Angesichts der in Abb. 32A illustrierten Flexibilität dieses Kontaktbereiches ergibt sich das anschauliche Bild eines Gelenkes, zum dem CK2 α die „Gelenkpfanne“ beisteuert. Neben den wichtigsten Kontaktseitenketten der CK2 α sind auf dem Bild die äquivalenten Aminosäuren der CHK1-Kinase (PDB-Code 1IA8), die möglicherweise in ähnlicher Form mit CK2 β wechselwirken kann, nach Superposition der Strukturen eingezeichnet.

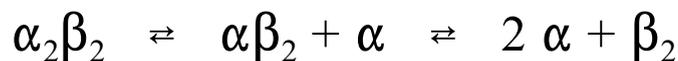
beiden dort dargestellten CK2 β -Monomeren eine Pseudorotationsachse³⁸¹, so liegt diese eingebettet in die CK2 α -Kontaktmulde, die „Gelenkpfanne“, und der zugehörige Rotationswinkel beträgt über 16°³²¹. Diese erstaunliche Flexibilität beruht wohl darauf, daß der α/β -Kontakt im wesentlichen hydrophober Natur ist, während andere nicht-kovalente Wechselwirkungen sterisch anspruchsvoller sind.

Zu den interessantesten Aspekten der „Gelenkpfanne“ auf der CK2 α -Oberfläche zählt die Tatsache, daß es sich um ein absolut konserviertes Strukturelement innerhalb der EPK-Superfamilie handelt. Alle EPKs besitzen ein solches Faltblatt. Sofern weitere Voraussetzungen gegeben sind wie die Hydrophobizität der äußeren Oberfläche und die Abwesenheit sterisch ungünstiger Faktoren, sollte eine EPK daher ein potentieller Wechselwirkungspartner der CK2 β sein.

21.2.6 Die α/β -Kontaktfläche ist überraschend klein

Abb. 15A läßt erahnen, daß die Kontaktfläche zwischen CK2 α und dem CK2 β -Dimer relativ klein ist. Dieser Eindruck wird durch eine quantitative Betrachtung bestätigt: Mit 832 Å²³²¹ ist die Kontaktfläche deutlich kleiner als die durchschnittliche Interaktionsfläche in Heterokomplexen. Dies gilt sowohl für permanente Heterokomplexe, für die Jones & Thornton³⁷³ einen Durchschnittswert von 1722 Å² berichtet haben, als auch für nicht-permanente Heterokomplexe, für die der entsprechende Wert nach Nooren & Thornton³⁸⁰ 1211 Å² (Maximum: 2213 Å²; Minimum: 570 Å²) beträgt.

Legt man diese Werte zugrunde, so lautet die Schlußfolgerung, daß das in Abb. 15 gezeigte CK2-Holoenzym zu den nicht-permanenten Heterokomplexen, ja möglicherweise gar - nach der Unterteilung von Nooren & Thornton³⁸⁰ - zu den schwachen nicht-permanenten Heterokomplexen gehört. Man müßte dann die Existenz der folgenden chemischen Gleichgewichte postulieren:



Wegen der weiten Entfernung der beiden CK2 α -Untereinheiten im Komplex (Abb. 15A) kann man davon ausgehen, daß ihre Bindung an das CK2 β -Dimer unabhängig voneinander ist und nicht-kooperativ erfolgt. Somit vereinfacht sich das Gleichgewicht in folgender Weise:



Während es, wie in den Kapiteln 13.4.5 und 13.4.6 dargestellt, in der biochemischen CK2-Literatur - insbesondere für Pflanzenzellen²⁷⁸, aber auch für das Insekt *Chironomus tentans*¹²⁷ - durchaus einzelne Indizien für die Coexistenz von CK2 α und CK2-Holoenzym gab, kam der Bericht über die erstaunlich kleinen α/β -Kontaktflächen insgesamt überraschend, denn er widersprach dem auf Cochet & Chambaz⁴² zurückgehenden Dogma über die hohe Stabilität des CK2-Holoenzym ebenso wie der Tatsache, daß über Jahrzehnte hinweg CK2-Aktivität aus Wirbeltiergewebe, aus *Drosophila* und aus Hefe nur in Form des CK2-Heterotetrameres isoliert worden war.

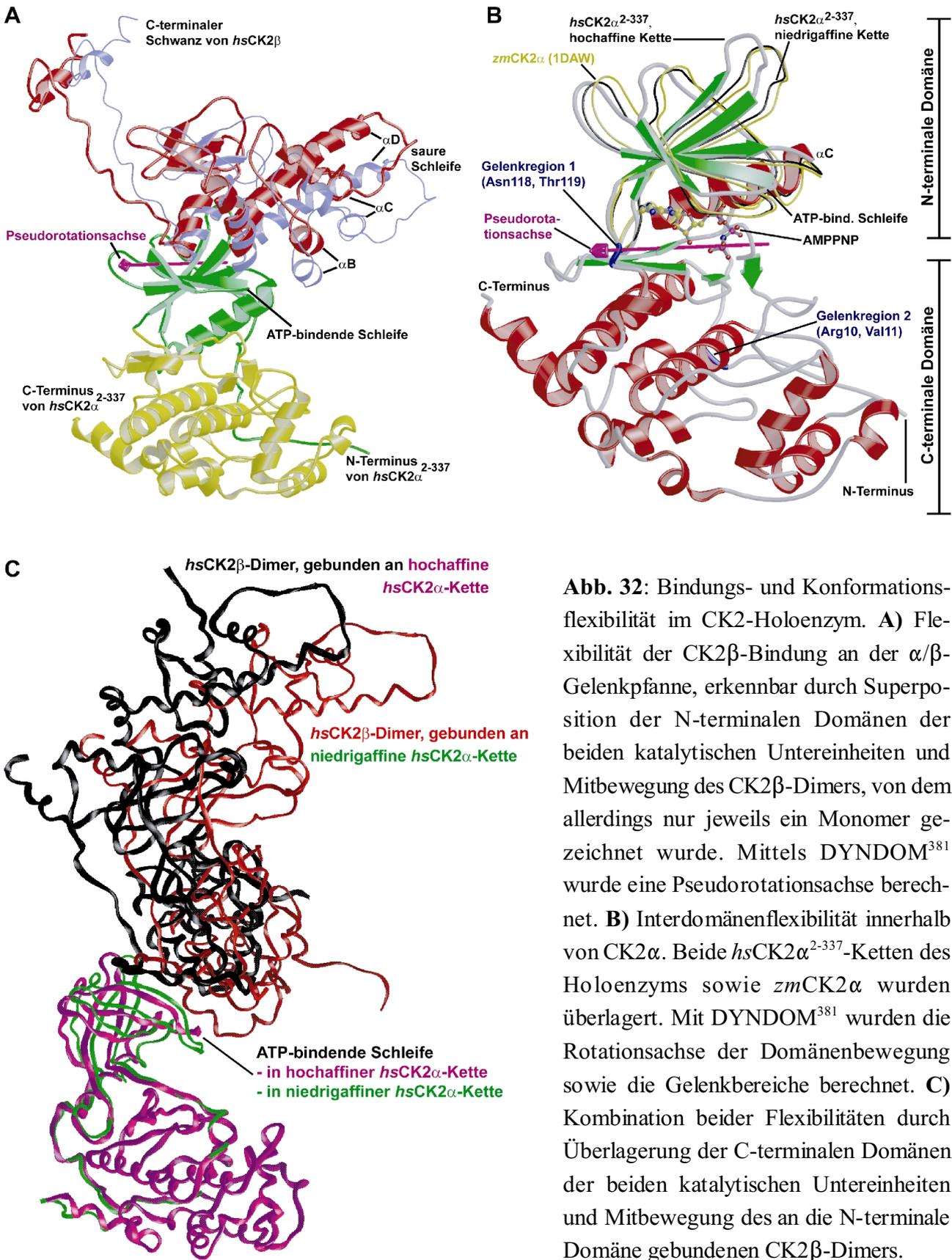


Abb. 32: Bindungs- und Konformationsflexibilität im CK2-Holoenzym. **A)** Flexibilität der CK2 β -Bindung an der α/β -Gelenkpfanne, erkennbar durch Superposition der N-terminalen Domänen der beiden katalytischen Untereinheiten und Mitbewegung des CK2 β -Dimers, von dem allerdings nur jeweils ein Monomer gezeichnet wurde. Mittels DYNDOM³⁸¹ wurde eine Pseudorotationsachse berechnet. **B)** Interdomänenflexibilität innerhalb von CK2 α . Beide *hsCK2α*²⁻³³⁷-Ketten des Holoenzym sowie *zmCK2α* wurden überlagert. Mit DYNDOM³⁸¹ wurden die Rotationsachse der Domänenbewegung sowie die Gelenkbereiche berechnet. **C)** Kombination beider Flexibilitäten durch Überlagerung der C-terminalen Domänen der beiden katalytischen Untereinheiten und Mitbewegung des an die N-terminale Domäne gebundenen CK2 β -Dimers.

Mittlerweile ist eine erste Gleichgewichtskonstante für das obengenannte Gleichgewicht publiziert worden. Martel *et al.*³⁸² bestimmten mit der Plasmonresonanz-Technik einen Wert von $K_D = [\alpha][\beta_2]^{1/2}[\alpha_2\beta_2]^{-1/2} = 5,41 \text{ nM}$. Nach Nooren & Thornton³⁸⁰ liegt diese Dissoziationskonstante im typischen Bereich für starke transiente Komplexe. Auf jeden Fall spricht auch sie für den nicht-permanenten Charakter der Assoziation zwischen CK2 α und CK2 β .

21.3 Beeinflusst die $\beta 4/\beta 5$ -Schleife das CK2 α /CK2 β -Assoziationsgleichgewicht?

Gemäß Nooren & Thornton³⁸⁰ zeichnen sich starke transiente Komplexe nicht nur durch eine Dissoziationskonstante im nanomolaren Bereich aus, sondern die Assoziation ihrer Untereinheiten ist auch oft mit größeren Konformationsänderungen verbunden. Auch im Falle von *hsCK2 α* ²⁻³³⁷ ist ein solches Phänomen zu beobachten: Überlagert man die Struktur von CK2 β -gebundener *hsCK2 α* ²⁻³³⁷ mit derjenigen von freier *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵ (Abb. 16), so erkennt man zwar die schon erwähnte Konservierung in den katalytischen Schlüsselbereichen, daneben aber auch eine sehr deutliche Umfaltung der $\beta 4/\beta 5$ -Schleife.

Nähere Einzelheiten dazu zeigt Abb. 33: Während die $\beta 4/\beta 5$ -Schleife im Falle beider CK2 α -Untereinheiten des CK2-Holoenzym „offen“ ist und die Bindung des CK2 β -Dimers sterisch nicht behindert,

ist sie in der freien *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵ in Richtung der hydrophoben Kontaktmulde umgeklappt. In dieser geschlossenen Konformation ist die Assoziation von CK2 β unmöglich.

Denkbar ist, daß durch diese Konformationsänderung der $\beta 4/\beta 5$ -Schleife das Gleichgewicht zwischen dem CK2-Holoenzym einerseits und CK2 α und dem CK2 β -Dimer andererseits beeinflusst wird. Freie CK2 α würde auf diese Weise dem Gleichgewicht entzogen und gewissermaßen vor der Assoziation mit CK2 β geschützt.

Einschränkend muß allerdings erwähnt werden, daß die in Abb. 33 gezeigte geschlossene Konformation der $\beta 4/\beta 5$ -Schleife in der *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵-Struktur in einem kristallinen Kontaktbereich liegt. Dieser Befund schließt zwar nicht aus, daß freie *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵ auch in Lösung diese Konformation einnehmen kann, jedoch ist die Wahr-

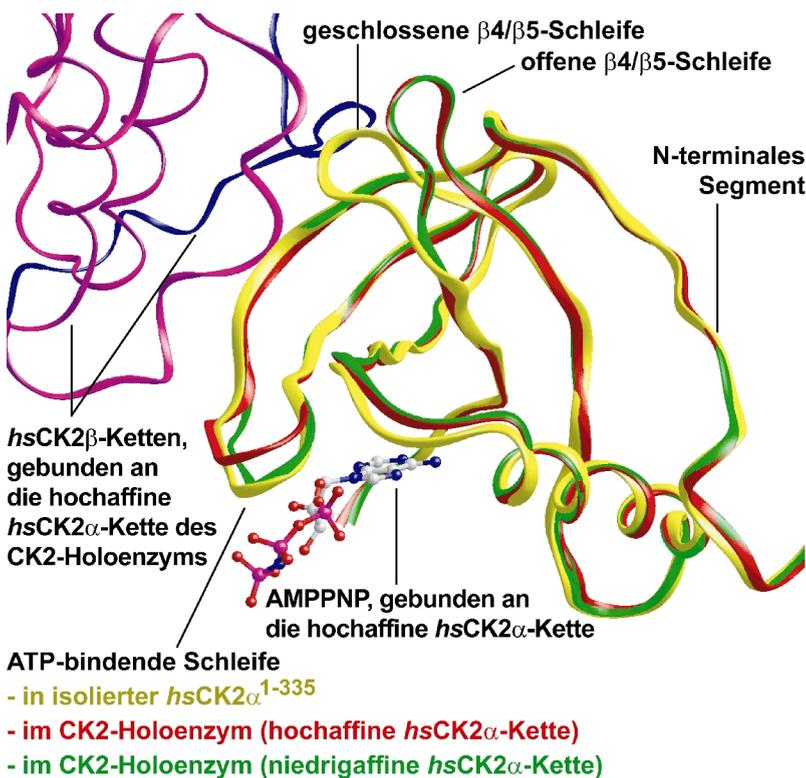


Abb. 33: Konformationsänderungen der $\beta 4/\beta 5$ -Schleife und der ATP-bindenden Schleife bei der Einbindung von CK2 α in das Holoenzym. Überlagert wurden isolierte *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵ (PDB-Code 1PJK; gelbe Farbe) mit hochaffiner *hsCK2 α* ²⁻³³⁷ (rot) und niedrigaffiner *hsCK2 α* ²⁻³³⁷ (grün) aus dem CK2-Holoenzym (PDB-Code 1JWH). Die beiden *hsCK2 β* -Monomere sind blau und violett gefärbt.

scheinlichkeit, daß es sich um ein Artefakt der Kristallpackung handelt, dem keiner biologische Bedeutung zukommt, mindestens ebenso so hoch.

Derartige Probleme bei der Interpretation spezieller Beobachtungen an Kristallstrukturen von Proteinen sind relativ häufig. Sie lassen sich lösen oder zumindest entschärfen, wenn zusätzliche Strukturinformationen hinzukommen, bei denen das gleiche oder ein sehr ähnliches Protein in alternativen Kristallpackungen oder noch besser in Lösung vorkommt.

Im Falle von *hsCK2 α* gibt es zwei ergänzende Strukturen dieser Art, die beide von Frau Inessa Ermakova im Rahmen ihrer Doktorarbeit erarbeitet und noch nicht veröffentlicht worden sind. Die erste Struktur betrifft *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* und stammt aus einem Kristall, der unter praktisch identischen Bedingungen gewachsen ist wie der zur publizierten Struktur (PDB-Code 1PJK)³²⁹ gehörende, der jedoch eine andere Symmetrie aufweist. Diese Alternativstruktur ist ebenfalls inkompatibel mit einer Bindung von CK2 β , denn die β 4 β 5-Schleife liegt auch hier in der geschlossenen Konformation vor. Vor allem aber ist die β 4 β 5-Schleife in diesem Falle nicht in einen Kristallkontaktbereich eingebunden.

Die zweite Vergleichsstruktur ist bereits im Zusammenhang mit der dualen Cosubstratspezifität vorgestellt worden (s. Kap. 19.2.3 und Abb. 26F): Es handelt sich um die Struktur der Mutante *hsCK2 α ¹⁻³³⁵-V66A/M163L*, deren Kristalle mit einem anderen Kristallisationsmitteltyp (Salz statt Polyethylenglykol) gewachsen waren und ebenfalls eine andere Packung und Symmetrie aufweisen. Auch in dieser Struktur nimmt die β 4 β 5-Schleife die geschlossene Konformation ein, liegt in diesem Falle allerdings in einem Kristallkontaktbereich.

Als Fazit bleibt festzuhalten, daß es bisher drei Kristallstrukturen von isolierter, C-terminal verkürzter *hsCK2 α* gibt^a, die alle in dieser Form nicht zur Bindung von CK2 β geeignet sind und nur nach Umfaltung der β 4 β 5-Schleife ein CK2-Holoenzym bilden können. Dieser Befund paßt vorzüglich zu den sich häufenden Berichten über eigenständige - d.h. nicht holoenzymgebundene - Populationen und biologische Funktionen von CK2 α .

21.4 Wie beeinflusst CK2 β die Aktivität von CK2 α ?

21.4.1 Übersicht und Klassifizierung

Eine Erwartung an die strukturbiologische Untersuchung des CK2-Holoenzym war, Aufschluß darüber zu bekommen, wie CK2 β seinen Einfluß auf die Aktivität von CK2 α ausübt. Die Hauptantwort auf diese Frage ist bereits wiederholt (s. Kap. 21.2.1 und Abb. 16) genannt worden: CK2 β läßt die katalytischen Schlüsselemente von CK2 α intakt und übt keine Wirkung auf CK2 α aus, die derjenigen der Cycline auf die cyclinabhängigen Proteinkinasen (Abb. 21) auch nur ansatzweise vergleichbar ist.

Trotzdem gibt es subtile Einflüsse von CK2 β auf die Aktivität von CK2 α , die sich mutmaßlich auch in den Strukturen widerspiegeln und die zunächst noch einmal resümiert und klassifiziert werden sollen. Betrachten wir die biochemischen Befunde genauer, so können wir die Wirkungen von CK2 β auf die CK2 α -Aktivität nach zwei verschiedenen Kriterien in jeweils zwei Gruppen unterteilen, nämlich

^aHinzufügen könnte man noch die Struktur einer Dreifach-Punktmutante von C-terminal verkürzter *hsCK2 α* (PDB-Code 1NA7)³³⁰, deren Kristalle isomorph zu den *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*-Kristallen sind, die dem PDB-Eintrag 1PJK zugrundeliegen.

einerseits in positive (stimulierende) und negative (inhibierende) Einflüsse und andererseits in Fernwirkungen und Nahwirkungen.

21.4.2 Fernwirkungen

Das Paradebeispiel für ein CK2 α -Substrat, dessen Phosphorylierung durch CK2 β herabreguliert wird, ist das Calmodulin^{260,261}. Dieser Effekt tritt nur mit dem kompletten Calmodulin als Substrat auf, während ein Calmodulinpeptid, das die Phosphorylierungsstelle Ser81 beinhaltet, unter dem Einfluß von CK2 β sogar besser als durch freie CK2 α phosphoryliert wird²⁴⁶. Die Herunterregulation der Calmodulinphosphorylierung beruht also offensichtlich auf *Fernwirkungen*, also auf störenden Wechselwirkungen, die von Teilen des Calmodulins fern von der Phosphorylierungsstelle verursacht werden.

Generell weiß man heute, daß Fernwirkungen bei der Substraterkennung durch Proteinkinasen eine größere Rolle spielen, als man lange Zeit angenommen hat, und daß insbesondere die Spezifität auf solchen Wechselwirkungen fern von der Phosphorylierungsregion beruhen³³¹. MAP-Kinasen beispielsweise erkennen ihre Substratproteine an speziellen „Docking“-Domänen und besitzen dafür besondere Erkennungsregionen³⁸³. Für den CDK2/Cyclin-A-Komplex wurde berichtet, daß bestimmte - allerdings nicht alle - Substrate über eine hydrophobe „Rekrutierungsregion“ gebunden werden, die 35 Å vom aktiven Zentrum entfernt ist und zum Cyclin A und nicht etwa zur CDK2 gehört³⁸⁴. Auch die strukturelle Grundlage dieser positiven Fernwirkung wurde aufgeklärt^{353,385}. Dieser Fall zeigt also - und das macht ihn für die CK2 so interessant -, wie ein Bindungsprotein die Substratspezifität einer Proteinkinase nachhaltig verändern kann.

Die Hemmung der CK2 α -katalysierten Calmodulin-Phosphorylierung durch CK2 β ist offensichtlich ein Beispiel für eine negative Fernwirkung. Rekha & Srinivasan³⁶³ haben eine genauere Erklärung dafür geliefert, indem sie aus Strukturen von CK2 α und Calmodulin einen Enzym-Substrat-Komplex modelliert und die CK2-Holoenzymstruktur darauf gefittet haben. Sie konnten auf diese Weise zeigen, daß es sterische Konflikte und abstoßende elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Calmodulin und CK2 β geben könnte, die weit vom aktiven Zentrum entfernt sind und die - in Einklang mit biochemischen Befunden²⁶¹ - in Gegenwart von Polylysin teilweise neutralisiert werden.

