

**Vergleichende Strukturanalyse zweier paraloger  
Isoformen der humanen Proteinkinase  $CK2\alpha$**

Inaugural - Dissertation

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
**Nils Bischoff**  
aus Hamburg

Köln 2013

Gutachter:

PD Dr. Karsten Niefind  
Prof. Günter Schwarz

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 08.07.2013

*für Judith*

## Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn PD Dr. Karsten Niefind für die Möglichkeit mich die letzten Jahre mit der CK2 beschäftigen zu dürfen. Ich bin froh durch die exzellente wissenschaftliche Betreuung und die vielseitigen und spannenden Fragestellungen, die das Thema beinhaltete, eine sehr lehrreiche Zeit verbracht zu haben.
- Herrn Prof. Günter Schwarz für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie für die Möglichkeit an der Supernova und dem PX Scanner arbeiten zu können.
- Elena Brunstein für jede Menge aufgereinigte *hsCK2 $\alpha$*  und *hsCK2 $\alpha'$* . Vor allem in Bezug auf die *hsCK2 $\alpha'$*  war dies die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Kristallisation und Strukturlösung, da in diesem Fall nichts über Quantität ging.
- Allen Arbeitsgruppenmitgliedern, die mich im Laufe der letzten Jahre begleitet, für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt und meine Arbeit Korrektur gelesen haben. Besonders angesprochen fühlen dürfen sich: Dr. Jennifer Raaf, Christine Tölzer, Nicole Splett, Dr. Stephan Wagner und Alexander Schnitzler. Weiterhin gilt ein besonderer Dank Moritz Fischer für die Arbeit an der *hsCK2 $\alpha$ /FLC21*-Komplexstruktur mit der wunderbaren Auflösung von 1,52 Å.
- Herrn Prof. Ulrich Baumann für die Möglichkeit sämtliche Infrastruktur seiner Arbeitsgruppe nutzen zu dürfen.
- Den Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Baumann und Herrn Prof. Schwarz für die schöne gemeinsame Zeit am Institut.
- Herrn Prof. Olaf-Georg Issinger für die Einladung nach Odense und die netten und äußerst informativen Gespräche über die Geschichte der CK2.
- Herrn Andriy Golub für den Inhibitor FLC21, der durch seine Bindungseigenschaften besonders viel Freude beim Verfeinern machte sowie für die nette Einladung nach Kiev.
- Herrn Michael Zimmermann für die Unterstützung in allen IT-Fragen und Problemen.



- Herrn Uwe Otto für die vielen Stunden an der Supernova, um diese wieder lauffähig zu bekommen.
- Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Judith, die sämtliche Launen, vor allem während der letzten Monate, ertragen und mir immer den nötigen Rückhalt gegeben hat sowie meinen Eltern die mich zu jeder Zeit unterstützten.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abstract</b> . . . . .	1
<b>Zusammenfassung</b> . . . . .	3
<b>1 Einleitung</b> . . . . .	5
1.1 Proteinphosphorylierung . . . . .	7
1.2 Paraloge Proteine . . . . .	8
1.3 Eukaryotische Proteinkinasen . . . . .	10
1.3.1 Aufbau und Regulation der eukaryotischen Proteinkinasen . . . . .	11
1.3.2 Die Spine-Theorie . . . . .	13
1.3.3 Proteinkinase-Inhibitoren . . . . .	16
1.4 Die Proteinkinase CK2 . . . . .	19
1.4.1 Aufbau der CK2 . . . . .	20
1.4.2 CK2 $\alpha$ -Inhibitoren . . . . .	22
1.4.3 Die Isoformen CK2 $\alpha$ und CK2 $\alpha'$ . . . . .	24
<b>2 Voraussetzungen und Ziele dieser Arbeit</b> . . . . .	27
<b>3 Theoretische Grundlagen zur Röntgenstrukturanalyse</b> . . . . .	29
3.1 Kristallisation . . . . .	31
3.2 Cryo-Bedingungen . . . . .	34
3.3 Röntgenstrahlung . . . . .	35
3.4 Röntgenbeugung . . . . .	36
3.5 Die Strukturlösung . . . . .	39
3.5.1 Das Phasenproblem . . . . .	39
3.5.2 Die Strukturlösung mit molekularem Ersatz . . . . .	39
3.5.3 Alternative Strukturlösungsmethoden . . . . .	40

3.6	Verfeinerung . . . . .	41
<b>4</b>	<b>Material und Methoden . . . . .</b>	<b>43</b>
4.1	Materialen und Software . . . . .	43
4.2	Proteinexpression im 5 L Maßstab . . . . .	46
4.2.1	Zellyse . . . . .	46
4.3	Proteinreinigung . . . . .	47
4.3.1	1. chromatographischer Schritt: P11–Cellulose . . . . .	47
4.3.2	2. chromatographischer Schritt: Heparinsäule . . . . .	47
4.3.3	3. chromatographischer Schritt: Gelpermeationssäule . . . . .	47
4.3.4	SDS-Gel . . . . .	48
4.3.5	Proteinkonzentration . . . . .	48
4.4	Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) . . . . .	49
4.4.1	Durchführung der ITC-Messungen . . . . .	50
4.5	Gekoppelter Aktivitätstest . . . . .	51
4.5.1	Durchführung des gekoppelten Aktivitätstests . . . . .	52
4.6	Proteinkristallisation . . . . .	52
4.6.1	Screening . . . . .	52
4.6.2	Optimierung . . . . .	53
4.6.3	Vorauswahl der Kristalle . . . . .	53
4.6.4	Überführung in Cryolösung und Kristallmontage . . . . .	54
4.6.5	Röntgendiffraktionsexperimente . . . . .	54
4.6.6	Strukturlösung . . . . .	54
<b>5</b>	<b>Ergebnisse . . . . .</b>	<b>57</b>
5.1	Expression und Reinigung von $hsCK2\alpha^{1-335}$ und $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$ . . . . .	57
5.2	Gekoppelter Aktivitätstest der $hsCK2\alpha$ -Isoformen . . . . .	58
5.3	ITC der $hsCK2\alpha$ -Isoformen mit $hsCK2\beta$ . . . . .	59
5.4	Proteinkristallisation . . . . .	61
5.4.1	Co-Kristallisation von $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$ mit MB002 . . . . .	63
5.4.2	Co-Kristallisation von $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$ mP mit FLC21 . . . . .	65
5.4.3	Co-Kristallisation von $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$ oP mit FLC21 . . . . .	67
5.4.4	Co-Kristallisation von $hsCK2\alpha^{1-335}$ mit MB002 . . . . .	69
5.4.5	Co-Kristallisation von $hsCK2\alpha^{1-335}$ oP mit FLC21 . . . . .	71
5.4.6	Co-Kristallisation von $hsCK2\alpha^{1-335}$ tP mit FLC21 . . . . .	74

<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	77
6.1	Die 3E3B Struktur	77
6.1.1	Die 3E3B-Kristallstruktur weist erhebliche Mängel auf	78
6.1.2	Der N-Terminus der 3E3B-Struktur muss gekürzt werden	79
6.1.3	Die $\beta 4/\beta 5$ -Schleife der 3E3B-Struktur besitzt keine neuartige Konformation	80
6.2	Die <i>hsCK2<math>\alpha</math><sup>Cys336Ser</sup></i> -Mutante	82
6.2.1	Die <i>hsCK2<math>\alpha</math><sup>Cys336Ser</sup></i> -Mutante ist vollständig aktiv	82
6.2.2	Die <i>hsCK2<math>\alpha</math><sup>Cys336Ser</sup></i> -Mutante hat eine geringere Affinität zu <i>hsCK2<math>\beta</math><sup>1-193</sup></i> als <i>hsCK2<math>\alpha</math><sup>1-335</sup></i>	82
6.3	globaler Strukturvergleich zwischen <i>hsCK2<math>\alpha</math>'</i> und <i>hsCK2<math>\alpha</math></i>	83
6.3.1	Die <i>hsCK2<math>\alpha</math>'</i> bildet ein weiteres $\beta$ -Faltblatt aus	86
6.3.2	Trp34 stabilisiert $\beta 0$ -Strang	88
6.4	Die Bindung der ATP-kompetitiven Inhibitoren	89
6.4.1	MB002 nimmt keinen Einfluss auf die Konformation der Gelenkregion	89
6.4.2	FLC21 zeigt in beiden <i>hsCK2<math>\alpha</math></i> -Isoformen die selben Bindungseigenschaften	90
6.4.3	FLC21 stabilisiert die ATP-bindende Schleife in einer inaktiven Konformation	92
6.4.4	FLC21 kann eine Halogenbindung zur ATP-bindenden Schleife ausbilden	94
6.4.5	FLC21 zwingt die Gelenkregion in die offene Konformation	96
6.4.6	CK2 $\alpha$ besitzt katalytische Aktivität trotz eines unvollständigen C-Spines	99
6.4.7	Ist die offene Gelenkkonformation die aktive Konformation?	101
6.5	<i>hsCK2<math>\alpha</math><sup>Cys336Ser</sup></i> -Mutante besitzt zweite Mutation	102
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerungen und Aussichten</b>	<b>105</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>109</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>113</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>116</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>117</b>
	<b>Literatur</b>	<b>118</b>

*Inhaltsverzeichnis*

---

<b>Publikationen</b> . . . . .	135
<b>Erklärung</b> . . . . .	137

# Abstract

Human protein kinase CK2 (formerly known as casein kinase 2) is a ubiquitous and highly conserved Ser/Thr kinase which is composed of a central dimer of two noncatalytic subunits (CK2 $\beta$ ) and two catalytic subunits (CK2 $\alpha$ ). CK2 is important in cell proliferation and apoptosis and this is the reason why an elevated CK2 expression contributes cancer.

In human, two paralog isoforms of the catalytic subunit (called CK2 $\alpha$  and CK2 $\alpha'$ ) exist, which differ in their C-terminal regions and show a different expression profiles. While the CK2 $\alpha$  isoform is well characterized *in vitro* and *in vivo*, little is known about the biochemical and structural properties of the CK2 $\alpha'$  isoform. To overcome this limited knowledge, a full length mutant of human CK2 $\alpha'$  was used. This study shows that the CK2 $\alpha'$  mutant is well soluble and catalytically active, with an affinity 12 times lower and less driven by enthalpy to CK2 $\beta$  than that of CK2 $\alpha$  to CK2 $\beta$ .

To detect structural differences and conspicuous features between the isoforms, crystal structures of CK2 $\alpha'$  and CK2 $\alpha$  with two potent ATP-competitive inhibitors 3-(4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzotriazol-1-yl)propan-1-ol (MB002) and 4-(6,8-Dichloro-3-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)-benzoic acid (FLC21) were solved. The present work shows for each of the CK2 $\alpha$  isoforms one crystal structure in complex with MB002 and two in complex with FLC21.

The results indicate a constantly open  $\beta$ 4/ $\beta$ 5 loop at the CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$  binding site of CK2 $\alpha'$ , in contrast to a dynamic  $\beta$ 4/ $\beta$ 5 loop in CK2 $\alpha$ , which can adopt two distinct conformations, an open and a closed one. The constantly open  $\beta$ 4/ $\beta$ 5 loop of CK2 $\alpha'$  is fixed by an additional parallel  $\beta$ -strand at the N-terminal side of the  $\beta$ 4/ $\beta$ 5 loop, which is absent in the most structures of CK2 $\alpha$ . Further a tryptophan residue fills a conserved hydrophobic pocket to a lower position in CK2 $\alpha'$  than in CK2 $\alpha$ . Moreover the interdomain hinge shows in all structures of CK2 $\alpha'$  an open and fully functional conformation while monomeric CK2 $\alpha$  adopts also a closed and unproductive conformation.

Besides this study shows a disagreement of CK2 $\alpha$  and CK2 $\alpha'$  to the spine concept of active protein kinases, which postulates two fully constructed stacks of hydrophobic residues called catalytic and regulatory spine. CK2 $\alpha'$  possesses with the open

interdomain hinge exclusively an incomplete catalytic spine, but CK2 $\alpha$  exhibits an incomplete catalytic spine as well as a complete catalytic spine, addicted to the conformation of the interdomain hinge. After all the CK2 $\alpha$  isoforms appear enzymatic activity with an incomplete catalytic spine, based on the hypothesis that the open interdomain hinge represents the active conformation.

The binding mode of the ATP-competitive inhibitor FLC21 is identical in both CK2 $\alpha$  isoforms and stabilizes in each case the open interdomain hinge conformation, however MB002 does not influence the hinge region and binds in two different manners, depending on whether the interdomain hinge exists in the open or in the closed conformation. In addition FLC21 stabilizes CK2 $\alpha$  and CK2 $\alpha'$  in an inactive conformation which were found only in one CK2 $\alpha$  structure so far. The inactivation is a result of a collapsed ATP-binding loop so that Arg47 (respectively Arg48 in CK2 $\alpha'$ ) occupies the ribose region of the ATP site and blocks the entrance of the ATP-binding pocket.

# Zusammenfassung

Die humane Proteinkinase CK2 (früher bekannt als Casein Kinase 2) ist eine ubiquitär vorkommende und hoch konservierte Ser/Thr Kinase die aus einem zentralen Dimer aus zwei nichtkatalytischen Untereinheiten (CK2 $\beta$ ) und zwei katalytischen Untereinheiten (CK2 $\alpha$ ) besteht. CK2 spielt eine entscheidende Rolle in Zellteilung und Apoptose, weshalb eine erhöhte CK2 Expression zu Krebs führen kann.

Im Menschen existieren zwei paraloge Isoformen der katalytischen Untereinheit (CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  genannt), welche sich im C-terminalen Bereich und im Expressionsprofil unterscheiden. Während die CK2 $\alpha$  in vitro und in vivo gut charakterisiert ist, ist über die biochemischen und strukturellen Eigenschaften der CK2 $\alpha'$  Isoform wenig bekannt. Um mehr über die CK2 $\alpha'$  zu erfahren, wird in dieser Arbeit eine gut lösliche, katalytisch aktive Vollängen Mutante der menschlichen CK2 $\alpha'$  vorgestellt, welche eine 12 mal geringere Affinität und weniger durch Enthalpie beeinflusste Bindung zur CK2 $\beta$  hat, als es die CK2 $\alpha$  zur CK2 $\beta$ .

Um strukturelle Unterschiede und Auffälligkeiten zwischen den beiden Isoformen aufzuklären, wurden Kristallstrukturen von CK2 $\alpha'$  und CK2 $\alpha$  mit zwei potenten ATP-kompetitiven Inhibitoren 3-(4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzotriazol-1-yl)propan-1-ol (MB002) and 4-(6,8-Dichloro-3-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)-benzoic acid (FLC21) aufgeklärt. Die vorliegende Arbeit zeigt für jede der beiden CK2 $\alpha$  Isoformen jeweils eine Kristallstruktur in Komplex mit MB002 und zwei in Komplex mit FLC21.

Die Ergebnisse offenbaren eine ständig geöffnete  $\beta 4/\beta 5$  Schleife der CK2 $\alpha'$  an der CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$  Bindetasche der CK2 $\alpha'$ , ganz im Gegensatz zu einer dynamischen  $\beta 4/\beta 5$  Schleife der CK2 $\alpha$ , welche zwei verschiedene Konformationen annehmen kann, eine offene und eine geschlossene. Die konstant geöffnete  $\beta 4/\beta 5$  Schleife von CK2 $\alpha'$  wird fixiert durch einen zusätzlichen  $\beta$ -Strang an der N-terminalen Seite der  $\beta 4/\beta 5$  Schleife, welcher in den meisten CK2 $\alpha$  Strukturen nicht ausgebildet wird. Weiter füllt ein Tryptophan eine konservierte hydrophobe Tasche zu einer etwas tiefer liegenden Position in CK2 $\alpha'$  aus, als es in CK2 $\alpha$  der Fall ist. Zusätzlich zeigt die Gelenkregion in allen Strukturen der CK2 $\alpha'$  eine offene und voll aktive Konformation aus, während die Monomere CK2 $\alpha$  sowohl eine geschlossene als auch eine offene Konformation annehmen können.



Außerdem zeigt diese Arbeit eine Unstimmigkeit der CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  in Bezug auf das Spine Konzept für aktive Proteinkinasen, welches zwei voll ausgebildete hydrophobe Stapel, katalytischer Spine und regulatorischer Spine genannt, postuliert. CK2 $\alpha'$  besitzt mit einer offenen Gelenkregion ausschließlich einen unvollständigen katalytischen Spine, wohingegen CK2 $\alpha$  sowohl einen unvollständigen als auch einen vollständigen katalytischen Spine aufweist, abhängig von der Konformation der Gelenkregion. Nach alledem scheinen beide CK2 $\alpha$  Isoformen katalytische Aktivität mit einem unvollständigen katalytischen Spine zu besitzen, wenn man die Hypothese zu Grunde legt, dass die offene Gelenkregion die aktive Konformation repräsentiert.

Der ATP-kompetitive Inhibitor FLC21 bindet in beiden CK2 $\alpha$  Isoformen in der selben Art und Weise und stabilisiert die Gelenkregion in der offene Konformation, MB002 hingegen nimmt keinen Einfluss auf die Gelenkregion und bindet in zwei unterschiedlichen Weisen, abhängig davon ob die Gelenkregion in der offenen oder in der geschlossenen Konformation vorliegt. Zusätzlich stabilisiert FLC21 CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  in einer inaktiven Konformation, welche bislang erst in einer CK2 $\alpha$  Struktur gefunden wurde. Die Inaktivierung ist Resultat einer kollabierten ATP-bindenden Schleife, so dass Arg47 (bzw. Arg48 in CK2 $\alpha'$ ) die Riboseregion der ATP-Bindestelle besetzt und so den Zugang zur ATP-Bindetasche blockiert.

# 1 Einleitung

Zellen besitzen einen hochkomplexen Aufbau und müssen unterschiedlichste Funktionen erfüllen. Damit eine Zelle zu jeder Zeit ihre vorgesehenen Aufgaben erfüllen kann, bedarf es strenger Regulationsmechanismen. Von daher müssen eine Vielzahl an Reaktionen wie z.B. Enzymaktivität, Transport, Signalweiterleitung und vieles mehr kontrolliert werden. Der wichtigste Mechanismus um einen Großteil der Funktionen zu regulieren ist die reversible Proteinphosphorylierung, dies bedeutet die Übertragung und Abspaltung von Phosphogruppen an Proteinen. Da die Übertragung einer Phosphogruppe eine biochemische Reaktion darstellt, bei der eine kovalente Bindung gebrochen und eine andere Bindung kovalent neu gebildet werden muss, müssen diese Reaktionen durch Enzyme katalysiert werden. Die Enzymklasse, die eine Übertragung einer Phosphogruppe auf ein Proteinmolekül katalysiert, ist die Klasse der Proteinkinasen. Die umgekehrte, also reversible Reaktion, ist die Dephosphorylierung und wird durch Proteinphosphatasen katalysiert.

Die Proteinphosphorylierung hat aufgrund zweier entscheidender Eigenschaften eine enorm wichtige Bedeutung im Laufe der Evolution angenommen. Zum einen ist dies die Reversibilität der Reaktion, zum anderen ist es die zweifach negative Ladung, welche die Phosphogruppen besitzen. Durch die kovalente Bindung der negativen Ladung kommt es zu einer zusätzlichen Polarität an dem Protein, welche einen großen Einfluss auf das Molekül haben kann. Die Folge ist, dass sich die Eigenschaften von Proteinen im phosphorylierten Zustand stark von dem Zustand im dephosphorylierten Zustand unterscheiden können. So kann dieser Mechanismus z.B. zu aktiven bzw. inaktiven Zuständen von Enzymen, zu veränderten Transportverhalten von Proteinen und vielem mehr führen. Genau diese veränderten Eigenschaften von Proteinen haben sich im Laufe der Evolution als wichtiger Regulationsmechanismus innerhalb einer Zelle durchgesetzt, denn durch eine kontrollierte Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Proteinen, ist es möglich bestimmte Prozesse innerhalb der Zelle zu einem ganz bestimmten Zeitpunkt an- bzw. abzuschalten. Um diese Kontrolle zu erreichen werden Proteinkinasen und Proteinphosphatasen in-

nerhalb einer Zelle selbst durch verschiedenste Signale reguliert, so dass ein sehr komplexer Regulationsmechanismus entsteht.

Die enorme Bedeutung, die die Proteinphosphorylierung und Dephosphorylierung für das Leben spielt, wird durch die Masse an Genen deutlich, die für Proteinkinasen codieren. So codieren z.B. rund 3% aller menschlichen Gene nur für Proteinkinasen und Proteinphosphatasen (Cohen 2001) (Manning *et al.* 2002). Dies ist eine bemerkenswerte Quote, denn Proteine müssen vielfältigste Funktionen als Enzyme, Struktur-, Transport-, oder Speichermoleküle wahrnehmen, um nur einen Teil der Aufgaben genannt zu haben.

Als erste Proteinkinase überhaupt wurde die Casein Kinase 1954 von George Burnett und Eugene Kennedy entdeckt (Burnett und Kennedy 1954). Nur ein Jahr später wurde erstmals durch Edmond Henri Fischer und Edwin Gerhard Krebs die reversible Phosphorylierung beschrieben (Fischer und Krebs 1955). Sie beobachteten sowohl die Umwandlung der Glycogen-Phosphorylase B in die Glycogen-Phosphorylase A als auch die Rückreaktion und konnten die reversible Umwandlung mit Phosphorylierung und Dephosphorylierung in Zusammenhang bringen. In den nächsten Jahrzehnten wurde immer offensichtlicher, dass die reversible Phosphorylierung fast sämtliche Aspekte des Zellebens reguliert. Auf Grund der Bedeutsamkeit ihrer Entdeckung wurden Fischer und Krebs 1992 mit dem Medizin-Nobelpreis ausgezeichnet.

Dass Proteinkinasen allerdings auch eine entscheidende Bedeutung bei der Entstehung verschiedener Krankheiten wie z.B. Krebs haben, konnte erstmals 1978 mit der Entdeckung der viralen Src-Tyrosinkinase (Collett und Erikson 1978) gezeigt werden. Im Laufe der nächsten Jahre konnten immer mehr Proteinkinasen mit weiteren Krankheitsbildern wie Diabetes oder Neurodegeneration in Verbindung gebracht werden. Diese Erkenntnis ist durch den schon beschriebenen regulativen Charakter der Phosphorylierung allerdings wenig verwunderlich, sollte eine Proteinkinase z.B. durch Mutation selbst außer Kontrolle geraten. Aufgrund des direkten Zusammenhangs zwischen Krankheit und Proteinkinase sind Proteinkinasen seit der 80-er Jahre ein begehrtes pharmakologisches Zielobjekt. Da Proteinkinasen jedoch eine hochkonservierte Struktur aufweisen sowie ein möglicher Wirkstoff mit der extrem hohen intrazellulären ATP-Konzentration von 2–10 mM konkurrieren müsste, wurden Proteinkinasen bis in die 90-er Jahre hinein als „non-druggable targets“ eingestuft, also zu einer Klasse, die nicht durch pharmakologische Wirkstoffe angreifbar ist (Cohen 2002a).

Als einen Wendepunkt für die Wirkstoffentwicklung gegen Proteinkinasen kann das Jahr 1997 bezeichnet werden, in dem der Wirkstoff STI571 für die ersten klinischen Studien zugelassen wurde. Dieser Wirkstoff hemmt in erster Linie die Bcr-Abl Tyrosin-Kinase und wird zur Behandlung von chronischer myeloischer Leukämie (CML) eingesetzt. 2002 bekam er schließlich unter dem Handelsnamen Gleevec<sup>®</sup> als erster Proteinkinase-Inhibitor die Marktzulassung und findet heute eine breite Verwendung in der Behandlung von CML und anderen Krebsarten (Eglen und Reisine 2009). Seither ist das Bemühen, weitere geeignete Proteinkinase-Inhibitoren zu entwickeln, stark gestiegen, so dass mittlerweile schon eine Reihe weiterer Wirkstoffe gegen Proteinkinasen die Marktzulassung erhalten haben (Eglen und Reisine 2009). Doch nicht jeder Wirkstoff wird mit dem Ziel eine Marktzulassung zu erhalten entwickelt, denn das Einsetzen von selektiven und potenten Proteinkinase-Inhibitoren in Zelllinien spielt auch heute noch eine enorme wissenschaftliche Bedeutung bei der weiteren Erforschung von Proteinkinasen *in vivo*.

## 1.1 Proteinphosphorylierung

Die Proteinphosphorylierung ist eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen bei Proteinen. Die Übertragung einer Phosphogruppe von ATP (Adenosin-triphosphat), oder seltener auch von GTP (Guanosin-triphosphat) auf ein Akzeptorprotein wird durch Proteinkinasen katalysiert (siehe Abbildung 1.1). Die umgekehrte Reaktion, die Abspaltung der Phosphogruppe von einem Protein, wird durch Proteinphosphatasen katalysiert.

Bei der Proteinphosphorylierung wird die  $\gamma$ -Phosphogruppe eines Nukleotid-Triphosphats auf die Seitenkette einer geeigneten Aminosäure übertragen. Geeignete Aminosäureseitenketten sind bei eukaryotischen Organismen in der Regel die des Serins, Threonins, sowie des Tyrosins. Bei allen drei Aminosäuren wird die Phosphogruppe über ein Sauerstoffatom (O-Phosphorylierung) gebunden (Ubersax und Ferrell 2007). Seltener können jedoch auch Phosphorylierungen über die Stickstoffatome von Arginin, Lysin und Histidin (N-Phosphorylierung) stattfinden (Yan *et al.* 1998) (Klumpp und Kriegstein 2005).

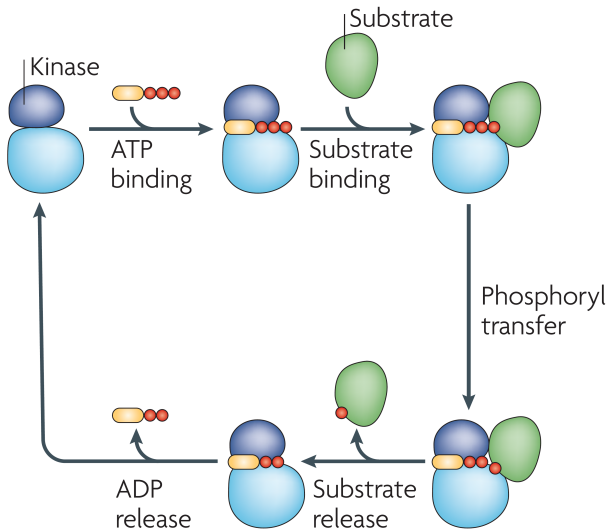


Abbildung 1.1: **Die Proteinphosphorylierung**

Die Abbildung zeigt das Grundprinzip der Proteinphosphorylierung. Zunächst müssen ein Phosphodonor, in diesem Fall ATP, und ein Protein als Phosphoakzeptor in räumliche Nähe gebracht werden. Hierzu binden beide Moleküle an eine Proteinkinase, die in ihrem aktiven Zentrum den Phosphotransfer katalysiert. Nach erfolgreichem Transfer trennen sich das phosphorylierte Protein, sowie das entstandene ADP (Adenosindiphosphat) wieder von der Proteinkinase, welche nun wieder frei für eine nächste Katalyse ist. (Abbildung entnommen aus (Ubersax und Ferrell 2007), mit freundlicher Genehmigung durch die Nature Publishing Group)

## 1.2 Paraloge Proteine

Proteine sind sehr komplexe Moleküle, die sich im Laufe der Evolution stetig weiterentwickelt und so immer spezialisiertere Aufgaben übernommen haben. Da die Primärsequenz der Proteine in der DNA codiert ist, kann es während der Meiose, z.B. durch ungleiches Crossing-over bei homologen Chromosomen, zu Genverdopplungen kommen. Durch Inversion, Translokation und Transposition können sich nun entstandene, homologe Gene im Genom verteilen. Durch das Vorhandensein zweier homologer Proteine besteht für eines der beiden Proteine die Möglichkeit zu divergieren, d.h. so zu mutieren, dass die grundsätzliche Funktion noch weiter, aber in einer leicht veränderten, spezialisierten Form ausgeführt wird. Erbringt das divergierte Protein einen zusätzlichen Nutzen für den Organismus und es findet durch

seine Veränderung keine Artneubildung statt, so sind das ursprüngliche und neue Protein paralog zueinander.

Ein gutes Beispiel für aus Genverdopplung entstandener paraloger Proteine sind die Mitglieder der Globinsuperfamilie. Das Vorfahren dieser Familie, welches für ein Sauerstoff-transportierendes Protein codierte, verdoppelte sich vor etwa 800 Millionen Jahren. Das Resultat ist das heutige Myoglobin, das andere Gen wurde zum Vorfahren für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globinfamilien, deren Trennung in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globine vor ca. 500 Millionen Jahren stattfand. Vor etwa 200 - 100 Millionen Jahren teilten sich schlussendlich sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -Gene noch weiter auf. Nach einer Entwicklungsgeschichte von etwa 800 Millionen Jahren spaltete sich das Vorläufergen der Globine also mehrfach auf, so dass heute beim Menschen auf Chromosom 22 nun ein Myoglobingen, auf Chromosom 16 drei  $\alpha$ -Globingene und auf Chromosom 11 fünf verschiedene  $\beta$ -Globingene existieren. Dass die Entwicklung hin zu mehreren verschiedenen Globinen einen zusätzlich Nutzen erbrachte, ist an den unterschiedlichen Expressionszeitpunkten der Globine während der menschlichen Entwicklung erkennbar, was eindeutig für eine Spezialisierung der einzelnen Globine spricht. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass in unterschiedlichen Entwicklungsstadien verschiedene Ansprüche an die Eigenschaften der Globine gestellt werden.

Doch nicht jeder während der Evolution entstandene Versuch war erfolgreich, denn es existieren auch sogenannte Pseudogene im humanen Genom, Gene die ebenfalls durch Genverdopplung entstanden sind, aber mittlerweile keine Funktion mehr aufweisen. Solch ein Funktionsverlust kann entweder durch eine fehlerhafte Duplikation oder durch das Ausbleiben einer klaren Verbesserung für den Organismus entstehen, so dass das betroffene Gen mit der Zeit wieder funktionslos wird (Klug *et al.* 2009).

Geschieht eine Genverdopplung bei der Proteinklasse der Enzyme, so werden die entstandenen Enzyme als Isoenzyme bezeichnet. Isoenzyme katalysieren immer noch die gleiche biochemische Reaktion, unterscheiden sich jedoch in Bezug auf Aktivität, Affinität oder in ihrer Lokalisation.

Die Bedeutung paraloger Enzyme soll kurz am Beispiel der Hexokinase gezeigt werden. Hexokinasen sind Kinasen welche den ersten Schritt der Glykolyse, die Umwandlung von Glucose zu Glukose-6-Phosphat, katalysieren. Bei Vertebraten kommen insgesamt vier verschiedene Isoformen der Hexokinase vor, welche als Hexokinase I bis IV bezeichnet werden. Einen bedeutenden Unterschied zu den anderen Isoenzymen weist die Hexokinase IV (oftmals auch als Glukokinase bezeichnet) auf,

denn sie wird als Einzige nicht von ihrem eigenen Produkt Glukose-6-Phosphat gehemmt. Dieses Phänomen wird mit dem Fehlen einer zweiten Hexokinase-Domäne erklärt. Die drei anderen Hexokinasen bestehen alle aus zwei fast gleichgroßen Hexokinase-Domänen, wobei nur eine der beiden Domänen katalytisch aktiv ist. Das zum Substrat sehr ähnliche Reaktionsprodukt Glukose-6-Phosphat kann an die zweite Hexokinase-Domäne binden und so die Aktivität der Kinasedomäne hemmen (Wilson 2003). Das Fehlen der zweiten Domäne bedingt die Unabhängigkeit der Hexokinase IV von ihrem Produkt (Kawai *et al.* 2005), und belegt ebenfalls die Spezialisierung paraloger Proteine.

### 1.3 Eukaryotische Proteinkinasen

Nahezu alle Protein-Phosphorylierungen in Eukaryoten werden durch die Superfamilie der eukaryotischen Proteinkinasen (ePK) katalysiert. Die ursprüngliche Annahme, dass sich diese Superfamilie nur auf Eukaryoten beschränkt, erwies sich jedoch nach genomweiten Analysen, bei denen ePKs auch in Bakterien und Archaeen nachgewiesen wurden, als falsch (Leonard *et al.* 1998). Im humanen Genom sind insgesamt 518 Gene nachgewiesen worden, die für Proteinkinasen codieren (siehe Abbildung 1.2), was in etwa 3% des gesamten Genoms entspricht (Manning *et al.* 2002). Auf Grund ihrer Spezifität für bestimmte Aminosäuren werden ePKs in zwei große Gruppen eingeteilt, die Serin/Threonin-Kinasen und die Tyrosin-Kinasen. Es wird davon ausgegangen, dass ca. ein Drittel aller humanen Proteine phosphoryliert werden. Bei einem Richtwert von etwa 30.000 Proteinen werden somit 10.000 von ihnen zu bestimmten Zeitpunkten phosphoryliert, ein großer Teil der Proteine wird auch wieder dephosphoryliert.

Bei etwa 500 vorhandenen Proteinkinasen ergeben sich somit im Durchschnitt 20 Proteinsubstrate pro Proteinkinase, für die etwas seltener vorkommenden Proteinphosphatasen ergeben sich sogar 60 Substrate pro Proteinphosphatase. Dies sind tendenziell eher konservative Schätzungen, da die meisten Proteine über mehrere Phosphorylierungsstellen verfügen. Des Weiteren gibt es eine Reihe von Isoenzymen unter den Proteinkinasen, bei denen viele Überlappungen im Substratprofil zu finden sind (Cohen 2002b).

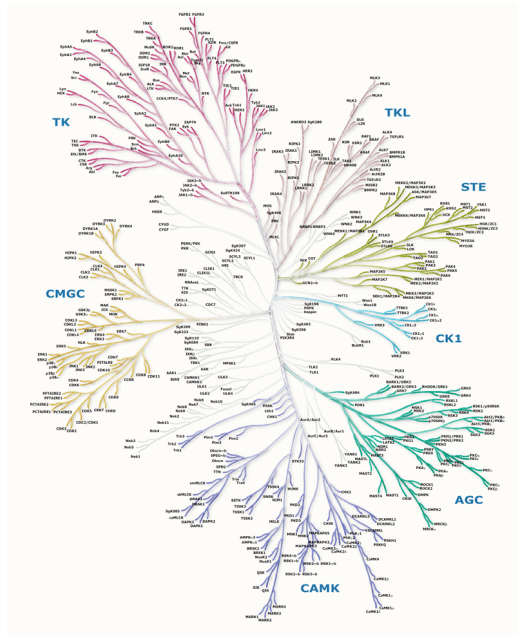


Abbildung 1.2: **Das humane Kinom**

In dem Dendrogramm des humanen Kinoms werden 491 der 518 Proteinkinasen dargestellt, die fehlenden 27 Proteinkinasen gehören zu den atypischen Proteinkinasen. Eingeteilt ist das Dendrogramm in CMGC-Kinasen (aus CDK, MAPK, GSK3 und CLK), TK (Tyrosinkinasen), TKL (Tyrosinkinase-ähnliche Kinasen), STE (MAPK-Kaskade-Kinasen STE3, STE11, STE20), CK1 (Caseinkinase 1), AGC (PKA, PKG und PKC) CAMK (Calmodulin-abhängige Proteinkinase). (Abbildung entnommen aus (Manning *et al.* 2002), mit freundlicher Genehmigung durch die AAAS)

### 1.3.1 Aufbau und Regulation der eukaryotischen Proteinkinasen

Eukaryotische Proteinkinasen besitzen eine hochkonservierte Struktur, sowohl in Bezug auf ihre globale Gestalt als auch in Bezug auf das aktive Zentrum. So bestehen alle ePKs aus zwei Domänen, in deren Spalt sich das aktive Zentrum befindet. Die kleinere, N-terminale Domäne wird größtenteils von  $\beta$ -Faltblättern ausgebildet, in der die Helix  $\alpha$ -C eine Ausnahme bildet. Die größere C-terminale Domäne besteht hingegen hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices (siehe Abbildung 1.7). Das aktive Zentrum ermöglicht in der aktiven Form der Kinase freien Zugang für einen Phosphodonor sowie für einen Phosphoakzeptor. In diesem Zustand befindet sich die



sogenannte Aktivierungsschleife in einer offenen Konformation. Durch diese offene Konformation befinden sich alle für den Phosphotransfer wichtigen Aminosäuren an hochkonservierten Positionen, so dass dieser Zustand bei allen ePKs nahezu identisch ist.

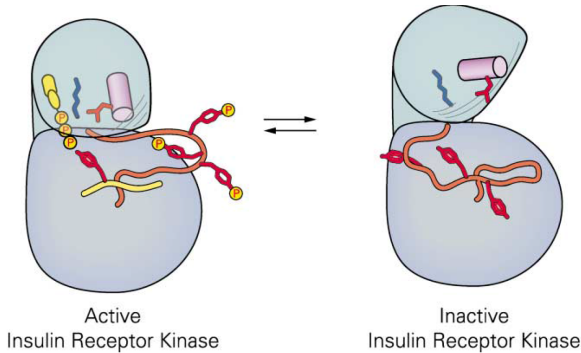


Abbildung 1.3: **aktive und inaktive Konformation einer Kinase**

Die Abbildung zeigt das Grundgerüst einer Proteinkinase am Beispiel der Insulinrezeptor Tyrosinkinase, nach Huse & Kuriyan 2002 (mit freundlicher Genehmigung von Elsevier). Zu sehen sind die kleineren N-terminalen Domäne, und die größeren C-terminalen Domäne, zwischen beiden liegt das aktive Zentrum. In diesem Fall muss für eine voll funktionsfähige Kinase die Aktivierungsschleife phosphoryliert sein, so dass sie in der offenen Konformation vorliegt. Ist die Aktivierungsschleife hingegen dephosphoryliert, so kollabiert die Schleife und blockiert das aktive Zentrum.

Im inaktiven Zustand hingegen befindet sich die Aktivierungsschleife in einer geschlossenen Form, was die Blockade des aktiven Zentrums zur Folge hat und so einen Phosphotransfer unmöglich macht (siehe Abbildung 1.3). Dieser inaktive Zustand unterscheidet sich zwischen den einzelnen ePKs zum Teil deutlich voneinander, auch wenn die Anzahl der Inaktivierungspfade begrenzt zu sein scheint.

Der reversible Übergang von einer inaktiven in eine aktive Kinase ist meist streng reguliert. So muss z.B. die Insulinrezeptor-Tyrosinkinase an ihrer Aktivierungsschleife phosphoryliert sein, um im aktiven Zustand vorliegen zu können (Hubbard 1997). Ist die Aktivierungsschleife jedoch dephosphoryliert, kollabiert dieser und blockiert das aktive Zentrum (siehe Abbildung 1.3) (Hubbard *et al.* 1994).

Allerdings gibt es noch zahlreiche weitere Arten der Aktivierung, so entdeckte etwa Walsh 1968, dass die durch zyklisches AMP (cAMP) vermittelten Signale durch die cAMP-abhängige Kinasen (CAPK) in der Zelle weitergeleitet werden. Diese Si-

gnalweiterleitung wird im Folgenden am Beispiel der Proteinkinase A, welche ein Mitglied der CAPKs ist, vorgestellt. Die PKA liegt zunächst als Heterotrimer, bestehend aus zwei katalytischen C-Untereinheiten und einem regulatorischen Dimer aus zwei R-Untereinheiten, in der Zelle vor. In diesem Zustand wird der Zugang zum aktiven Zentrum von den R-Untereinheiten blockiert, so dass die Proteinkinase sich in einem inaktiven Zustand befindet. Nach Eintreffen des cAMP in der Zelle bindet dieses an die R-Untereinheiten, woraufhin die beiden C-Untereinheiten von dem Dimer freigesetzt werden. Nach der Freisetzung gelangt die C-Untereinheit in ihren aktiven Zustand, so dass die Substrate der PKA phosphoryliert werden können. Sinkt im Laufe der Zeit die cAMP-Konzentration innerhalb der Zelle, nehmen die Interaktionen zwischen cAMP und der R-Untereinheit immer weiter ab. Die Folge ist die erneute Bindung der katalytischen an die regulatorischen Untereinheit und eine dementsprechende Inaktivierung der PKA. Mit dem Absinken der cAMP-Konzentration wird somit auch die weitere Phosphorylierung der PKA-Substrate immer weiter reduziert (Johnson *et al.* 1996) (Huse und Kuriyan 2002) (Kim *et al.* 2007).

Diese Beispiele verdeutlichen wie die Regulation der ePKs zwischen aktiver und inaktiver Kinasekonformation vonstatten gehen können. Die exakten Regulationsmechanismen variieren zum Teil enorm zwischen einzelnen ePKs, jedoch liegt in einer aktiven ePK der Aktivierungsschleife immer in der offenen Konformation vor.

### 1.3.2 Die Spine-Theorie

Die allgemeine regulatorische Struktur der ePKs wurde im vorigen Kapitel 1.3.1 erläutert. Doch um den wichtigen Mechanismus der Proteinregulierung zu erhalten, wurden im Laufe der Evolution weit mehr bedeutende Aminosäuren konserviert, als zunächst angenommen. Im Fokus waren jahrelang zunächst hauptsächlich katalytisch wichtige Aminosäuren, die sich im aktiven Zentrum der Kinase befinden. In diesem Bereich wurden schon recht früh mehrere für die Katalyse notwendige Aminosäuren, wie zum Beispiel das sehr prominente DFG-Motiv, bestehend aus einem Aspartat, einem Phenylalanin und einem Glycin, identifiziert. Die Regulation der Proteinkinasen ist allerdings weit tiefer in ihren Strukturen enthalten, doch um zu diesen Schluss zu gelangen, waren zunächst über 10 Jahre kristallographische Arbeiten an ePKs notwendig.

Mit Hilfe zahlreicher gelöster Strukturen von verschiedenen ePKs, sowohl im aktiven als auch im inaktiven Zustand, konnte ein Muster von bestimmten Aminosäuren

ausgemacht werden, deren strukturelle Bedeutung zunächst wegen ihrer teils weiten Entfernung zum aktiven Zentrum verborgen blieb. Möglich wurde dies dank eines neuen bioinformatischen LSP-Alignments (*local spatial pattern alignment*), in dem die Abstände der  $C_{\alpha}$ - und  $C_{\beta}$ -Atome der einzelnen Aminosäuren untereinander verglichen werden (Kornev *et al.* 2008a). Durch diese Analyse wurde zunächst für alle aktiven Proteinkinasen, deren Struktur zu diesem Zeitpunkt bekannt war, ein hochkonservierter Stapel - genannt Spine - aus mehreren hydrophoben Aminosäuren gefunden. Die Aminosäuren verbinden N- und C-Terminus miteinander und schließen das aus dem DFG-Motiv bekannte Phenylalanin in der aktiven Konformation mit ein (Kornev *et al.* 2006). Ist solch ein Spine in der Proteinkinase ausgebildet, liegen alle wichtigen Aminosäuren in einer bestimmten, hochkonservierten Ausrichtung vor, so dass das aktive Zentrum für die Katalyse vorbereitet ist (siehe Abbildung 1.4 A). Geraten die Aminosäuren des hydrophoben Spines jedoch in Unordnung, wie es bei einem geschlossenen Aktivierungsloop der Fall ist, liegen auch die katalytisch entscheidenden Aminosäuren in einer inaktiven Ausrichtung vor (siehe Abbildung 1.4 B). Da dieser hydrophobe Stapel also das Zustandekommen einer aktiven Kinasekonformation reguliert, wird er als regulatorischer Spine (R-Spine) bezeichnet.

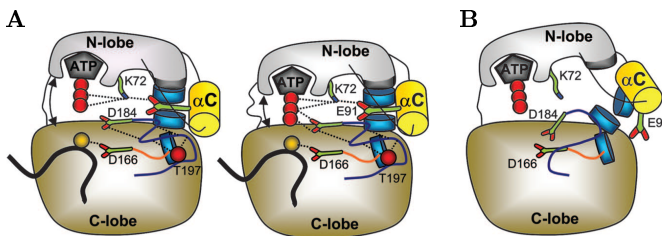


Abbildung 1.4: **Der regulatorische-Spine**

In dieser Abbildung wird das Prinzip des regulatorischen Spines dargestellt. A: Durch das Ausbilden des regulatorischen Spines aus hydrophoben Aminosäuren (blaue Scheiben), werden die für den Phosphoryltransfer notwendigen Aminosäuren ausgerichtet und in ihrer konservierten Position stabilisiert. Durch katalytisch wichtige Aminosäuren wird ATP so gebunden, dass eine aktive ePK vorliegt. B: Der regulatorische Spine ist ungeordnet, die katalytisch wichtigen Aminosäuren sind so ausgerichtet, dass ihre Position nicht mit der Katalyse der Reaktion vereinbar ist. (Abbildung entnommen aus (Kornev *et al.* 2006), mit freundlicher Genehmigung durch die PNAS)

Die Existenz des regulatorischen Spines verdeutlicht die Bedeutung einiger Aminosäuren fernab des aktiven Zentrums für eine aktive Proteinkinase. Kurze Zeit nach der Entdeckung des regulatorischen Spines, konnte die Spine-Theorie durch die Entdeckung eines zweiten Spines erweitert werden (Kornev *et al.* 2008b). Der zweite Spine besteht ebenfalls aus mehreren hydrophoben Aminosäuren und dehnt sich von der C-terminalen bis in die N-terminale Domäne hinein aus. Verankert sind beide Spines in der sehr hydrophoben Helix  $\alpha$ -F, welche sich komplett durch den C-terminalen Bereich der Proteinkinase erstreckt. Beim R-Spine besteht eine konservierte Salzbrücke zwischen dem Spine und der Helix, beim C-Spine hingegen sind zwei Aminosäuren des Spines sogar Bestandteil der Helix  $\alpha$ -F. Erstaunlicherweise ist dieser Spine jedoch unvollständig, da er eine Lücke in der ATP-Bindetasche aufweist. Sobald allerdings ein ATP Molekül bindet, wird diese Lücke durch den Adeninring des ATPs gefüllt (siehe Abbildung 1.5), die N-terminale und C-terminale Domäne schließen sich leicht, und der zweite Spine ist ebenfalls komplett. Da durch die Vervollständigung des Spines eine letzte, kleine Konformationsänderung bewirkt wird, und dieses für eine endgültig aktive Konformation verantwortlich ist, wird dieser Spine als katalytischer Spine (C-Spine) bezeichnet.