21.4.3 Nahwirkungen

Als *Nahwirkungen* seien direkte Einflüsse von CK2 β auf die Umgebung des aktiven Zentrums von CK2 α verstanden. Derartige Nahwirkungen können positiv oder negativ sein, wie Allende & Allende⁵⁶ es 1998 in ihrem Modell für die Architektur des CK2-Holoenzym angedeutet haben (s. Abb. 8): Während das C-terminale Segment von CK2 β generell eine aktivierende Wirkung auf CK2 α hat, die bei der Phosphorylierung von Peptidsubstraten zu erkennen ist, wirkt die saure Schleife inhibierend, indem sie mit positiv geladenen Molekülteilen in der Nähe des aktiven Zentrums - mutmaßlich mit dem basischen Strang - wechselwirkt. Im folgenden soll spekuliert werden, worin die strukturellen Grundlagen dieser Nahwirkungen bestehen könnten.

21.4.4 Unterstützt CK2 β die Interdomänen-Flexibilität?

Kommen wir zunächst zur positive Nahwirkung von CK2 β auf CK2 α , zur Aktivierung der Phosphorylierung von Peptiden oder auch von Casein. Auffällig sind in diesem Zusammenhang die folgenden

drei Beobachtungen am CK2-Holoenzym: Erstens ist der Öffnungswinkel zwischen den Hauptdomänen bei den beiden katalytischen Unterheiten des CK2-Holoenzym unterschiedlich (Abb. 32B), was auf eine Dynamik an der Spalte des aktiven Zentrums schließen läßt; zweitens ist dieser Befund mit der in Kap. 21.2.5 beschriebenen und in Abb. 32B illustrierten Variabilität des α/β -Kontaktes korreliert; und drittens unterscheiden sich die beiden katalytischen Untereinheiten in ihrer Affinität zu AMPPNP.

Die „Interdomänen-Flexibilität“ ist auch bei anderen EPKs, insbesondere bei CAPK gefunden worden, und zwar sowohl in Lösung als auch im kristallinen Zustand (s. zusammenfassende Übersicht von Akamine *et al.*³⁸⁶). Sie gilt als wichtiger Faktor im Reaktionsgeschehen, weil sie sowohl die Bindung von ATP und des Proteinsubstrates als auch den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, nämlich die Freisetzung von ADP beeinflusst^{387,331}. Trotz dieses und anderer Beispiele lieferte das CK2-Holoenzym jedoch den ersten Fall einer EPK-Kristallstruktur, bei dem zwei Öffnungszustände des aktiven Zentrums innerhalb eines Kristalls beobachtet werden konnten (Abb. 32B). Als Gelenkbereiche hat das Programm DYNDOM³⁸¹ das Dipeptid Asn118-Thr119 und das Dipeptid Arg10-Vall1 identifiziert, d.h. die Spitze des N-terminalen Segmentes gehört in CK2 α strukturell zur C-terminalen Hauptdomäne (s. blau gezeichnete Hauptkettenstücke in Abb. 32B).

Auffälligerweise sind die beiden in Abb. 32A/B magentafarben eingezeichneten Rotationsachsen annähernd parallel, und die dynamischen Bewegungen sind gleichsinnig. Überlagert man die beiden C-terminalen Domänen, so erkennt man, daß die Kette mit dem größeren Öffnungswinkel (violett in Abb. 32C) auch das CK2 β -Dimer so gebunden hat, daß der Gesamt-Öffnungswinkel zwischen C-terminaler Domäne und CK2 β -Dimer maximal ist. Mit anderen Worten: CK2 β unterstützt die funktionell wichtige Öffnungsbewegung zwischen den CK2 α -Hauptdomänen. Ob das der Grund dafür ist, daß die stärker geöffnete CK2 α -Kette „hochaffin“ ist und im Gegensatz zur geschlosseneren Kette (grün in Abb. 32C) ein AMPPNP-Molekül als Liganden enthält, ist allerdings nicht eindeutig zu erkennen.

21.4.5 Stabilisierung der ATP-bindenden Schleife „von hinten“

Doch CK2 β scheint nicht nur die N-terminale Domäne als ganzes zu „ziehen“, sondern hat möglicherweise auch noch eine spezielle Wirkung auf die ATP-bindende Schleife. Diese Schleife ist die einzige CK2 α -Region innerhalb eines CK2-Holoenzym, die sowohl den katalytischen Schlüsselbereichen angehört als auch direkten Kontakt zu CK2 β hat. Die ATP-bindende Schleife wird gewissermaßen „von hinten“ stabilisiert (Abb. 33), und ihre Spitze wird auf diese Weise „hochgebogen“ und gestreckt, was sowohl an Abb. 33 als auch an Abb. 32C erkennbar ist.

Möglicherweise wird - unabhängig von dem im vorigen Abschnitt skizzierten Einfluß von CK2 β auf den Interdomänen-Öffnungswinkel - auf diese Weise die Affinität des Enzyms gegenüber ATP und ADP zusätzlich beeinflusst. Eine ähnliche besondere Rolle der hochflexiblen, glycinreichen ATP-Bindungsschleife wird von Johnson *et al.*³⁸⁷ für CAPK diskutiert, wobei die Autoren zurecht betonen, daß die Rollen beider Beweglichkeiten - die der Gesamtdomäne und die ATP-bindenden Schleife - schon allein experimentell kaum voneinander zu trennen sind.

Im Falle der CK2 jedoch lohnt es sich, in diesem Zusammenhang noch auf eine Arbeit von Sarno *et al.*³³⁴ hinzuweisen. Die Autoren stellten *hsCK2 α* -Mutanten her, bei denen die Wechselwirkung zwischen Aktivierungsschleife und N-terminalem Segment gestört war, und zwar am krassesten dadurch, daß das N-terminale Segment ganz oder teilweise deletiert war. Dabei erwies sich bereits eine Mutante,

der die zwölf N-terminalen Aminosäuren fehlten, als nahezu inaktiv. Vollkommen inaktiv war eine Mutante ohne die ersten 30 Aminosäuren³³⁴. Dieses Ergebnis bestätigte für sich genommen erst einmal, daß das N-terminale Segment eine wesentliche Rolle für die Aktivität von CK2 α besitzt.

Ebenso interessant jedoch war der Bericht der Autoren, daß CK2 β in der Lage ist, diese CK2 α -Mutanten komplett oder teilweise zu reaktivieren³³⁴. So sind Deletionsmutanten, denen 12 oder 18 Aminosäuren am N-Terminus fehlen, im Komplex mit CK2 β wieder voll aktiv, während diese Reaktivierung durch CK2 β bei längeren Deletionen nur teilweise gelang³³⁴. Wenn diese Befunde stimmen, so bedeutet das, daß CK2 β und das N-terminale Segment von CK2 α teilweise funktionell äquivalent sind, daß also CK2 β die konstitutive Aktivität von CK2 α auch dann noch gewährleistet, wenn das N-terminale Segment ausgefallen ist^a.

Ihre Erklärung für diese Ergebnisse gründeten Sarno *et al.*³³⁴ auf der strukturellen Plastizität von CDK2 (Abb. 21). Sie schlugen vor, daß die Aktivierungsschleife von CK2 α nach Wegfall der Fixierung durch das N-terminale Segment in ähnlicher Weise „hochklappt“, wie es bei isolierter CDK2 beobachtet wurde (Abb. 21 oben). CK2 β solle dann eine Rückfaltung in den aktiven Zustand bewirken. Die Autoren blieben allerdings eine Erklärung dafür schuldig, wie CK2 β diese Wirkung auf die Aktivierungsschleife haben könnte, ohne direkt an sie zu binden.

Diesen Mangel haben wir in unserer Publikation der *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵-Struktur aufgegriffen und die Hypothese entsprechend weitergesponnen³²⁹ (s. Anhang 8). Schaut man sich die inaktive Konformation von cyclin-freier CDK2 genauer an (Abb. 21 oben), so sieht man, daß nicht nur die Aktivierungsschleife „hochgebogen“, sondern gleichzeitig die Spitze der ATP-Bindungsschleife „heruntergeklappt“ ist und daß beide Strukturelemente in Kontakt miteinander getreten sind. Diese Wechselwirkung stabilisiert die inaktive Konformation, so daß jegliche Störung dazu führen sollte, daß die aktive Kinasekonformation begünstigt wird. Eine solche Störung könnte im Falle der CK2 α darin bestehen, daß CK2 β die ATP-bindende Schleife „von hinten“ stabilisiert, so daß deren Spitze nicht mehr in Kontakt zur Aktivierungsschleife treten kann. Diese wiederum würde dann selbst bei fehlendem N-terminalen Segment in ihren aktiven Zustand wechseln.

Obwohl nicht unlogisch, sind diese Ideen doch extrem spekulativ. Vor allem aber sind sie nach heutigem Kenntnisstand physiologisch unerheblich, weil es keinerlei Anzeichen dafür gibt, daß CK2 α *in vivo* durch Abspalten des N-Terminus abgeschaltet und möglicherweise durch CK2 β wieder angeschaltet werden könnte.

^aZweifel sind insofern angebracht, als die Arbeit zentrale methodische Fehler aufweist: Bei der Michaelis-Menten-Kinetik wurden laut Sarno *et al.*³³⁴ die ATP- und die Substratkonzentration konstant gehalten und die Enzymkonzentration variiert. Sollte es sich dabei um einen Fehler in der Beschreibung handeln, sollte also in Wahrheit die ATP-Konzentration systematisch variiert worden sein (was zur Diskussion der Ergebnisse passen würde), so wurde doch die Möglichkeit außer acht gelassen, daß sich auch die Affinität des Enzyms zum Substratpeptid verändert haben könnte. Bei Mutationen, die die für die Substratbindung so wichtige Aktivierungsschleife betreffen, hätte dies zumindest untersucht werden müssen.

21.4.6 Ringstrukturen im Kristall - das Rätsel der sauren Schleife

Kommen wir schließlich zur negativen Nahwirkung, dem inhibierenden Effekt, den die saure Schleife von CK2 β auf holoenzymgebundene CK2 α ausübt²⁴⁶. Um eine Nahwirkung sollte es den biochemischen Befunden zufolge deshalb handeln, weil der basische Strang von CK2 α unweit des aktiven Zentrums als wahrscheinlichste Kontaktzone der sauren CK2 β -Schleife identifiziert worden war. Die saure Schleife ist also unmittelbar kompetitiv zu Peptidsubstraten. Erinnerung sei in dem Zusammenhang an das von Allende & Allende⁵⁶ 1998 vorgestellte Modell für den Aufbau des CK2-Holoenzym (Abb. 8, Kap. 13.4.3). Schon damals war unverständlich, warum nicht die zahlreichen, bis in die 70er Jahre zurückreichenden Befunde über höher aggregierte CK2-Oligomere in die Betrachtung einbezogen wurden. Denn wenn zwei Proteine mehr als eine starke Kontaktzone zueinander haben, dann ist die Bildung hochmolekularer Aggregate nicht ungewöhnlich.

Auf die Möglichkeit, daß die saure Schleife Ursache für die Aggregationsneigung des CK2-Holoenzym sein könnte, wurde erstmals in der Strukturpublikation des CK2-Holoenzym hingewiesen³²¹ (s. Anhang 6): Die durch Mutagenese- und Vernetzungsstudien²⁶⁸ belegten Kontakte zwischen saurer CK2 β -Schleife und basischem CK2 α -Strang waren zwar *innerhalb* eines CK2-Holoenzym nicht vorhanden, aber sie könnten, so unsere damalige Argumentation, durchaus zur Wechselwirkung verschiedener Holoenzym-Tetramere führen. Dieser Gedanke, den wir damals nur angedeutet haben, sei im folgenden genauer dargelegt.

Ausgangspunkt ist die Erkenntnis, daß Proteinkristalle selbst polymere Aggregate sind. Sie verdanken ihre Existenz der Tatsache, daß Proteinmoleküle auf ihren Oberflächen normalerweise mehrere kleine Wechselwirkungsbereiche zueinander besitzen. Die meisten dieser Kontaktstellen sind zu klein, um in Lösung eine Bedeutung zu haben; im Kristallkörper tragen sie jedoch in kooperativer Weise zur Stabilität des dreidimensionalen Netzwerkes bei. Hin und wieder sind einzelne dieser sogenannten „Kristallkontakte“ so groß und markant, daß sie zu der Vermutung Anlaß geben, daß sie auch in nicht-kristalliner Umgebung existieren können. Das gilt insbesondere, wenn es unabhängig gewonnene biochemische Hinweise auf die Existenz dieser Kontakte gibt.

Genau diese Situation liegt im Falle des CK2-Holoenzym vor: Betrachtet man sich die kristallinen Umgebungen der beiden sauren Schleifen des CK2-Tetramers genauer, so stellt man fest, daß eine von ihnen praktisch ohne Kontakte und daher auch undefiniert in der Elektronendichte ist (blaues, gelbes und magentafarbenes CK2 β -Monomer in Abb. 34A). Die andere saure Schleife jedoch stößt mit ihrer negativen Ladung in die positiv geladene Region eines aktiven Zentrums vor, das zu einem benachbarten Holoenzym gehört (schwarzes, graues und orangefarbenes CK2 β -Monomer in Abb. 34A). Dieses Arrangement führt im Endeffekt zu einem Dreiering aus CK2-Tetrameren (Abb. 34A), der - von der Seite betrachtet - flach aussieht (Abb. 34B).

Die Wechselwirkungsfläche dieses alternativen CK2 α /CK2 β -Kontaktes liegt - berechnet mit dem Programm CNS³⁸⁸ - bei etwa 510 Å². Für einen überwiegend ionischen Kontakt ist das zweifellos zu klein, um allein in Lösung stabil zu sein. Im Ringverbund dagegen können durch Kooperativität dennoch stabile Aggregate entstehen, sofern die Lösungsbedingungen dies zulassen. Das heißt insbesondere, daß die Ionenstärke nicht zu groß sein darf, weil anderenfalls ionische Wechselwirkungen geschwächt werden.

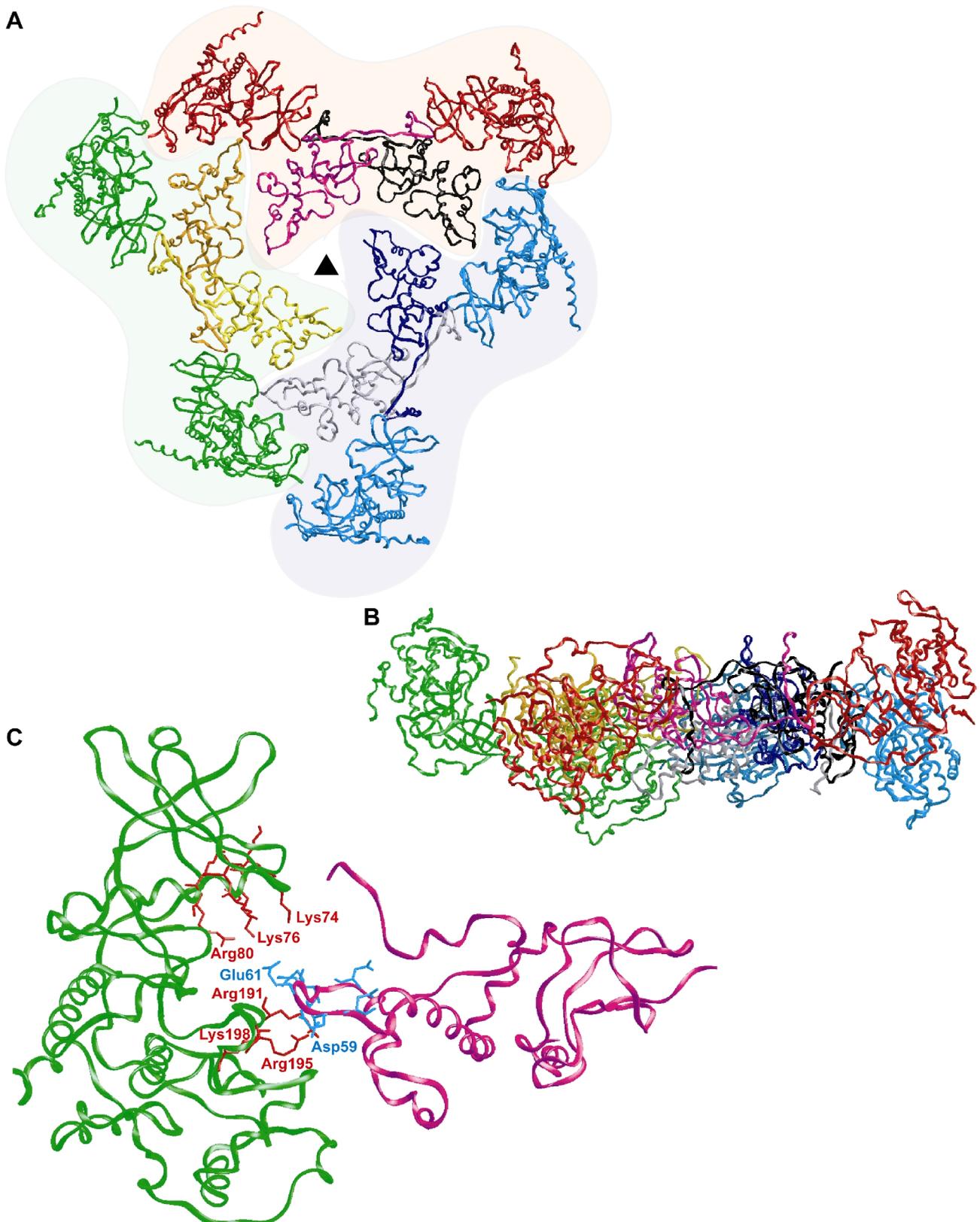


Abb. 34: Der alternative CK2 α /CK2 β -Kontakt, wie er in den Kristallen des CK2-Holoenzym³²¹ existiert. **A)** Dieser Kontakt führt zu Ringstrukturen aus drei CK2-Tetrameren um eine zentrale dreizählige Drehachse (Symbol \blacktriangle). **B)** Von der Seite betrachtet, sind diese Ringe relativ flach. **C)** Wechselwirkungsregionen des alternativen CK2 α /CK2 β -Kontaktes. Die saure CK2 β -Schleife (blau) kommt dem basischen CK2 α -Strang, vor allem aber der (p+1)-Schleife nahe und blockiert so die Substratbindung.

Der ionische Charakter des alternativen CK2 α /CK2 β -Kontaktes wird an Abb. 34C deutlich. Die saure CK2 β -Schleife kommt dem basischen CK2 α -Strang nahe, jedoch beträgt der dichteste Atom-Atom-Abstand immerhin noch ca. 8 Å. Demgegenüber bildet sich ein enger Kontakt zur (p+1)-Schleife mit seinen drei positiv geladenen Aminosäuren Arg191, Arg195 und Lys198 aus, so wie es Mutagenesestudien aus dem Jahre 1997 nahegelegt haben²⁶³. Insgesamt paßt die gefundene Kristallpackung sehr schön zu der Inhibitionswirkung der sauren CK2 β -Schleife: In dem Dreiering der Abb. 34A besitzt jedes Holoenzym eine CK2 α -Untereinheit, die frei und zugänglich ist, und eine zweite, deren (p+1)-Schleife durch CK2 β blockiert ist. Bricht der Ring auf, so wird auch die zweite CK2 α -Kette zugänglich und die Aktivität steigt.

Ein solches Szenario paßt vorzüglich zu all den merkwürdigen Beobachtungen aus fünf Jahrzehnten CK2-Forschung:

- erstens zu der erstmals 1964 von Rodnight & Lavin³⁰ beobachteten Tatsache, daß das Enzym bei sehr niedrigen Salzkonzentration kaum aktiv ist und ein Aktivitätsmaximum bei 0,2 M NaCl oder KCl besitzt (s. a. Kap. 10.3)
- zweitens zu dem in den 70er Jahren entdeckten kuriosen Verhalten des CK2-Holoenzym in Phosphocellulose-Chromatographiesäulen⁸² (s. a. Kap. 11.5.2), der Tatsache nämlich, daß CK2 zwar hochaffin an dieses Material bindet und erst bei 0,7 M NaCl eluiert, daß es aber zur Bindung eine Mindest-NaCl-Konzentration von 0,25 M benötigt
- drittens zu der Aktivitätssteigerung durch Spermin und andere Polykationen, die Ende der 70er Jahre aufgefallen ist¹¹³ (s.a. Kap. 11.4.2)
- viertens zu der Tatsache, daß die genannten Aktivierungen durch Salz und Polykationen nur das CK2-Holoenzym, nicht jedoch auf CK2 α betreffen, daß sie somit die Anwesenheit von CK2 β erfordern
- fünftens zu den hyperaktiven Holoenzymvarianten, die Boldyreff *et al.*²⁴⁶ 1993 durch „Entladung“ der sauren Schleife erzeugt haben (s. a. Kap. 13.3.5)

Freilich haben diese Überlegungen nur dann einen Sinn, wenn derartige Ringstrukturen nicht nur im Kristallverband, sondern auch in Lösung auftreten. Aber genau dafür gibt es seit den Arbeiten Valeros *et al.*²⁷² experimentelle Hinweise (s. a. Kap. 13.4.4), auch wenn die von jenen Autoren gefundenen Ringe aus vier Holoenzymen bestehen (Abb. 9) und damit größer als die kristallinen Dreieringe (Abb. 34A/B) sind. Trotz dieses Widerspruches paßt die durch Abb. 34C illustrierte strukturelle Rolle der sauren Schleife so gut zum biochemischen Verhalten des CK2-Holoenzym, daß es sich wohl kaum um ein reines Kristallisationsartefakt handelt.