Zusammengefasst besagt die Spine-Theorie, dass zunächst der R-Spine ausgebildet werden muss, um die ATP-Bindetasche für das Binden von ATP auszurichten. Durch ein anschließend gebundenes ATP-Molekül wird das aktive Zentrum vervollständigt und ein Phosphotransfer kann stattfinden. Insgesamt werden also zwei vollständig ausgebildete Spines für eine voll aktive Kinase benötigt.

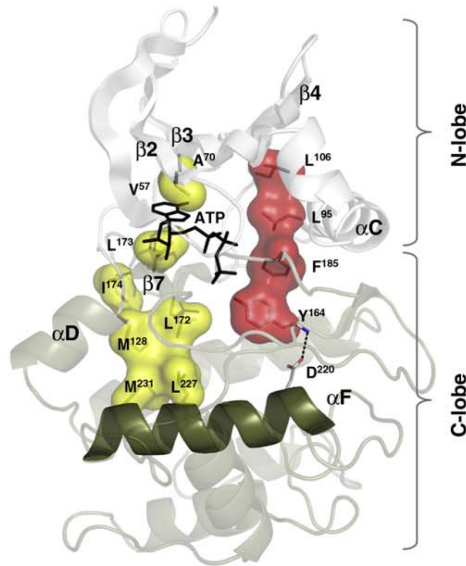


Abbildung 1.5: **Die Spines einer aktiven Proteinkinase**

Zu sehen sind die Spines am Beispiel der PKA. Der C-Spine (katalytischer Spine) ist in gelb und der R-Spine (regulatorische Spine) in rot dargestellt. Beide Spines verbinden C- und N-Terminus miteinander und liegen um das aktive Zentrum der Kinase. Der C-Spine beginnt ab der Helix  $\alpha$ -F und wird durch ein ATP-Molekül komplettiert. (Abbildung entnommen aus (Taylor und Kornev 2011), mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

### 1.3.3 Proteinkinase-Inhibitoren

Fehlregulierte ePKs können mit einer Vielzahl an Krankheiten wie Krebs, Diabetes oder auch Neurodegeneration in Verbindung gebracht werden. So ist es nicht weiter verwunderlich, dass ePKs nach den G-Protein gekoppelten Rezeptoren mittlerweile als zweitwichtigstes Target für die Entwicklung pharmakologischer Substanzen gelten (Cohen 2002a) (Sawyer 2004).

Am häufigsten werden Inhibitoren der Klasse I, d.h. ATP-kompetitive Inhibitoren, die an die aktive Form der Kinase binden, entwickelt (Eglen und Reisine 2009). Da die ATP-Bindetasche in ihrer aktiven Konformation jedoch sehr stark konserviert ist, ist es schwierig mit dieser Klasse an Inhibitoren ePKs spezifisch zu hemmen. Von daher ist es sehr beliebt, durch strukturbasiertes Wirkstoffdesign Inhibitoren der Klasse II zu entwickeln. Inhibitoren der Klasse II binden ebenfalls an die ATP-

Bindetasche, stabilisieren jedoch die inaktive Form der Kinase. Da die inaktive Konformation zwischen den ePKs sehr unterschiedlich ist, ermöglicht dies eine spezifischere Inhibition von ePKs.

Grundsätzlich ist diese Art der Inhibition auch sehr vielversprechend und führte z.B. mit Gleevec<sup>®</sup> schon zu erfolgreichen Medikamenten. Der Wirkstoff von Gleevec - Imatinib - bindet die inaktive Form der Bcr-Abl Kinase, und wird seit einigen Jahren erfolgreich gegen chronische myeloische Leukämie sowie gastrointestinale Stromatumore eingesetzt (Liu und Gray 2006). Ein großes Problem bei dieser Art von Inhibitoren stellt jedoch die beobachtete Ausbildung von Resistenzen gegen den Wirkstoff dar. So wurden nach einiger Zeit Mutation in der Bcr-Abl Kinase gefunden, welche die Kinase resistent gegen Imatinib machen können (Corbin *et al.* 2003) (Gorre *et al.* 2001). Von daher gehen die Bemühungen mittlerweile dahin, Inhibitoren gegen die entstandenen resistenten Bcr-Abl Kinasen zu entwickeln (Salah *et al.* 2011).

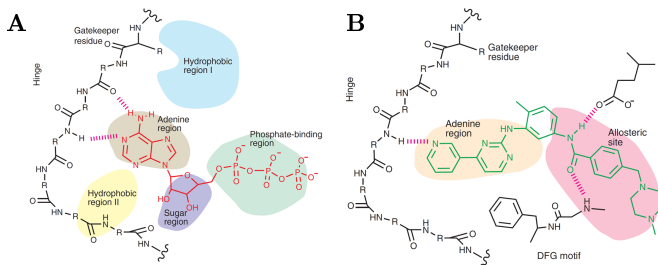


Abbildung 1.6: **Das Pharmacophore Modell**

A: Das Pharmacophore-Modell nach Traxler und Furet. Die ATP-Bindetasche wird in insgesamt fünf verschiedene Regionen eingeteilt. B: Erweiterung des Pharmacophore-Modells mit angrenzender allosterischer Bindetasche, die adressiert werden muss, um die Proteinkinase in ihrem inaktiven Zustand zu stabilisieren. (Abbildung entnommen aus (Liu und Gray 2006), mit freundlicher Genehmigung durch die Nature Publishing Group)

Weiterhin wurde mittlerweile auch gezeigt, dass Wirkstoffe mit einer geringeren Selektivität ebenfalls erfolgreich sein können, so ist schon seit einigen Jahren mit Nexavar<sup>®</sup> ein Multikinase-Inhibitor mit dem Wirkstoff Sorafenib auf dem Markt (Yu *et al.* 2013), der gegen Leber- und Nierenkrebs eingesetzt wird. Weitere Möglichkeiten der Inhibierung von ePKs funktionieren z.B. über die Bindung von Wirkstoffen an allosterischen Stellen des Proteins, oder aber in Form von Peptiden,

welche die Substratbindestelle blockieren können. Auch eine Kombination aus ATP-kompetitiven Inhibitoren mit Peptidketten, sogenannte Bisubstrat-Inhibitoren, ist möglich (Lavogina *et al.* 2010).

Um einen möglichst selektiven und potenten ATP-kompetitiven Inhibitor entwickeln zu können, bedarf es einiger Modifikationen an einer bereits vorhandenen Leitstruktur. Die ATP-Bindetasche ist in der Tat zwischen alle ePKs hochkonserviert, dennoch gibt es aber auch dort einzelne Aminosäuren, die sich zwischen den einzelnen ePKs unterscheiden und eine spezifische Inhibition ermöglichen.

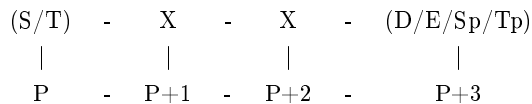
Für die rationale Weiterentwicklung ATP-kompetitiver Inhibitoren wurde das Pharmacophore-Modell (Traxler und Furet 1999) entwickelt, welches die ATP-Bindetasche in verschiedene Regionen einteilt (siehe Abbildung 1.6). Das zentrale Element der ATP-Bindetasche ist die Gelenkregion (*hinge*) als Verbindung zwischen N- und C-terminaler Domäne, die an ihrem N-terminalen Anfang die hydrophobe Region I und am C-terminalen Ende die hydrophobe Region II ausbildet. Beide flankieren die adenin-bindende Region, welche ebenfalls noch in Kontakt mit der Gelenkregion steht. Darüber hinaus wird die ATP-Bindetasche noch von der zucker-bindenden und der phosphat-bindenden Region geprägt. In all diese verschiedenen Richtungen kann theoretisch eine Leitstruktur weiter optimiert werden, um z.B. eine bessere Selektivität oder Löslichkeit zu erlangen. Für eine Optimierung in Bezug auf Selektivität bieten sich jedoch speziell die hydrophoben Taschen an, da an diesen Stellen die größten Unterschiede zwischen den einzelnen ePKs vorhanden sind (Noble *et al.* 2004).

Die Optimierung der Selektivität von potenten Leitstrukturen ist sicherlich meistens die größte Herausforderung bei der Entwicklung von Proteinkinase-Inhibitoren. Ist die Weiterentwicklung einer Leitstruktur dafür gedacht einen Wirkstoff herzustellen, der auch in klinischen Studien angewendet werden kann, sind neben möglichst guten Bindungseigenschaften und Selektivität weitere Faktoren wie Absorption und Verteilung des Wirkstoffs von Bedeutung. Um diese Eigenschaften zu erreichen, bedarf es einiger Optimierungen an der Leitstruktur. Zu diesem Zweck wurden die „*Rule of five*“ von Lipinski anhand von Erfahrungswerten bei bekannten Substanzen aufgestellt (Lipinski *et al.* 2001), die einige Richtwerte über Molekülmasse, Anzahl der möglichen Bindungspartner und Lipophilie geben, an denen sich bei der Entwicklung orientiert werden kann.

## 1.4 Die Proteinkinase CK2

Die Proteinkinase CK2, früher Caseinkinase 2 genannt, wurde bereits 1954 als erste Proteinkinase von Burnett und Kennedy beschrieben (Burnett und Kennedy 1954), wobei sich hinter dem Begriff Protein-Phosphokinase höchstwahrscheinlich die beiden Proteinkinasen CK1 und CK2 verbargen.

Die Proteinkinase CK2 ist eine hochkonservierte Serin/Threonin Kinase, welche zu der Familie der CMGC-Kinasen gehört (siehe Abbildung 1.2). Sie wurde sowohl in allen Eukaryoten (Guerra und Issinger 1999), als auch in sämtlichen Gewebetypen gefunden (Faust und Montenarh 2000) und ist somit ubiquitär vertreten. Die CK2 ist ein Heterotetramer und besteht aus zwei katalytischen CK2 $\alpha$ - und zwei regulatorischen CK2 $\beta$ -Untereinheiten. Die CK2 $\alpha$ -Untereinheit ist stets aktiv und liegt *in vivo* sowohl als Monomer als auch im Holoenzym vor. Die Untereinheit CK2 $\beta$  bildet stets ein stabiles Dimer und wird oftmals als regulatorische Untereinheit bezeichnet, da sie Aktivität, Spezifität und Regulation der  $\alpha$ -Untereinheit beeinflussen kann (Issinger 1993). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass CK2 $\beta$  nicht nur ein Wechselwirkungspartner für die CK2 $\alpha$  ist, sondern noch über 40 weitere Wechselwirkungspartner hat (Filhol *et al.* 2004). Eine bemerkenswerte Eigenschaft der CK2 $\alpha$  ist ihre Pleiotropie, so wurden mittlerweile über 300 Substrate *in vitro* beschrieben (Meggio und Pinna 2003) (Salvi *et al.* 2009), des weiteren bevorzugt sie saure Substrate und hat eine recht kurze Konsensussequenz für die Substraterkennung (Marchiori *et al.* 1988).



Bemerkenswerterweise wurde die CK2 bislang ausschließlich als aktives Enzym beobachtet, und eine Regulation durch *second messenger* oder Ähnliches ist nicht bekannt, so dass die CK2 als konstitutiv aktive Kinase beschrieben wird (Allende und Allende 1995). Weiterhin ist die CK2 im Gegensatz zu den meisten anderen ePKs in der Lage als Phosphodonor neben ATP auch GTP zu verwenden (Traugh und Traut 1974), eine Eigenschaft, die als duale Co-Substratspezifität bezeichnet wird.

Die Funktionen der CK2 in der Zelle sind vielfältig, was vermutlich mit dem großen Substratspektrum und der konstitutiven Aktivität zu erklären ist. Involviert ist



die CK2 unter anderem in Zellzyklus (Litchfield 2003), Proliferation und Apoptose (Guerra und Issinger 1999).

Die CK2 konnte mittlerweile mit einer Reihe von Krankheiten in Verbindung gebracht werden, wobei der Einfluss der CK2 auf Krebszellen hierbei sicher eine herausragende Stellung einnimmt. Die CK2 selbst scheint jedoch nicht fehlreguliert zu sein, für das CK2-Gen sind bislang keine Onkogen-Mutationen bekannt, doch in nahezu allen Krebszellen konnte eine erhöhte CK2-Expression nachgewiesen werden (Trembley *et al.* 2009). Der direkte Zusammenhang zwischen der erhöhten CK2-Konzentration und Tumoren konnte mittlerweile in verschiedenen Experimenten eindrucksvoll gezeigt werden, so induzierte die Überexpression der CK2 die Proliferation (Seldin und Leder 1995) und die Hemmung der CK2 durch TBB in Krebszellen leitete die Apoptose ein (Ruzzene *et al.* 2002). Ebenso fiel auch der Einfluss von CK2-Aktivität für die Angiogenese auf (Mottet *et al.* 2005). Somit kann festgehalten werden, dass die Kombination der CK2 als Mediator der Proliferation und Angiogenese sowie als Suppressor der Apoptose mehrere Schlüssel-Eigenschaften von Krebszellen unterstützt.

### 1.4.1 Aufbau der CK2

Die ersten strukturellen Informationen über die CK2 ergab die Kristallstruktur der CK2 $\alpha$  aus *Zea mays* (Niefind *et al.* 1998) in Komplex mit ATP. In dieser ersten Kristallstruktur der CK2 $\alpha$  wurden schon die ersten Besonderheiten der katalytischen Untereinheit offensichtlich. So fiel in der Struktur der N-Terminus auf, der ungewöhnlicherweise sehr dicht an der Aktivierungsschleife der CK2 $\alpha$  vorbeiläuft und mit dieser interagiert (siehe Abbildung 1.7). Ebenso wurde in der Publikation auf das in der CK2 $\alpha$  einzigartige DWG-Motiv verwiesen, welches das normalerweise hochkonservierte DFG-Motiv der ePKs ersetzt. In der Struktur konnte gezeigt werden, dass das Tryptophan, im Gegensatz zu einem Phenylalanin, in der Lage ist mit einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke den Aktivierungsloop in der aktiven Konformation zu stabilisieren. Diese strukturellen Ergebnisse lieferten erste Erkenntnisse, die die konstitutive Aktivität der CK2 $\alpha$  erklären könnten.

Außerdem fiel die Gelenkregion auf, die in einer einzigartigen Konformation vorliegt, bis zu dieser Kristallstruktur wurde kein entsprechender Unterschied in den Gelenkregionen aller ePKs gefunden. Da die neue Konformation der *zmCK2 $\alpha$*  der ATP-Bindetasche eine etwas größere räumliche Ausdehnung erlaubt, wurde diese daraufhin als offene Konformation bezeichnet. Diese ungewöhnliche Konformati-

on sollte schon ein Jahr später mehr Sinn ergeben, als eine weitere Struktur der *zmCK2 $\alpha$*  gelöst wurde, dieses Mal mit GMPPNP (Niefind *et al.* 1999). In dieser Struktur wird deutlich, wie der durch die offene Konformation zusätzliche Platz in der ATP Bindungsstelle für die GTP-Bindung genutzt wird.

Die erste Kristallstruktur der CK2 $\beta$ -Untereinheit konnte 1999 gelöst werden (Chantalat *et al.* 1999), in der die Dimerisierung über ein Zinkfingermotiv gezeigt werden konnte. Schließlich konnte 2001 auch die Struktur des CK2-Holoenzym gelöst werden (Niefind *et al.* 2001), durch die die genaue Bindung der beiden CK2 $\alpha$ -Untereinheiten über die  $\beta$ 4/ $\beta$ 5-Schleife an das CK2 $\beta$ -Dimer aufgeklärt wurde.

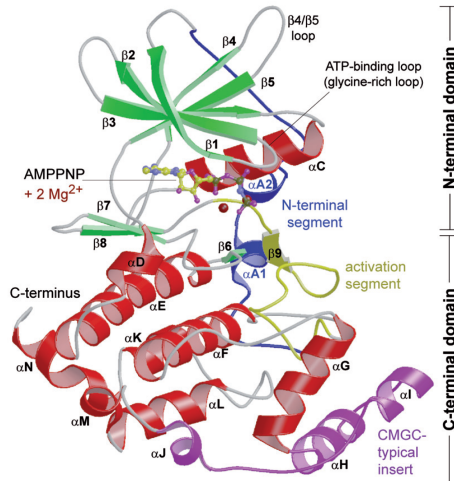


Abbildung 1.7: **Die Struktur der CK2 $\alpha$**

In der Abbildung sind einzelne Strukturelemente der CK2 $\alpha$  dargestellt. Der N-Terminus besteht, mit Ausnahme der Helix  $\alpha$ C, aus  $\beta$ -Faltblättern, der C-Terminus besteht größtenteils aus  $\alpha$ -Helices. Das aktive Zentrum befindet sich zwischen beiden Domänen, der Aktivierungsloop liegt in der offenen, aktiven Konformation vor. Die Helix  $\alpha$ F bildet das Zentrum des gesamten C-terminalen Bereichs. ((Niefind *et al.* 2009), mit freundlicher Genehmigung von Springer)

Im Laufe der nächsten Jahre kamen etliche weitere CK2-Strukturen hinzu, zumeist in Komplex mit verschiedenen Inhibitoren. In diesen Strukturen konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Kontaktstelle der *hsCK2 $\alpha$* , die  $\beta$ 4/ $\beta$ 5-Schleife, normalerweise in einer geschlossenen Konformation vorliegt und nur bei Bindung an die

*hsCK2 $\beta$* -Untereinheit eine offene Konformation einnimmt. Die  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife der *zmCK2 $\alpha$*  hingegen wurde bislang in allen Strukturen ausschließlich in einer offenen Konformation vorgefunden. Darüber hinaus wurde in der *hsCK2 $\alpha$*  eine Flexibilität in der Gelenkregion entdeckt (Niefind und Issinger 2010), die sie von der *zmCK2 $\alpha$*  unterscheidet. Denn diese kann sowohl in der offenen Konformation als auch in der für ePKs typischen geschlossenen Konformation vorliegen.

Die konstitutive Aktivität der *CK2 $\alpha$*  wurde mittlerweile durch über 40 publizierte Strukturen bestätigt, in denen bislang ausschließlich die aktive Konformation mit einer offenen Aktivierungsschleife nachgewiesen werden konnte. Lediglich in einer Struktur konnte die Blockade der ATP-Bindetasche durch eine kollabierte ATP-bindende Schleife beobachtet werden (Raaf *et al.* 2009). Inwiefern diese inaktive Konformation *in vivo* eine Rolle spielt, konnte allerdings noch nicht gezeigt werden.

### 1.4.2 CK2 $\alpha$ -Inhibitoren

Wie zuvor in Kapitel 1.4 beschrieben, beeinflusst die Proteinkinase *CK2* den Zellzyklus und ist ebenfalls ein Schlüsselenzym in Krebszellen. Von daher ist die *CK2* schon seit längerem das zentrale Thema von verschiedensten Forschungsprojekten. Vor allem die Arbeit mit der *CK2* in Kombination mit verschiedenen Inhibitoren entwickelte sich als wichtiges Mittel zu Erforschung der Eigenschaften dieser ungewöhnlichen Proteinkinase (Kramerov und Ljubimov 2012).

Mehrere Übersichtsartikel über die Verwendung von Inhibitoren mit der *CK2* sind in den letzten Jahren erschienen und fassen die bisher bekannten Ergebnisse zusammen (Prudent und Cochet 2009) (Battistutta 2009) (Cozza *et al.* 2012). Sowohl natürliche Inhibitoren aus den Gruppen der Flavonole und Anthrachinone als auch synthetisch hergestellte Inhibitoren haben sich in den vergangenen Jahren als besonders potente *CK2*-Inhibitoren erwiesen. Apigeninin, welches beispielsweise in Sellerie vorkommt, und Emodin, welches aus Rhabarber stammt, sind Beispiele für natürliche Wirkstoffe. Tetrabromobenzimidazol (TBB) hingegen ist der wahrscheinlich meistgenutzte, synthetisch hergestellte Inhibitor (siehe Abbildung 1.8). Mit diesen und weiteren Inhibitoren, die alle der Klasse I Inhibitoren angehören, konnte inzwischen in verschiedenen Krebszelllinien die Induktion der Apoptose gezeigt (Olsen *et al.* 2007) (Farah *et al.* 2003) (Sarno *et al.* 2005) oder auch die Suppression der Angiogenese (Kramerov *et al.* 2008) durch *CK2*-Inhibition nachgewiesen werden. Besonders war allerdings die Beobachtung, dass der ebenfalls ATP-kompetitive Inhibitor 5,6-dichloro-1-beta-D-Ribofuranosylbenzimidazole (DRB) auch die Wechselwirkung

zwischen der CK2 $\alpha$ - mit der CK2 $\beta$ -Untereinheit beeinflusst, indem er neben der kanonischen ATP-Bindestasche auch die CK2 $\beta$ -Bindestelle der CK2 $\alpha$  adressiert (Raaf *et al.* 2008b). Neben dem DRB wurden noch wenige weitere Substanzen entdeckt, welche die CK2 $\beta$ -Bindestelle adressieren (Laudet *et al.* 2008), grundsätzlich liegt der Fokus jedoch stark auf der Entwicklung von ATP-kompetitiven Inhibitoren gegen die CK2 $\alpha$ -Untereinheit.

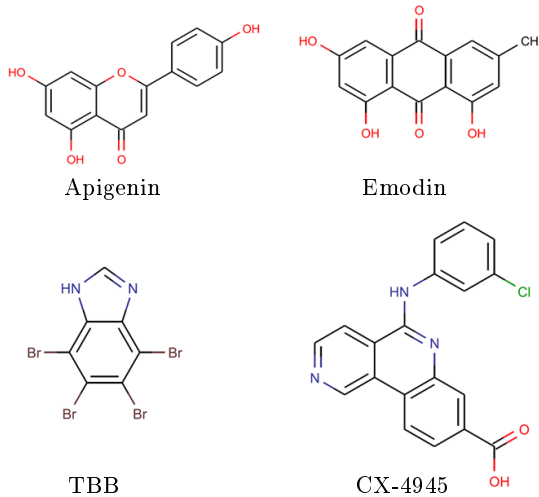


Abbildung 1.8: **CK2-Inhibitoren**

Strukturen bekannter CK2-Inhibitoren. Apigenin: ein Vertreter aus der Klasse der Flavonole/ Emodin: ein Vertreter aus der Klasse der Anthrachinone/ TBB (Tetrabromobenzimidazol): ein synthetisch hergestellter Wirkstoff/ CX-4945: erster CK2-Inhibitor in der ersten klinischen Phase

Bislang gingen die Bemühungen der Weiterentwicklung von CK2-Inhibitoren zu meist in die Richtung potentere und selektivere Inhibitoren für Forschungszwecke in Zelllinien zu erhalten, um mit ihnen weitere Eigenschaften der CK2 *in vivo* zu erforschen. Die Entwicklung eines spezifischen CK2-Inhibitors, der tatsächlich in klinischen Studien getestet werden kann, erschien auf Grund der vielfältigen und überlebenswichtigen Eigenschaften der CK2 lange Zeit als utopisch. Von daher war es etwas überraschend, als der CK2-Inhibitor CX-4945 die Zulassung zur ersten klinischen Phase erhielt (Pierre *et al.* 2011). Dies zeigt, dass ein CK2-Inhibitor unter pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Gesichtspunkten machbar sein

kann. Aber unabhängig davon, ob die klinischen Studien des Inhibitors erfolgreich verlaufen werden, die Bemühungen um potentere und selektivere Inhibitoren werden stetig voranschreiten, um weitere Erkenntnisse über die Rolle der Proteinkinase CK2 *in vivo* zu erhalten.