V Schlußfolgerungen und Ausblick

22 Auswirkungen der Kristallstrukturen auf die CK2-Forschung

22.1 Erklärungs- und Hypothesepotential von 3D-Strukturen am Beispiel der dualen Cosubstratspezifität von CK2

Wie einleitend betont, besitzt die Strukturbiologie den Anspruch, biologische und biochemische Phänomene mit Hilfe der 3D-Strukturen der beteiligten Makromoleküle erklären oder zumindest einen wesentlichen Beitrag zu ihrem Verständnis leisten zu können. Inwieweit dieses Versprechen eingelöst wird, hängt entscheidend davon, was man als „Erklärung“ gelten läßt, auf welcher Detailebene - die molekulare oder die zelluläre - man abzielt und ob man an den chemisch-mechanistischen oder eher an den biologisch-funktionellen Aspekten eines Phänomens interessiert ist, oder anders ausgedrückt, ob man „Wie?“ oder vielmehr „Wozu?“ meint, wenn man „Warum?“ fragt.

Daß chemisch-kausale und biologisch-finale Erklärungen eng miteinander korreliert sind, daß sie aber dennoch voneinander unterschieden werden sollten, sei an einem Beispiel erläutert: Das Problem der dualen Cosubstratspezifität von CK2 wurde in chemischer Hinsicht weitgehend gelöst. Die Fähigkeit der ATP-Bindungsstelle, sich durch eine gewisse Freiheit in der Adeninringebene und durch den Einbau von Wasser an markante Wasserstoffbrückenpositionen auf GTP-Bindung „umzurüsten“, konnte durch die Komplexstrukturen von *zmCK2 α* mit ATP- und GTP-Analoga (Abb. 26A/B) verstanden werden⁷⁷ (s. Anhang 3). Sofern es sich also um ein *In-vitro*-Phänomen ohne physiologische Bedeutung handelt, kann diese Eigenschaft der CK2 insgesamt als geklärt gelten.

Aber eben jene Voraussetzung ist durch die Kristallstrukturen zweifelhaft geworden. Zuvor gab es keinen Hinweis auf einen biologischen Sinn der GTP-Nutzung durch CK2 mit Ausnahme eines bereits 1964 von Rodnight & Lavin³⁰ zitierten Befundes⁷⁹, wonach der GTP-Gehalt bestimmter Nervenzellen nach elektrischer Stimulation steigt und wonach möglicherweise GTP die Phosphoquelle für die Phosphoproteinfraktion dieser Zellen ist, aber selbst diese Spur verlor sich in der nachfolgenden CK2-Literatur wieder. Erst die Kristallstrukturen der binären Komplexe und die auf ihnen beruhende, im Kap. 19.2.3 skizzierte Protein-Design-Studie zeigten, daß es dezidierte strukturelle Anpassungen zugunsten der dualen Cosubstratspezifität gibt wie das Fehlen eines Ankers für die Nukleotidribose sowie die Existenz einer voluminösen Seitenkette (Ile/Val66) zur einen und einer großen, aber flexiblen Seitenkette (Met163) zur anderen Seite der Adeninfläche. Diese Anpassungen sind so markant, daß es sich höchstwahrscheinlich nicht um Zufallsprodukte der Evolution handelt, sondern daß sie infolge eines Selektionsvorteils für die Zellen durch die duale Cosubstratspezifität entstanden sind. Worin dieser Vorteil und damit der biologische Sinn des Phänomens besteht, ist freilich offen und kann durch strukturbio-logische Methoden nicht ermittelt werden.

Wir sehen also: 3D-Strukturen von Biomolekülen besitzen ein hohes Erklärungspotential, wenn es deren chemische Eigenschaften betrifft. Geht es jedoch um die biologische Funktion(en) dieser Eigenschaften, so stoßen sie an Grenzen der Aussagekraft, ohne jedoch irrelevant zu sein. Denn immerhin haben sie auch in dieser Hinsicht ein wertvolles Hypothesepotential.

Dieses Nebeneinander von Erklärungs- und Hypothesepotential ist auch den anderen CK2-Strukturen zueigen. Es wird am besten erkennbar, wenn man der Frage nachgeht, welche Wirkung die Strukturen auf die CK2-Forschung hatten und wie sie durch ein primär zellbiologisch, molekulargenetisch und medizinisch ausgerichtetes Umfeld aufgenommen und verarbeitet wurden. Darin soll

der Schwerpunkt dieses Schlußteils bestehen, wobei in diesem Zusammenhang - ohne Anspruch auf Vollständigkeit - einige der aktuellen zellbiologischen Erkenntnisse zur CK2 mitgeteilt werden.

22.2 Das Erklärungs- und Hypothesepotential der CK2-Holoenzymstruktur

22.2.1 Promiskuität von CK2 α und CK2 β - ein Leben ohne Holoenzym?

Von begrenztem Erklärungspotential sind Kristallstrukturen nicht nur bei biologischen Funktionen, sondern aufgrund ihrer statischen Natur auch, wenn es um dynamische Prozesse geht. Umgekehrt kommt gerade dann ihr Hypothesepotential besonders zur Geltung. Dies kann man an der Struktur des CK2-Holoenzym gut beobachten.

Der Erklärungswert dieser Struktur besteht, wie bereits dargelegt wurde, in erster Linie aus drei Punkten: Erstens wurden die Befunde der 90er Jahre zu seiner Grundarchitektur - ein zentrales CK2 β -Dimer mit zwei assoziierten, aber voneinander getrennten CK2 α -Ketten - bestätigt; zweitens zeigte sich im Einklang mit der konstitutiven Aktivität, daß sich die CK2 α -Struktur in den katalytischen Schlüsselbereichen durch die Bindung an CK2 β nur marginal verändert, daß also die aktive Konformation erhalten bleibt; und drittens wurden im Kristallverband Wechselwirkungen zwischen CK2-Tetrameren gefunden, die konsistent mit verschiedenen, bis dahin unverstandenen Eigenschaften des Enzyms sind, wie z.B. seiner Aggregationsneigung und Inaktivierung unter Niedrigsalzbedingungen oder seiner Stimulierung durch Spermin.

Um nun das Hypothesepotential der Struktur aufzuzeigen, sei daran erinnert, daß das CK2-Holoenzym bis weit in die 90er Jahre als ein obligatorisches Heterotetramer und als die physiologisch einzig relevante Erscheinungsform des Enzyms galt, während den Untereinheiten CK2 α und CK2 β kein vom Holoenzym unabhängiges Eigenleben und demnach auch keine eigene Funktion zugebilligt wurde. Vor diesem Hintergrund mußte man davon ausgehen, daß die markanten Einflüsse von CK2 β auf die Aktivität, die Stabilität und die Spezifität von CK2 α *in vivo* ohne regulatorische Bedeutung sind.

Diese Sichtweise begann sich erst zu ändern, als Mitte der 90er Jahre durch Hefe-2-Hybridexperimente sowohl für CK2 α als auch für CK2 β alternative Interaktionspartner identifiziert worden waren. Plötzlich schien die Idee nicht mehr abwegig, daß CK2 α und CK2 β in variabler Weise in das zelluläre Geschehen eingebunden sind, daß sie miteinander, aber auch mit anderen Partnern assoziieren oder gar in isolierter Form vorliegen und spezifische Wirkungen entfalten können. 1998 schließlich erschien der erste Übersichtsartikel, der sich explizit einer solchen „Promiskuität“ der CK2-Untereinheiten und ihrer Konsequenzen widmete⁵⁶.

Das Feld war also schon bereitet, als 2001 die CK2-Holoenzymstruktur erschien³²¹. Trotzdem waren die geringe Größe der α/β -Kontaktflächen und die Flexibilität des α/β -Kontaktes (Abb. 32a/c), die dabei zutage traten und die im Einklang mit einem nicht-permanenten Charakter des Komplexes standen, eine große Überraschung. Bezeichnenderweise war dies derjenige strukturbioologische Aspekt der CK2, der in nachfolgenden Übersichten^{45,47,48,49,50} die stärkste Beachtung fand. Trotz des statischen Charakters der Kristallstruktur erhielt mit diesem Befund die Idee einer variablen oder gar dynamischen Quartärstruktur der CK2 eine strukturelle Grundlage. Damit bekam gleichzeitig die „Promiskuitätshypothese“, wonach CK2 α -Monomere und CK2 β -Dimere holoenzym-unabhängige Populationen und Funktionen besitzen, mehr Gewicht, wie sich an allen neueren Übersichtsartikeln ablesen läßt^{45,47,48,49}.

22.2.2 Die Struktur des CK2-Holoenzym relativiert dessen Bedeutung

Paradoxerweise hat also die Struktur des CK2-Holoenzym dessen Bedeutung im Rahmen der CK2-Forschung vermindert, indem sie das Bewußtsein für mögliche eigenständige Funktionen von CK2 α und CK2 β erhöht hat. Dies wird besonders deutlich am jüngsten CK2-Übersichtsartikel⁴⁵. Nach Meinung seiner Autoren ergänzt sich das dynamische Bild, das der statischen Holoenzymstruktur entspringt, vorzüglich mit ihren eigenen zellbiologischen Daten, wonach es nämlich signifikante Subpopulationen von CK2 α und CK2 β gibt, die unabhängig voneinander vom Cytoplasma in den Kern einer Zelle importiert werden, und wonach CK2 α im Gegensatz zu CK2 β sogar wieder exportiert werden kann³⁸⁹.

Diese Passung von struktur- und zellbiologischen Daten im Sinne einer dynamischen Wechselwirkung zwischen den CK2-Untereinheiten sei - so die Autoren - angesichts des traditionellen Bildes vom extrem stabilen CK2-Holoenzym verblüffend. Sie werde - wie es bereits im Titel heißt⁴⁵ - zu einem „new view of an old molecular complex“ führen und sie werfe insbesondere ein neues Licht auf die alten Fragen nach der CK2-Funktion und -Regulation, weil künftig immer die Existenz einer mehr oder weniger großen CK2 α -Population beachtet werden müsse. Wenn es beispielsweise mit CK2 α und dem CK2-Holoenzym zwei Formen von CK2-Aktivität gebe, die sich in ihren Substratspezifitäten deutlich unterschieden, dann würden Veränderungen ihres Konzentrationsverhältnisses, wie sie möglicherweise aufgrund regulatorischer Signale induziert würden, zu signifikanten Verschiebungen im „Phosphoproteom“ führen.

22.2.3 CK2 im Überlebenskampf der Zelle - Die Holoenzymstruktur paßt zur Rolle der CK2 bei der Herabregulation der RNA-Polymerase-III unter Zellstressbedingungen

Im Jahre 2001 berichteten Ghavidel & Schultz³⁹⁰, daß CK2 in Hefe eine wichtige Rolle spielt, wenn die DNA-Transkription durch RNA-Polymerase-III bei Gefahr von DNA-Schäden durch UV-Licht oder bestimmte Chemikalien herabreguliert wird. Im Normalfall ist CK2 über sein CK2 β -Dimer mit dem RNA-Polymerase-III-Komplex - genauer gesagt mit dem Transkriptionsfaktor TFIIIB - assoziiert und aktiviert ihn durch Phosphorylierung an einer TFIIIB-Komponente, dem sogenannten „TATA-bindenden Protein“³⁹¹. Unter Stressbedingungen jedoch sinkt die Aktivität des Polymerase-Komplexes um 80 bis 90 %, und zwar offenbar dadurch, daß die CK2 α -Monomere freigesetzt werden³⁹⁰.

Nach dem klassischen Bild vom CK2-Holoenzym wäre ein solches Szenario recht unwahrscheinlich gewesen. Die geringe Größe der α/β -Kontaktfläche jedoch läßt es plausibel erscheinen. Zwar konnten Ghavidel & Schultz³⁹⁰ die Holoenzymstruktur, die fast zeitgleich mit ihrer Studie publiziert wurde, noch nicht in diesem Sinne in ihre Diskussion einfließen lassen, dies hat jedoch Pinna⁴⁹ bald darauf nachgeholt, so daß dieser Fall als eine gelungene Korrelation von chemischer Struktur und biologischer Funktion gelten kann.

Allerdings ist diese Bewertung mit einem gewissen Vorbehalt zu versehen. Zwar gilt heute als sicher, daß der CK2 eine zentrale Rolle als Mediator beim Überlebenskampf einer Zelle unter Stressbedingungen und speziell bei der Reaktion auf DNA-Schäden spielt⁵⁰, aber viele Einzelheiten sind dabei nicht geklärt oder strittig. So berichteten Johnston *et al.*³⁹², daß CK2 auch in Säugerzellen durch Bindung und Phosphorylierung des RNA-Polymerase-III-Komplexes die von ihm katalysierte DNA-Transkription stimuliert, aber ob dieser Prozeß unter UV-Stress herabgesetzt wird, indem CK2 α freigesetzt wird, blieb dabei offen. Hu *et al.*³⁹³ schließlich fanden in einem zellfreien System neben positiven auch

negative regulatorische Effekte von CK2 auf die RNA-Polymerase-III-katalysierte DNA-Transkription.

Doch nicht nur die Aktivität der RNA-Polymerase-III - sie ist in eukaryontischen Zellen nur einer von drei verschiedenen Enzymkomplexen zur DNA-Transkription - wird unter starkem UV-Streß herabgesetzt, der gesamte Zellzyklus wird angehalten. Eine Schlüsselrolle kommt dabei dem Tumorsuppressor-Protein p53 zu, einem Transkriptionsfaktor der RNA-Polymerase-II, bei dem verschiedene Streßsignale zusammenlaufen³⁹⁴. Normalerweise ist p53 kurzlebig und kommt nur in geringen Konzentrationen vor. Unter Streßbedingungen jedoch wird es im Zellkern akkumuliert und aktiviert. Die Folge ist, daß die Expression von über 150 Genen - darunter eine Fülle von zellzyklusrelevanten Genen - induziert oder inhibiert wird³⁹⁵. Bei dieser Aktivierung spielen Phosphorylierungen und andere posttranslationale Modifikationen eine wichtige Rolle.

So konnten Keller *et al.*³⁹⁶ zeigen, daß sich nach UV-Einwirkung ein Komplex bildet, der humanes p53 spezifisch an Ser392 phosphoryliert und damit aktiviert und der sowohl CK2 als auch den sogenannten FACT-Komplex enthält. In einer Folgearbeit nutzten sie die CK2-Holoenzymstruktur, um ein Modell dieses p53-Ser392-Kinase-Komplexes vorzustellen³⁹⁷. Zwar war schon vorher bekannt, daß p53 durch CK2 an Ser392 phosphoryliert werden kann³⁹⁸, aber nach Assoziation mit dem FACT-Komplex erlangt p53 eine deutliche Präferenz gegenüber anderen Substraten einschließlich Casein. Wir haben hier also ein Beispiel dafür vorliegen, wie assoziierende Proteine - hier der FACT-Komplex - die Substratspezifität von CK2 in funktionell bedeutsamer Weise verändern können.

Ein dritter Transkriptionsfaktor nach TFIIB und p53, der sowohl mit CK2 als auch mit der UV-Streßantwort verbunden ist, ist der „Nukleare Faktor“ NF- κ B, ein Heterodimer aus einer Untereinheit zur DNA-Bindung und einer zweiten zur Aktivierung der Transkription gewisser Gene, die den programmierten Zelltod (Apoptose) hemmen. Sein Kürzel rührt daher, daß er bei einer Studie zur Expression von Immunglobulinen in B-Lymphozyten gefunden wurde als ein Proteinkomplex, der sich an sogenannte Enhancer-DNA-Elemente für leichte Immunglobulinketten vom κ -Typ binden kann³⁹⁹. Unter Normalbedingungen allerdings liegt NF- κ B inaktiv im Cytosol vor, nämlich größtenteils verankert an Inhibitormoleküle (I κ Bs), die die NLS-Signale der NF- κ B-Komplexe abschirmen.

Die meisten Stimuli, die zur Aktivierung von NF- κ B führen, benutzen dabei eine I κ B-Kinase, durch die die I κ Bs im N-terminalen Bereich phosphoryliert werden. Anschließend werden sie ubiquitinabhängig abgebaut, was zur Freisetzung der NF- κ B-Dimere und zu deren Translokation in den Zellkern führt. Auch durch niedrige UV-Dosen wird der I κ B-Abbau stimuliert, und zwar ebenfalls über den Ubiquitin-Proteasom-Weg; vermittelt wird dieser Prozeß in diesem Falle allerdings nicht durch die typische I κ B-Kinase, sondern, wie erst kürzlich festgestellt wurde, über eine CK2-katalysierte Phosphorylierung im C-terminalen Bereich⁴⁰⁰. Stromaufwärts von CK2 beinhaltet diese Signalkette außerdem die MAP-Kinase p38 γ , von der schon länger bekannt ist, daß sie in aktiver Form und nach Streßinduktion CK2 durch Komplexbildung - also nicht durch Phosphorylierung - stimulieren kann⁴⁰¹.

Im Endeffekt führt dieses Signal dazu, daß der Zellzyklus angehalten und die Apoptose verhindert wird. Die Zelle erhält somit Zeit, eventuell eingetretene DNA-Schäden zu beheben, wobei seit kurzem bekannt ist, daß CK2 dabei auch eine unmittelbare Rolle spielt: Sie phosphoryliert ein „Gerüstprotein“ und bewirkt dadurch, daß ein Enzymkomplex zusammengelagert und aktiviert wird, der Brüche in DNA-Einzelsträngen repariert⁴⁰².

Es sei an dieser Stelle angemerkt, daß sich die anti-apoptotische Wirkung von CK2 nicht nur im Zu-

sammenhang mit dem NF- κ B/I κ B-System offenbart, sondern in den vergangenen Jahren zu einem wesentlichen Schwerpunkt der CK2-Forschung geworden ist. Die mittlerweile gut dokumentierte Rolle von CK2 bei der Hemmung der Apoptose ist daher ein Hauptthema der beiden Übersichtsartikel von Litchfield⁴⁷ und Ahmed *et al.*⁵⁰. Daß umgekehrt die Hemmung von CK2 den Zelltod auslösen kann, wurde von Ruzzene *et al.*⁴⁰³ durch den Einsatz von 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol gezeigt.

22.2.4 CK2 β als Ankerprotein - Interaktionen ohne Konkurrenz mit CK2 α

Die Komplexe aus FACT und CK2 oder aus TFIIIB und CK2 sind Beispiele für eine Tendenz, die wir bereits im Kap. 13.6.6 kennengelernt haben: CK2 wirkt nicht nur in katalytischen Mengen als Enzym, sondern in vielen Fällen als stöchiometrischer Interaktionspartner, der stabile Komplexe mit seinen Substraten oder auch mit anderen Proteinen bilden kann. Diese erstmals 1999 von Guerra & Issinger⁵⁴ zusammenfassend dargestellte Tendenz hat sich in den vergangenen Jahren noch verstärkt. Dazu haben nicht nur die obengenannten und viele weitere Einzelbeispiele beigetragen, sondern vor allem auch „globale“ Ansätze. So untersuchten Gavin *et al.*⁴⁰⁴ 232 Komplexe aus dem Hefeproteom und fanden dabei sieben Multiproteinkomplexe mit mindestens zwei CK2-Untereinheiten und außerdem zwei weitere, die nur CK2 α enthielten.