### 1.4.3 Die Isoformen CK2 $\alpha$ und CK2 $\alpha'$

Neben der schon erwähnten CK2 $\alpha$ , kommen mit der CK2 $\alpha'$  und der CK2 $\alpha''$  noch zwei weitere Isoformen der katalytischen Untereinheit der CK2 in Vertebraten vor. Während es sich bei der CK2 $\alpha'$  um ein paraloges Protein handelt, welches auf einem anderen Chromosom codiert ist als die CK2 $\alpha$  (Lozemann *et al.* 1990) (Yang-Feng *et al.* 1994), ist die Isoform CK2 $\alpha''$  vermutlich eine Splicingvariante der CK2 $\alpha$  (Shi *et al.* 2001). Bei allen drei Isoformen handelt es sich um katalytisch aktive Proteinkinasen, die Isoformen CK2 $\alpha'$  und CK2 $\alpha''$  sind bislang jedoch deutlich weniger als CK2 $\alpha$  untersucht (Litchfield *et al.* 2001).

Die beiden paralogen Isoformen CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  besitzen eine sehr hohe Sequenzidentität, von Aminosäure 1-330 beträgt diese 85 %, die C-terminalen Enden unterscheiden sich jedoch komplett in Länge und Sequenz (siehe Abbildung 8.1 in Kapitel 8). Die CK2 $\alpha$  besteht aus insgesamt 391 Aminosäuren, ihre Isoform hingegen nur aus 350. Aus diesen Aminosäuresequenzen resultieren Molekulargewichte von 45 kDa für die CK2 $\alpha$  und 41 kDa für die CK2 $\alpha'$ . Beide  $\alpha$ -Untereinheiten können unabhängig voneinander mit der CK2 $\beta$ -Untereinheit wechselwirken, so dass sich drei verschiedene CK2-Holoenzym Isoformen, bestehend aus 2CK2 $\alpha$ -2CK2 $\beta$ , 2CK2 $\alpha'$ -2CK2 $\beta$  und CK2 $\alpha$ -2CK2 $\beta$ -CK2 $\alpha'$ , ergeben können (Pinna 2002).

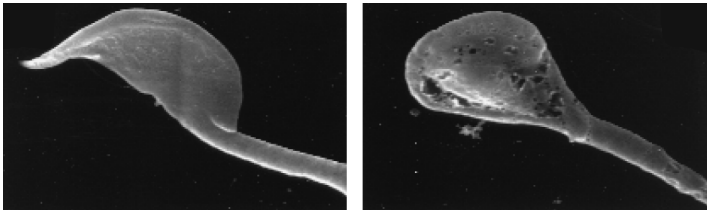


Abbildung 1.9: **Spermatozoon aus WT- und *Csnk2a2*<sup>-/-</sup>-Mäusen**

A: Spermatozoon mit normaler Kopfform von WT-Mäusen. B: Spermatozoon mit runder, abnormaler Kopfform (Globozoospermie) von *Csnk2a2*<sup>-/-</sup>-Mäusen. (Abbildung entnommen aus (Xu *et al.* 1999), mit freundlicher Genehmigung durch die Nature Publishing Group)

Weitere wesentliche Unterschiede zwischen den Isoformen CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  konnten schon auf verschiedenen Ebenen nachgewiesen werden. Zum einen führten Knockout-Experimente der CK2 $\alpha$  (Csnk2a1 $^{-/-}$ ) in Mäusen zu embryonaler Letalität (Lou *et al.* 2008), wohingegen sich Mäuse aus CK2 $\alpha'$  (Csnk2a2 $^{-/-}$ ) Knockout-Experimenten als überlebensfähig erwiesen. Allerdings führte dieser Knockout bei männlichen Mäusen zu einer Globozoospermie (siehe Abbildung 1.9) aufgrund einer unvollständigen Spermatogenese, so dass diese Mäuse unfruchtbar waren (Xu *et al.* 1999). Andere Untersuchungen zeigten ein unterschiedliches Expressionsprofil der Isoformen, während die CK2 $\alpha$  in allen untersuchten Geweben exprimiert wird, findet die Expression der CK2 $\alpha'$  hauptsächlich im Gehirn und in den Hoden statt (Guerra *et al.* 1999). Zusätzlich wurden eine Glykosylierungsstelle (Tarrant *et al.* 2012) und vier Phosphorylierungsstellen am C-Terminus der CK2 $\alpha$  ausgemacht (Bosc *et al.* 1995). Im Laufe des Zellzyklus muss die CK2 an diesen Stellen phosphoryliert werden, damit die Mitose erfolgreich durchlaufen werden kann (St-Denis *et al.* 2009), die CK2 $\alpha'$  besitzt hingegen keine bekannten Phosphorylierungsstellen. Weiterhin ist seit einiger Zeit ein thermostabilisierender Einfluß der CK2 $\beta$ -Untereinheit auf die CK2 $\alpha$  bekannt, welcher bei der CK2 $\alpha'$  in dieser Form nicht nachgewiesen werden konnte (Olsen *et al.* 2006)(Olsen *et al.* 2008).

Es lässt sich zusammenfassen, dass einige interessante Unterschiede zwischen den beiden Isoformen in den letzten Jahren festgestellt wurden wobei, abgesehen vom Expressionsprofil, der C-Terminus die größten Differenzen zu offenbaren scheint. Strukturell konnten die beiden Isoformen jedoch bis vor kurzem noch nicht miteinander verglichen werden, da bis 2009 ausschließlich Kristallstrukturen der CK2 $\alpha$ -Isoform gelöst wurden. Außerdem konnten bislang noch keine strukturellen Informationen über den C-Terminus der CK2 $\alpha$  gewonnen werden, da das C-terminale Ende scheinbar keine geordnete Strukturen ausbildet und sich so mittels Röntgenstrukturanalyse nicht sichtbar machen lässt.

Aus diesen Gründen gab es schon seit längerem das Bestreben, erste Information über die Struktur der CK2 $\alpha'$  sowie weitere strukturelle Hinweise auf die C-terminalen Unterschiede zu erlangen.



## 2 Voraussetzungen und Ziele dieser Arbeit

Die Strukturen der humanen CK2 $\alpha$  und CK2 $\beta$  sind mittlerweile sowohl als Monomer als auch als CK2-Holoenzym aufgeklärt. Vor allem von der *hsCK2 $\alpha$*  existieren mittlerweile viele Strukturen, die das Enzym sowohl als Apoenzym als auch mit ATP-Analoga oder mit ATP-kompetitiven Inhibitoren zeigen. Auf die erste Kristallstruktur der *hsCK2 $\alpha'$*  hingegen musste bis ins Jahr 2009 gewartet werden (Nakaniwa *et al.* 2009).

Diese lange Wartezeit ist hauptsächlich zwei Gründen geschuldet. Zum einen war das Interesse an der *hsCK2 $\alpha'$*  auf Grund der deutlich eingeschränkten Expression im Gegensatz zur *hsCK2 $\alpha$*  um einiges geringer und zum anderen gab es mit der *hsCK2 $\alpha'$*  lange Zeit Löslichkeitsprobleme, so dass ein Arbeiten mit dem gereinigten Protein nicht möglich war (Olsen *et al.* 2006).

Um dennoch strukturelle Informationen über die *hsCK2 $\alpha'$*  zu erhalten gab es verschiedene Ansätze. Einer davon sah eine Chimäre aus *hsCK2 $\alpha$* <sup>1–325</sup> und *hsCK2 $\alpha'$* <sup>327–350</sup> vor, um die Löslichkeitsprobleme der *hsCK2 $\alpha'$*  zu umgehen und zumindest erste Informationen über den einzigartigen C-Terminus zu erhalten. Dieser Ansatz erwies sich auch als erfolgreich, so dass das chimäre Protein in *E.coli* exprimiert werden konnte. Die erhaltene Chimäre zeigte jedoch eine langsam, aber sichere Neigung Dimere auszubilden. Aus dieser Erkenntnis heraus fiel das Augenmerk auf ein Cystein an Position 336 der Aminosäuresequenz als möglicher Kandidat für die Bildung von Disulfidbrücken innerhalb der *hsCK2 $\alpha'$* . Um die Bildung von Disulfidbrücken an den C-terminalen Enden zu vermeiden, wurde eine *hsCK2 $\alpha'$* <sup>Cys336Ser</sup>-Mutante erstellt, welche sich auch tatsächlich als exprimierbar und stabil herausstellte.

Als mit der vorliegenden Arbeit im April 2009 begonnen wurde, hatte eine Arbeitsgruppe aus Japan ebenfalls das Löslichkeitsproblem der *hsCK2 $\alpha'$*  mit einer C-terminalen Deletionsmutante *hsCK2 $\alpha'$* <sup>1–334</sup> in den Griff bekommen und konnte die erste Struktur der *hsCK2 $\alpha'$*  mit der PDB-ID 3E3B veröffentlichen (Nakaniwa *et al.* 2009). Die gelöste und veröffentlichte Struktur wies allerdings erhebliche Qua-



litätsmängel auf, zusätzlich bestand aufgrund der Deletion am C-Terminus keine Möglichkeit weitere Informationen über diese hochinteressante Region zu erhalten. Die Kristallisation der *hsCK2 $\alpha$ '<sup>Cys336Ser</sup>*-Mutante sollte eine neue Möglichkeit eröffnen, strukturelle Unterschiede und Besonderheiten der *hsCK2 $\alpha$ '* aufzudecken. Besonders der Bereich des C-Terminus ist wie zuvor schon erwähnt von besonderer Bedeutung, aber auch die Bindung an die regulatorische Untereinheit CK2 $\beta$  ist von großem Interesse. Darüber hinaus wurden alle bisher bekannten CK2-Inhibitoren lediglich für die Isoform der *hsCK2 $\alpha$*  entwickelt. Um auch mögliche Unterschiede in der strukturellen Bindung von Inhibitoren ausmachen zu können, sollten sowohl die *hsCK2 $\alpha$ '<sup>Cys336Ser</sup>*, als auch die *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>* mit verschiedenen, hochpotenten CK2 $\alpha$ -Inhibitoren co-kristallisiert werden. Zu diesem Zweck standen mehrere CK2-Inhibitoren bereit.

Für diese Arbeit fanden zum Einen das TBB-Derivat MB002 (Bretner *et al.* 2008) mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $0,32 \mu M$ , sowie das Flavonol-Derivat FLC21 (Golub *et al.* 2011) mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $0,04 \mu M$  gegen die CK2 $\alpha$  Anwendung (siehe Abbildung 2.1).

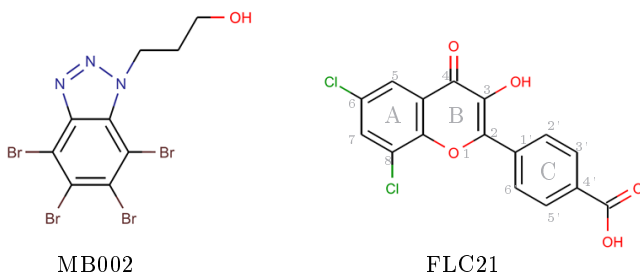


Abbildung 2.1: **Verwendete CK2-Inhibitoren**

Chemische Struktur der beiden für diese Arbeit verwendeten Inhibitoren. MB002 [3-(4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzotriazol-1-yl)], FLC21 [4-(6,8-Dichloro-3-hydroxy-4-oxo-4*H*-chromen-2-yl)benzoic acid]

### 3 Theoretische Grundlagen zur Röntgenstrukturanalyse

Struktur-Funktionsbeziehungen von Proteinen gewinnen in der aktuellen Forschung an immer größerer Bedeutung. Um möglichst weitreichende Informationen zu erhalten, wird hierfür die dreidimensionale Struktur des Proteins auf atomarer Ebene benötigt. Für dieses Ziel stehen momentan zwei grundlegend verschiedene Methoden, die Röntgenstrukturanalyse und die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR = *nuklear magnetic resonance spectroscopy*) zur Verfügung.

Bei der Röntgenstrukturanalyse werden Einkristalle mit elektromagnetischen Wellen im Röntgenbereich bestrahlt, die an den Elektronen des Moleküls gebeugt werden. Aus dem daraus für Kristalle resultierenden typischen Diffraktionsmuster lässt sich eine Elektronendichtekarte erstellen, in die die einzelnen Atome genau eingepasst werden können. Bei der NMR-Spektroskopie hingegen werden die Proteinproben in einer wässrigen Lösung in ein homogenes Magnetfeld gebracht, an dem sich bestimmte Atomkerne ausrichten. Durch das Einstrahlen von Radiowellen wird die Magnetisierung gestört, und ein elektrisches Signal kann beobachtet werden. Die erhaltenen Informationen geben Aufschluss über die Abstände der einzelnen Atomkerne zueinander, so dass eine Bestimmung der Probe möglich ist.

Dass Proteinstrukturen auf zwei verschiedene Weisen hergestellt werden können ist ein sehr positiver Aspekt. Dies eröffnet die Möglichkeit die Strukturen der verschiedenen Methoden miteinander zu vergleichen und gibt den erhaltenen Informationen somit einen enormen Mehrwert. Zusätzlich haben unterschiedliche Methoden meist ihre Vor- und Nachteile und können daher gut bei verschiedenen Fragestellungen und Problematiken genutzt werden.

Die Entwicklung einer NMR-Struktur ist z.B. auf Grund des extrem hohen Informationsgehalts immer noch deutlich aufwendiger als bei der Röntgenstrukturanalyse, weshalb diese Methode bei Proteinen über 30 kDa keine Anwendung mehr findet. Weiterhin ist es bei verschiedenen Proteinen nicht möglich diese in Lösung zu bringen, was für das NMR-Experiment jedoch unabdingbar ist. Die Vorteile der NMR-

Spektroskopie sind jedoch, dass eine sehr gute Auflösung erzielt werden kann, die Proteine sich in Lösung befinden sowie mögliche Aussagen über Proteindynamiken, die direkt in den Messungen enthalten sind.

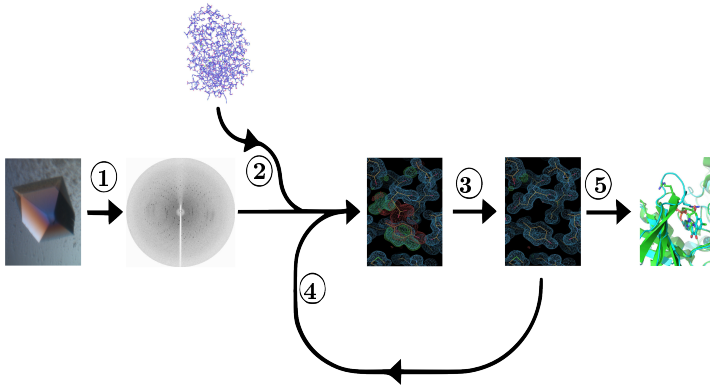


Abbildung 3.1: **Die Arbeitsschritte der Röntgenstrukturanalyse**

**1) Das Experiment:** Als Grundvoraussetzung für ein erfolgreiches Röntgenstrukturrexperiment wird ein geeigneter Proteinkristall in Cryolösung benötigt (Kapitel 3.1 und 3.2). Mit dieser Voraussetzung kann eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt werden.

**2) Molekularer Ersatz:** Mittels molekularen Ersatzes werden die ersten Phasen für die Diffraktionsbildern berechnet (Kapitel 3.5.2). Die ermittelten Phasen liefern eine erste Elektronendichtekarte.

**3) Strukturverfeinerung:** Mit Hilfe von Computersoftware wird die Struktur an die vorhandenen Elektronendichten angepasst (Kapitel 3.6).

**4) Neue Phasen:** Die angepasste Struktur dient als Vorlage für neue Phasen, um eine verbesserte Elektronendichtekarte zu erhalten.

**5) Strukturanalyse:** Die Endverfeinerte Struktur kann für Strukturanalysen verwendet werden.

Als erster Flaschenhals der Röntgenstrukturanalyse besteht die Züchtung von beugungsfähigen Einkristallen, dies alleine führt dazu, dass diese Methode für einige Proteine keine Anwendung finden kann. Außerdem befinden sich die Proteine im Kristall verschiedenen kristallbedingter Kontakte ausgesetzt, die einen Einfluß auf die Konformation des Proteins haben können. Dafür ist mit dieser Methode die Strukturlösung von recht großen Proteinkomplexen, sowie von Membranproteinen möglich. Mittlerweile sind fast 80.000 Strukturen der knapp 90.000 in der PDB

hinterlegten Strukturen mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse entstanden, was eindrucksvoll die Bedeutung dieser Methode belegt.

Zur besseren Übersicht werden in Abbildung 3.1 die wichtigsten Arbeitsschritte der Röntgenstrukturanalyse kurz vorgestellt.

### 3.1 Kristallisation

Die kleinste geometrische Einheit eines Kristalls wird Elementarzelle genannt, mit der das gesamte Kristallgitter des Kristalls beschrieben werden kann. Die Elementarzelle wird durch Gitterpunkte dargestellt, welche durch die Ecken der Elementarzelle festgelegt und durch die Basisvektoren  $\vec{a}$ ,  $\vec{b}$  und  $\vec{c}$ , sowie die Winkel  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  beschrieben werden können. Aus diesen Basisvektoren und Winkeln ist es möglich insgesamt sieben verschiedenen Kristallsysteme zu bilden. Das triklin Kristallsystem ist das primitivste aller sieben möglichen Systeme, und stellt keine Anforderungen an die Basisvektoren und Winkel. Die sechs weiteren Kristallsysteme werden monoklin, orthorhombisch, hexagonal, tetragonal, trigonal und kubisch genannt, wobei z.B das kubische System die höchsten Anforderungen an die Basisvektoren und Winkel stellt, da diese jeweils gleich sein müssen. Innerhalb dieser sieben Kristallsysteme können zusätzlich Zentrierungen vorkommen, aus denen die 14 möglichen Bravais-Gitter resultieren, welche von Auguste Bravais schon 1849 klassifiziert wurden. Erstrecken sich die Bravaisgitter in einem dreidimensionalen Raum, können die Symmetrioperationen Translation, Rotation, Schraubenrotation, Spiegelung, Gleitspiegelung und Inversion, sowie Kombinationen dieser Operationen auf sie angewendet werden, was schlussendlich zu 230 möglichen Raumgruppen führt. Da in dieser Arbeit jedoch ausschließlich Proteinkristalle behandelt werden, können die Symmetrioperationen Spiegelung, Gleitspiegelung und Inversion auf Grund der Chiralität der meisten Aminosäuren nicht vorkommen. Somit ergibt sich für Proteinkristalle die Anzahl von 65 möglichen Raumgruppen.

Die Grundvoraussetzung für ein Röntgendiffraktionsexperiment ist ein geeigneter Proteinkristall. Bei einem Kristall handelt es sich um einen homogenen, anisotropen Körper, in dem sich gleiche Moleküle in regelmäßigen Abständen wiederholen und eine symmetrische und räumliche Struktur (wie oben beschrieben) aufweisen. Solch symmetrische Anordnungen können unter gewissen Umständen auch Proteine annehmen. Da Proteine allerdings recht große Moleküle mit einer sehr vielseitigen Oberfläche sind, ergeben sich aus den resultierenden Proteinkristallen Kristalle mit

großen Elementarzellen und einem Lösungsmittelanteil von etwa 50 %. Weiterhin bilden Proteine im Verhältnis zu ihrer Größe nur schwache Kontakte untereinander aus, was zu einer mechanischen Instabilität führt.

Um gereinigte Proteine in eine kristalline Form überführen zu können, müssen sie in einer Lösung langsam in eine Sättigungskonzentration gebracht werden. Hierdurch können sich langsam spezifische Kontakte zwischen den Proteinen ausbilden, und so zur Kristallisation beitragen. Eine Standardmethode um langsam eine Sättigungskonzentration zu erreichen ist die Dampfdiffusionsmethode (McPherson 1990). Bei der Dampfdiffusionsmethode verwendet man einen geschlossenen Raum, in dem ein Protein in einer Lösung mit Fällungsmittel vorliegt. In diesem Raum befindet sich zusätzlich ein Reservoir mit einer höheren Fällungsmittelkonzentration als in dem Proteintropfen. Durch den Konzentrationsunterschied zwischen Proteintropfen und Reservoir werden beiden Lösungen langsam durch Diffusion, hauptsächlich von Wasser aber auch von flüchtigen Fällungsmitteln, durch die Gasphase ausgeglichen. Die beiden Dampfdiffusionsmethoden des hängenden und des sitzenden Tropfens sind in Abbildung 3.2 B und C dargestellt.

Während der Diffusion des Wassers aus dem Proteintropfen, steigt langsam sowohl die Proteinkonzentration als auch die Fällungsmittelkonzentration, so dass ab einem bestimmten Punkt eine Sättigungskonzentration für das Protein erreicht ist. Da die Löslichkeit für Proteine aufgrund der steigenden Fällungsmittelkonzentration stetig abnimmt, gelangt das Protein in einen metastabilen Bereich (siehe Abbildung 3.2 A). Durch geordnete, intermolekulare Kontakte untereinander können Proteine jedoch ihre Oberfläche zum Lösungsmittel verringern ohne auszufallen. Sollte dies einsetzen beginnt die Nukleation. Im Anschluss können sich weitere Proteine an diese Kristallkeime anlagern und ein stetiges Kristallwachstum bei langsam abnehmender Löslichkeit entsteht.

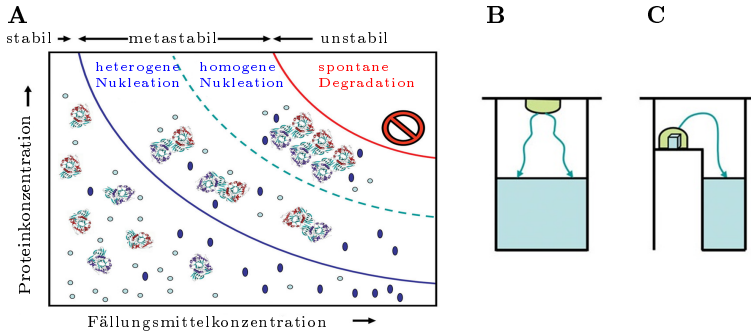


Abbildung 3.2: **Grundlagen der Proteinkristallisation**

A: Phasendiagramm der Proteinkristallisation: Fällungsmittelmoleküle sind dunkelblaue Ovale, Wassermoleküle als hellblaue Kreise dargestellt. In der metastabilen Zone kann es zur Keimbildung kommen. Damit diese von selbst entstehen (homogene Nukleation) ist eine gewisse Sättigungskonzentrationen notwendig. Bei etwas niedrigeren Sättigungskonzentration sind fremde Seeds notwendig (heterogene Nukleation). B: Dampfdiffusion mit der Methode des hängenden Tropfens C: Dampfdiffusion mit der Methode des sitzenden Tropfens. (Abbildung entnommen aus (Rupp 2009), mit freundlicher Genehmigung von Bernhard Rupp und Garland Science)

Leider kann solch ein geeigneten Punkt für Nukleation und Kristallwachstum von Proteinen nicht vorhergesagt werden. Um dennoch Proteine zur Kristallisation zu bewegen, wird nach wie vor mit der Methode des Versuchs und Irrtums gearbeitet, d.h. es werden so lange verschiedenste Bedingungen getestet, bis der gewünschte Erfolg eintritt. Die hierfür verwendeten Bedingungen können allerdings aus beliebigen vielen, verschiedenen Parametern zusammengesetzt werden, beispielsweise können verschiedene Fällungsmittel und deren Konzentration, der pH-Wert, die Temperatur und vieles mehr variiert werden. Um möglichst erfolgreich Kristalle züchten zu können, werden meist verschiedene Kristallisationsscreens, d.h. eine Vielzahl vorgefertigter Bedingungen, für die initiale Kristallsuche verwendet. Werden in solchen initialen Screens Kristalle gefunden, die noch nicht den erforderlichen Bedürfnissen wie einer ausreichenden Größe, Stabilität oder Streuvermögen entsprechen, werden die gefundenen Bedingungen weiter verfeinert. Dies geschieht indem einzelne Parameter so lange leicht verändert werden, bis eine möglichst optimale Bedingung für die Kristallisation des Proteins gefunden wurde.

Nicht immer gelingt das Kristallisieren wie beschrieben. Je nach Protein kann es schwierig sein geeignete Bedingungen auszumachen, die zu einer Nukleation und einem anschließenden Kristallwachstum führen. Eine Möglichkeit dieses Problem zu

umgehen ist das Hinzufügen von externen Seeds, so dass das Kristallwachstum bei einer niedrigeren Sättigungskonzentration vonstatten gehen kann (siehe Abbildung 3.2 A). Diese Seeds sind kleinste Kristallkeime fremder Kristalle und können auf verschiedene Arten zu dem Kristallisationstropfen hinzugefügt werden, zwei gängige Methoden sind das Microseeding und das Streak-Seeding (Bergfors 2003). Bei der Methode des Microseedings wird ein vorhandener Kristall durch vortexen oder Ultraschall zerkleinert, so dass nur noch kleinste Kristallkeime vorhanden sind. Um die richtige Menge an Seeds für das Kristallwachstum zu ermitteln, werden in der Regel zunächst Verdünnungsreihen hergestellt, welche dann zu den Kristallisationstropfen hinzugegeben werden. Bei der Methode des Streak-Seedings werden Tierhaare verwendet, vornehmlich Schnurrbarthaare einer Katze, mit denen ein vorhandener Proteinkristall angestochen wird. Durch die raue Oberfläche des Haares bleiben einzelne Kristallkeime haften, so dass diese in die Proteintropfen abgegeben werden können, wenn das Haar nacheinander durch mehrere Proteintropfen gestrichen wird.

## 3.2 Cryo-Bedingungen

Nach der erfolgreichen Züchtung eines Proteinkristalls, besteht noch eine weitere Hürde, bevor ein Röntgenexperiment durchgeführt werden kann. Auf Grund der hohen Energie von Röntgenstrahlen werden Proteinkristalle während einer Messung sehr beansprucht und beschädigt (Sliz *et al.* 2003). Um eine Schädigung bestmöglich zu minimieren und die Lebensdauer eines Proteinkristalls zu verlängern, wird die Messung bei einem stetigen Stickstoffstrom von 100 K durchgeführt. Wie allerdings in Kapitel 3.1 beschrieben, sind Proteinkristalle sehr empfindliche Objekte, die ein möglichst schonendes Einfrieren erfordern. Zu diesem Zweck werden Cryo-Bedingungen benötigt, die bei dem Schockfrieren in flüssigen Stickstoff keine Eiskristalle ausbilden (Garman und Owen 2006), die einen doppelt negativen Effekt für das Experiment darstellen. Zum einen resultieren aus Eiskristallen Diffraktionsringe während der Messung auf dem Detektor, so dass Reflexe an diesen Stellen nicht ausgewertet werden können. Zum anderen können Eiskristalle auch die Kristallsymmetrie beeinflussen, so dass eine zufriedenstellende Diffraktion nicht mehr möglich ist.

Zur Herstellung geeigneter Cryo-Bedingungen wird oftmals Glycerin verwendet, welches das meist genutzte Cryo-Schutzmittel sein dürfte. Weitere Cryo-Schutzmittel

sind z.B. Polyethylenglycole, hohe Salzkonzentrationen, oder 2,3-Butandiol. Nach Möglichkeit wird eine Cryo-Lösung jedoch so gewählt, dass diese nur die Bestandteile der eigentlichen Mutterlauge in einer höheren Konzentration enthält. Die gewählte Cryolösung sollte aber auf jeden Fall keine Diffraktionsringe während eines Röntgenexperimentes bei 100 K verursachen.

Die Überführung der Proteinkristalle in Cryolösung kann auf unterschiedliche Art und Weise geschehen, z.B. mittels *Soaking*. Hierbei wird der Kristall mit einer Ny-lonschleife aus dem Proteintropfen genommen und in eine Cryolösung gelegt, anschließend kann der Kristall schockgefroren werden. Schonender für den Kristall ist jedoch das Austauschen der Mutterlauge gegen eine neue Mutterlauge höherer Konzentration. Dies hat zur Folge, dass der Proteintropfen langsam weiter eintrocknen kann bis eine ausreichende Konzentration von vorhandenen Cryo-Protoktants in dem Proteintropfen vorliegt.

### 3.3 Röntgenstrahlung

Röntgenstrahlen haben eine Wellenlänge zwischen  $10^{-8}$  m und  $10^{-12}$  m und können auf zwei unterschiedliche Arten für eine Röntgenexperiment hergestellt werden. Zum einen gibt es für Heimlaboratorien nach wie vor die klassische Röntgenröhre, welche aus einer Kathode sowie einer Anode (zumeist Kupfer oder Molybdän) besteht (siehe Abbildung 3.3 A). Zwischen Kathode und Anode wird eine Spannung angelegt, so dass Elektronen aus der Kathode emittiert und beschleunigt werden. Treffen diese auf die Anode, werden dort Elektronen aus einer inneren Schale der Atome herausgeschlagen, die entstehenden Lücken werden von Elektronen aus den äußeren Schalen aufgefüllt. Durch diesen Elektronenübergang, von einem Energieniveau einer äußeren Schale zu einem Energieniveau einer inneren Schale, entstehen Röntgenstrahlen, die jeweils eine charakteristische Wellenlänge für das Anodenmaterial haben. Allerdings besitzt diese Art von Röntgenstrahlung nur eine relativ geringe Energie, die Röntgenbeugungsexperimente nur an Proteinkristallen mit guter Streukraft erlaubt, sowie eine invariable Wellenlänge, die vom eingesetzten Anodenmaterial abhängig ist.

Eine andere Art von Röntgenstrahlung ist die Synchrotronstrahlung, bei der sich zu Nutzen gemacht wird, dass alle elektrisch geladenen Teilchen Strahlung emittieren sobald sie beschleunigt, gebremst oder in ihrer Flugrichtung geändert werden. Die Einrichtung um solche Strahlung zu erzeugen wird Synchrotron genannt, welche



sich in den letzten Jahrzehnten enorm weiterentwickelt haben (Helliwell 1998). In einem Elektronen-Synchrotron (siehe Abbildung 3.3 B) werden zunächst Elektronen beschleunigt und im Anschluß in einen Synchrotronring eingespeist. In diesem Ring werden sie durch starke Magnetfelder, sogenannte Undulatoren, ständig von ihrer Bahn abgelenkt. Durch das Ablenken entsteht tangential zur Bewegungsrichtung die Synchrotronstrahlung. Das Besondere an dieser Strahlung ist die extrem hohe Intensität der erzeugten Strahlung bis zu mehreren GeV, sowie ein breites elektromagnetisches Spektrum, welches von  $10^{-4}$  m bis zu  $10^{-11}$  m reicht, und somit auch den Bereich der Röntgenstrahlung abdeckt.

Aus den beschriebenen Gründen werden klassische Röntgenröhren in Heimlaboratorien zumeist nur noch zur Vorcharakterisierung von Proteinkristallen genutzt, die zur Strukturklärung selbst herangezogenen Datensätze stammen immer häufiger aus Synchrotronquellen.

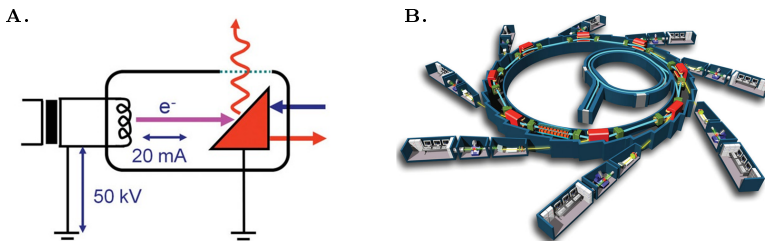


Abbildung 3.3: **Erzeugung von Röntgenstrahlung**

A: Schematischer Aufbau einer klassischen Röntgenröhre. Durch das Anlegen einer Spannung werden Elektronen beschleunigt und prallen auf eine Anode. Ein Großteil der Energie geht hierbei zunächst als Wärmeenergie verloren, weshalb die Anode ständig gekühlt werden muss. Durch die restliche Energie werden Elektronen aus der Anode herausgeschlagen, so dass Elektronen von höheren Energieniveaus nachrücken müssen, so dass Röntgenstrahlung entsteht. B: Aufbau eines Synchrotrons am Beispiel des Elektronen-Synchrotrons SOLEIL aus Frankreich. (Abbildungen entnommen aus (Rupp 2009), mit freundlicher Genehmigung von Bernhard Rupp und Garland Science)

## 3.4 Röntgenbeugung

Bei der Durchführung eines Röntgenbeugungsexperiments wird ein Röntgenstrahl auf einen Kristall gerichtet. Ein Großteil des Strahls geht bei dem Experiment ungehindert durch den Kristall, ein kleiner Teil hingegen wird an dem Kristall gebeugt und auf einem nachgeschalteten Detektor als Röntgenreflexe sichtbar. Die

entstandenen Reflexe resultieren aus der Beugung des Röntgenstrahls an den Elektronen der einzelnen Atome, da der Röntgenstrahl die Elektronen zu frequenzgleichen Schwingungen anregt, und diese ebenfalls wieder Strahlung mit derselben Wellenlänge abgeben. Der entscheidende Faktor für ein Röntgenexperiment ist die geordnete, symmetrische Anordnung der Atome in einem Kristallgitter. Aufgrund dieser Anordnung kann es bei den gebeugten Strahlen zu konstruktiver Interferenz kommen, so dass sie auf dem Detektor als Reflex erkennbar sind. Diese konstruktive Interferenz findet immer dann statt, wenn die Bragg-Bedingung (siehe Formel 3.1) für einzelne Atome erfüllt ist.

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d_{(hkl)} \cdot \sin\theta \quad (3.1)$$

Mit folgenden Parametern :

- $n$  : ganze Zahl
- $\lambda$  : Wellenlänge
- $d_{(hkl)}$  : Netzebene
- $\theta$  : Bragg – Winkel

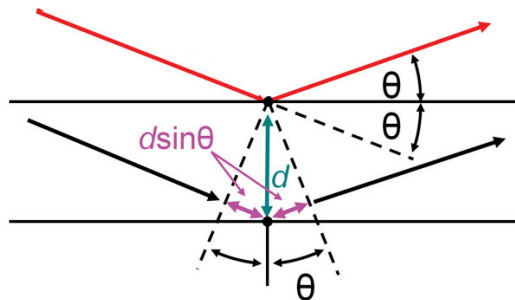


Abbildung 3.4: **Darstellung der Röntgenbeugung gemäß dem Bragg'schen Gesetz**

Darstellung zweier benachbarter Netzebenen, an denen ein Röntgenstrahl nach dem Bragg'schen Gesetz gebeugt wird. (Abbildung entnommen aus (Rupp 2009), mit freundlicher Genehmigung von Bernhard Rupp und Garland Science)

Ist die Bragg-Bedingung erfüllt, d.h. weisen die Atome die von dem Röntgenstrahl getroffen werden einen Gangunterschied von einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge  $\lambda$  auf, so kommt es zu konstruktiver Interferenz. Die entstandenen Reflexe stammen demnach vom Röntgenstrahl, der an einer bestimmten Netzebenenschar gebeugt wurde. Bei dieser Vorstellung bedeutet eine Netzebene eine beliebige Ebene durch das Kristallgitter. Eine Netzebenenschar besteht aus unendlich vielen Netzebenen, die alle in einem festen Abstand parallel zueinander verlaufen, unter der Voraussetzung, dass jeder Gitterpunkt des Kristallgitters einmal auf einer Ebene liegt.

Die Beugung des Strahls an den Elektronen und die entstehende konstruktive Interferenz auf Grund der symmetrischen Anordnung der Atome erklären somit die Positionen der einzelnen Reflexe auf dem Detektor. In dem bislang beschriebenen Beispiel wird der Röntgenstrahl allerdings nur an Elektronen von Atomen gebeugt, die genau auf einer Netzebenenschar liegen. Um einen vollständigen Datensatz zu erhalten, müssen allerdings sämtliche Reflexe, die bei der Anordnung der Atome möglich sind, detektiert werden. Aus diesem Grund wird ein Kristall ständig gedreht und es werden mehrere Diffraktionsbilder, alle aus unterschiedlichen Winkeln und somit mit unterschiedlichen Netzebenenscharen, aufgenommen. Wieviele Diffraktionsbilder für einen vollständigen Datensatz notwendig sind, ist dementsprechend von der Symmetrie des Kristalls abhängig, wobei ein Kristall mit höherer Symmetrie weniger Bilder benötigt um jeden möglichen Reflex einmal zu erzeugen. Da über die erhaltenen Reflexe Informationen über die Netzebenen vorliegen, die durch das vorhandene Kristallgitter gelegt werden können ist es aus ihnen möglich auf dieses zurückzuschließen, diesen Vorgang nennt man Indizierung. Mit den Millerschen Indizes  $(h, k, l)$  lassen sich die Netzebenenscharen sowie die entsprechenden Reflexe beschreiben. Hier gilt jedoch, dass die Werte den reziproken Schnittpunktkoordinaten der Netzebenen mit dem Kristallgitter entsprechen. Dies hat zur Folge, dass die aus einem Röntgenbeugungsexperiment enthaltenen Daten sich im reziproken Raum befinden.

## 3.5 Die Strukturlösung

### 3.5.1 Das Phasenproblem

Mit einer Fourier-Transformation (siehe Formel 3.2) ist es theoretisch möglich von den gemessenen Reflexen auf die tatsächliche Lage der Atome, genauer gesagt die der Elektronen der einzelnen Atome, zurückzuschließen.

$$\rho_{(xyz)} = \frac{1}{V} \sum F_{(h,k,l)} \cdot e^{i\alpha(h,k,l)} \cdot e^{-2\pi i(hx,ky,lz)} \quad (3.2)$$

Mit folgenden Parametern :

$\rho_{(xyz)}$	:	Elektronendichte
$V$	:	Volumen der Elementarzelle
$F_{(hkl)}$	:	Strukturfaktoramplitude
$i\alpha(hkl)$	:	Phase
$-2\pi i(hx, ky, lz)$	:	Basisfunktion

Die für eine Fourier-Transformation benötigten Größen sind nach Beendigung des Experiments jedoch nicht vollständig vorhanden. Zwar kann die Strukturfaktoramplitude ( $F_{(hkl)}$ ) ermittelt werden, da sie proportional zur Quadratwurzel der gemessenen Intensitäten ist, die Phase ( $\alpha$ ) hingegen geht verloren. Die aus dieser Tatsache entstehenden Schwierigkeit bei der Rückrechnung auf die Elektronendichte  $\rho_{(xyz)}$  wird das Phasenproblem genannt.

### 3.5.2 Die Strukturlösung mit molekularem Ersatz

Je nachdem ob es sich bei dem zu untersuchenden Protein um eine schon bekannte Struktur handelt oder um eine *de novo* Strukturlösung, ist die Lösung des Phasenproblems unterschiedlich anspruchsvoll. Die einfachste Möglichkeit das Phasenproblem zu umgehen ist die des molekularen Ersatzes. Sie setzt eine bekannte Struktur mit einer Sequenzidentität von mindestens 30 % zu dem zu untersuchenden Protein voraus. Bei dieser Methode wird die bekannte Struktur als Suchmodell für die

Phasenbestimmung verwendet, und mit Hilfe der Patterson-Funktion (siehe Formel 3.3) so gut wie möglich in der Elementarzelle ausgerichtet.

$$P_{(uvw)} = \frac{1}{VEZ} \sum_{(hkl)} |F_{(h,k,l)}|^2 \cos[2\pi(hu + kv + lw)] \quad (3.3)$$

Mit folgendem Parameter:

$u, v, w$  : Ortsvektoren in der Elementarzelle

Der Vorteil einer Patterson-Funktion ist, dass diese nur auf den Strukturfaktoramplituden basiert und ohne Kenntnis der Phase erlaubt die Proteinstruktur zu bestimmen. Hierbei werden alle Abstände und Orientierungen zwischen den Atomen als Vektoren dargestellt, allerdings funktioniert diese Methode nur bei sehr einfachen Strukturen mit wenigen Atomen in der Elementarzelle. Dank der vorgegebenen Struktur beim molekularen Ersatz, kann die Patterson-Funktion jedoch wieder eingesetzt werden.

Während des molekularen Ersatzes werden zunächst zwei Patterson-Funktionen berechnet, zum einen mit den Strukturfaktoramplituden  $F_{(obs)}$  aus den gemessenen Diffraktionsdaten, und zum anderen mit den Strukturfaktoramplituden  $F_{(calc)}$  aus dem Suchmodell. Die berechneten Patterson-Vektoren werden im Anschluss miteinander verglichen, durch Translation und Rotation wird dann versucht die Patterson-Vektoren des Suchmodells möglichst nah an die des Zielmodells zu bringen. Ist die beste Position für das Suchmodell in der Elementarzelle gefunden, kann die Elektronendichte für den Datensatz berechnet werden.

### 3.5.3 Alternative Strukturlösungsmethoden

Sollte kein passendes Suchmodell für den molekularen Ersatz vorhanden sein, stellt sich die Strukturlösung um einiges komplizierter dar, doch es gibt Möglichkeiten die fehlenden Phasen auf andere Weise zu erhalten. Als Beispiel wird hier kurz die Methode des isomorphen Ersatzes (SIR - *single isomorphous replacement*) bzw. (MIR *multiple isomorphous replacement*) vorgestellt, welche klassischerweise für die *de*

*novo* Strukturlösung verwendet wurde und auch heute noch verwendet wird. Bei dieser Methode besteht die Schwierigkeit zunächst darin Schweratomverbindungen in einen Proteinkristall diffundieren zu lassen, so dass diese kovalent an die Proteinoberfläche binden können. Bei diesem Prozess darf aber selbstverständlich die Protein- oder Kristallstruktur nicht verändert werden.

Infolge der hohen Anzahl an Elektronen der Schweratomverbindungen, wird bei einem Röntgendiffraktionsexperiment der Röntgenstrahl an ihnen sehr viel stärker gebeugt, als an den kleineren, natürlich im Protein vorkommenden Atomen. Aus dieser Tatsache resultieren deutlich veränderte Intensitäten der Reflexe, die an den Schweratomverbindungen gebeugt werden. Mit Hilfe dieser Reflexe ist die Berechnung der Position der Schweratome im Kristall mit der Patterson-Funktion (siehe Formel 3.3) möglich, was wiederum zu ersten Phasen für die Strukturlösung führen kann. Da die berechneten Phasen mit nur einer Schweratomverbindung (SIR) oftmals nicht für eine Strukturlösung ausreichen, werden meistens die Phasen von mehreren verschiedenen Schweratomverbindungen kombiniert und zur Strukturlösung verwendet (MIR) (Lottspeich und Engels 2006).

### 3.6 Verfeinerung

Die nach der Phasierung erhaltenen Elektronendichtekarten enthalten zunächst nur ziemlich unzureichende Information über die genaue Lage der einzelnen Atome des Proteins, da die richtigen Phasen nur annäherungsweise erreicht werden können. Somit handelt es sich bei der Interpretation einer ersten Elektronendichte nur um ein unzureichendes Modell des tatsächlichen, vermessenen Proteins. Um ein plausibles Proteinmodell zu erhalten, das dem Original möglichst nahe kommt, ist es weiter notwendig die Strukturfaktoramplituden des Proteinmodells  $F_{(calc)}$ , an die Strukturfaktoramplituden der gemessenen Daten  $F_{(obs)}$  anzupassen. Dies geschieht indem mit geeigneter Computersoftware, mit dessen Hilfe das Proteinmodell unter Berücksichtigung der vorhandenen Elektronendichte, sowie biochemisch sinnvoller Aspekte, verfeinert wird. Ziel ist es ein neues Modell zu konstruieren, mit dessen Neuberechneten Strukturfaktoramplituden  $F_{(calc)}$  die Differenz zu den Strukturfaktoramplituden des Suchmodells  $F_{(obs)}$  weiter minimiert werden kann.