Schon die Auflistung von Guerra & Issinger⁵⁴ legte nahe, daß in vielen Fällen das CK2 β -Dimer die entscheidenden Kontakte herstellt. Detaillierte Erklärungen gibt es dafür bisher nicht, da bislang keine Strukturanalysen von Komplexen aus CK2 β oder dem CK2-Holoenzym mit anderen Proteinen vorliegen^a. Dennoch kann festgestellt werden - vor allem Ahmed *et al.*⁵⁰ argumentieren in ihrer Übersicht in diese Richtung -, daß erstens durch die langgestreckte Form des CK2 β -Dimers und zweitens durch die geringe Abdeckung von CK2 β durch CK2 α im Holoenzym sehr viel Oberfläche für weitergehende Kontakte zur Verfügung steht. Einzelheiten dieser Interaktionen werden - und darin wird eine der zentralen Aufgaben der Strukturbiologie im Rahmen der künftigen CK2-Forschung bestehen - durch Strukturanalysen funktioneller Komplexe offenbart werden.

22.2.5 CK2 β als Bindungspartner verschiedener Proteinkinasen - CK2 α -kompetitive Interaktionen

Das Thema „CK2 β als Interaktionspartner“ hat jedoch noch einen zweiten Aspekt: Während die im vorangegangenen Abschnitt angesprochenen Interaktionen den α/β -Kontakt unangetastet lassen, gibt es auch CK2 α -kompetitive Wechselwirkungen. Dieser Punkt wurde bereits im Kap. 21.2.5 angesprochen im Zusammenhang mit der Lokalisation des α/β -Kontaktes auf der CK2 α -Oberfläche: Weil für diesen Kontakt nicht etwa individuell geformte Schleifenbereiche, sondern vielmehr das hochkonservierte β -Faltblatt der N-terminalen Domäne mit seiner hydrophoben Außenseite verantwortlich ist, liegt die Idee nahe, daß CK2 β in gleicher Weise an andere Proteinkinasen der EPK-Superfamilie andocken kann.

Als diese Hypothese in der Strukturpublikation des CK2-Holoenzym erstmals geäußert wurde (s. Anhang 6)³²¹, waren bereits die beiden MAP-Kinase-Kinase-Kinasen A-Raf^{293,294} und c-Mos²⁹⁵ bei Hefe-

^aDies wird sich allerdings in absehbarer Zeit ändern, denn es wurden bereits die Atomkoordinaten eines Komplexes aus C-terminal verkürzter CK2 β und einem Peptid aus dem bekannten CDK2-Inhibitor p21^{WAF1} in der Proteinstrukturdatenbank abgelegt (Code 1RQF). Diese Koordinaten sind noch nicht freigegeben, und eine zugehörige Strukturpublikation existiert ebenfalls noch nicht.

2-Hybridstudien als Interaktionspartner von CK2 β identifiziert worden. Im Falle von c-Mos wurde mittlerweile bestätigt, daß wie bei CK2 α die N-terminale Domäne den Kontakt zu CK2 β herstellt⁴⁰⁵. Als weitere EPK mit Affinität zu CK2 β ist in jüngerer Zeit die „Checkpoint“-Kinase 1 (CHK1) hinzugekommen. CHK1 dient dazu, den Zellzyklus im Falle von Schäden an der DNA in der G2-Phase zu arretieren. Guerra *et al.*⁴⁰⁶ konnten zeigen, daß CK2 β *in vivo* mit CHK1 assoziiert, daß für diese Wechselwirkung wie bei derjenigen mit CK2 α der C-terminale CK2 β -Schwanz verantwortlich ist und daß die CHK1-Aktivität zumindest *in vitro* durch CK2 β gesteigert wird.

Auffälligerweise ist der entscheidende Oberflächenbereich in CHK1 tatsächlich mit Charakteristika ausgestattet, die in Kap. 21.2.5 als weitergehende Voraussetzungen für die Bindung an CK2 β genannt wurden: Die β -Faltblatt-Gelenkpfanne ist nämlich sowohl sterisch zugänglich als auch hydrophob. Drei der vier Hauptkontaktseitenketten in Abb. 31 sind im Vergleich zwischen *hsCK2 α* und CHK1 aus *Homo sapiens* absolut konserviert. Lediglich Phe54 ist gegen Glutamin (Gln24) ersetzt. Glutamin ist zwar eine hydrophile Aminosäure, jedoch ist im Falle des Gln24 aus CHK1 der polare Kopf so geneigt (Abb. 31), daß der aliphatisch-hydrophobe Zwischenabschnitt zur Hydrophobizität der potentiellen CK2 β -Bindungsmulde beitragen kann.

Für die Zukunft liegt es also nahe, CK2 β im Komplex mit CHK1 oder einer anderen interagierenden EPK zu produzieren und zu kristallisieren. Sollte das gelingen, so wäre das ein starkes Indiz dafür, daß die Bedeutung von CK2 β als Ankerprotein für eukaryontische Proteinkinasen über CK2 hinausgeht.

22.2.6 Die CK2-Holoenzymstruktur bei der Erklärung der CK2-Funktion im Tagesrhythmus

Auf eine interessante Funktion von CK2 stoßen wir durch eine Publikation, in der die Struktur des CK2-Holoenzym bei der Erklärung einer auffälligen Veränderung des 24-Stunden-Tagesrhythmus bei *Drosophila* herangezogen wurde⁴⁰⁷. Bereits 1991 war eine *Drosophila*-Mutante namens *Andante* beschrieben worden, die einen um ein bis zwei Stunden verlängerten Tagesrhythmus aufweist⁴⁰⁸. Akten *et al.*⁴⁰⁷ charakterisierten diese Mutante und fanden heraus, daß die entscheidende Veränderung das CK2 β -Gen betrifft, wodurch es zu einem Austausch von Met166 gegen Isoleucin kommt. Diese Position liegt in der Helix α F (Abb. 31) und ist integraler Bestandteil des α/β -Kontaktes, durch den CK2 α üblicherweise stimuliert wird.

Normalerweise besteht die Aufgabe von CK2 in diesem Zusammenhang darin, innerhalb bestimmter Nervenzellen und in Kooperation mit CK1 und GSK3 zwei Tagesrhythmusproteine, nämlich die Produkte der Gene „*period*“ und „*timeless*“ zu phosphorylieren⁴⁰⁹. Dadurch wird deren Transport vom Cytosol in den Zellkern gesteuert, wo sie die Transkription ihrer eigenen Gene unterdrücken. Durch diese negative Rückkopplung oszillieren die Konzentrationen dieser Proteine in jenen Nervenzellen normalerweise im 24-Stunden-Rhythmus. Die Proteinkinasen wirken dabei nicht gleichsinnig: Während CK1 den nuklearen Import der besagten Proteine bremst, wirken GSK3 und CK2 befördernd.

Akten *et al.*⁴⁰⁷ gehen nun davon aus, daß durch die von ihnen gefundenen CK2 β -Mutation ein Holoenzym mit etwas verminderter Aktivität entsteht. Dadurch - so die Vermutung - werden die Genprodukte von *timeless* und *period* weniger stark phosphoryliert, was zu einer Verlängerung des Tagesrhythmus' führt. Für diese Hypothese spricht, daß sie konsistent mit ähnlichen Ergebnissen auf Seiten von CK2 α ist: In einer zweiten *Drosophila*-Mutante mit verlängertem Tagesrhythmus und Namen *Timekeeper* war das CK2 α -Gen in einem Allel (Der homozygote Genotyp war nicht lebensfähig) so

verändert, daß u.a. Met161 (entsprechend Met163 in *hsCK2 α* ; s. Abb. 5) in Lysin ausgetauscht worden ist⁴¹⁰. In Anbetracht der Rolle, die dieses Methionin bei der Cosubstratbindung spielt (s. Abb. 26C/E) ist es unmittelbar plausibel, daß die Aktivität von *Timekeeper-CK2 α* vermindert ist, wie es Lin *et al.*⁴¹⁰ auch tatsächlich festgestellt haben.

Da sowohl CK1 als auch GSK3 Enzyme sind, die eine primäre Phosphorylierung ihrer Substrate durch andere Proteinkinasen bevorzugen, ist vermutet worden⁴⁰⁹, daß der CK2 diese Aufgabe einer Initialphosphorylierung zukommen könnte. Dieses funktionelle Motiv, die synergistische Wirkung von CK2 und GSK3, wird uns noch einmal im Zusammenhang mit der Regulation der Glycogensynthese begegnen, wo es sich um eine gesicherte Tatsache handelt.

22.3 Das Hypothesepotential der CK2 α -Strukturen

22.3.1 Konstitutiv aktive CK2 α , regulierbares CK2-Holoenzym?

Doch zunächst noch einmal kurz zurück zum Thema „CK2 und NF- κ B“: Neben der Einbindung von CK2 in den alternativen NF- κ B-Signalweg, der bei mildem UV-Streß benutzt wird, wurde über andere Beziehungen des Enzyms zu NF- κ B berichtet⁵⁰ wie z.B. über eine basale, d.h. nicht von extrazellulären Signalen abhängige Phosphorylierung von I κ B α ^{411,412}, die für dessen ständigen und funktionell wichtigen Umsatz sorgt. Wir sehen hier also, wie zwei Eigenschaften der CK2 an einer Stelle zusammenkommen und funktionell ineinander greifen: die konstitutive Aktivität, die mitwirkt, das ganze NF- κ B/I κ B-System intakt zu halten, und die partielle Stimulierbarkeit - in diesem Falle durch die MAP-Kinase p38 γ -, durch die CK2 bei der intrazellulären Verarbeitung eines spezifischen Signals mitwirkt.

Diese Doppelrolle des Enzyms schält sich zunehmend als funktionell bedeutend heraus: Es gibt Beispiele dafür, daß CK2 direkt in Signalketten eingebunden ist und dafür in einem gewissen Maße regulierbar sein muß; aber es gibt auch Fälle, bei denen die konstitutive Aktivität die entscheidende Eigenschaft ist, weil sie für eine mehr oder weniger gleichbleibende Grundphosphorylierung wesentlicher Proteine sorgt. Ein weiteres Beispiel hierfür wird im übernächsten Kapitel gegeben, wenn über die Rolle der CK2 bei der Regulation der Glycogensynthese berichtet wird.

Dieser funktionellen Doppelnatur der CK2 entspricht auch ihr strukturbiologisches Profil: Das Enzym basiert auf einer katalytischen Untereinheit, die auf Nichtregulierbarkeit optimiert wurde, indem erstens die regulatorischen Schlüsselemente Helix α C und Aktivierungsschleife intramolekular in aktiven Konformationen fixiert und indem zweitens regulatorische Anionenbindungsstellen zu reinen Substraterkennungsregionen umgestaltet und umfunktioniert wurden (s. Kap. 17.3.4).

Von Veränderungen in der interzellulären Konzentration und Verteilung abgesehen, wird CK2 α erst regulierbar oder zumindest modulierbar, indem es an CK2 β bindet. CK2 β läßt die aktive Konformation von CK2 α weitgehend unverändert, stellt aber neue Ansatzpunkte für Phosphorylierungen und Interaktionen bereit. In der Tat haben fast alle in der Geschichte der CK2-Forschung diskutierten Regulationsmechanismen ihren Angriffsort an CK2 β . Mit anderen Worten: CK2 β ist selbst ein Modulator der CK2 α -Aktivität und -Spezifität, aber es kann darüber hinaus als Anker für andere Proteine und als Vermittler subtilerer Regulationssignale dienen.

Strukturbiologisch nicht zu klären ist die nach wie vor offene Frage, inwieweit die Zelle von diesem Gewinn an Funktionalität durch Bildung eines Holoenzym tatsächlich Gebrauch macht. Festzuhalten

bleibt aber eine der wichtigsten Botschaften dieser Schrift: Die konstitutive Aktivität von CK2 ist nicht etwa das Ergebnis einer Wissenslücke, die nach Aufdecken eines bislang unbekanntes Regulationsmechanismus' geschlossen wird, sondern sie ist die Kerneigenschaft des Enzyms, durch die sie sich von der großen Mehrheit der eukaryontischen Proteinkinasen und insbesondere von ihren nächsten Verwandten in der CMGC-Familie unterscheidet.

22.3.2 CK2-Phosphorylierung: ein Fall von substrat-unterstützter Katalyse?

Doch die im Kap. 17.3.4 vorgestellte Kristallstruktur von *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵ im Komplex mit zwei Sulfationen paßt nicht nur vorzüglich zur konstitutiven Aktivität des Enzyms, sie legt auch eine weitergehende Hypothese nahe: Möglicherweise handelt es sich bei der durch CK2 katalysierten Phosphorylierung um eine Art substrat-unterstützte Katalyse.

Hintergrund dieser Idee ist die von Johnson *et al.*²⁸¹ herausgearbeitete Erkenntnis, daß „RD-Kinasen“ ein Anion nahe der Spitze der Aktivierungsschleife benötigen, um ihre volle Aktivität zu erlangen. Während CAPK, die CDKs oder die MAP-Kinasen durch Phosphorylierung zu dieser negativen Ladung gelangen, wird sie bei CK2 vom Substrat geliefert, nämlich durch eine anionische Seitenkette an der (p+3)-Position. Es sieht also so aus, als ob ein typisches CK2-Substrat nicht nur die Phosphoakzeptor-Aminosäure bereitstellt, sondern gleichzeitig das Enzym anionisch aktiviert.

Um diese Hypothese zu testen, müßte man beide Funktionen voneinander trennen: Möglicherweise wird ein Peptid, das mit der (p+1)- oder der (p+2)-Position endet, erst dann mit signifikanter Aktivität phosphoryliert, wenn an der Anionenbindungsstelle, die normalerweise die (p+3)-Position erkennt, ein externes Anion wie Sulfat oder Phosphat gebunden ist. Voraussetzung ist allerdings, daß ein solches Peptid auch ohne (p+3)-Position mit ausreichender Affinität an das Enzym gebunden wird. Entsprechende kinetische Untersuchungen sind gegenwärtig in Arbeit.

22.4 CK2 und Glycogenstoffwechsel - warum die Verschiebung der ersten Anionenbindungsstelle notwendig und sinnvoll war

Im Kap. 17.3.4 wurde gezeigt, wie die Anionenbindungsstelle an der Spitze Aktivierungsschleife in CK2 α im Vergleich zu den übrigen CMGC-Kinasen abgeschwächt und in Richtung des aktiven Zentrums verschoben wurde. Darüber hinaus wurde nahegelegt, daß dies der Grund für den entscheidenden Unterschied bei der Substraterkennung zwischen CK2 α und GSK3 ist: CK2 α bevorzugt eine einfach negative Ladung in (p+3)-Position, GSK3 dagegen eine doppelt negative Ladung (Phosphogruppe) in (p+4)-Position. Hier nun wird erklärt, wie wichtig dieses Detail ist, damit CK2 mit GSK3 kooperieren und trotz konstitutiver Aktivität im Rahmen einer Signaltransduktionskaskade mitwirken kann.

Zunächst sei noch einmal daran erinnert, daß in den 50er und 60er Jahren trotz der vorherigen Entdeckung der „Protein-Phosphokinase“ durch Burnett & Kennedy²² der Glycogenstoffwechsel der Katalysator für die Entwicklung der Proteinkinaseforschung war. Erst 1981 wurde klar, daß es eine Querbeziehung gibt, weil die Glycogensynthese zu den Substraten der CK2 gehört^{35,136}. Inzwischen ist bekannt, worin die funktionelle Bedeutung dieser Phosphorylierung besteht: Das Schlüsselenzym zur Regulation der Glycogensynthese ist GSK3⁴¹³. Ohne externen Stimulus hält GSK3 die Glycogensynthese in einem phosphorylierten Zustand, in dem sie inaktiv ist. Steigt der Zucker- und infolgedessen

der Insulingehalt des Blutes, so wird GSK3 durch die Proteinkinase B phosphoryliert und inaktiviert. Nunmehr bewirken Phosphatasen, daß Glycogensynthase durch Dephosphorylierung aktiviert wird.

Die Rolle der CK2 in diesem Szenario wurde bereits im Kap. 11.7.3 angedeutet: GSK3 phosphoryliert Glycogensynthase zwar vierfach, benötigt jedoch eine initiale Phosphorylierung vier Positionen N-terminal von seiner eigenen Phosphorylierungsstelle; für diese Grundphosphorylierung ist CK2 zuständig. Dafür braucht sie einerseits konstitutive Aktivität, andererseits aber auch die im Kap. 17.3.4 beschriebene Verschiebung der für die Substraterkennung entscheidenden Anionenbindungsstelle. Gäbe es nämlich keine klare Abgrenzung zur GSK3, so würde CK2 die Glycogensynthase vermutlich durchphosphorylieren und damit konstitutiv inaktivieren.

23 CK2 und Globalisierung

Die in den vorangegangenen Kapiteln angesprochenen und viele weitere Beispiele zeigen, daß CK2 eine wachsende Popularität unter Zellbiologen genießt, und zwar insbesondere auch bei solchen, die nicht zur klassischen „CK2-Szene“ gehören. Der Grund für diese Tendenz ist sicherlich die ausgeprägte Pleiotropie des Enzyms: Die Wahrscheinlichkeit, bei zellbiologischen Studien auf Phosphorylierungen zu stoßen, die auf CK2 zurückgehen und obendrein funktionell wichtig sind, ist offenbar so hoch, daß es mittlerweile eine Fülle von Forschungsbereichen gibt, in denen eine Mitwirkung der CK2 gesichert oder wahrscheinlich ist. Dazu zählen nicht nur Felder wie Zellzyklus, Signaltransduktion, Apoptose, DNA-Reparatur oder Tagesrhythmus, die hier bereits angesprochen worden sind, sondern auch Themen wie Virusinfektion⁵⁴, Neurophysiologie⁵², Proteinbiosynthese und -degradation⁴⁶ oder Zellkerntransport^{45,389}. In diesem Sinne könnte man CK2 als ein Enzym mit globaler Wirkung bezeichnen.

Dieser Eindruck wird verstärkt durch die globalen Forschungsansätze, wie sie seit einigen Jahren verfolgt werden. Durch sie deutet sich bereits an, daß die derzeitige Zahl von 307 dokumentierten CK2-Substraten noch einmal eine sprunghafte Steigerung erfahren wird. So umfaßt nach neueren Schätzungen das „Phosphoproteom“, die Gesamtheit der phosphorylierten Proteine, in eukaryontischer Zellen ein Drittel aller Genprodukte¹⁰, und nach einer massenspektrometrischen Analyse des Phosphoproteoms von Hefe könnte ein Viertel davon auf die Aktivität von CK2 zurückgehen⁴¹⁴. Vielleicht haben Meggio & Pinna⁴⁶ recht mit ihrer Vermutung, daß CK2 durch diese extreme Pleiotropie in Verbindung mit der konstitutiven Aktivität wie keine andere Proteinkinase dazu beiträgt, das Phosphoproteom auf einem lebenswichtigen Niveau zu halten, und daß sie daher mit keiner der klassischen Proteinkinasen zu vergleichen ist, die für spezifische Zwecke an- und abgeschaltet werden können.

Zusätzlich zu und korreliert mit ihrer globalen Rolle auf Proteomebene scheint CK2 auch eine globale Funktion bei der Regulation der Genexpression zu besitzen. Zu diesem Schluß kommen Barz *et al.*⁴¹⁵ in einer Studie, für die sie die Genexpression von Hefe-Deletionsstämmen für CK2 α und CK2 β im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Stämmen untersucht haben, und zwar mit Zellen, die nach Arretierung in der G0-Phase erneut in den Zellzyklus entlassen wurden. Es ergab sich, daß etwa ein Viertel der ca. 900 Gene, die in Hefe zellzyklusabhängig reguliert werden, in ihrer Expression durch CK2 beeinflusst werden und in Beziehung zu jenem Wiedereintritt in den Zellzyklus stehen. Insgesamt scheint CK2 nicht in erster Linie lokal auf einzelne Transkriptionskontrollprozesse, sondern vielmehr

auf globale Vorgänge wie Umstrukturierungen im Chromatin einzuwirken.

24 Ein Schlußwort

Kommen wir zu einer Schlußbewertung: In dieser Schrift wird die CK2-Forschung, also ein klassisches biochemisch-zellbiologisches Gebiet nach strukturbiologischen Kriterien eingeteilt: in eine Zeit vor den relevanten 3D-Strukturen und in eine Zeit danach. Diese Praxis ist - wie jede Gliederung eines historischen Prozesses - willkürlich und entsprechend zweifelhaft, zumal unschwer nachzuweisen ist, daß auch nach Publikation der relevanten Kristallstrukturen ein Großteil der CK2-Forschung ohne 3D-Information ausgekommen ist. Auch die beiden berühmtesten Fälle aus der übrigen Proteinkinaseforschung, der der CAPK und der der CDKs, zeigen: 3D-Strukturen kamen erst ins Spiel, als die nobelpreisgewürdigten Entdeckungen längst publiziert waren.