Zur Beurteilung der Qualität des Strukturmodells dient der kristallographische R-Wert, wobei ein kleinerer Wert für eine größere Übereinstimmung von Modell und experimentellen Daten steht. Berechnet wird der allgemeine kristallographische R-

Wert nach Formel 3.4. Die endgültige Qualitätsbeurteilung des Modells erfolgt mit dem sogenannten freien R-Wert ( $R_{free}$ ). Beim freien R-Wert (siehe Formel 3.5) wird ein zufällig gewählter Testsatz ( $T$ ) von 5 - 10% der Reflexe von der Berechnung ausgeschlossen. Bei dieser Methode der Berechnung wird davon ausgegangen, dass der Wert weniger für *overfitting* anfällig ist (Brünger 1992).

$$R = \frac{\sum_{(hkl)} ||F_{(obs)}| - k|F_{(calc)}||}{\sum_{(hkl)} |F_{(obs)}|} \quad (3.4)$$

$$R_{free} = \frac{\sum_{(hkl \subset T)} ||F_{(obs)}| - k|F_{(calc)}||}{\sum_{(hkl \subset T)} |F_{(obs)}|} \quad (3.5)$$

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien und Software

Tabelle 4.1: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
ÄKTA-Explorer	GE Healthcare, Solingen, DE
FPLC-System	Pharmacia Biotech, Freiburg, DE
Hydra II Liquid Handling System	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
Isothermal titration calorimeter (ITC)	Microcal, Northampton, US
MicroMax-007 HF	Rigaku, Tokyo, Japan
Mosquito Crystal	TTP LabTech Ltd, Melbourne, UK
Photometer, Ultraspec 200	Pharmacia Biotech, Freiburg, DE
PX Scanner	Agilent Technologies, Inc., Loveland, Colorado, US
SuperNova	Agilent Technologies, Inc., Loveland, Colorado, US

Tabelle 4.2: Verwendete Kristallisationsscreens

Screen	Hersteller
Crystal Screen	Hampton Research, Aliso Viejo, US
Crystal Screen 2	Hampton Research, Aliso Viejo, US
Crystal Screen Cryo	Hampton Research, Aliso Viejo, US
Crystal Screen HT	Hampton Research, Aliso Viejo, US



<b>Screen</b>	<b>Hersteller</b>
Grid Screen Ammonium sulfate	Hampton Research, Aliso Viejo, US
Grid Screen PEG/LiCl	Hampton Research, Aliso Viejo, US
Grid Screen PEG 6000	Hampton Research, Aliso Viejo, US
PEG/Ion Screen	Hampton Research, Aliso Viejo, US
SaltRX Screen	Hampton Research, Aliso Viejo, US
Grid Screen Sodium chloride	Hampton Research, Aliso Viejo, US
Grid Screen Sodium malonate	Hampton Research, Aliso Viejo, US
JBScreen Classic 1–10	Jena Bioscience, Jena, DE
JBScreen Kinase	Jena Bioscience, Jena, DE
JCSG Core Suite I–IV	Quiagen, Hilden, DE

Tabelle 4.3: Verwendete Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller/Referenz</b>
CCP4	(Winn <i>et al.</i> 2011)
CNS	(Brünger <i>et al.</i> 1998)
Coot	(Emsley und Cowtan 2004)
Imosflm	(Battye <i>et al.</i> 2011)
Inkscape	<a href="http://inkscape.org">http://inkscape.org</a>
Latex	(Carlisle <i>et al.</i> 1997)
Marvin Sketch	Chemaxon, Budapest, HU
Mendeley	(The Mendeley Support Team 2011)
MS Office	Microsoft, Redmond, US
Phenix	(Adams <i>et al.</i> 2010)
PRODRG	(Schüttelkopf und Aalten 2004)
PyMol	(Schrödinger, LLC 2010)
Swift	Pharmacia, Freiburg, DE
XDS	(Kabsch 2010)

Tabelle 4.4: Verwendete Puffer

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
LB-Medium (für 1 L)	10 g NaCl 10 g Pepton 5 g Hefeextrakt pH 7,0
Lysis - Puffer	25 mM Tris-HCl pH 8,5 300 mM NaCl
ITC - Puffer	25 mM Tris-HCl 500 mM NaCl pH 8,5
10 x SDS-Auftragspuffer	50 mM Tris pH 8,0 0,8 mM EDTA 10 % (w/v) SDS 2 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol 0,4 % (w/v) Bromphenolblau
20 x SDS - Laufpuffer	1 M MES 1 M Tris 2 % (w/v) SDS 0,6 % (w/v) EDTA
Färbelösung	10 % (v/v) Ethanol 2 % (v/v) O-Phosphorsäure 5 % (w/v) Aluminiumsulfat 0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
Entfärbelösung	10 % Ethanol 2 % o-Phosphorsäure

### 4.2 Proteinexpression im 5 L Maßstab

Für die Proteinexpression der *hsCK2 $\alpha$ <sup>Cys336Ser</sup>* wurde der *E. coli* Stamm C41(DE3) mit dem entsprechend mutierten Gen auf einem pETDuet-Vektor verwendet. Die Expression der *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>* fand mit dem *E. coli* Stamm BL21(DE3) mit dem entsprechend mutierten Gen auf einem pT7-7-Vektor statt. Sowohl Expression als auch Reinigung wurden bei beiden Proteinen nach demselben Schema durchgeführt. Zunächst wurde eine Übernachtskultur mit den zu exprimierenden Zellen, bestehend aus 50 ml LB-Medium mit 75  $\mu\text{g/ml}$  Ampicilin, angesetzt und mit 220 Umdrehungen pro Minute bei 37° C inkubiert. Am Folgetag wurden jeweils 6 ml der Übernachtskultur in acht mit jeweils 600 ml LB-Medium und 75  $\mu\text{g/ml}$  Ampicilin vorbereiteten Erlenmeyerkolben gegeben, und weiter mit 220 Umdrehungen pro Minute bei 37° C geschüttelt. Nachdem eine  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 0,6 erreicht war, wurde die Proteinexpression durch die Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  1 M IPTG induziert. Es wurden weitere drei Stunden bei gleichbleibenden Bedingungen geschüttelt. Anschließend konnten die Kulturen 20 Minuten lang bei 4° C und 4.500 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert werden. Die entstandenen Pellets wurden zunächst in 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendiert und anschließend erneut über 20 Minuten bei 5.000 Umdrehungen und 4° C abzentrifugiert. Diese wurden schließlich bei -80° C eingefroren.

#### 4.2.1 Zellyse

Für den Zellaufschluss wurden die Pellets in 40 ml Lysispuffer, versetzt mit 1 ml Lysozym (40 mg/ml) und 40  $\mu\text{l}$  DNase (10 mg/ml), resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen per Ultraschall aufgeschlossen (3 min, bei einer Amplitude von 40 % und abwechselnd 2 sec Puls und 2 sec Pause). Die aufgeschlossenen Zellen wurden bei 4° C und 40.000 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert. Zum Abschluss des Aufschlusses wurde der Überstand durch einen Papierfilter filtriert, um die letzten Zellreste zu entfernen.

## 4.3 Proteinreinigung

Die Proteinreinigung, sowohl der *hsCk2 $\alpha$ <sup>Cys336Ser</sup>* als auch der *hsCk2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>*, liefen über einen etablierten, dreistufigen Chromatographie Prozess (Niefind *et al.* 2007). Der erste dieser Reinigungsschritte erfolgte über eine P11 Cellulosesäule, gefolgt von einer Heparinsäule. Der dritte und abschließende Schritt verlief über eine Gelpermeationssäule.

### 4.3.1 1. chromatographischer Schritt: P11–Cellulose

Der erste chromatographische Schritt zur Aufreinigung erfolgte mittels bifunktionellem Kationenaustauscher, der P11-Cellulose. Das Trennmedium Cellulose-Phosphat, wird häufig für die Reinigung von Enzymen verwendet. Die Säule wurde zunächst mit 300 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 8,5 äquilibriert. Das Auftragen erfolgte mittels Superloop mit einer Flussrate von 0,3 ml/min. Eluiert wurde das Protein mit einem linearen NaCl-Gradienten bis zu einer Endkonzentration von 1 M NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 8,5.

### 4.3.2 2. chromatographischer Schritt: Heparinsäule

Der zweite Reinigungsschritt erfolgte mittels Affinitätschromatographie mit einer Heparinsäule. Die vereinigten Fraktionen aus der Reinigung mit der P11–Cellulose wurden auf eine Pufferkonzentration von ca. 300 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 8,5 verdünnt. Aufgetragen wurde die Probe mit einer Flussrate von 1 ml/min, das Eluieren erfolgte mit dem selben Salzgradienten wie bei der P11–Cellulose.

### 4.3.3 3. chromatographischer Schritt: Gelpermeationssäule

Der abschließende Schritt der Reinigung wurde mit einer HiPrep Superdex 200 HP Säule durchgeführt. Die Säule wurde mit 500 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 8,5 äquilibriert. Der Lauf fand unter den selben Pufferbedingungen und einer Flussrate von 0,5 ml/min statt.

### 4.3.4 SDS-Gel

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde die Standardmethode nach Lämmli genutzt (Lämmli 1970), die eine gute Auftrennung einzelner Proteine nach Größe erlaubt. Als SDS-Gel dienten vorgefertigte 4 - 12% Bis-Tris Gele der Firma Invitrogen. Zur Probenvorbereitung wurden 13  $\mu\text{l}$  der Proteinprobe mit einer Konzentration von ca. 100  $\mu\text{M}$  mit 5  $\mu\text{l}$  Auftragspuffer gemischt und nach einer Inkubation von 5 min bei 95°C auf das SDS-Gel aufgetragen. Anschließend wurde an die mit Lauffpuffer befüllte Elektrophoresekammer eine elektrische Spannung von 120 mA angelegt, so dass die einzelnen Proteine im Gel getrennt wurden. Um die einzelnen Proteinbanden sichtbar zu machen wurden die Gele etwa 2 Stunden in Färbelösung gefärbt und anschließend mit Entfärbelösung wieder entfärbt.

### 4.3.5 Proteinkonzentration

Das Konzentrieren des gereinigten Proteins fand mittels Ultrazentrifugation statt. Zu diesem Zweck wurden AMICON-Ultrafiltrationsröhrchen mit einer Ausschlussgröße von 10.000 Da verwendet, das Protein wurde bei 5.000 Umdrehungen pro Minute und 4°C auf eine Konzentration von 5–10 mg/ml gebracht.

Die Konzentrationsbestimmung des Proteins wurde am Photometer bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt. Die Verwendung eines Wellenlängenscans von 250 nm–400 nm, die Basislinie wurde hierbei von der Absorption bei 280 nm abgezogen, erlaubte eine möglichst genaue Konzentrationsbestimmung. Die zur Berechnung benötigten Extinktionskoeffizienten wurden mittels ProtParam vom ExPASy Server (Wilkins *et al.* 1999) unter Berücksichtigung der entsprechenden Mutationen berechnet. Bestimmt wurde die Proteinkonzentration schließlich mit dem umgeformten Lambert-Beerschen-Gesetz (siehe Formel 4.1).

$$c = \frac{A_{280\text{ nm}}}{d \cdot \varepsilon_{280\text{ nm}}} \quad (4.1)$$

## 4.4 Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die Bindung von Molekülen, z.B. bei Protein - Protein Wechselwirkungen, oder auch zwischen Protein und niedermolekularen Liganden, sind allesamt biochemische Reaktionen, die entweder Wärme an ihre Umgebung abgeben oder aufnehmen. Ein ITC-Experiment ist eine sehr direkte Methode diesen durch Bindung verursachten Wärmeunterschied zu messen.

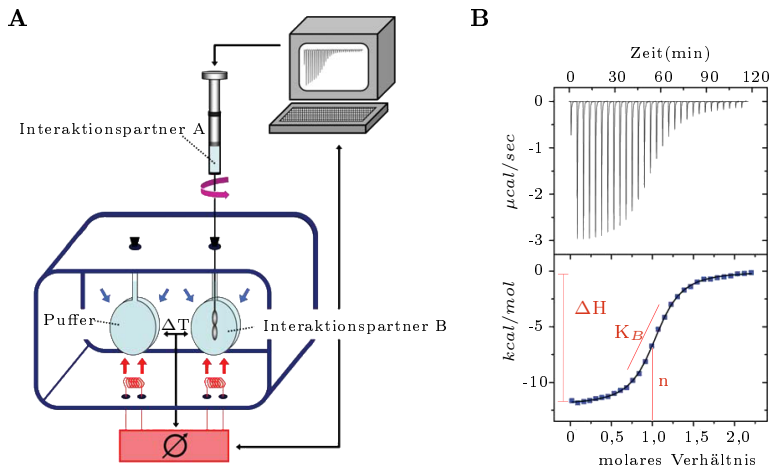


Abbildung 4.1: ITC-Gerät und Messung

A: Schematische Darstellung eines ITC-Gerätes. Ein ITC-Gerät besteht aus zwei Kammer, wobei in die eine Puffer, in die andere der Interaktionspartner B gefüllt wird. Anschließend wird der Interaktionspartner A in mehreren Injektionen in die Kammer mit dem Interaktionspartner B eingespritzt. Die Kammern werden durch Heizspulen auf derselben Temperatur gehalten, der entstehende Energieunterschied zwischen den beiden Kammer kann gemessen werden. B: Beispiellauf einer ITC-Messung. Der obere Teil der ITC-Messung zeigt typische Rohdaten einer ITC-Messung, hierbei entspricht jeder Peak einer Injektion des Interaktionspartners A. Die Integration der einzelnen Peaks führt zum unteren Teil der Abbildung, aus welcher die Parameter Stöchiometrie ( $n$ ), die Bindungskonstante ( $K_B$ ) und die Enthalpieänderung ( $\Delta H$ ) entnommen werden können (Abbildungen entnommen und angepasst aus (Praefcke und Hermann 2011), mit freundlicher Genehmigung von Springer).

Ein ITC-Gerät besteht zu diesem Zweck aus einer Messkammer und einer Referenzkammer, die von einem adiabatischen Mantel umgeben sind, der einen Wärmeaustausch der einzelnen Kammern mit der Umgebung verhindert. An beiden Kammern wird über Thermoelemente die jeweiligen Temperatur exakt gemessen. In der Messkammer befindet sich eine fest definierte Menge eines Bindungspartners, mittels Injektion werden kleine Mengen des zweiten Bindungspartners, die genaue Konzentration muss auch hier bekannt sein, in bestimmten Zeitintervallen in die Kammer eingespritzt. Kommt es in der Zelle zu Wechselwirkungen zwischen beiden Liganden wird aufgrund der Reaktion entweder Wärme verbraucht bzw. freigesetzt. Die grundlegende Idee bei einem ITC-Gerät ist nun, dass versucht wird beide Kammern auf einer festgelegten Temperatur zu halten. Die hierzu verbrauchte oder eingesparte Energie an der Messkammer kann exakt gemessen werden und lässt Rückschlüsse über die Bindung der beiden Liganden zu.

Mit Hilfe eines ITC-Experimentes lassen sich somit folgende Bindungsparameter berechnen:

- $\Delta H$  : Enthalpieänderung  $J \cdot mol^{-1}$
- $K_D$  : Dissoziationskonstante  $mol/l$
- $K_B$  : Bindungskonstante  $l/mol$
- $\Delta G$  : Änderung der freien Enthalpie,  $J \cdot mol^{-1}$
- $\Delta S$  : Entropieänderung  $J \cdot (K^{-1} \cdot mol^{-1})$

### 4.4.1 Durchführung der ITC-Messungen

Sämtliche ITC-Experimente wurden bei einer Temperatur von 20° C durchgeführt. Die Referenzkammer wurde mit einem Puffer bestehend aus 500 mM NaCl und 25 mM Tris/HCl (pH 8,5) gefüllt, die Messkammer mit 10  $\mu M$  - 20  $\mu M$  *hsCK2 $\beta$ <sup>1-193</sup>* welche im selben Puffer gelöst war. Die Injektionsspritze beinhaltete entweder *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>* bzw. *hsCK2 $\alpha$ <sup>Cys336Ser</sup>* mit Konzentrationen zwischen 100  $\mu M$  und 200  $\mu M$ , ebenfalls im selben Puffer gelöst. Jedes ITC-Experiment bestand aus einer initialen 2  $\mu l$  Injektion gefolgt von 24 Injektionen mit jeweils 10  $\mu l$ . Die Injektionen fanden in einem Intervall von 300 sec statt, wobei jede Injektion über einen Zeitraum von 20 sec erfolgte.

Die integrierten Peaks wurden mittels ORIGIN-Software (Version 8, Origin Lab) unter der Annahme ausgewertet, dass ein *hsCK2 $\beta$ <sup>1-193</sup>*-Dimer zwei identische und unabhängige Bindungsstellen für die *hsCK2 $\alpha$*  zu Verfügung stellt. Der Mittelwert aus drei wiederholten Experimenten lag der Bestimmung der einzelnen Parameter zu Grunde.

## 4.5 Gekoppelter Aktivitätstest

Zu Bestimmung der Aktivität der *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>* und *hsCK2 $\alpha$ <sup>Cys336Ser</sup>* wurde ein gekoppelter Aktivitätstest genutzt (Roskoski 1983). Diese Art von Test ist eine indirekte Methode um die Aktivität eines Enzyms zu ermitteln, da der gemessene Parameter, die Abnahme von NADH zu NAD<sup>+</sup> nicht durch die katalytische Aktivität der CK2 zustande kommt, sondern von der Lactatdehydrogenase (LDH) katalysiert wird. Die Abnahme von NADH zu NAD<sup>+</sup> kann mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt werden. Um sicherzustellen, dass der erste Schritt der Reaktionskaskade auch der geschwindigkeitsbestimmende ist, müssen alle an den Reaktionen beteiligten Komponenten, mit Ausnahme der *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>* / *hsCK2 $\alpha$ <sup>Cys336Ser</sup>* und ATP, im Sättigungsbereich vorliegen.

Das Prinzip des gekoppelten Aktivitätstests ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

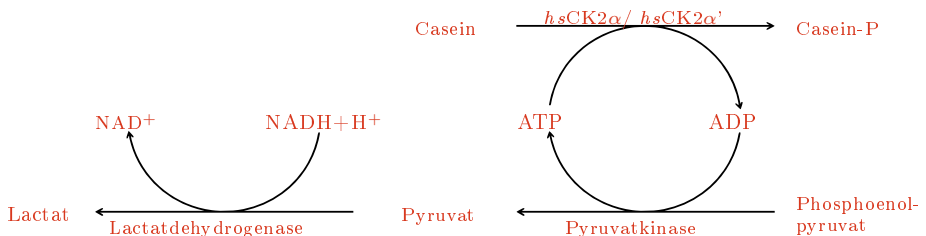


Abbildung 4.2: **Schema des gekoppelten Aktivitätstests**

Die erste Reaktion des Aktivitätstests ist die Phosphorylierung von Casein, die durch die *hsCK2 $\alpha$*  / *hsCK2 $\alpha$ '* katalysiert wird. Das aus dieser Reaktion entstandene ADP wird von der Pyruvatkinase (PK) genutzt um Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat umzuwandeln. Die dritte und letzte Reaktion ist die Reduktion von Pyruvat zu Lactat, die durch die Lactatdehydrogenase unter der Oxidation von NADH + H<sup>+</sup> zu NAD<sup>+</sup> katalysiert wird.



### 4.5.1 Durchführung des gekoppelten Aktivitätstests

Der gekoppelte Aktivitätstest fand in einer Quarzküvette bei einer Temperatur von 37°C und einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ l statt. Der Ansatz bestand aus 25 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5mM NaCl, 18mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM Peptid-Substrat (Sequenz: RRRADDSDDDD), 0,2 mM NADH, 1 mM Phosphoenolpyruvat, 20 U/ml Pyruvatkinase, 50 U/ml Lactatdehydrogenase und 0,02 mg/ml *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>*, bzw. *hsCK2 $\alpha$ <sup>Cys336Ser</sup>*. Die ATP-Konzentrationen wurden von 10  $\mu$ M bis 150  $\mu$ M variiert, jeder Messpunkt ergab sich aus dem Mittelwert von drei Wiederholungen.

### 4.6 Proteinkristallisation

Die Kristallisation des Proteins mit den Inhibitoren erfolgte mittels Co-Kristallisation. Zu diesem Zweck wurde das Proteine in einem Puffer, bestehend aus 0,5M NaCl, 25 mM NaCl, pH 8,5, zunächst auf eine Konzentration von 5 mg/ml bis 6 mg/ml gebracht. Die Inhibitoren wurden in DMSO gelöst und so eingesetzt, dass der Inhibitor eine Endkonzentration von 1 mM im Protein/Inhibitorgemisch hat, was in etwa einen sechs bis achtfachen Überschuss zum Protein entspricht.

Die Inkubation fand in einer Zeit von 20 min bis 60 min entweder bei Raumtemperatur oder auf Eis gelagert statt. Anschließend wurde unlösliches Material abzentrifugiert, die Kristallisationsansätze erfolgten dann stets mit der Methode der Dampfdiffusion.

#### 4.6.1 Screening

Das initiale Screening nach geeigneten Kristallisationsbedingungen der *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>* und *hsCK2 $\alpha$ <sup>Cys336Ser</sup>* erfolgte in 96er Platten (Intelli-Plates oder TTP-Plates) mit der Methode des sitzenden Tropfens statt. Als Pipettierhilfe wurden die Pipettierroboter Hydra II bzw. Mosquito genutzt, die verwendeten Kristallisationsscreens kamen von den Firmen Jena Bioscience, Hampton Research und Qiagen und sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Kristallisationsansätze erfolgte bei *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>* ausschließlich bei 20°C, bei der *hsCK2 $\alpha$ <sup>Cys336Ser</sup>* wurde Kristallisationen bei 4°C, 10°C und 20°C angesetzt.

### 4.6.2 Optimierung

Nach erfolgreicher Kristallisation wurden die Kristalle falls nötig noch optimiert. Dies geschah in 24-Well Platten, zum Teil mit der Methoden des sitzenden und zum Teil mit der Methode des hängenden Tropfens. Bei einigen Kristallen wurde zusätzlich noch das Streekseedings eingesetzt (Kapitel 3.1), hierzu wurden Haare von einem Pferdeschweif verwendet. Vorhandene Kristalle wurden mit diesen Haaren angestochen, anschließend wurden der Reihe nach sechs identische Bedingungen mit diesem Haar angeimpft, so dass eine Verdünnungsreihe der Kristallisationskeime in den Proteintropfen entstand.

### 4.6.3 Vorauswahl der Kristalle

Die Auswahl geeigneter Kristalle für das Röntgendiffraktionsexperiment verlief über bis zu drei Schritten. Der erste Schritt war die optische Kontrolle, d.h. die Kristalle wurden unter dem Mikroskop nach optischen Gesichtspunkten wie einer ausreichenden Größe, Vorliegen als Einkristall und möglichst scharfen Kanten ausgewählt.

Als zweiter Schritt erfolgte die Kontrolle am PX-Scanner. Der PX-Scanner bietet die Möglichkeit in den 96-Well Platten ein erstes Röntgendiffraktionsexperiment der Kristalle durchzuführen. Die Platten können während des Experimentes um bis zu  $6^\circ$  geneigt werden, so dass Diffraktionsbilder aus leicht veränderten Winkeln aufgenommen werden können. Da die Beugungsfähigkeit von Proteinkristallen und Salzkristallen sehr unterschiedlich ist, die Reflexe von Proteinkristallen sind aufgrund der großen Einheitszelle sehr dicht beisammen wohingegen die Reflexe bei Salzkristallen aufgrund der kleinen Einheitszelle sehr dicht beisammen sind, können Proteinkristalle und Salzkristalle eindeutig auseinander gehalten werden. Die Tatsache dass die Kristalle bei dieser Methode im Proteintropfen verbleiben können ist in zweierlei Hinsicht von Vorteil. Zum einen können die Kristalle hierdurch noch weiter wachsen und zum anderen kann die Streufähigkeit ohne den Einfluss von Cryo-Bedingungen abgeschätzt werden.

Die schlussendlich Entscheidung welche Proteinkristalle an den Synchrotron-Beamlines vermessen werden sollten erfolgte durch die Auswertung von Röntgendiffraktionsbilder welche bei 100 K an den Heimanlagen Supernova bzw. der MicroMax-007 HF aufgenommen wurden. Auf diese Weise wurden die Kristalle mit der besten Diffraktion ausgewählt und die Eignung der Cryobedingungen konnte noch überprüft werden.