Selbst das markanteste historische Beispiel für eine strukturbiologisch motivierte Zäsur, das der DNA-Doppelhelix, ist nicht so eindeutig, wie es zunächst erscheint. Aus heutiger Sicht ist zwar unbestritten, daß das 3D-Strukturmodell der DNA einen Epochenwechsel für die Genetik, ja für die gesamte Biologie bedeutet hat. Dennoch hat es in den 50er Jahren durchaus eine geraume Zeit gedauert, bis die Tragweite der Doppelhelix erkannt und allgemein akzeptiert wurde. Wenn also in der vorliegenden Schrift die CK2-Forschung nach strukturbiologischen Kriterien eingeteilt wurde, so kommt darin auch die Hoffnung des Verfassers zum Ausdruck, daß sich die seit 1998 publizierten Kristallstrukturen langfristig als Marksteine in der CK2-Forschung erweisen werden. Schon jetzt ist zumindest die Feststellung erlaubt, daß mit Hilfe dieser Strukturen zentrale Eigenschaften des Enzyms rationalisiert und einige angestaute Probleme gelöst werden konnten.

Als besonders eindrucksvoll erwies sich das Erklärungspotential der CK2-Strukturen bei der konstitutiven Aktivität, bei der dualen Cosubstratspezifität, bei der Dimerisierung von CK2 β über eine Zinkbindungsdomäne und bei der Architektur des CK2-Holoenzym. Darüber hinaus wurde hier dargelegt, daß den Strukturen ein Hypothesepotential innewohnt, das sich auch auf die spezifisch biologischen Aspekte der CK2-Forschung erstreckt. Dieses Hypothesepotential hat teilweise schon begonnen, sich zu entfalten, aber es verspricht vor allem für die Zukunft - und möglicherweise unter Mitwirkung der in dieser Schrift erstmals herausgearbeiteten Zusammenhänge - eine reiche wissenschaftliche Rendite.

Somit sind die CK2-Kristallstrukturen gerade durch ihre Einbettung in ein primär zellbiologisches und molekulargenetisches Umfeld besonders schöne Beispiele für das Vermögen biomolekularer 3D-Strukturen, Fragen zu beantworten, aber gleichzeitig neue aufzuwerfen. Darin liegt ihr besonderer wissenschaftlicher Wert, denn - so Kim Nasmyth in seinem spannenden und bereits im Kap. 11.1 zitierten Essay über die Entdeckung der CDKs und der Cycline¹⁰² - „die wirklichen Kennzeichen der Naturwissenschaften sind nicht Kriterien wie die Poppersche Falsifizierbarkeit, denn diese sind genauso auch auf andere Arten von Untersuchungen anwendbar, die sich in ewigen Zirkeln zu bewegen scheinen... Es ist [vielmehr] die Fähigkeit, Kettenreaktionen von Fragen und Antworten zu erzeugen, die die Naturwissenschaften von anderen Formen des Denkens unterscheidet.“ Dem ist nichts hinzuzufügen.

Literaturliste

1. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucl. Acids Res.* **28**, 235-242.
2. Hanks, S. K. & Hunter, T. (1995). The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576-596.
3. Kraulis, P. J. (1997). Molscript: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **24**, 946-950.
4. Merritt, E. A. & Bacon, D. J. (1997). Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Meth. Enzymol.* **277**, 505-524.
5. Esnouf, R. M. (1997). An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J. Mol. Graphics* **15**, 132-134.
6. Schomburg, D. & Reichelt, J. (1988). BRAGI: a comprehensive protein modelling program system. *J. Mol. Graphics* **6**, 161-165.
7. Costas, A. M. G., White, A. K. & Metcalf, W. W. (2001). Purification and characterization of a novel phosphorus-oxidizing enzyme from *Pseudomonas stutzeri* WM88. *J. Biol. Chem.* **276**, 17429-17436.
8. Schink, B. & Friedrich, M. (2000). Phosphite oxidation by sulphate reduction. *Nature* **406**, 37.
9. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CNB) (1977). Nomenclature of phosphorus-containing compounds of biochemical importance. *Eur. J. Biochem.* **79**, 1-9.
10. Ahn, N. G. & Resing, K. A. (2001). Toward the phosphoproteome. *Nature Biotechnol.* **19**, 317-318
11. Cheek, S., Zhang, H. & Grishin, N. V. (2002). Sequence and structure classification of kinases. *J. Mol. Biol.* **320**, 855-881.
12. Rubin, G. M. *et al.* (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **287**, 2204-2215.
13. Kennelly, P. J. (2002). Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* **206**, 1-8.
14. Mecham, D. K. & Olcott, H. S. (1949). Phosvitin, the principal phosphoprotein of egg yolk. *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 3670-3679.
15. Hammarsten, O. (1883). Zur Frage, ob das Casein ein einheitlicher Stoff sei. *Z. Physiol. Chem.* **7**, 227-273.
16. Davidson, J. N., Frazer, S. C. & Hutchison, W. C. (1951). Phosphorus compounds in the cell. 1. Protein-bound phosphorus fractions studied with the aid of radioactive phosphorus. *Biochem. J.* **49**, 311-321
17. Perlmann, G. E. (1955). The nature of phosphorus linkages in phosphoproteins. *Adv. Prot. Chem.* **10**, 1-30
18. Kennedy, E. P. & Smith, S. W. (1954). The isolation of radioactive phosphoserine from "phosphoprotein" of the Ehrlich ascites tumor. *J. Biol. Chem.* **207**, 153-163

19. Lipmann, F. & Levene, P. A. (1932). Serinephosphoric acid obtained on hydrolysis of vitellinic acid. *J. Biol. Chem.* **98**, 109-114.
20. De Verdier, C. H. (1952). Isolation of phosphothreonine from bovine casein. *Nature* **170**, 804-805.
21. Duclos, B., Marcandier, S & Cozzone, A. J. (1991). Chemical properties and separation of phosphoamino acids by thin-layer chromatography and/or electrophoresis. *Meth. Enzymol.* **201**, 10-21.
22. Burnett, G. & Kennedy, E. P. (1954). The enzymatic phosphorylation of proteins. *J. Biol. Chem.* **211**, 969-980
23. Krebs, E. G. & Fischer, E. H. (1956). The phosphorylase-b to -a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 150-157.
24. Walsh, D. A., Perkins, J. P. & Krebs, E. G. (1968). An adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **243**, 3763-3774.
25. Watson, J. D. & Crick, F. H. C. (1953). A structure of deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737-738.
26. Knighton, D.R., Zheng, J., Ten Eyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N. H., Taylor, S. S. & Sowadski, J. M. (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**, 407-414.
27. Niefind, K., Guerra, B., Pinna, L. A., Issinger, O.-G. & Schomburg, D. (1998). Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays* at 2.1 Å resolution. *EMBO J.* **17**, 2451-2462.
28. Ahmed, K., Issinger, O.-G., Marshak, D. R. & Pyerin, W. (1994). Editorial. *Cell. Mol. Biol. Res.* **40**, 371-372
29. Rabinowitz, M. & Lipmann, F. (1960). Reversible phosphate transfer between yolk phosphoprotein and adenosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* **235**, 1043-1050.
30. Rodnight R. & Lavin, B. E. (1964). Phosvitin kinase from brain: activation by ions and subcellular distribution. *Biochem. J.* **93**, 84-91.
31. Rubin, C. S. & Rosen, O. M. (1975). Protein phosphorylation. In: Snell, E. E., Boyer, P. D., Meister, A. & Richardson, C. C. (Hrsg.). *Ann. Rev. Biochem.* **44**, 831-887.
32. Thornburg, W. & Lindell, T. J. (1977). Purification of rat liver nuclear protein kinase NII. *J. Biol. Chem.* **252**, 6660-6665.
33. Hosey, M. M. & Tao, M. (1977). Protein kinases of rabbit and human erythrocyte membranes. Solubilization and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* **482**, 348-357.
34. Dahmus, M. E. & Natzle, J. (1977). Purification and characterization of Novikoff ascites tumor protein kinase. *Biochemistry* **16**, 1901-1908.
35. DePaoli-Roach, A. A., Roach, P. J., Pham, K., Kramer, G. & Hardesty, B. (1981). Phosphorylation of glycogen synthase and of the β subunit of eukaryotic initiation factor two by a common protein kinase. *J. Biol. Chem.* **256**, 8871-8874.

36. Cohen, P., Yellowlees, D., Aitken, A., Donella-Deana, A., Hemmings, B. A. & Parker, P. J. (1982). Separation and characterisation of glycogen synthase kinase 3, glycogen synthase kinase 4 and glycogen synthase kinase 5 from rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* **124**, 21-35.
37. Woodgett, J. R. & Cohen, P. (1984). Multisite phosphorylation of glycogen synthase. Molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-II (glycogen synthase kinase-5). *Biochim. Biophys. Acta* **788**, 339-347.
38. Kumon, A. & Villar-Palasi, C. (1979). Purification and properties of troponin T kinase from rabbit skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **566**, 305-320.
39. Gusev, N. B., Dobrovolskii, A. B. & Severin, S. E. (1980). Isolation and some properties of troponin T kinase from rabbit skeletal muscle. *Biochem. J.* **189**, 219-226.
40. Villar-Palasi, C. & Kumon, A. (1981). Purification and properties of dog cardiac troponin T kinase. *J. Biol. Chem.* **256**, 7409-7415.
41. Deana, A. D., Meggio, F., Pinna, L. A. & Moret, V. (1978). Different susceptibility of whole casein components to enzymatic phosphorylation by two forms of rat liver 'casein kinase'. *Biochim. Biophys. Acta* **524**, 316-326.
42. Cochet, C. & Chambaz, E. M. (1983). Oligomeric structure and catalytic activity of G type casein kinase. Isolation of the two subunits and renaturation experiments. *J. Biol. Chem.* **258**, 1403-1406.
43. Pinna, L. A. (1990). Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation? *Biochim. Biophys. Acta* **1054**, 267-284.
44. Tuazon, P. T. & Traugh, J. A. (1991). Casein kinases I and II - multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation. In: Greengard, P. & Robinson, G. A., eds. *Advances in second messengers and phosphoprotein research.*, Bd. 23, New York, Raven Press Ltd., 123-164.
45. Filhol, O., Martiel, J.-L. & Cochet, C. (2004). Protein kinase CK2: a new view of an old molecular complex. *EMBO Rep.* **5**, 351-355.
46. Meggio, F. & Pinna, L. A. (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.* **17**, 349-368.
47. Litchfield, D. W. (2003). Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem. J.* **369**, 1-15.
48. Pinna, L. A. (2003). The raison d'etre of constitutively active protein kinases: the lesson of CK2. *Acc. Chem. Res.* **36**, 378-384.
49. Pinna, L. A. (2002). Protein kinase CK2: a challenge to canons. *J. Cell Sci.* **115**, 3873-3878.
50. Ahmed, K., Gerber, D. A. & Cochet, C. (2002). Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol.* **12**, 226-230.
51. Riera, M., Peracchia, G., Pages, M. (2001). Distinctive features of plant protein kinase CK2. *Mol. Cell. Biochem.* **227**, 119-127.

52. Blanquet, P. R. (2000). Casein kinase 2 as a potentially important enzyme in the nervous system. *Progr. Neurobiol.* **60**, 211-246.
53. Faust, M. & Montenarh, M. (2000). Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function? *Cell. Tissue Res.* **301**, 329-40.
54. Guerra, B. & Issinger, O.-G. (1999). Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis* **20**, 391-408.
55. Glover, C. V. (1998). On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **59**, 95-133.
56. Allende, C. C. & Allende, J. E. (1998). Promiscuous subunit interactions: a possible mechanism for the regulation of protein kinase CK2. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **30/31**, 129-136.
57. Pinna, L. A. & Meggio, F. (1997). Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation. *Progr. Cell Cycle Res.* **3**, 77-97.
58. Allende, J. E. & Allende, C. C. (1995). Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J.* **9**, 313-323.
59. Pinna L. A. (1994). A historical view of protein kinase CK2. *Cell. Mol. Biol. Res.* **40**, 383-390.
60. Issinger, O.-G. (1993). Casein kinases: pleiotropic mediators of cellular regulation. *Pharmac. Ther.* **59**, 1-30.
61. Hathaway, G. M. & Traugh, J. A. (1982). Casein kinases - multipotential protein kinases. *Curr. Topics Cell. Reg.* **21**, 101-127.
62. Bingham, E. W., Farrell, H. M. jr. & Basch, J. J. (1972). Phosphorylation of casein. Role of the golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* **247**, 8193-8194.
63. Mackinlay, A. G., West, D. W. & Manson, W. (1977). Specific casein phosphorylation by a casein kinase from lactating bovine mammary gland. *Eur. J. Biochem.* **76**, 233-243.
64. Kennedy, E. P. (1992). Sailing to Byzantium. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 1-28.
65. Cohen, P. (2002). The origins of protein phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* **4**, E127-E130.
66. Cori, G. T. & Green, A. A. (1943). Crystalline muscle phosphorylase. II. Prosthetic group. *J. Biol. Chem.* **151**, 31-48.
67. Madsen, N. B. (1986). Glycogen phosphorylase. In *The Enzymes, Third Edition, Volume XVII: Control by Phosphorylation, Part A* (Boyer, P. D. & Krebs, E. G., eds), 365-394, Academic Press, London.
68. Krebs, D. G., Kent, A. B. & Fischer, E. H. (1958). The muscle phosphorylase b kinase reaction. *J. Biol. Chem.* **231**, 73-83.
69. Meyer, W. L., Fischer, E. H. & Krebs, E. G. (1964). Activation of skeletal muscle phosphorylase b kinase by Ca^{2+} . *Biochemistry* **3**, 1033-1039.
70. Sutherland E. W. & Wosilait, W. D. (1955). Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature* **175**, 169-170.
71. Sutherland, E. W. & Cori, C. F. (1951). Effect of hyperglycemic-glycogenolytic factor and epinephrine on liver phosphorylase. *J. Biol. Chem.* **218**, 531-543.

72. Sutherland, E. W. & Rall, T. W. (1957). The properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg⁺⁺, and epinephrine or glucagon. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3608-3608.
73. Sutherland, E. W. & Rall, T. W. (1958). Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J. Biol. Chem.* **232**, 1065-1076.
74. Nolan, C., Novoa, W. B., Krebs, E. G. & Fischer, E. H. (1964). Further studies on the site phosphorylated in the phosphorylase *b* to *a* reaction. *Biochemistry* **3**, 542-551.
75. Krebs, E. G., Graves, D. J. & Fischer, E. H. (1959). Factors affecting the activity of muscle phosphorylase b kinase. *J. Biol. Chem.* **234**, 2867-2873.
76. Rosell-Perez, M., Villar-Palasi, C. & Larner, J. (1962). Studies on UDPG-glycogen transglucosylase. I. Preparation and differentiation of two activities of UDPG-glycogen transglucosylase from rat skeletal muscle. *Biochemistry* **1**, 763-768.
77. Niefind, K., Pütter, M., Guerra, B., Issinger, O.-G. & Schomburg, D. (1999). GTP plus water mimics ATP in the active site of protein kinase CK2. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 1100-1103.
78. Traugh, J. A. & Traut, R. R. (1974). Characterization of protein kinases from rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.* **249**, 1207-1212.
79. Heald, P. J. (1957). Guanosine di- and tri-phosphates in the phosphate metabolism of cerebral tissues promoted by electrical pulses. *Biochem. J.* **67**, 529-536.
80. Grankowski, N., Boldyreff, B. & Issinger, O.-G. (1991). Isolation and characterization of recombinant human casein kinase II subunits alpha and beta from bacteria. *Eur. J. Biochem.* **198**, 25-30.
81. Pinna, L. A., Baggio, B., Moret, V. & Siliprandi, N. (1969). Isolation and properties of a protein kinase from rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* **178**, 199-201.
82. Hathaway, G. M. & Traugh, J. A. (1979). Cyclic nucleotide-independent protein kinases from rabbit reticulocytes. Purification of casein kinases. *J. Biol. Chem.* **254**, 762-768.
83. Huijing, F. & Larner, J. (1966). On the effect of adenosine 3',5' cyclophosphate on the kinase of UDPG:alpha-1,4-glucan alpha-4-glucosyl transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**, 259-263.
84. Picton, C., Aitken, A., Bilham, T. & Cohen, P. (1982). Multisite phosphorylation of glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Organisation of the seven sites in the polypeptide chain. *Eur. J. Biochem.* **124**, 37-45.
85. Gill, G. N. & Garren, L. D. (1969). On the mechanism of action of adrenocorticotrophic hormone: the binding of cyclic-3',5'-adenosine monophosphate to an adrenal cortical protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **63**, 512-519.
86. Brostrom, M. A., Reimann, E. M., Walsh, D. A. & Krebs, E. G. (1970). A cyclic 3',5'-amp-stimulated protein kinase from cardiac muscle. *Adv. Enzyme Regul.* **8**, 191-203.
87. Krebs, E. G. (1993). Nobel Lecture. Protein phosphorylation and cellular regulation I. *Biosci. Rep.* **13**, 127-142.

88. Langan, T. A. (1969). Action of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent histone kinase *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **244**, 5763-5765.
89. Walsh, D. A. & Van Patten, S. M. (1994). Multiple pathway signal transduction by the cAMP-dependent protein kinase. *FASEB J.* **8**, 1227-1236.
90. Shoji, S., Parmelee, D. C., Wade, R. D., Kumar, S., Ericsson, L. H., Walsh, K. A., Neurath, H., Long, G. L., Demaille, J. G., Fischer, E. H. & Titani, K. (1981). Complete amino acid sequence of the catalytic subunit of bovine cardiac muscle cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 848-851.
91. Zheng, J. H., Knighton, D. R., Parello, J., Taylor, S. S. & Sowadski, J. M. (1991). Crystallization of catalytic subunit of adenosine cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Methods Enzymol.* **200**, 508-521.
92. Feramisco, J. R., Glass, D. B. & Krebs, E. G. (1980). Optimal spatial requirements for the location of basic residues in peptide substrates for the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **255**, 4240-4245.
93. Grand, R. J., Shenolikar, S. & Cohen, P. (1981). The amino acid sequence of the delta subunit (calmodulin) of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. *Eur. J. Biochem.* **113**, 359-367.
94. Krebs, E. G. (1993). Protein Phosphorylation and Cellular Regulation I (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **32**, 1122-1129.
95. Kuo, J. F. & Greengard, P. J. (1970). Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. VI. Isolation and partial purification of a protein kinase activated by guanosine 3',5'-monophosphate. *J. Biol. Chem.* **245**, 2493-2498.
96. Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U. & Nishizuka Y. (1980). Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* **255**, 2273-2276.
97. Linn, T. C., Pettit, F. H. & Reed, I. J. (1969). Alpha-keto acid dehydrogenase komplex. X. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex from beef kidney mitochondria by phosphorylation and dephosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **62**, 234-241.
98. Popov, K. M., Kedishvili, N. Y., Zhao, Y., Shimomura, Y., Crabb, D. W., Harris, R. A. (1993). Primary structure of pyruvate dehydrogenase kinase establishes a new family of eukaryotic protein kinases. *J. Biol. Chem.* **268**, 26602-26606.
99. Rusch, H. P., Sachsenmaier, W., Behrens, K. & Gruter, V. (1966). Synchronization of mitosis by the fusion of the plasmodia of *Physarum polycephalum*. *J. Cell Biol.* **31**, 204-209.
100. Rao, P. N. & Johnson, R. T. (1970). Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature* **225**, 159-164.
101. Bradbury, E. M., Inglis, R. J., Matthews, H. R. & Langan, T. A. (1974). Molecular basis of control of mitotic cell division in eukaryotes. *Nature* **249**, 553-556.
102. Nasmyth, K. (2001). A price for proliferation. *Cell* **107**, 689-701.

103. Rous, P. (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* **13**, 397-411.
104. Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**, 1209-1211.
105. Temin, H. M. & Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous Sarcoma Virus. *Nature* **226**, 1211-1213.
106. Stehelin, D., Guntaka, R. V., Varmus, H. E. & Bishop, J. M. (1976). Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses. *J. Mol. Biol.* **101**, 349-365.
107. Walsh, D. A. & Krebs, E. G. (1973). Protein kinases. *The Enzymes*, 2. Aufl., Bd. 8, 555-581. (Boyer, Hrsg.)
108. Reimann, E. M., Walsh, D. A. & Krebs, E. G. (1971). Purification and properties of rabbit skeletal muscle adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* **246**, 1986-1995.
109. Traugh, J. A., Ashby, C. D. & Walsh, D. A. (1974). Criteria for the classification of protein kinases. *Meth. Enzymol.* **38**, 290-299.
110. Pinna, L. A. & Ruzzene, M. (1996). How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* **1314**, 191-225.
111. Kumar, R. & Tao, M. (1975). Multiple forms of casein kinase from rabbit erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **410**, 87-98.
112. Criss, W. E., Yamamoto, M., Takai, Y, Nishizuka, Y. & Morris, H. P. (1978). Requirement of polycations for the enzymatic activity of a new protein kinase-substrate complex from Morris hepatoma 3924A. *Cancer Res.* **38**, 3532-3539.
113. Mäenpää, P. H. (1977). Effects of polyamines and polyanions on a cyclic nucleotide-independent and a cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta* **498**, 294-305.
114. Hathaway, G. M. & Traugh, J. A. (1984). Kinetics of activation of casein kinase II by polyamines and reversal of 2,3-bisphosphoglycerate inhibition. *J. Biol. Chem.* **259**, 7011-7015.
115. Hathaway, G. M. & Traugh, J. A. (1984). Interaction of polyamines and magnesium with casein kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **233**, 133-138.
116. Meggio, F., Shugar, D. & Pinna, L. A. (1990). Ribofuranosyl-benzimidazole derivatives as inhibitors of casein kinase-2 and casein kinase-1. *Eur. J. Biochem.* **187**, 89-94.
117. De Moliner, E., Moro, S., Sarno, S., Zagotto, G., Zanotti, G., Pinna, L. A. & Battistutta, R. (2003). Inhibition of protein kinase CK2 by anthraquinone-related compounds. A structural insight. *J. Biol. Chem.* **278**, 1831-1836.
118. Kemp, B. E., Froscio, M., Rogers, A., Murray, A. W. (1975). Multiple protein kinases from human lymphocytes. Identification of enzymes phosphorylating exogenous histone and casein. *Biochem. J.* **145**, 241-249.

119. Baggio, B., Pinna, L. A., Moret, V. & Siliprandi, N. (1970). A simple procedure for the purification of rat liver phosphokinase. *Biochim. Biophys. Acta* **212**, 515-517.
120. Hathaway, G., Zoller, M. J. & Traugh, J. A. (1981). Identification of the catalytic subunit of casein kinase II by affinity labeling with 5'-*p*-fluorosulfonylbenzoyl adenosine. *J. Biol. Chem.* **256**, 11442-11446.
121. Litchfield, D. W., Lozeman, F. J., Piening, C., Sommercorn, J., Takio, K., Walsh, K. A. & Krebs, E. G. (1990). Subunit structure of casein kinase II from bovine testis. Demonstration that the α and α' subunits are distinct polypeptides. *J. Biol. Chem.* **265**, 7638-7644.
122. Chester, N., Yu, I. J. & Marshak, D. R. (1995). Identification and characterization of protein kinase CKII isoforms in HeLa cells. Isoform-specific differences in rates of assembly from catalytic and regulatory subunits. *J. Biol. Chem.* **270**, 7501-7514.
123. Heldin, P. (1987). Phosphorylation *in vitro* of human fibrinogen with casein kinase TS and characterization of phosphorylated sites. *Arch. Biochem. Biophys.* **257**, 269-275.
124. Pinna, L. A., Donella-Deana, A. & Meggio, F. (1979). Structural features determining the site specificity of a rat liver cAMP-independent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **87**, 114-120.
125. Desjardins, P. R., Lue, P. F., Liew, C. C. & Gornall, A. G. (1972). Purification and properties of rat liver nuclear protein kinases. *Can. J. Biochem.* **50**, 1249-1259.
126. Desjardins, P. R., Liew, C. C. & Gornall, A. G. (1975). Rat liver nuclear protein kinases. *Can. J. Biochem.* **53**, 354-363.
127. Stigare, J., Buddelmeijer, N., Pigon, A. & Egyhazi, E. (1993). A majority of casein kinase II alpha subunit is tightly bound to intranuclear components but not to the beta subunit. *Mol. Cell. Biochem.* **129**, 77-85.
128. Hosey, M. M. & Tao, M. (1976). An analysis of the autophosphorylation of rabbit and human erythrocyte membranes. *Biochemistry* **15**, 1562-1568.
129. Kübler, D., Pyerin, W. & Kinzel, V. (1982). Protein kinase activity and substrates at the surface of intact HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **257**, 322-329.
130. Pyerin, W., Burow, E., Michaely, K., Kübler, D. & Kinzel, V. (1987). Catalytic and molecular properties of highly purified phosphokinase/casein kinase type II from human epithelial cells in culture (HeLa) and relation to ecto protein kinase. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **368**, 215-227.
131. Issinger, O.-G., Benne, R., Hershey, J. W. B. & Traut, R. R. (1976). Phosphorylation *in vitro* of eukaryotic initiation factors IF-E2 and IF-E3 by protein kinases. *J. Biol. Chem.* **251**, 6471-6474.
132. Kramer, G. & Hardesty, B. (1981). Phosphorylation reactions that influence the activity of eIF-2. *Curr. Top. Cell. Regul.* **20**, 185-203.
133. Dobrovol'skii, A. B., Gusev, N. B., Martynov, A. V. & Severin, S. E. (1976). Search for a protein kinase specific for troponin T. *Biokhimiia* **41**, 1291-1296.
134. Cohen, P. (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation - a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 596-601.

135. Huang, K.-P., Itarte, E., Singh, T. J. & Akatsuka, A. (1982). Phosphorylation of glycogen synthase by cyclic AMP-independent casein kinase-2 from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **257**, 3236-3242.
136. DePaoli-Roach, A. A., Ahmad, Z. & Roach, P. J. (1981). Characterization of a rabbit skeletal muscle protein kinase (PC0.7) able to phosphorylate glycogen synthase and phosphovitin. *J. Biol. Chem.* **256**, 8955-8962.
137. Embi, N., Rylatt, D. B. & Cohen, P. (1980). Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur. J. Biochem.* **107**, 519-527.
138. Hemmings, B. A., Aitken, A., Cohen, P., Rymond, M. & Hofmann, F. (1982). Phosphorylation of the type-II regulatory subunit of cyclic-AMP-dependent protein kinase by glycogen synthase kinase 3 and glycogen synthase kinase 5. *Eur. J. Biochem.* **127**, 473-481.
139. DePaoli-Roach, A. A. (1984). Synergistic phosphorylation and activation of ATP-Mg-dependent phosphoprotein phosphatase by F_A /GSK-3 and casein kinase II (PC_{0.7}). *J. Biol. Chem.* **259**, 12144-12152.
140. Pena, J. M., Itarte, E., Domingo, A. & Cusso, R. (1983). Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate dependent and independent protein kinases in human leukemic cells. *Cancer Res.* **43**, 1172-1175.
141. Prowald, K., Fischer, H. & Issinger, O.-G. (1984). Enhanced casein kinase II activity in human tumor cell cultures. *FEBS Lett.* **176**, 479-483.
142. Schneider, H. R., Reichert, G. & Issinger, O.-G. (1986). Enhanced casein kinase II activity during mouse embryogenesis. *Eur. J. Biochem.* **161**, 733-738.
143. Johnson, L. N., Noble, M. E. M. & Owen, D. J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**, 149-158.
144. Meggio, F., Boldyreff, B., Issinger, O.-G. & Pinna, L. A. (1993). The autophosphorylation and p34^{cdc2} phosphorylation sites of casein kinase-2 β -subunit are not essential for reconstituting the fully-active heterotetrameric holoenzyme. *Biochem. Biophys. Acta* **1164**, 223-225.
145. Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M. & Vogt, P. K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* **260**, 170-173.
146. Levinson, A. D., Oppermann, H., Levintow, L., Varmus, H. E. & Bishop, J. M. (1978). Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein. *Cell* **15**, 561-572.
147. Collett, M. S. & Erikson, R. L. (1978). Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 2021-2024.
148. Erikson, R. L., Collett, M. S., Erikson, E. & Purchio, A. F. (1979). Evidence that the avian sarcoma virus transforming gene product is a cyclic AMP-independent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 6260-6264.
149. Collet, M. S., Purchio, A. F. & Erikson, R. L. (1980). Avian sarcoma virus-transforming protein, pp60^{src} shows protein kinase activity specific for tyrosine. *Nature* **285**, 167-169.

150. Hunter, T. & Cooper, J. A. (1985). Protein-tyrosine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 897-930.
151. Witte, O. N., Dasgupta, A. & Baltimore, D. (1980). Abelson murine leukaemia virus protein is phosphorylated in vitro to form phosphotyrosine. *Nature* **283**, 826-831.
152. Witte, O. N., Ponticelli, A., Gifford, A., Baltimore, D., Rosenberg, N. & Elder, J. (1981). Phosphorylation of the Abelson murine leukemia virus transforming protein. *J. Virol.* **39**, 870-878.
153. Carpenter, G., King, L. jr. & Cohen, S. (1979). Rapid enhancement of protein phosphorylation in A-431 cell membrane preparations by epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **254**, 4884-4891.
154. Ushiro, H. & Cohen, S. (1980). Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J. Biol. Chem.* **255**, 8363-8365.
155. Kasuga, M., Zick, Y, Blith, D. L. Karlsson, F. A., Haring, H. U. & Kahn, C. R. (1992). Insulin stimulation of phosphorylation of the β subunit of the insulin receptor. Formation of both phosphoserine and phosphotyrosine. *J. Biol. Chem.* **257**, 9891-9894.
156. Graziani, Y., Erikson, E. & Erikson, R. L. (1983). Characterization of the Rous Sarcoma Virus transforming gene product. *In vitro* phosphorylation with ATP and GTP as phosphate donors. *J. Biol. Chem.* **258**, 6344-6351.
157. Carpenter, G., King, L., jr. & Cohen, S. (1979). Rapid enhancement of protein phosphorylation in A-431 cell membrane preparations by epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **254**, 4884-4891.
158. Kemp, B. E. & Pearson, R. B. (1991). Design and use of peptide substrates for protein kinases. *Meth. Enzymol.* **200**, 121-134.
159. Glover, C. V., Shelton, E. R. & Brutlag, D. L. (1983). Purification and characterization of a type II casein kinase from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **258**, 3258-3265.
160. Rigobello, M. P., Jori, E., Carignani, G. & Pinna, L. A. (1982). Isolation and characterization of a type II casein kinase ('casein kinase-TS') from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **144**, 354-358.
161. Erdmann, H., Böcher, M. & Wagner, K. G. (1982). Two protein kinases from nuclei of cultured tobacco cells with properties similar to the cyclic nucleotide-independent enzymes (NI and NII) from animal tissue. *FEBS Lett.* **137**, 245-248.
162. Dahmus, G. K., Glover, C. V. C., Brutlag, D. L. & Dahmus, M. E. (1984). Similarities in structure and function of calf thymus and *Drosophila* casein kinase II. *J. Biol. Chem.* **259**, 9001-9006.
163. Dahmus, M. E. (1981). Calf thymus RNA polymerase I and II do not contain subunits structurally related to casein kinase I and II. *J. Mol. Biol.* **256**, 11239-11243.
164. Padmanabha, R. & Glover, C. V. C. (1987). Casein kinase II of yeast contains two distinct α polypeptides and an unusually large β subunit. *J. Mol. Biol.* **262**, 1829-1835.
165. Saxena, A., Padmanabha, R. & Glover, C. V. (1987). Isolation and sequencing of cDNA clones encoding alpha and beta subunits of *Drosophila melanogaster* casein kinase II. *Mol. Cell Biol.* **7**, 3409-3417.

166. Barker, W. C. & Dayhoff, M. O. (1982). Viral *src* gene products are related to the catalytic chain of mammalian cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2836-2839.
167. Hanks, S. K., Quinn, A. M. & Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**, 42-52.
168. Takio, K., Kuenzel, E. A., Walsh, K. A. & Krebs, E. G. (1987). Amino acid sequence of the β subunit of bovine lung casein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4851-4855.
169. Jakobi, R., Voss, H. & Pyerin, W. (1989). Human phosvitin/casein kinase type II. Molecular cloning and sequencing of full-length cDNA encoding subunit beta. *Eur. J. Biochem.* **183**, 227-233.
170. Heller-Harrison, R. A., Meisner, H. & Czech, M. P. (1989). Cloning and characterization of a cDNA encoding the β subunit of human casein kinase II. *Biochemistry* **28**, 9053-9058.
171. Livak, K. J. (1990). Detailed structure of the *Drosophila melanogaster* stellate gene and their transcripts. *Genetics* **124**, 303-316.
172. Bozzetti, M. P., Massari, S., Finelli, P., Meggio, F., Pinna, L. A., Boldyreff, B., Issinger, O.-G., Palumbo, G., Ciriaco, C., Bonaccorsi, S. & Pimpinelli, S. (1995). The *Ste* locus, a component of the parasitic *cry-Ste* system of *Drosophila melanogaster*, encodes a protein that forms crystals in primary spermatocytes and mimics properties of the β subunit of casein kinase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6067-6071.
173. Kalmykova, A. I., Dobritsa, A. A. & Gvozdev, V. A. (1997). The *Su(Ste)* repeat in the Y chromosome and betaCK2tes gene encode predicted isoforms of regulatory β -subunit of protein kinase CK2 in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett.* **416**, 164-166.
174. Frame, S. & Cohen, P. (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* **359**, 1-16.
175. Lörincz, A. T. & Reed, S. I. (1984). Primary structure homology between the product of yeast cell division control gene *CDC28* and vertebrate oncogenes. *Nature* **307**, 183-185.
176. Reed, S. I., Hadwiger, J. A. & Lorinez, A. T. (1985). Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell division cycle gene *CDC28*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 4055-4059.
177. Lee, M. & Nurse, P. (1987). Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* **327**, 31-35.
178. Arion, D., Meijer, L., Brizuela, L. & Beach, D. (1988). Cdc2 is a component of the M-phase specific histone H1 kinase: evidence for identity with MPF. *Cell* **55**, 371-378.
179. Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P. & Maller, J. (1988). Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*⁺. *Cell* **54**, 433-439.
180. Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D. & Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**, 389-396.

181. Labbé, J.-C., Capony, J.-P., Caput, D., Cavadore, J.-C., Derancourt, J., Kaghad, M., Lelias, J.-M., Picard, A. & Dorée, M. (1989). MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *EMBO J.* **8**, 3053-3058.
182. Glotzer, M., Murray, A. W. & Kirschner, M. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132-138.
183. Smith, C. J., Rubin, C. S. & Rosen, O. M. (1980). Insulin-treated 3T3-L1 adipocytes and cell-free extracts derived from them incorporate ³²P into ribosomal protein S6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2641-2645.
184. Cobb, M. H. & Rosen, O. M. (1983). Description of a protein kinase derived from insulin-treated 3T3-L1 cells that catalyzes the phosphorylation of ribosomal protein S6 and casein. *J. Biol. Chem.* **258**, 12472-12481.
185. Novak-Hofer, I. & Thomas, G. (1985). Epidermal growth factor-mediated activation of an S6 kinase in Swiss mouse 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **260**, 10314-10319.
186. Seger, R. & Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**, 726-735.
187. Sturgill, T. W. & Ray, L. B. (1986). Muscle proteins related to microtubule associated protein-2 are substrates for an insulin-stimulatable kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **134**, 565-571.
188. Ray, L. B. & Sturgill, T. W. (1987). Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1502-1506.
189. Sturgill, T. W., Ray, L. B., Erikson, E. & Maller, J. L. (1988). Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* **334**, 715-718.
190. Pearson, G., Robinson, F., Gibson, T. B., Xu, B.-E., Karandikar, M., Berman, K. & Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* **22**, 153-183.
191. Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B.-E., Wright, A., Vanderbilt, C. & Cobb, M. H. (2001). MAP kinases. *Chem. Rev.* **101**, 2449-2476.
192. Lindberg, R. A., Quinn, A. M. & Hunter, T. (1992). Dual specificity protein kinases: will any hydroxyl do? *Trends Biochem. Sci.* **17**, 114-119.
193. Heidenreich, K., Paduschek, M., Molders, M. & Klein, H.-W. (1994). The insulin receptor: a protein kinase with dual specificity? *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **375**, 99-104.
194. Al-Hasani, H., Eisermann, B., Tennagels, N., Magg, C., Passlack, W., Koenen, M., Müller-Wieland, D., Meyer, H. E., Klein, H.-W. (1997). Identification of Ser-1275 and Ser-1309 as autophosphorylation sites of the insulin receptor. *FEBS Lett.* **400**, 65-70.
195. Chardot, T., Shen, H. & Meunier, J.-C. (1995). Dual specificity of casein kinase II from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *C. R. Acad. Sci. Paris Life Sci.* **318**, 937-942.
196. Wilson, L. K., Dhillon, N., Thorner, J., Martins, G. S. (1997). Casein kinase II catalyzes tyrosine phosphorylation of the yeast nucleolar immunophilin Fpr3. *J. Biol. Chem.* **272**, 12961-12967.

197. Marin, O., Meggio, F., Sarno, S., Cesaro, L., Pagano, M. A. & Pinna, L. A. (1999). Tyrosine versus serine/threonine phosphorylation by protein kinase casein kinase-2. *J. Biol. Chem.* **274**, 29260-29265.
198. Hunter, T. & Plowman, G. D. (1997). The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 14-21.
199. Manning, G., Plowman, G. D., Hunter, T. & Sudarsanam, S. (2002). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 514-520.
200. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912-1934.
201. Litchfield, D. W., Dobrowolska, G. & Krebs, E. G. (1994). Regulation of casein kinase II by growth factors: a reevaluation. *Cell. Mol. Biol. Res.* **40**, 373-381.
202. Sommercorn, J., Mulligan, J. A., Lozeman, F. J. & Krebs, E. G. (1987). Activation of casein kinase II in response to insulin and to epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8834-8838.
203. Pinna, L. A., Meggio, F., Marchiori, F., Borin, G. (1984). Opposite and mutually incompatible structural requirements of type-2 casein kinase and cAMP-dependent protein kinase as visualized with synthetic peptide substrates. *FEBS Lett.* **171**, 211-214.
204. Meggio, F., Marchiori, F., Borin, G., Chessa, G. & Pinna L. A. (1984). Synthetic peptides including acidic clusters as substrates and inhibitors of rat liver casein kinase TS (type-2). *J. Biol. Chem.* **259**, 14576-14579.
205. Kuenzel, E. A. & Krebs, E. G. (1985). A synthetic peptide substrate specific for casein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 737-741.
206. Kuenzel, E. A., Mulligan, J. A., Sommercorn, J. & Krebs, E. G. (1987). Substrate specificity determinants for casein kinase II as deduced from studies with synthetic peptides. *J. Biol. Chem.* **262**, 9136-9140.
207. Marchiori, F., Meggio, F., Marin, O., Borin, G., Calderan, A., Ruzza, P. & Pinna, L. A. (1988). Synthetic peptide substrates for casein kinase 2. Assessment of minimum structural requirements for phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **971**, 332-338.
208. Sigrist, C. J., Cerutti, L., Hulo, N., Gattiker, A., Falquet, L., Pagni, M., Bairoch, A. & Bucher, P. (2002). PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinform.* **3**, 265-274.
209. Wang, J. Y. & Koshland, D. E., Jr. (1978). Evidence for protein kinase activities in the prokaryote *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **253**, 7605-7608.
210. Vallejos, R. H., Holuigue, L., Lucero, H. A. & Torruella, M. (1985). Evidence of tyrosine kinase activity in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**, 685-691.
211. Boyer, P. D., DeLuca, M., Ebner, K. E., Hultquist, D. E. & Peter, J. B. (1962). Identification of phosphohistidine in digests from a probable intermediate of oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **237**, 3306.