#### 4.6.4 Überführung in Cryolösung und Kristallmontage

Die Überführung der Kristalle fand auf zwei unterschiedliche Weisen statt. Zum Einen wurden die schon in der Mutterlauge vorhandenen Cryo-Schutzmittel in der Mutterlauge weiter erhöht, zum Anderen wurde zu dem Proteintropfen Glycerin hinzugegeben. Die genauen Cryo-Bedingungen für die einzelnen Kristalle sind in den Kapiteln 5.4.1 bis 5.4.6 aufgeführt.

Die Kristallmontage fand nach der Überführung in Cryo-Lösung mit einer Nylon-schleife bzw. Nylonnetzen in der für den jeweiligen Kristall passenden Größe statt. Anschließend wurden die Kristalle in flüssigen Stickstoff bis zur weiteren Verwendung auf den Heimanlagen bzw. Synchrotron-Beamlines eingefroren.

#### 4.6.5 Röntgendiffraktionsexperimente

Die Röntgendiffraktionsexperimente für die in dieser Arbeit gezeigten Strukturen wurden entweder an der Beamline BL14.1 am BESSY mit einer Wellenlänge von 0.91841 Å oder an der Beamline PX-3 der SLS mit einer Wellenlänge von 1.00 Å durchgeführt. Die Messungen fanden jeweils bei einer Temperatur von 100 K statt. Die optimalen Winkel sowie die Anzahl für einen vollständigen Datensatz benötigten Bilder wurden mittels der Strategievorhersage von imosflm ermittelt (Battye *et al.* 2011).

#### 4.6.6 Strukturlösung

Für die Datenprozessierung wurde XDS (Kabsch 2010) verwendet, der molekulare Ersatz fand mit Phaser (McCoy *et al.* 2007) aus dem CCP4-Paket statt.

Manuelle Korrekturen der Kristallstrukturen wurden mittels Coot (Emsley *et al.* 2010) durchgeführt, die anschließenden Verfeinerungen erfolgten entweder mit phenix.refine (Adams *et al.* 2010) oder Refmac aus dem CCP4-Paket (Winn *et al.* 2011). Hierbei wurden die Strukturen neben der Beachtung eines niedrigen freien R-Wertes (Kapitel refsec:Verfeinerung nach möglichst sinnvollen chemischen Kriterien verfeinert. Für den richtigen Hauptkettenverlauf wurden die Torsionswinkel mittels Ramachandran Diagramm (Lovell *et al.* 2003) analysiert und für die Seitenketten chemisch sinnvolle und bekannte Rotamere beachtet (Lovell *et al.* 2000). Unerlaubte Bereiche von Hauptkettentorsionswinkel des Peptidrückgrats sind allerdings nicht für alle Aminosäuren vermeidbar, da z.B. intermolekulare Zwänge einzelne Hauptkettentorsionswinkel in unerlaubten Bereichen halten können. So wird z.B. in

*hsCK2 $\alpha$* -Strukturen zumeist Ala193 in unerlaubten Bereichen des Ramachandran Diagramms vorgefunden, doch trotz solcher Ausnahmen ist es für die meisten Kristallstrukturen ein realistisches Ziel solche unerlaubten Bereiche auf weniger als 1% aller Aminosäuren dieser Struktur zu beschränken. Die Topologien der Inhibitoren wurden mit Hilfe von PRODRG (Schüttelkopf und Aalten 2004) erstellt und manuell in die entsprechende Elektronendichte eingepasst.

Die Darstellung der Kristallstrukturen für diese Arbeit erfolgte schlussendlich mit PyMol (Schrödinger, LLC 2010).



## 5 Ergebnisse

### 5.1 Expression und Reinigung von *hsCK2 $\alpha^{1-335}$* und *hsCK2 $\alpha^{Cys336Ser}$*

Die für Aktivitätstests, ITC-Messungen und Strukturanalysen verwendeten *hsCK2 $\alpha^{1-335}$*  und *hsCK2 $\alpha^{Cys336Ser}$*  Isoenzyme wurden nach den in den Kapiteln 4.2 und 4.3 beschriebenen Methoden mit Erfolg exprimiert und gereinigt. Die Methode war für die *hsCK2 $\alpha^{Cys336Ser}$*  schon etabliert, konnte aber auch für die *hsCK2 $\alpha^{1-335}$*  erfolgreich angewendet werden.

Da die Reinigung der beiden *hsCK2 $\alpha$* -Isoformen nach demselben Schema ablief, sind in den Abbildungen 5.1 A-C lediglich die Chromatogramme einer erfolgreichen Beispielreinigung der *hsCK2 $\alpha^{Cys336Ser}$*  gezeigt. Eine ausreichende Reinheit des Proteins nach den drei Reinigungsschritten konnte durch ein SDS-Gel nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.1 D). Beide Proteine ließen sich im Anschluss problemlos bis auf 10 mg/ml konzentrieren und bei -80° C einfrieren. Die eingefrorenen Aliquots konnten anschließend für ITC-Messung, Aktivitätstest und Kristallisationsansätze genutzt werden.

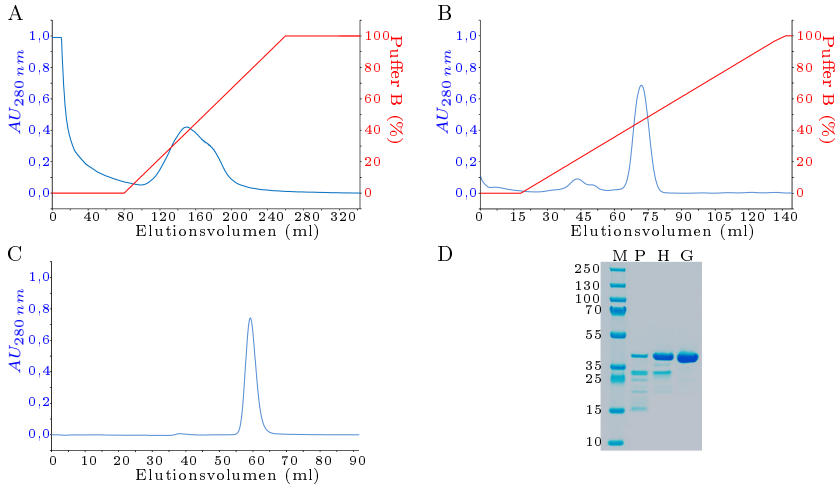


Abbildung 5.1: **Reinigung der *hsCK2α*-Isoformen**

Chromatogramme der einzelnen Reinigungsschritte der *hsCK2α*-Isoformen, wobei Puffer B aus 1 M NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 8,5 besteht. A: 1. Reinigungsschritt mit einer P11-Cellulose Säule B: 2. Reinigungsschritt mit einer Heparinsäule C: dritter Reinigungsschritt mit einer Gelpermeationssäule D: SDS-Gel mit aufgetragenen Proben aus den einzelnen Reinigungsschritten (M = Marker, P = P11-Cellulose Säule, H = Heparinsäule, G = Gelpermeationssäule).

## 5.2 Gekoppelter Aktivitätstest der *hsCK2α*-Isoformen

Der gekoppelte Aktivitätstest wurde wie in Kapitel 4.5 beschrieben mit dem synthetischen Peptid (RRRADDSDDDDDD) durchgeführt. Jeder Wert resultiert aus einer Dreifachbestimmung und wurde in der doppelt reziproken Lineweaver-Burk Darstellung aufgetragen (siehe Abbildung 5.2). Die Lineweaver-Burk Darstellung ermöglicht mit Hilfe einer Regressionsgeraden eine relativ einfache Bestimmung der  $K_M$ - und  $k_{cat}$ -Werte. Auf diese Weise wurden für die *hsCK2α*<sup>Cys336Ser</sup> ein  $K_M$ -Wert von  $11,5 \mu\text{M}$  und einen  $k_{cat}$ -Wert von  $2,72 \text{ min}^{-1}$  ermittelt. Die für *hsCK2α*<sup>1-335</sup> ermittelten Werte waren  $K_M = 11,2 \mu\text{M}$  und  $k_{cat} = 4,92 \text{ min}^{-1}$ .

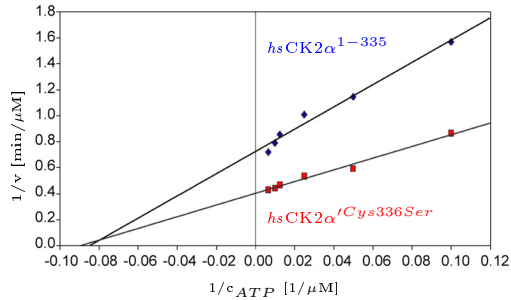


Abbildung 5.2: **Aktivitätstest der *hsCK2 $\alpha$* -Isoformen**

Lineweaver-Burk Auftragung der Aktivitätstests der beiden *hsCK2 $\alpha$* -Isoformen. In rot sind die Messpunkte der *hsCK2 $\alpha$ '<sup>Cys336Ser</sup>* und in blau die Messpunkte der *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>* dargestellt.

### 5.3 ITC der *hsCK2 $\alpha$* -Isoformen mit *hsCK2 $\beta$*

Die Bindungsaffinität der beiden *hsCK2 $\alpha$*  Isoformen zur *hsCK2 $\beta$*  wurde mittels ITC-Messung bestimmt. Die für diese Messung genutzte *hsCK2 $\beta$*  war eine C-terminale Deletionsmutante *hsCK2 $\beta$ <sup>1-193</sup>*, die in ihrer Affinität keine Unterschiede zur Wildtyp *hsCK2 $\beta$*  aufweist (Boldyreff *et al.* 1993) (Raaf *et al.* 2008a). Bei der Auswertung wurden für das *hsCK2 $\beta$* -Dimer zwei äquivalente und unabhängige Bindungsstellen für die *hsCK2 $\alpha$* -Untereinheiten angenommen.

In Abbildung 5.3 sind Beispielmessungen, einmal mit *hsCK2 $\alpha$ '<sup>Cys336Ser</sup>* und einmal mit *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>*, sowie die integrierten Peaks gezeigt. Die durch das ITC-Experiment ermittelten Daten (siehe Tabelle 5.1) sind Mittelwerte und stammen aus jeweils drei Messungen. Die ermittelte mittlere Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) für *hsCK2 $\alpha$ '<sup>Cys336Ser</sup>* zur *hsCK2 $\beta$ <sup>1-193</sup>* betrug 45,5 nM mit einem enthalpischen Beitrag ( $\Delta H^\circ$ ) von -17,2 kJ/mol. Die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) der *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>* zur *hsCK2 $\beta$ <sup>1-193</sup>* betrug 3,7 nM mit einem gemessenen enthalpischen Beitrag ( $\Delta H^\circ$ ) von -63,8 kJ/mol.



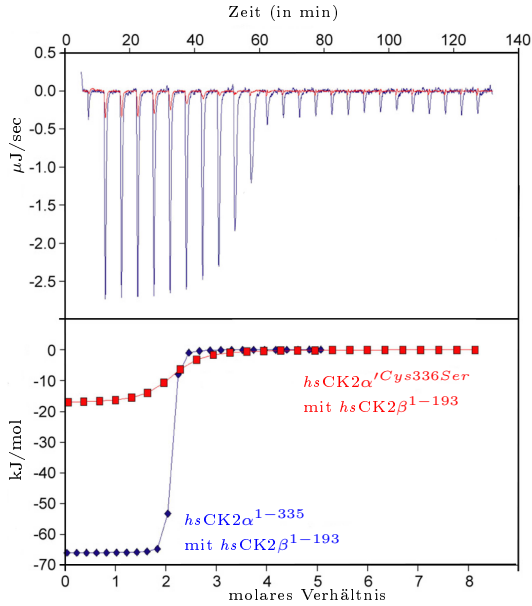


Abbildung 5.3: ITC-Spektren der beiden  $hsCK2\alpha$  Isoenzyme

In rot ist das ITC-Spektrum der  $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$  und in blau das ITC-Spektrum der  $hsCK2\alpha^{1-335}$  dargestellt. Die obere Hälfte zeigt die Rohdaten der ITC-Messungen, die untere Hälfte die integrierten Peaks mit angepasster Kurve zur Ermittlung der thermodynamischen Parameter.

Tabelle 5.1: Daten der ITC-Messung

$hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$		$hsCK2\alpha^{1-335}$
2	n (Stöchiometrie)	2
$2,2 \cdot 10^7$	$K_B$ (l/mol)	$2,7 \cdot 10^8$
$45,5 \cdot 10^{-9}$	$K_D$ (mol/l)	$3,7 \cdot 10^{-9}$
-17,2	$\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	-63,8
82,0	$\Delta S^\circ$ [J/(mol*K)]	-56,4

## 5.4 Proteinkristallisation

Die Proteinkristallisation der beiden *hsCK2 $\alpha$* -Isoformen erwies sich als sehr unterschiedlich. Die Kristallisation von *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>* konnte problemlos bei Raumtemperatur durchgeführt werden, hierbei konnten sowohl bekannte Kristallisationsbedingungen optimiert als auch per Screening neue gefunden werden. Die Spannbreite der Kristallisationsbedingungen die *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>* zur Kristallisation bringen reicht hierbei von verschiedenen PEG-Bedingungen bis hin zu extremen Hochsalzbedingungen.

Die Kristallisation von *hsCK2 $\alpha$ <sup>Cys336Ser</sup>* brachte hingegen deutlich mehr Probleme mit sich, so konnte zwar die Struktur 3OFM durch Kristallisation bei Raumtemperatur gewonnen werden, allerdings war dies der einzige Fall in dem beugungsfähige Kristalle in Stäbchenform gewachsen sind. Ansonsten brachten alle Versuche bei Raumtemperatur lediglich dünne Nadeln mit geringem bis keinem Diffraktionsvermögen hervor. Die eine erfolgreiche Bedingung konnte für weitere Kristallisationen leider auch nicht reproduziert werden. Erfolgreicher erwies sich dann schlussendlich das Screening bei 4° C, welches immer noch vornehmlich dünne Nadeln mit schlechtem Diffraktionsvermögen hervorbrachte, allerdings auch in einigen Bedingungen ausreichend große Kristalle in stäbchenform mit gutem Diffraktionsvermögen. Einige dieser Bedingungen ließen sich anschließend auch bis zu einem gewissen Grad reproduzieren.

Für diese Arbeit wurden insgesamt sechs Kristallstrukturen gelöst, sowie eine bereits veröffentlichte *hsCK2 $\alpha$ '* Struktur mit der PDB 3E3B (Nakanawa *et al.* 2009) verbessert. Zum besseren Verständnis der folgend vorgestellten Kristallstrukturen werden die für diese Arbeit selbst gelösten Strukturen an dieser Stelle schon einmal kurz zusammengefasst.

Es wurden insgesamt drei Strukturen mit der *hsCK2 $\alpha$ <sup>Cys336Ser</sup>* und drei Strukturen mit der *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>* gelöst. Alle sechs Strukturen sind durch Co-Kristallisation entstanden, wobei sowohl eine *hsCK2 $\alpha$ <sup>Cys336Ser</sup>*-Struktur und eine *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>*-Struktur in Komplex mit dem Inhibitor MB002 (siehe Tabelle 5.2) sind. Des Weiteren sind zwei Strukturen der *hsCK2 $\alpha$ <sup>Cys336Ser</sup>* und zwei Strukturen der *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>* in Komplex mit dem Inhibitor FLC21 gelöst worden. Sämtliche Proteinkristalle der *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>*-Strukturen sind bei 20°C gezüchtet worden, ebenso wie die Kristalle die zur Lösung der Struktur von *hsCK2 $\alpha$ <sup>Cys336Ser</sup>* in Komplex mit MB002 verwendet wurden. Die Kristallisation der zwei Komplexstrukturen mit

FLC21 fand hingegen bei 4° C statt.

Die in den folgenden Kapiteln gezeigten Kristallstrukturen sind in der Tabelle 5.2 zusammengefasst, wobei die zwei  $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}/FLC21$ - und die zwei  $hsCK2\alpha^{1-335}/FLC21$ -Komplexstrukturen zur besseren Unterscheidung zusätzlich noch ein Kürzel für das vorhandene Bravais Gitter erhalten. Bei diesen Kürzeln gilt: **mP**-monoklin primitiv, **tP**-tetragonal primitiv und **oP**-orthorhombisch primitiv.

Tabelle 5.2: Zusammenfassung der gelösten Kristallstrukturen

Kristallstruktur	Raumgruppe	Farbcode	Kapitel
$hsCK2\alpha^{Cys336Ser}/MB02$ (3OFM)	$P1$	gelb	5.4.1
$hsCK2\alpha^{Cys336Ser}_{mP}/FLC21$ (Kette A)	$P12_11$	rot	5.4.2
$hsCK2\alpha^{Cys336Ser}_{mP}/FLC21$ (Kette B)	$P12_11$	hellrot	5.4.2
$hsCK2\alpha^{Cys336Ser}_{oP}/FLC21$	$P2_12_12_1$	orange	5.4.3
$hsCK2\alpha^{1-335}/MB02$ (3RPS) *	$P4_3$	lila	5.4.4
$hsCK2\alpha^{1-335}_{oP}/FLC21$	$P2_12_12_1$	blau	5.4.5
$hsCK2\alpha^{1-335}_{tP}/FLC21$	$P4_32_12_1$	cyan	5.4.6

Die genauen Kristallisationsbedingungen, sowie Zusammenfassungen der Datenmessungen und Verfeinerungen werden in den folgenden Kapiteln 5.4.1 bis 5.4.6 aufgeführt.

\* Diese Struktur besitzt zwei Ketten, es wird in dieser Arbeit allerdings nur eine gezeigt.

### 5.4.1 Co-Kristallisation von *hsCK2 $\alpha$* <sup>Cys336Ser</sup> mit MB002

Für die *hsCK2 $\alpha$* <sup>Cys336Ser</sup>/MB002 Komplexstruktur wurde das Protein in 0,5M NaCl, 25 mM Tris/HCl, pH 8,5 auf eine Konzentration von 6 mg/ml gebracht. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde der Kristallisationstropfen aus 0,5  $\mu$ l Protein und 0,5  $\mu$ l Mutterlauge zusammengesetzt. Die Mutterlauge bestand aus 28 % PEG 6000; 500 mM LiCl und 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) die Kristallisation fand bei 20° C mit der Methode des sitzenden Tropfens statt.

In dem Proteintropfen wurden viele feine Nadeln, allerdings auch einige kleine Stäbchen gefunden, welche für die Datenmessung genutzt wurden. Die vorhandene Mutterlauge stellte sich als cryotauglich heraus, so dass der Kristall für die Datenmessung direkt aus dem Proteintropfen weggefroren werden konnte, ein Foto von diesem Kristall existiert leider nicht.

Der Datensatz wurde am BESSY an der Beamline BL-14.1 bei 100 K mit einer Wellenlänge von 0,91841 Å vermessen. Für den molekularen Ersatz diente die *hsCK2 $\alpha$* -Struktur mit der PDB 2PVR (Niefind *et al.* 2007) als Vorlage. Die Struktur konnte in der Raumgruppe *P*1 bis zu einem freien R-Wert von 20,7% verfeinert werden (siehe Tabelle 5.3), der Inhibitor MB002 ist gut in der ATP-Bindetasche durch Elektronendichte definiert (siehe Abbildung 5.4). Die Kristallstruktur wurde unter der PDB 3OFM veröffentlicht (Bischoff *et al.* 2011b) und wird in den folgenden Kapiteln mit seiner PDB-ID als 3OFM bezeichnet.

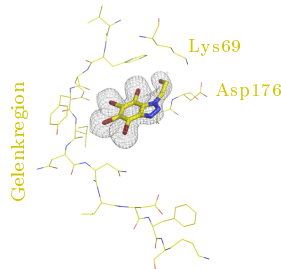


Abbildung 5.4: **Der *hsCK2 $\alpha$* <sup>1-335</sup>/MB002 Komplex**

Der Inhibitor MB002 in der ATP-Bindetasche, die Elektronendichte ist mit einem Konturlevel von  $1\sigma$  dargestellt.

Tabelle 5.3: Datensatz und Verfeinerung  $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}/MB002$  (3OFM)

Datensammlung	$hsCK2\alpha^{Cys336Ser}/MB002$ (3OFM)
Beamline	BL 14.1 (BESSY)
Datensammlungs Temperatur (K)	100
Wellenlänge (Å)	0,91841
Raumgruppe	<i>P</i> 1
Gitterkonstanten	
<i>a</i> ; <i>b</i> ; <i>c</i> (Å)	46,69; 47,57; 50,57
$\alpha$ ; $\beta$ ; $\gamma$ (°)	112,40; 89,49; 91,30
Auflösung: Gesamt (höchste Schale)(Å)	33,03–2,20 (2,25–2,20)
$R_{sym}$ (%)	5,7 (25,7)
Signal Rausch Verhältnis ( $I/\sigma_I$ )	12,6 (3,4)
Vollständigkeit (%)	86,8 (47,7)
Redundanz	2,2 (2,2)
<i>B</i> -Faktor von Wilson Plot (Å <sup>2</sup> )	26,1
Verfeinerung	
Auflösung (Å)	33,03–2,20
Anzahl der Reflexe in Arbeits Set/Test Set	22.479/ 1184
$R_{work}/R_{free}$	17,2/20,7
Anzahl der Atome	
Protein	2768
Ligand/Ion	18
Wasser	227
durchschnittliche <i>B</i> -Faktoren (Å <sup>2</sup> )	33,1
Standardabweichungen	
Bindungslängen (Å)	0,007
Bindungswinkel (°)	0,975
Ramachandran Diagramm Qualität	
favorisierte Regionen (%)	88,9
erlaubte Regionen (%)	10,7
unerlaubte Regionen (%)	0,3
unerlaubte Rotamere (%)	0,33

### 5.4.2 Co-Kristallisation von $hsCK2\alpha'^{Cys336Ser}$ mP mit FLC21

Für die Co-Kristallisation wurde die  $hsCK2\alpha'^{Cys336Ser}$  in 0,5 M NaCl, 25 mM Tris/HCl, pH 8,5 auf eine Konzentration von 5,5 mg/ml gebracht. Die Inkubationszeit mit dem Inhibitor FLC21 betrug 20 min bei Raumtemperatur, der Proteintropfen bestand aus 0,3  $\mu$ l Protein/Inhibitorgemisch und 0,3  $\mu$ l Mutterlauge. Die Kristallisation fand bei 4° C und mit der Methode des sitzenden Tropfens statt. Die Mutterlauge bestand aus 25 % PEG 4000; 15 % Glycerin; 0,08 M Tris/HCl; 0,17 M Na-Acetat; pH 8,5.

Die Kristalle in dem Proteintropfen waren dünne, lange Stäbchen (siehe Abbildung 5.5 A). Die Cryolösung bestand aus der Mutterlauge mit 10 % Glycerin, in welche die Kristalle vor dem Einfrieren kurz überführt wurden.