212. Ninfa, A. J. & Magasanik, B. (1986). Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5909-5913.
213. Ninfa, A. J., Ninfa, E. G., Lupas, A. N., Stock, A., Magasanik, B. & Stock, J. (1988). Crosstalk between bacterial chemotaxis signal transduction proteins and regulators of transcription of the Ntr regulon: evidence that nitrogen assimilation and chemotaxis are controlled by a common phosphotransfer mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5492-5496.
214. Hess, J. F., Bourret, R. B. & Simon, M. I. (1988). Histidine phosphorylation and phosphoryl group transfer in bacterial chemotaxis. *Nature* **336**, 139-143.
215. Grebe, T. W. & Stock, J. B. (1999). The histidine protein kinase superfamily. *Adv. Microb. Physiol.* **41**, 139-227.
216. Krebs, E. G. (1998). An accidental biochemist. *Ann. Rev. Biochem.* **67**, 13-32.
217. Dobrowolska, G., Boldyreff, B. & Issinger, O.-G. (1991). Cloning and sequencing of the casein kinase 2 α subunit from *Zea Mays*. *Biochim. Biophys. Acta* **1129**, 139-140.
218. Boeckmann, B., Bairoch, A., Apweiler, R., Blatter, M.-C., Estreicher, A., Gasteiger E., Martin, M. J., Michoud, K., O'Donovan, C., Phan, I., Pilbout, S. & Schneider, M. (2003). The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res.* **31**, 365-370.
219. Manning, G., Plowman, G. D., Hunter, T. & Sudarsanam, S. (2002). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 514-520.
220. Collinge, M. A. & Walker, J. C. (1994). Isolation of an *Arabidopsis thaliana* casein kinase II beta subunit by complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol. Biol.* **25**, 649-658.
221. Boldyreff, B., Meggio, F., Pinna, L. A. & Issinger, O.-G. (1992). Casein kinase 2 structure-function relationship: creation of a set of mutants of the β subunit that variably surrogate the wildtype β subunit function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 228-234.
222. Berg, J. M. (1986). Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science* **232**, 485-487.
223. Berg, J. M. (1990). Zinc fingers and other metal-binding domains. Elements for interactions between macromolecules. *J. Biol. Chem.* **265**, 6513-6516.
224. Berg, J. M. (1990). Zinc finger domains: hypotheses and current knowledge. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **19**, 405-421.
225. Gatica, M., Hinrichs, M. V., Jedlicki, A., Allende, C. C., & Allende, J. E. (1993). Effect of metal ions on the activity of casein kinase II from *Xenopus laevis*. *FEBS Lett.* **315**, 173-177.
226. Reed, J. C., Bidwai, A. P. & Glover, C. V. C. (1994). Cloning and disruption of *CKB2*, the gene encoding the 32-kDa regulatory β' -subunit of *Saccharomyces cerevisiae* casein kinase II. *J. Biol. Chem.* **269**, 18192-18200.
227. Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys Inc., San Diego, CA, USA.

228. Litchfield, D. W., Lozeman, F. J., Cicirelli, M. F., Harrylock, M., Ericsson, L. H., Piening, C. J. & Krebs, E. G. (1991). Phosphorylation of the β subunit of casein kinase II in human A431 cells. Identification of the autophosphorylation site and a site phosphorylated by p34cdc2. *J. Biol. Chem.* **266**, 20380-20389.
229. Boldyreff, B., James, P., Staudenmann, W. & Issinger, O.-G. (1993). Ser2 is the autophosphorylation site in the beta subunit from bicistronically expressed human casein kinase-2 and from native rat liver casein kinase-2 beta. *Eur. J. Biochem.* **218**, 515-521.
230. Zhang, C., Vilks, G., Canton, D. A. & Litchfield, D. W. (2002). Phosphorylation regulates the stability of the regulatory CK2 β subunit. *Oncogene* **21**, 3754-3764.
231. Zachariae, W. (2004). Destruction with a box: substrate recognition by the anaphase-promoting complex. *Mol. Cell* **13**, 2-3.
232. Schulz, G. E. (1992). Binding of nucleotides by proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 61-67.
233. Bossemeyer, D. (1994). The glycine-rich sequence of protein kinases: a multifunctional element. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 201-205.
234. Jakobi, R. & Traugh, J. A. (1992). Characterization of the phosphotransferase domain of casein kinase II by site-directed mutagenesis and expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**, 23894-23902.
235. Dorée, M. & Galas, S. (1994). The cyclin-dependent protein kinases and the control of cell division. *FASEB J.* **8**, 1114-1121.
236. Ackerman, P. & Osheroff, N. (1989). Regulation of casein kinase II activity by epidermal growth factor in human A-431 carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 11958-11965.
237. Ackerman, P., Glover, C. V. C. & Osheroff, N. (1989). Stimulation of casein kinase II activity by epidermal growth factor: relationship between the physiological activity of the kinase and the phosphorylation state of its β subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 821-825.
238. Meisner, H., Heller-Harrison, R., Buxton, J. & Czech, M. P. (1989). Molecular cloning of the human casein kinase II α subunit. *Biochemistry* **28**, 4072-4076.
239. Lozeman, F. J., Litchfield, D. W., Piening, C., Takio, K., Walsh, K. A., Krebs, E. G. (1990). Isolation and characterization of human cDNA clones encoding the alpha and the alpha' subunits of casein kinase II. *Biochemistry* **29**, 8436-8447.
240. Dingwall, C. & Laskey, R. A. (1991). Nuclear targeting sequences - a consensus? *Trends Biol. Sci.* **16**, 178-181.
241. Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. & Smith, A. E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**, 499-509.
242. Martel, V., Filhol, O., Nueda, A., Gerber, D., Benitez, M. J. & Cochet, C. (2001). Visualization and molecular analysis of nuclear import of protein kinase CK2 subunits in living cells. *Mol. Cell. Biochem.* **227**, 81-90.
243. Hu, E. & Rubin, C. S. (1990). Expression of wild-type and mutated forms of the catalytic (α) subunit of *Caenorhabditis elegans* casein kinase II in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**,

- 20609-20615.
244. Lin, W.-J., Tuazon, P. T. & Traugh, J. A. (1991). Characterization of the catalytic subunit of casein kinase II expressed in *Escherichia coli* and regulation of activity. *J. Biol. Chem.* **266**, 5664-5669.
245. Boldyreff, B., Meggio, F., Dobrowolska, G., Pinna, L. A. & Issinger, O.-G. (1993). Expression and characterization of a recombinant maize CK-2 subunit. *Biochim. Biophys. Acta* **1173**, 32-38.
246. Boldyreff, B., Meggio, F., Pinna, L. A. & Issinger, O.-G. (1993). Reconstitution of normal and hyperactivated forms of casein kinase-2 by variably mutated β -subunits. *Biochemistry* **32**, 12672-12677.
247. Hinrichs, M. V., Gatica, M., Allende, C. C. & Allende, J. E. (1995). Site-directed mutants of the β subunit of protein kinase CK2 demonstrate the important role of Pro-58. *FEBS Lett.* **368**, 211-214.
248. Sarno, S., Boldyreff, B., Marin, O., Guerra, B., Meggio, F., Issinger, O.-G., Pinna, L. A. (1995). Mapping the residues of protein kinase CK2 implicated in substrate recognition: mutagenesis of conserved basic residues in the alpha-subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **206**, 171-179.
249. Sarno, S., Vaglio, P., Meggio, F., Issinger, O.-G., Pinna, L. A. (1996). Protein kinase CK2 mutants defective in substrate recognition. Purification and kinetic analysis. *J. Biol. Chem.* **271**, 10595-601.
250. Sarno, S., Vaglio, P., Marin, O., Issinger, O.-G., Ruffato, K., Pinna, L. A. (1997). Mutational analysis of residues implicated in the interaction between protein kinase CK2 and peptide substrates. *Biochemistry* **36**, 11717-11724.
251. Schmidt-Spaniol, I., Boldyreff, B. & Issinger, O.-G. (1992). Isolation and characterization of a monoclonal anti CK-2-subunit of the IgG1 subclass. *Hybridoma* **11**, 53-59.
252. Nastainczyk, W., Schmidt-Spaniol, I., Boldyreff, B. & Issinger, O.-G. (1995). Isolation and characterization of a monoclonal anti protein kinase CK2 subunit antibody of the IgG class for the direct detection of CK2 subunit in tissue cultures of various mammalian species and human tumors. *Hybridoma* **14**, 335-339.
253. Mestres, P., Boldyreff, B., Ebensperger, C., Hameister, H. & Issinger, O.-G. (1994). Expression of casein kinase 2 during mouse embryogenesis. *Acta Anat.* **149**, 13-20.
254. Filhol, O., Cochet, C., Wedegaertner, P., Gill, G. N. & Chambaz, E. M. (1991). Coexpression of both alpha and beta subunits is required for assembly of regulated casein kinase II. *Biochemistry* **30**, 11133-40.
255. Birnbaum, M. J., Wu, J., O'Reilly, D. R., Rivera-Marrero, C. A., Hanna, D. E., Miller, L. K. & Glover, C. V. (1992). Expression and purification of the alpha and beta subunits of *Drosophila* casein kinase II using a baculovirus vector. *Protein Expr. Purif.* **3**, 142-150.
256. Klimczak, L. J., Collinge, M. A., Farini, D., Giuliano, G., Walker, J. C. & Cashmore, A. R. (1995). Reconstitution of Arabidopsis casein kinase II from recombinant subunits and phosphorylation of transcription factor GBF1. *Plant Cell* **7**, 105-115.

-
257. Issinger, O.-G., Brockel, C., Boldyreff, B. & Pelton, J. T. (1992). Characterization of the α and β subunits of casein kinase 2 by far-UV CD spectroscopy. *Biochemistry* **31**, 6098-6103.
258. Meggio, F., Boldyreff, B., Marin, O., Pinna, L. A. & Issinger, O.-G. (1992). Role of the β subunit of casein kinase-2 on the stability and specificity of the recombinant reconstituted holoenzyme. *Eur. J. Biochem.* **204**, 293-297.
259. Meggio, F., Brunati, A. M. & Pinna, L. A. (1987). Polycation-dependent, Ca^{2+} -antagonized phosphorylation of calmodulin by casein kinase-2 and a spleen tyrosine protein kinase. *FEBS Lett.* **215**, 241-246.
260. Bidwai, A. P., Reed, J. C. & Glover, C. V. C. (1993). Phosphorylation of calmodulin by the catalytic subunit of casein kinase II is inhibited by the regulatory subunit. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 265-270.
261. Meggio, F., Boldyreff, B., Marin, O., Marchiori, F., Perich, J. W., Issinger, O.-G. & Pinna, L. A. (1992). The effect of polylysine on casein-kinase-2 activity is influenced by both the structure of the protein/peptide substrates and the subunit composition of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* **205**, 939-945.
262. Meggio, F., Boldyreff, B., Issinger, O.-G. & Pinna, L. A. (1994). Casein kinase-2 down-regulation and activation by polybasic peptides are mediated by acidic residues in the 55-64 region of the β -subunit. A study with calmodulin as phosphorylatable substrate. *Biochemistry* **33**, 4336-4342.
263. Sarno, S., Vaglio, P., Marin, O., Meggio, F., Issinger, O.-G. & Pinna, L. A. (1997). Basic residues in the 74-83 and 191-198 segments of protein kinase CK2 catalytic subunit are implicated in negative but not in positive regulation by the β -subunit. *Eur. J. Biochem.* **248**, 290-295.
264. Fields, S. & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
265. Gietz, R. D., Graham, K. C. & Litchfield, D. W. (1995). Interactions between the subunits of casein kinase II. *J. Biol. Chem.* **270**, 13017-13021.
266. Kusk, M., Bendixen, C., Duno, M., Westergaard, O. & Thomsen, B. (1995). Genetic dissection of intersubunit contacts within human protein kinase CK2. *J. Mol. Biol.* **253**, 703-711.
267. Boldyreff, B., Mietens, U. & Issinger, O.-G. (1996). Structure of protein kinase CK2: dimerization of the human β -subunit. *FEBS Lett.* **379**, 153-156.
268. Krehan, A., Lorenz, P., Plana-Coll, M. & Pyerin, W. (1996). Interaction sites between catalytic and regulatory subunits in human protein kinase CK2 holoenzymes as indicated by chemical cross-linking and immunological investigations. *Biochemistry* **35**, 4966-4975.
269. Lüscher, B. & Litchfield, D. W. (1994). Biosynthesis of casein kinase II in lymphoid cell lines. *Eur. J. Biochem.* **220**, 521-526.
270. Glover, C. V. C. (1986). A filamentous form of *Drosophila* casein kinase II. *J. Biol. Chem.* **261**, 14349-14354.
271. Mamrack, M. D. (1989). Stimulation of enzymatic activity in filament preparations of casein kinase II by polylysine, melittin, and spermine. *Mol. Cell. Biochem.* **85**, 147-157.

272. Valero, E., De Bonis, S., Filhol, O., Wade, R. H., Langowski, J., Chambaz, E. M. & Cochet, C. (1995). Quaternary structure of casein kinase 2. Characterization of multiple oligomeric states and relation with its catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 8345-8352.
273. Yan, T.-F. J. & Tao, M. (1982). Purification and characterization of a wheat germ protein kinase. *J. Biol. Chem.* **257**, 7037-7043.
274. Dobrowolska, G., Ber, E. & Muszyńska, G. (1986). Separation and purification of maize casein kinases by affinity chromatography. *J. Chromatogr.* **376**, 421-427.
275. Dobrowolska, G., Meggio, F., Szczegielniak, J., Muszynska, G. & Pinna, L. A. (1992). Purification and characterization of maize seedling casein kinase IIB, a monomeric enzyme immunologically related to the α subunit of animal casein kinase-2. *Eur. J. Biochem.* **204**, 299-303.
276. Li, H. & Roux, S. J. (1992). Purification and characterization of a casein kinase 2-type protein kinase from pea nuclei. *Plant Physiol.* **99**, 686-692.
277. Klimczak, L. J., Schindler, U. & Cashmore, A. R. (1992). DNA binding activity of the Arabidopsis G-Box binding factor GBF1 is stimulated by phosphorylation by casein kinase II from Broccoli. *Plant Cell* **4**, 87-98.
278. Espunya, M. C. & Martínez, M. C. (1997). Identification of two different molecular forms of *Arabidopsis thaliana* casein kinase II. *Plant Science* **124**, 131-142.
279. Edelman, A. M., Blumenthal, D. K. & Krebs, E. G. (1987). Protein serine/threonine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 567-613.
280. Ackerman, P., Glover, C. V. C. & Osheroff, N. (1990). Stimulation of casein kinase II by epidermal growth factor: relationship between the physiological activity of the kinase and the phosphorylation state of its β subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 821-825.
281. Johnson, L. N., Noble, M. E. M. & Owen, D. J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**, 149-158.
282. Padmanabha, R., Chen-Wu, J. L., Hanna, D. E. & Glover, C. V. C. (1990). Isolation, sequencing, and disruption of the yeast CKA2 gene: casein kinase II is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4089-4099.
283. Snell, V. & Nurse, P. (1994). Genetic analysis of cell morphogenesis in fission yeast - a role for casein kinase II in the establishment of polarized growth. *EMBO J.* **13**, 2066-2074.
284. Kikkawa, U., Mann, S. K., Firtel, R. A. & Hunter, T. (1992). Molecular cloning of casein kinase II alpha subunit from Dictyostelium discoideum and its expression in the life cycle. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5711-5723.
285. Xu, X., Toselli, A. P., Russell, L. D. & Seldin, D. C. (1999). Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II α' catalytic subunit. *Nat. Genet.* **23**, 118-121.
286. Bidwai, A. P., Reed, J. C., Glover, C. V. C. (1995). Cloning and disruption of CKB1, the gene encoding the 38-kDa beta subunit of *Saccharomyces cerevisiae* casein kinase II (CKII). Deletion of CKII regulatory subunits elicits a salt-sensitive phenotype. *J. Biol. Chem.* **270**, 10395-10404.

287. Buchou, T., Vernet, M., Blond, O., Jensen, H. H., Pointu, H., Olsen, B. B., Cochet, C., Issinger, O.-G. & Boldyreff, B. (2003). Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 908-915.
288. Russo, G. L., Vandenberg, M. T., Yu, I. J., Bae, Y. S., Franza, B. R. jr. & Marshak, D. R. (1992). Casein kinase II phosphorylates p34^{cdc2} kinase in G1 phase of the HeLa cell division cycle. *J. Biol. Chem.* **267**, 20317-20325.
289. Pepperkok, R., Lorenz, P., Ansorge, W. & Pyerin, W. (1994). Casein kinase II is required for transition of G0/G1, early G1, and G1/S phases of the cell cycle. *J. Biol. Chem.* **269**, 6986-6991.
290. Dobrowolska, G., Meggio, F., Marin, O., Lozeman, F. J., Li, D., Pinna, L. A. & Krebs, E. G. (1994). Substrate recognition by casein kinase-II: the role of histidine-160. *FEBS Lett.* **355**, 237-241.
291. Schneider, H. R. & Issinger, O.-G. (1988). Nucleolin (C23), a physiological substrate for casein kinase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**, 1390-1397.
292. Caizergues-Ferrer, M., Belenguer, P., Lapeyre, B., Amalric, F., Wallace, M. O. & Olson, M. O. (1987). Phosphorylation of nucleolin by a nucleolar type NII protein kinase. *Biochemistry* **26**, 7876-7883.
293. Hagemann, C., Kalmes, A., Wixler, V., Schuster, T. & Rapp, U. R. (1997). The regulatory subunit of protein kinase CK2 is a specific A-Raf activator. *FEBS Lett.* **403**, 200-202.
294. Boldyreff, B. & Issinger, O.-G. (1997). A-Raf kinase is a new interacting partner of protein kinase CK2 β subunit. *FEBS Lett.* **403**, 197-199.
295. Chen, M., Li, D. Krebs, E. G. & Cooper, J. A. (1997). The casein kinase 2 β subunit binds to Mos and inhibits Mos activity. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1904-1912.
296. Kusk, M., Ahmed, R., Thomsen, B., Bendixen, C., Issinger, O.-G. & Boldyreff, B. (1999). Interactions of protein kinase CK2beta subunit within the holoenzyme and with other proteins. *Mol. Cell. Biochem.* **191**, 51-58.
297. Hèrichè, J. K., Lebrin, F., Rabilloud, T., Leroy, D., Chambaz, E. M. & Goldberg, Y. (1997). Regulation of protein phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2 α . *Science* **276**, 952-955.
298. Ole-MoiYoi, O. K. (1995). Casein kinase II in Theileriosis. *Science* **267**, 834-836.
299. Ole-MoiYoi, O. K. (1989). *Theileria parva*: an intracellular protozoan parasite that induces reversible lymphocyte transformation. *Exp. Parasitol.* **69**, 204-210.
300. Seldin, D. C. & Leder, P. (1995). Casein kinase II α transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle. *Science* **267**, 894-897.
301. Dobbelaere, D. & Heussler, V. (1999). Transformation of leukocytes by *Theileria parva* and *T. annulata*. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 1-42.
302. Dobbelaere, D. & Rottenberg, S. (2003). *Theileria*-induced leukocyte transformation. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 377-382.

303. Zhang, F., Strand, A., Robbins, D., Cobb, M. H., Goldsmith, E. J. (1994). Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* **367**, 704-711.
304. Wang, Z., Harkins, P. C., Ulevitch, R. J., Han, J., Cobb, M. H., Goldsmith, E. J. (1997). The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2327-2332.
305. De Bondt, H. L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H. D., Morgan, D. O., Kim, S.-H. (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* **363**, 595-602.
306. Harris, R. A., Popov, K. M., Zhao, Y., Kedishvili, N. Y., Shimomura, Y. & Crabb, D. W. (1995). A new family of protein kinases - the mitochondrial protein kinases. *Adv. Enzyme Regul.* **35**, 147-162.
307. Wolanin, P. M., Thomason, P. A. & Stock, J. B. (2002). Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology* **3**, reviews3013.1-3013.8
308. Ryazanov, A. G., Pavur, K. S. & Dorovkov, M. V. (1999). Alpha-kinases: a new class of protein kinases with a novel catalytic domain. *Curr. Biol.* **9**, R43-R45.
309. Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546-563.
310. Plowman, G. D., Sudarsanam, S., Bingham, J., Whyte, D. & Hunter, T. (1999). The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: A model for signal transduction in multicellular organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13603-13610.
311. Kostich, M., English, J., Madison, V., Gheyas, F., Wang, L., Qiu, P., Greene, J. & Laz, T. M. (2002). Human members of the eukaryotic protein kinase family. *Genome Biology* **3**, research0043.1-0043.12
312. Wang, D., Harper, J. F. & Gribskov, M. (2003). Systematic trans-genomic comparison of protein kinases between *Arabidopsis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.* **132**, 2152-2165.
313. Hunter, T. (1987). A thousand and one protein kinases. *Cell* **50**, 823-829.
314. Leonard, C. J., Aravind, L. & Koonin, E. V. (1998). Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the "eukaryotic" protein kinase superfamily. *Genome Res.* **8**, 1038-1047.
315. Young, T. A., Delagoutte, B., Endrizzi, J. A., Falick, A. M. & Alber, T. (2003). Structure of *Mycobacterium tuberculosis* PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases. *Nature Struct. Biol.* **10**, 168-174.
316. Guerra, B., Niefind, K., Pinna, L. A., Schomburg, D. & Issinger, O.-G. (1998). Expression, purification and crystallization of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays*. *Acta cryst.* **D54**, 143-145.
317. Russell, R. B. & Barton, G. J. (1992). Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison. *PROTEINS: Struct. Funct. Genet.* **14**, 309-323.

318. Canagarajah, B. J., Khokhlatchev, A., Cobb, M. H. & Goldsmith, E. J. (1997). Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**, 859-869.
319. Chantalat, L., Leroy, D., Filhol, O., Nueda, A., Benitez, M. J., Chambaz, E. M., Cochet, C. & Dideberg, O. (1999). Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *EMBO J.* **18**, 2930-2940.
320. Chantalat, L., Leroy, D., Filhol, O., Quintaine, N., Chambaz, E. M., Cochet, C. & Dideberg, O. (1999). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the regulatory subunit of human protein kinase CK2. *Acta Crystallogr.* **D55**, 895-897.
321. Niefind, K., Guerra, B., Ermakowa, I. & Issinger, O.-G. (2001). Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J.* **20**, 5320-5331.
322. Niefind, K., Guerra, B., Ermakowa, I. & Issinger, O.-G. (2000). Crystallization and preliminary characterization of crystals of human protein kinase CK2. *Acta Crystallogr.* **D56**, 1680-1684.
323. Guerra, B., Niefind, K., Ermakowa, I. & Issinger, O.-G. (2001). Characterization of CK2 holoenzyme variants with regard to crystallization. *Mol. Cell. Biochem.* **227**, 3-11.
324. Battistutta, R., Sarno, S., De Moliner, E., Marin, O., Issinger, O.-G., Zanotti, G. & Pinna, L. (2000). The crystal structure of the complex of Zea mays α subunit with a fragment of human β subunit provides the clue to the architecture of protein kinase CK2 holoenzyme. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5184-5190.
325. Battistutta, R., Sarno, S., De Moliner, E., Papinutto, E., Zanotti, G., Pinna, L. A. (2000). The replacement of ATP by the competitive inhibitor emodin induces conformational modifications in the catalytic site of protein kinase CK2. *J. Biol. Chem.* **275**, 29618-29622.
326. Battistutta, R., DeMoliner, E., Sarno, S., Zanotti, G. & Pinna, L. A. (2001). Structural features underlying the selective inhibition of protein kinase CK2 by ATP site-directed tetrabromo-2-benzotriazole. *Protein Sci.* **10**, 220-2206.
327. De Moliner, E., Moro, S., Sarno, S., Zagotto, G., Zanotti, G., Pinna, L. A. & Battistutta, R. (2003). Inhibition of protein kinase CK2 by anthraquinone-related compounds. A structural insight. *J. Biol. Chem.* **278**, 1831-1836.
328. Sarno, S., de Moliner, E., Ruzzene, M., Pagano, M. A., Battistutta, R., Bain, J., Fabbro, D., Schoepfer, J., Elliott, M., Furet, P., Meggio, F., Zanotti, G. & Pinna, L. A. (2003). Biochemical and three-dimensional-structural study of the specific inhibition of protein kinase CK2 by [5-oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-a)quinazolin-7-yl]acetic acid (IQA). *Biochem. J.* **374**, 639-646.
329. Ermakova, I., Boldyreff, B., Issinger, O.-G. & Niefind, K. (2003). Crystal structure of a C-terminal deletion mutant of human protein kinase CK2 catalytic subunit. *J. Mol. Biol.* **330**, 925-934.
330. Pechkova, E., Zanotti, G. & Nicolini, C. (2003). Three-dimensional atomic structure of a catalytic subunit mutant of human protein kinase CK2. *Acta Crystallogr.* **D59**, 2133-2139.
331. Adams, J. A. (2001). Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem. Rev.* **101**, 2271-2290.
332. Armstrong, R. N., Kondo, H., Granot, J., Kaiser, E. T. & Mildvan, A. S. (1979). Magnetic resonance and kinetic studies of the manganese(II) ion and substrate complexes of the catalytic

- subunit of adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinase from bovine heart. *Biochemistry* **18**, 1230-1238.
333. Chaillot, D., Declerck, N., Niefind, K., Schomburg, D., Chardot, T. & Meunier, J. C. (2000). Mutation of recombinant catalytic subunit of the protein kinase CK2 that affects catalytic efficiency and specificity. *Protein Eng.* **13**, 291-298.
334. Sarno, S., Ghisellini, P. & Pinna, L. A. (2002). Unique activation mechanism of protein kinase CK2. The N-terminal segment is essential for constitutive activity of the catalytic subunit but not of the holoenzyme. *J. Biol. Chem.* **277**, 22509-22514.
335. Knighton, D. R., Zheng, J., Ten Eyck, L. F., Xuong, N.-H., Taylor, S. S. & Sowadski, J. M. (1991). Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**, 414-420.
336. Ho, M., Bramson, H. N., Hansen, D. E., Knowles, J. R. & Kaiser, E. T. (1988). Stereochemical course of the phospho group transfer catalyzed by cAMP-dependent protein kinase. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 2680 - 2681.
337. Gibbs, C. S. & Zoller, M. J. (1991). Rational scanning mutagenesis of a protein kinase identifies functional regions involved in catalysis and substrate interactions. *J. Biol. Chem.* **266**, 8923-8931.
338. Kim, K. & Cole, P. A. (1998). Kinetic analysis of a protein tyrosine kinase reaction transition state in the forward and reverse direction. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 6851-6858.
339. Zhou, J. & Adams, J. A. (1997). Is there a catalytic base in the active site of cAMP-dependent protein kinase? *Biochemistry* **36**, 2977-2984.
340. Valiev, M., Kawai, R., Adams, J. A. & Weare, J. (2002). The role of the putative catalytic base in the phosphoryl transfer reaction in a protein kinase: first-principles calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 9926-9927.
341. Madhusudan, Trafny, E. A., Xuong, N. H., Adams, J. A., Ten Eyck, L. F., Taylor, S. S. & Sowadski, J. M. (1994). cAMP-dependent protein kinase: crystallographic insights into substrate recognition and phosphotransfer. *Protein Sci.* **3**, 176-187.
342. Cook, A., Lowe, E. D., Chrysin, E. D., Skamnaki, V. T., Oikonomakos, N. G. & Johnson, L. N. (2002). Structural studies on phospho-CDK2/cyclin A bound to nitrate, a transition state analogue: implications for the protein kinase mechanism. *Biochemistry* **41**, 7301-7311.
343. Madhusudan, Akamine, P., Xuong, N. H. & Taylor, S. S. (2002). Crystal structure of a transition state mimic of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 273-277.
344. Lahiri, S. D., Zhang, G., Dunaway-Mariano, D. & Allen, K. N. (2003). The pentacovalent phosphorus intermediate of a phosphoryl transfer reaction. *Science* **299**, 2067-2071.
345. Cook, P. F., Neville, M. E. jr., Vrana, K. E., Hartl, F. T. & Roskoski, R. jr. (1982). Adenosine cyclic 3',5'-monophosphate dependent protein kinase: kinetic mechanism for the bovine skeletal muscle catalytic subunit. *Biochemistry* **21**, 5794-5799.
346. Grant, B. D. & Adams, J. A. (1996). Pre-steady-state kinetic analysis of cAMP-dependent protein kinase using rapid quench flow techniques. *Biochemistry* **35**, 2022-2029.

347. Skamnaki, V. T., Owen, D. J., Noble, M. E., Lowe, E. D., Lowe, G., Oikonomakos, N. G. & Johnson, L. N. (1999). Catalytic mechanism of phosphorylase kinase probed by mutational studies. *Biochemistry* **38**, 14718-14730.
348. Enke, D. A., Kaldis, P. & Solomon, M. J. (2000). Kinetic analysis of the cyclin-dependent kinase-activating kinase (Cak1p) from budding yeast. *J. Biol. Chem.* **275**, 33267-33271.
349. Enke, D. A., Kaldis, P., Holmes, J. K. & Solomon, M. J. (1999). The CDK-activating kinase (Cak1p) from budding yeast has an unusual ATP-binding pocket. *J. Biol. Chem.* **274**, 1949-1956.
350. Huse, M. & Kuriyan, J. (2002). The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109**, 275-282.
351. Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., Pavletich, N. P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**, 313-320.
352. Russo, A. A., Jeffrey, P. D. & Pavletich, N. P. (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nature Struct. Biol.* **3**, 696-700.
353. Brown, N. R., Noble, M. E. M., Endicott, J. A. & Johnson, L. N. (1999). The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases. *Nature Cell Biol.* **1**, 438-443.
354. Dajani, R., Fraser, E., Roe, S. M., Young, N., Good, V., Dale, T. C. & Pearl, L. H. (2001). Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 β : structural basis of phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* **105**, 721-732.
355. Ter Haar, E., Coll, J. T., Austen, D. A., Hsiao, H.-M., Swenson, L. & Jain, J. (2001). Structure of GSK3 β reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nature Struct. Biol.* **8**, 593-596.
356. Bax, B., Carter, P. S., Lewis, C., Guy, A. R., Bridges, A., Tanner, R., Pettman, G., Mannix, C., Culbert, A. A., Brown, M. J. B., Smith, D. G. & Reith, A. D. (2001). The structure of phosphorylated GSK-3 β complexed with a peptide, FRATtide, that inhibits β -catenin phosphorylation. *Structure* **9**, 1143-1152.
357. Frame, S., Cohen, P. & Biondi, R. M. (2001). A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol. Cell* **7**, 1321-1327.
358. Bertrand, J. A., Thieffine, S., Vulpetti, A., Christiani, C., Valsasina, B., Knapp, S., Kalisz, H. M. & Flocco, M. (2003). Structural characterization of the GSK-3 β active site using selective and non-selective ATP-mimetic inhibitors. *J. Mol. Biol.* **333**, 393-407.
359. Aoki, M., Yokota, T., Sugiura, I., Sasaki, C., Hasegawa, T., Okumura, C., Ishiguro, K., Kohno, T., Sugio, S. & Matsuzaki, T. (2003). Structural insight into nucleotide recognition in tau-protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 β . *Acta Cryst.* **D60**, 439-446.
360. Taylor, S. S. & Radzio-Andzelm, E. (1994). Three protein kinase structures define a common motif. *Structure* **2**, 345-365.
361. Sarno, S., Ghisellini, P., Cesaro, L., Battistutta, R. & Pinna, L. A. (2001). Generation of mutants of CK2 α which are dependent on the β -subunit for catalytic activity. *Mol. Cell. Biochem.* **227**,

- 13-19.
362. Sarno, S., Vaglio, P., Cesaro, L., Marin, O. & Pinna, L. A. (1999). A multifunctional network of basic residues confers unique properties to protein kinase CK2. *Mol. Cell. Biochem.* **191**, 13-19.
363. Rekha, N. & Srinivasan, N. (2003). Structural basis of regulation and substrate specificity of protein kinase CK2 deduced from the modeling of protein-protein interactions. *BMC Struct Biol.* **3**, 4-16.
364. Murshudov, G. N., Vagin & Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Cryst.* **D53**, 240-255.
365. Williams, D. H. & Mitchell, T. (2002). Latest developments in crystallography and structure-based design of protein kinase inhibitors as drug candidates. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2**, 567-573.
366. Toledo, L. M., Lydon, N. B. & Elbaum, D. (1999). The structure-based design of ATP-site directed protein kinase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **6**, 775-805.
367. Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W. T., Clarkson, B. & Kuriyan, J. (2000). Structural mechanism for STI-571 inhibition of Abelson tyrosine kinase. *Science* **289**, 1938-1942.
368. Noble, M. E. M., Endicott, J. A. & Johnson, L. N. (2004). Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* **303**, 1800-1805.
369. Sarno, S., Moro, S., Meggio, F., Zagotto, G., Dal Ben, D., Ghisellini, P., Battistutta, R., Zanotti, G. & Pinna, L. A. (2002). Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **93**, 159-168.
370. Srinivasan, N., Antonelli, M., Jacob, G., Korn, I., Romero, F., Jedlicki, A., Dhanaraj, V., Sayed, M. F., Blundell, T. L., Allende, C. C., Allende, J. E. (1999). Structural interpretation of site-directed mutagenesis and specificity of the catalytic subunit of protein kinase CK2 using comparative modelling. *Protein Eng.* **12**, 119-127.
371. Omura, S., Sasaki, Y., Iwai, Y., Takeshima, H. (1995). Staurosporine, a potentially important gift from a microorganism. *J. Antibiot. (Tokyo)* **48**, 535-548.
372. Meggio, F., Donella Deana, A., Ruzzene, M., Brunati, A. M., Cesaro, L., Guerra, B., Meyer, T., Mett, H., Fabbro, D. & Furet, P. (1995). Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition. Kinetic studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2. *Eur. J. Biochem.* **234**, 317-322.
373. Jones, S. & Thornton, J. M. (1996). Principles of protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13-20.
374. Canton, D. A., Zhang, C. & Litchfield, D. W. (2001). Assembly of protein kinase CK2: investigation of complex formation between catalytic and regulatory subunits using a zinc-finger-deficient mutant of CK2 β . *Biochem. J.* **358**, 87-94.
375. Chantalat, L., Leroy, D., Filhol, O., Quintaine, N., Chambaz, E. M, Cochet, C. & Dideberg, O. (1999). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the regulatory subunit of human protein kinase CK2. *Acta Crystallogr.* **D55**, 895-897.

376. Boldyreff, B., Meggio, F., Pinna, L. A. & Issinger, O.-G. (1994). Protein kinase CK2 structure-function relationship: effects of the β subunit on reconstitution and activity. *Cell. Mol. Biol. Res.* **40**, 391-399.
377. Sali, A., Glaeser, R., Earnest, T. & Baumeister, W. (2003). From words to literature in structural proteomics. *Nature* **422**, 216-225.
378. Sarno, S., Marin, O., Ghisellini, P., Meggio, F. & Pinna, L. A. (1998). Biochemical evidence that the N-terminal segments of the α subunit and β subunit play interchangeable roles in the activation of protein kinase CK2. *FEBS Lett.* **441**, 29-33.
379. Nooren, I. M. A. & Thornton, J. M. (2003). Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J.* **22**, 3486-3492.
380. Nooren, I. M. A. & Thornton, J. M. (2003). Structural characterization and functional significance of transient protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* **325**, 991-1018.
381. Hayward, S. & Berendsen, H. J. (1998). Systematic analysis of domain motions in proteins from conformational change: new results on citrate synthase and T4 lysozyme. *Proteins* **30**, 144-154.
382. Martel, V., Filhol, O., Nueda, A. & Cochet, C. (2002). Dynamic localization/association of protein kinase CK2 subunits in living cells. A role in its cellular regulation? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **973**, 272-277.
383. Sharrocks, A. D., Yang, S. H. & Galanis, A. (2000). Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 448-53.
384. Schulman, B.A., Lindstrom, D. L. & Harlow, E. (1998). Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10453-10458.
385. Lowe, E. D., Tews, I., Cheng, K. Y., Brown, N. R., Gul, S., Noble, M. E., Gamblin, S. J. & Johnson, L. N. (2002). Specificity determinants of recruitment peptides bound to phospho-CDK2/cyclin A. *Biochemistry* **41**, 15625-15634.
386. Akamine, P., Madhusudan, Wu, J., Xuong, N.-H., Ten Eyck, L. F. & Taylor, S. S. (2003). Dynamic features of cAMP-dependent protein kinase revealed by apoenzyme crystal structure. *J. Mol. Biol.* **327**, 159-171.
387. Johnson, D. A., Akamine, P., Radzio-Andzelm, E., Madhusudan, M., Taylor, S. S. (2001). Dynamics of cAMP-dependent protein kinase. *Chem. Rev.* **101**, 2243-2270.
388. Brünger, A. T., Adams, P. D., Chlore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.* **D54**, 905-921.
389. Filhol, O., Nueda, A., Martel, V., Gerber-Scokaert, D., Benitez, M. J., Souchier, C., Saoudi, Y. & Cochet, C. (2003). Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual subunits. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 975-987.
390. Ghavidel, A. & Schultz, M. C. (2001). TATA binding protein-associated CK2 transduces DNA damage signals to the RNA polymerase III transcriptional machinery. *Cell* **106**, 575-584.

391. Ghavidel, A., Hockman, D. J. & Schultz, M. C. (1999). A review of progress towards elucidating the role of protein kinase CK2 in polymerase III transcription: regulation of the TATA binding protein. *Mol. Cell. Biochem.* **191**, 143-148.
392. Johnston, I. M., Allison, S. J., Morton, J. P., Schramm, L., Scott, P. H. & White, R. J. (2002). CK2 forms a stable complex with TFIIB and activates RNA polymerase III transcription in human cells. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3757-3768.
393. Hu, P., Wu, S. & Hernandez, N. (2003). A minimal RNA polymerase III transcription system from human cells reveals positive and negative regulatory roles for CK2. *Mol. Cell* **12**, 699-709.
394. Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310.
395. Appella, E. & Anderson, C. W. (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2764-2772.
396. Keller, D. M., Zeng, X., Wang, Y., Zhang, Q. H., Kapoor, M., Shu, H., Goodman, R., Lozano, G., Zhao, Y. & Lu, H. (2001). A DNA damage-induced p53 serine 392 kinase complex contains CK2, hSpt16, and SSRP1. *Mol. Cell* **7**, 283-292.
397. Keller, D. M. & Lu, H. (2002). p53 serine 392 phosphorylation increases after UV through induction of the assembly of the CK2·hSPT16·SSRP1 complex. *J. Biol. Chem.* **277**, 50206-50213.
398. Meek, D. W., Simon, S., Kikkawa, U. & Eckhart, W. (1990). The p53 tumour suppressor protein is phosphorylated at serine 389 by casein kinase II. *EMBO J.* **9**, 3253-3260.
399. Sen, R. & Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**, 705-716.
400. Kato, T. Jr., Delhase, M., Hoffmann, A. & Karin, M. (2003). CK2 is a C-terminal I κ B kinase responsible for NF- κ B activation during the UV response. *Mol. Cell* **12**, 829-839.
401. Sayed, M., Kim, S. O., Salh, B. S., Issinger, O.-G. & Pelech, S. L. (2000). Stress-induced activation of protein kinase CK2 by direct interaction with p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 16569-16573.
402. Loizou, J. I., El-Khamisy, S. F., Zlatanou, A., Moore, D. J., Chan, D. W., Qin, J., Sarno, S., Meggio, F., Pinna, L. A. & Caldecott, K. W. (2004). The protein kinase CK2 facilitates repair of chromosomal DNA single-strand breaks. *Cell* **117**, 17-28.
403. Ruzzene, M., Penzo, D. & Pinna, L. A. (2002). Protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) induces apoptosis and caspase-dependent degradation of haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) in Jurkat cells. *Biochem. J.* **364**, 41-47.
404. Gavin, A. C, Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M. A., Copley, R. R., Edelman, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G. & Superti-Furga, G. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-147.

405. Lieberman, S. L. & Ruderman, J. V. (2004). CK2 β , which inhibits Mos function, binds to a discrete domain in the N-terminus of Mos. *Dev. Biol.* **268**, 271-279.
406. Guerra, B., Issinger, O.-G., Wang, J. Y. (2003). Modulation of human checkpoint kinase Chk1 by the regulatory beta-subunit of protein kinase CK2. *Oncogene* **22**, 4933-4942.
407. Akten, B., Jauch, E., Genova, G. K., Kim, E. Y., Edery, I., Raabe, T. & Jackson, F. R. (2003). A role for CK2 in the *Drosophila* circadian oscillator. *Nat. Neurosci.* **6**, 251-257.
408. Konopka, R. J., Smith, R. F. & Orr, D. (1991). Characterization of *Andante*, a new *Drosophila* clock mutant, and its interactions with other clock mutants. *J. Neurogenet.* **7**, 103-114.
409. Blau, J. (2003). A new role for an old kinase: CK2 and the circadian clock. *Nat. Neurosci.* **6**, 208-210.
410. Lin, J. M., Kilman, V. L., Keegan, K., Paddock, B., Emery-Le, M., Rosbash, M. & Allada, R. (2002). A role for casein kinase 2 α in the *Drosophila* circadian clock. *Nature* **420**, 816-820.
411. McElhinny, J. A., Trushin, S. A., Bren, G. D., Chester, N. & Paya, C. V. (1996). Casein kinase II phosphorylates I kappa B alpha at S-283, S-289, S-293, and T-291 and is required for its degradation. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 899-906.
412. Bren, G. D., Pennington, K. N. & Paya, C. V. (2000). PKC- ζ -associated CK2 participates in the turnover of free I κ B α . *J. Mol. Biol.* **297**, 1245-1258.
413. Cohen, P. & Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 769-776.
414. Ficarro, S. B., McClelland, M. L., Stukenberg, P. T., Burke, D. J., Ross, M. M., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. & White, F. M. (2002). Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnol.* **19**, 301-305.
415. Barz, T., Ackermann, K., Dubois, G., Eils, R. & Pyerin, W. (2003). Genome-wide expression screens indicate a global role for protein kinase CK2 in chromatin remodeling. *J. Cell Sci.* **116**, 1563-1577.