Die Datenmessung wurde bei 100 K an der Beamline PX-3 an der SLS bei einer Wellenlänge von 1,00 Å durchgeführt. Die Struktur wurde mit Hilfe des molekularen Ersatzes gelöst, wobei die zuvor gelöste  $hsCK2\alpha'^{Cys336Ser}$ /MB02 Komplexstruktur (3OFM) als Vorlage diente.

Die Kristallstruktur hat die Raumgruppe  $P12_11$ , besteht aus zwei Ketten und konnte bis zu einem freien R-Wert von 21,57 % verfeinert werden (siehe Tabelle 5.4). Der Inhibitor FLC21 ist in beiden Ketten sehr gut in der ATP-Bindetasche durch die Elektronendichte definiert (siehe Abbildung 5.5 B+C). Die Kristallstruktur wird im Folgenden als  $hsCK2\alpha'^{Cys336Ser}$  mP/FLC21 bezeichnet.

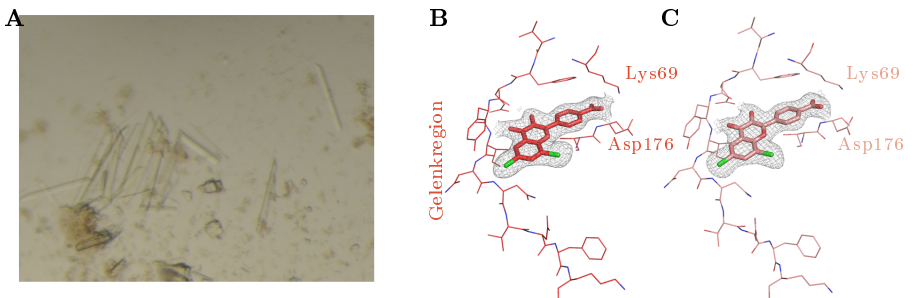


Abbildung 5.5: Der  $hsCK2\alpha'^{Cys336Ser}$  mP/FLC21 Komplex

A:  $hsCK2\alpha'^{Cys336Ser}$  mP/FLC21 Kristall B: Inhibitor FLC21 in der ATP Bindetasche der Kette A, die Elektronendichte ist mit einem Konturlevel von  $1\sigma$  dargestellt. C: Inhibitor FLC21 in der ATP-Bindetasche der Kette B, die Elektronendichte wird mit einem Konturlevel von  $1\sigma$  dargestellt.

Tabelle 5.4: Datensatz und Verfeinerung  $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$  mP/FLC21

Datensammlung	$hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$ mP/FLC21
Beamline	PX-3 (SLS)
Datensammlungs Temperatur (K)	100
Wellenlänge (Å)	1,00
Raumgruppe	$P12_11$
Gitterkonstanten	
$a; b; c$ (Å)	69,34; 87,62; 72,98
$\alpha; \beta; \gamma$ (°)	90,0; 109,69; 90,0
Auflösung: Gesamt (höchste Schale)(Å)	48,42–2,24 (2,36–2,24)
$R_{sym}$ (%)	9,3 (60,9)
Signal Rausch Verhältnis ( $I/\sigma I$ )	9,3 (2,1)
Vollständigkeit (%)	98,3 (92,6)
Redundanz	3,3 (3,1)
$B$ -Faktor von Wilson Plot (Å <sup>2</sup> )	30,55
<hr/>	
Verfeinerung	
Auflösung (Å)	48,42–2,24
Anzahl der Reflexe in Arbeits Set/Test Set	69.325 / 3455
$R_{work}/R_{free}$	16,44/21,57
Anzahl der Atome	
Protein	5546
Ligand/Ion	77
Wasser	329
durchschnittliche $B$ -Faktoren (Å <sup>2</sup> )	30,8
Standardabweichungen	
Bindungslängen (Å)	0,003
Bindungswinkel (°)	0,699
Ramachandran Diagramm Qualität	
favorisierte Regionen (%)	(95,88)
erlaubte Regionen (%)	(3,96)
unerlaubte Regionen (%)	(0,15)
unerlaubte Rotamere (%)	1,00

### 5.4.3 Co-Kristallisation von $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$ oP mit FLC21

Die dritte Komplexstruktur der  $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$  ist erneut durch Co-Kristallisation mit dem Inhibitor FLC21 entstanden. Der Kristallisationstropfen wurde auf dieselbe Weise erstellt wie im vorigen Kapitel 5.4.2 beschrieben, die Kristallisation fand ebenfalls bei 4° C statt. Die Mutterlauge war zusammengesetzt aus 25 % PEG 5000 MME; 0,1 M MES; 0,2 M Am-Sulfat; pH 6,5.

Als Proteinkristalle gab es sowohl dünne Nadeln, als auch Kristalle in Stäbchenform (siehe Abbildung 5.6 A), welche für die Datenmessung verwendet wurden. Die Cryolösung bestand aus der Mutterlauge mit 20 % Glycerin.

Der Datensatz wurde ebenfalls an der Beamline PX-3 an der SLS, bei einer Temperatur von 100 K und einer Wellenlänge von 1,00 Å aufgenommen. Als Vorlage für den molekularen Ersatz diente erneut die 3OFM.

Die Struktur wurde in der Raumgruppe  $P2_12_12_1$  bis zu einem freien R-Wert von 22,38 % verfeinert (siehe Tabelle 5.5), der Inhibitor FLC21 ist durch Elektronendichte sehr gut in der ATP-Bindetasche definiert (siehe Abbildung 5.6 B). In der restlichen Arbeit wird diese Struktur als  $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$  oP/FLC21 bezeichnet.

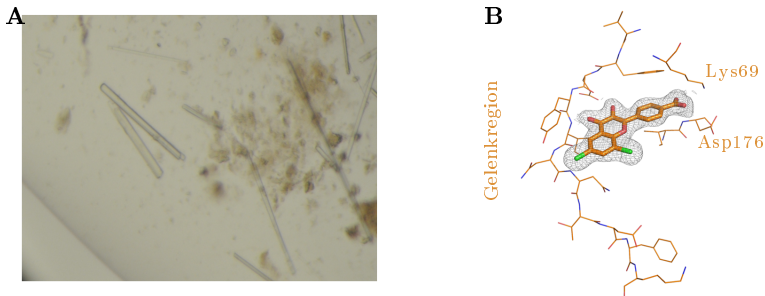


Abbildung 5.6: **Der  $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$  oP/FLC21 Komplex**

A:  $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$  oP/FLC21 Kristall B: Inhibitor FLC21 in der ATP Bindetasche, die Elektronendichte ist mit einem Konturlevel von  $1\sigma$  dargestellt.



Tabelle 5.5: Datensatz und Verfeinerung  $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}_{op}/FLC21$ 

Datensammlung	$hsCK2\alpha^{Cys336Ser}_{op}/FLC21$
Beamline	PX-3 (SLS)
Datensammlungs Temperatur (K)	100
Wellenlänge (Å)	1,00
Raumgruppe	$P 2_12_12_1$
Gitterkonstanten	
$a; b; c$ (Å)	46,85; 83,78; 142,344
$\alpha; \beta; \gamma$ (°)	90,0; 90,0; 90,0
Auflösung: Gesamt (höchste Schale)(Å)	44,5–2,2 (2,27–2,2)
$R_{sym}$ (%)	18,6 (111,6)
Signal Rausch Verhältnis ( $I/\sigma I$ )	9,8 (2,3)
Vollständigkeit (%)	99,2 (92,5)
Redundanz	8,0 (7,5)
$B$ -Faktor von Wilson Plot (Å <sup>2</sup> )	20,52
<hr/>	
Verfeinerung	
Auflösung (Å)	44,5–2,2
Anzahl der Reflexe in Arbeits Set/Test Set	54.644/ 2.747
$R_{work}/R_{free}$	17,89/22,38
Anzahl der Atome	
Protein	2787
Ligand/Ion	78
Wasser	274
durchschnittliche $B$ -Faktoren (Å <sup>2</sup> )	32,10
Standardabweichungen	
Bindungslängen (Å)	0,007
Bindungswinkel (°)	1,004
Ramachandran Diagramm Qualität	
favorisierte Regionen (%)	93,35
erlaubte Regionen (%)	(6,04)
unerlaubte Regionen (%)	(0,6)
unerlaubte Rotamere (%)	1,67

### 5.4.4 Co-Kristallisation von $hsCK2\alpha^{1-335}$ mit MB002

Der Inhibitor MB002 wurde mit 6 mg/ml  $hsCK2\alpha^{1-335}$  (in 0,5 M NaCl, 25 mM Tris/HCl, pH 8,5) gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Proteintropfen aus 0,5  $\mu$ l Protein/Inhibitorgemisch und 0,5  $\mu$ l Mutterlauge zusammengesetzt. Die Kristallisation erfolgte bei 20° C und es wurde die Methode des sitzenden Tropfens verwendet. Die Mutterlauge bestand aus 4 M NaCl; 0,1 Na-Zitrat; pH 5,0.

Die Kristalle hatten eine tetragonal-bipyramidale Form (siehe Abbildung 5.7 A) und konnten direkt weggefroren werden, da die Hochsalzbedingung schon als Cryolösung tauglich war. Der Datensatz wurde am BESSY an der Beamline BL-14.1 mit einer Wellenlänge von 0,91841 Å und einer Temperatur von 100 K aufgenommen.

Für den molekularen Ersatz wurde die Struktur mit der PDB 2PVR (Niefind *et al.* 2007) als Vorlage genommen. Die Struktur konnte in der Raumgruppe  $P4_3$  bis zu einem freien R-Wert von 22,8 % verfeinert werden (siehe Tabelle 5.6). Die Struktur besteht aus zwei Ketten, wobei in Kette A der Inhibitor gut in einer Elektronendichte in der ATP-Bindetasche definiert ist (siehe Abbildung 5.7 B), bei Kette B hingegen kann in der ATP-Bindetasche kein Inhibitor nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Da die Kette B allerdings keine für die  $hsCK2\alpha$  neuen Erkenntnisse liefert, wird im Folgenden von dieser Struktur ausschließlich die Kette A behandelt. Diese Kristallstruktur wurde unter der PDB 3RPS veröffentlicht (Bischoff *et al.* 2011a) und wird im Folgenden mit ihrer PDB-ID als 3RPS bezeichnet.



Abbildung 5.7: **Der  $hsCK2\alpha^{1-335}$ /MB002 Komplex**

A:  $hsCK2\alpha^{1-335}$ /MB002 Kristall B: Inhibitor MB002 in der ATP-Bindetasche in der Kette A, die Elektronendichte ist mit einem Konturlevel von  $1\sigma$  dargestellt.

Tabelle 5.6: Datensatz und Verfeinerung *hsCK2 $\alpha$ /MB002* (3RPS)

Datensammlung	<i>hsCK2<math>\alpha</math>/MB002</i> (3RPS)
Beamline	BL 14.1 (BESSY)
Datensammlungs Temperatur (K)	100
Wellenlänge (Å)	0,91841
Raumgruppe	<i>P</i> 4 <sub>3</sub>
Gitterkonstanten	
<i>a</i> ; <i>b</i> ; <i>c</i> (Å)	72,01; 72,01; 133,12
$\alpha$ ; $\beta$ ; $\gamma$ (°)	90,0; 90,0; 90,0
Auflösung: Gesamt (höchste Schale)(Å)	19,75–2,3 (2,38–2,3)
<i>R</i> <sub>sym</sub> (%)	5,7 (25,7)
Signal Rausch Verhältnis ( <i>I</i> / $\sigma$ <i>I</i> )	20,41 (2,47)
Vollständigkeit (%)	99,7 (98,4)
Redundanz	7,6 (7,3)
<i>B</i> -Faktor von Wilson Plot (Å <sup>2</sup> )	54,3,1
<hr/>	
Verfeinerung	
Auflösung (Å)	19,75–2,3
Anzahl der Reflexe in Arbeits Set/Test Set	29.111/ 912
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub>	17,0/22,8
Anzahl der Atome	
Protein	5634
Ligand/Ion	31
Wasser	145
durchschnittliche <i>B</i> -Faktoren (Å <sup>2</sup> )	52,4
Standardabweichungen	
Bindungslängen (Å)	0,006
Bindungswinkel (°)	0,924
Ramachandran Diagramm Qualität	
favorisierte Regionen (%)	93,52
erlaubte Regionen (%)	5,72
unerlaubte Regionen (%)	0,75
unerlaubte Rotamere (%)	2,94

### 5.4.5 Co-Kristallisation von $hsCK2\alpha^{1-335}$ oP mit FLC21

Für die Co-Kristallisation der  $hsCK2\alpha^{1-335}$  mit dem Inhibitor FLC21, lag das Protein in 0,5 M NaCl, 25 mM Tris/HCl, pH 8,5 mit einer Konzentration von 6 mg/ml vor. Nach einer Inkubationszeit von 1 h auf Eis wurde der Proteintropfen aus 1  $\mu$ l Protein/Inhibitorgemisch und 1  $\mu$ l Mutterlauge zusammengesetzt, welche aus 24 % PEG 3350 und 0,2 M KCl bestand.

Für diesen Co-Kristallisationsansatz wurde zusätzlich noch die Methode des Seeding verwendet. Hierfür wurde ein  $hsCK2\alpha^{1-335}$  Kristall, ebenfalls mit dem Inhibitor FLC21, mit einem Pferdehaar angestochen welches im Anschluß durch den Proteintropfen gezogen wurde. Die Kristallisation fand bei einer Temperatur von 20 °C und der Methode des sitzenden Tropfens statt. Der für das Seeding verwendete Kristall stammte aus einer Bedingung mit 19 % PEG 3350 und 0,2 M KCl.

Insgesamt wurden in diesen Bedingungen mehrere  $hsCK2\alpha^{1-335}$  Kristalle in Stäbchenform mit dem Inhibitor FLC21 gezüchtet (siehe Abbildung 5.8 A). Die mittels Seeding gezüchteten Kristalle brachten jedoch die beste Auflösung, so dass einer von ihnen für die Datenmessung ausgewählt wurde. Die Cryolösung für die Datenmessung bestand aus der Mutterlauge mit 15 % Glycerin.

Das Röntgendiffraktionsexperiment fand bei einer Temperatur von 100 K und einer Wellenlänge von 0,91841 Å am BESSY an der Beamline BL-14.1 statt. Für den molekularen Ersatz wurde die  $hsCK2\alpha^{1-335}$  Struktur mit der PDB 3NSZ (Ferguson *et al.* 2011) verwendet.

Die Struktur konnte in der Raumgruppe  $P2_12_12_1$  bis zu einem freien R-Wert von 21,28 % verfeinert werden (siehe Tabelle 5.7). In der ATP-Bindetasche ist der Inhibitor FLC21 gut durch Elektronendichte definiert (siehe Abbildung 5.8 B). Die Struktur wird in dieser Arbeit weiter als  $hsCK2\alpha^{1-335}$ oP/FLC21 bezeichnet.

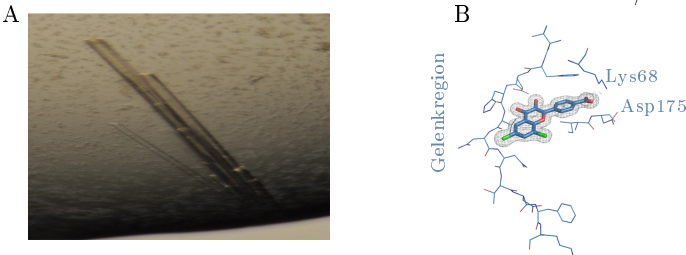


Abbildung 5.8: **Der  $hsCK2\alpha^{1-335}$ oP/FLC21 Komplex** A: Kristallbild des  $hsCK2\alpha^{1-335}$ oP/FLC21 Komplexes B: Inhibitor FLC21 in der ATP-Bindetasche, die Elektronendichte ist mit  $1\sigma$  dargestellt.

Tabelle 5.7: Datensatz und Verfeinerung  $hsCK2\alpha^{1-335}$ oP/FLC21

Datensammlung	$hsCK2\alpha^{1-335}$ oP/FLC21
Beamline	BL 14.1 (BESSY)
Datensammlungs Temperatur (K)	100
Wellenlänge (Å)	0,91841
Raumgruppe	$P2_12_12_1$
Gitterkonstanten	
$a; b; c$ (Å)	48,03; 79,57; 82,14
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90,0; 90,0; 90,0
Auflösung: Gesamt (höchste Schale)(Å)	48,03–1,52 (1,60–1,52)
$R_{sym}$ (%)	5,9 (72,5)
Signal Rausch Verhältnis ( $I/\sigma I$ )	15,7 (2,0)
Vollständigkeit (%)	99,9 (99,8)
Redundanz	4,1 (4,1)
$B$ -Faktor von Wilson Plot (Å <sup>2</sup> )	15,59
<hr/>	
Verfeinerung	
Auflösung (Å)	48,03–1,52
Anzahl der Reflexe in Arbeits Set/Test Set	49.122/ 2.487
$R_{work}/R_{free}$	17,49/21,28
Anzahl der Atome	
Protein	2824
Ligand/Ion	37
Wasser	334
durchschnittliche $B$ -Faktoren (Å <sup>2</sup> )	18,9
Standardabweichungen	
Bindungslängen (Å)	0,015
Bindungswinkel (°)	1,528
Ramachandran Diagramm Qualität	
favorisierte Regionen (%)	(98,2)
erlaubte Regionen (%)	(1,8)
unerlaubte Regionen (%)	(0,0)
unerlaubte Rotamere (%)	1,29

### 5.4.6 Co-Kristallisation von $hsCK2\alpha^{1-335}tP$ mit FLC21

Für diesen Kristallisationsansatz wurden 5,5 mg/ml  $hsCK2\alpha^{1-335}$  in 0,5 M NaCl, 25 mM Tris/HCl, pH 8,5) verwendet, der Inhibitor FLC21 hatte in dem Protein/Inhibitorgemisch eine Endkonzentration von 1 mM. Es wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, der Proteintropfen bestand anschließend aus 1  $\mu$ l Protein/Inhibitorgemisch und 1  $\mu$ l Mutterlauge. Die Kristallisation erfolgte bei 20° C, bei diesem Ansatz wurde die Methode des hängenden Tropfens verwendet. Die Mutterlauge bestand aus 4,3 M NaCl; 0,1 Na-Zitrat; pH 5,2.

Die in dieser Hochsalzbedingung gezüchteten Kristalle (siehe Abbildung 5.9 A) konnten aufgrund der Cryotauglichkeit erneut direkt weggefroren werden.

Der Datensatz wurde am BESSY an der Beamline BL-14.1 mit einer Wellenlänge von 0,91841 Å und einer Temperatur von 100 K aufgenommen. Für den molekularen Ersatz wurde die Struktur mit der PDB 2PVR als Vorlage genommen.

Die Kristallstruktur konnte in der Raumgruppe  $P 4_3 2_1 2$  bis zu einem freien R-Wert von 24,61 % gelöst werden (siehe Tabelle 5.8) und der Inhibitor FLC21 ist in der ATP-Bindetasche gut durch Elektronendichte definiert (siehe Abbildung 5.9 B). Diese Kristallstruktur wird weiterhin als  $hsCK2\alpha^{1-335}tP/FLC21$  bezeichnet.



Abbildung 5.9: **Der  $hsCK2\alpha^{1-335}tP/FLC21$  Komplex**

A: Kristallbild des  $hsCK2\alpha^{1-335}tP/FLC21$  Komplexes B: Inhibitor FLC21 in der ATP-Bindetasche, die Elektronendichte ist mit  $1\sigma$  dargestellt.

Tabelle 5.8: Datensatz und Verfeinerung  $hsCK2\alpha^{1-335}tP/FLC21$ 

Datensammlung	$hsCK2\alpha^{1-335}tP/FLC21$
Beamline	BL-14.1 (BESSY)
Datensammlungs Temperatur (K)	100
Wellenlänge (Å)	0,91841
Raumgruppe	$P4_32_12$
Gitterkonstanten	
$a; b; c$ (Å)	72,59; 72,59; 133,25
$\alpha; \beta; \gamma$ (°)	90,0; 90,0; 90,0
Auflösung: Gesamt (höchste Schale)()	49,09–2,22 (2,34–2,22)
$R_{sym}$ (%)	11,9 (114,2)
Signal Rausch Verhältnis ( $I/\sigma I$ )	14,9 (2,1)
Vollständigkeit (%)	100,0 (100,0)
Redundanz	7,9 (7,9)
$B$ -Faktor von Wilson Plot (Å <sup>2</sup> )	37,6
<hr/>	
Verfeinerung	
Auflösung (Å)	49,09–2,22
Anzahl der Reflexe in Arbeits Set/Test Set	18.352/ 940
$R_{work}/R_{free}$ (%)	19,67/24,61
Anzahl der Atome	
Protein	2935
Ligand/Ion	27
Wasser	104
Durchschnittlicher $B$ -Faktor (Å <sup>2</sup> )	55,4
Standardabweichungen	
Bindungslängen (Å)	0,005
Bindungswinkel (°)	0,646
Ramachandran Diagramm Qualität	
favorisierte Regionen (%)	(96,06)
erlaubte Regionen (%)	(3,64)
unerlaubte Regionen (%)	(0,3)
unerlaubte Rotamere (%)	1,31

## 6 Diskussion

### 6.1 Die 3E3B Struktur

Wie in Kapitel 2 erwähnt, wurde bereits vor den im Ergebnisteil 5.4.1–5.4.3 präsentierten 5.4.1–5.4.3 *hsCK2 $\alpha$ '<sup>Cys336Ser</sup>*-Komplexstrukturen, eine *hsCK2 $\alpha$ '*-Struktur gelöst und unter 3E3B in der PDB hinterlegt (Nakaniwa *et al.* 2009). Bevor nun also auf die in dieser Arbeit gezeigten *hsCK2 $\alpha$ '*-Strukturen eingegangen werden kann, ist es notwendig die vorhandene Struktur 3E3B sowie die über sie getätigten Aussagen näher zu betrachten.

Die publizierte Struktur ist aus einer C-terminale Deletionsmutante *hsCK2 $\alpha$ '<sup>1–334</sup>* entstanden und wurde mit dem Inhibitor CC04820 bei Raumtemperatur co-kristallisiert. Die Struktur konnte bei einer Auflösung von 3,2 Å in der Raumgruppe P 2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2 gelöst werden und wurde bis zu einem freien R-Wert von 27,1 % verfeinert (siehe Tabelle 8.1 in Kapitel 8).

Neben der allgemein sehr großen strukturellen Ähnlichkeit von *hsCK2 $\alpha$ '<sup>1–334</sup>* zu *hsCK2 $\alpha$*  und der Bindung des Inhibitors CC04820 in der ATP-Bindetasche wird besonders auf die  $\beta$ 4/ $\beta$ 5-Schleife eingegangen, für die eine neuartige Konformation beschrieben wird. Begründet wird die neuartige Konformation unter anderem mit dem N-terminale Bereich von *hsCK2 $\alpha$ '<sup>1–334</sup>*, welcher sehr viel dichter an der  $\beta$ 4/ $\beta$ 5-Schleife vorbeiläuft, als es bei der *hsCK2 $\alpha$*  der Fall ist. Resultat ist eine neue Wasserstoffbrücke zwischen Gly35 und Lys103 des  $\beta$ 4-Strangs. Darüber hinaus werden zwei weitere Wasserstoffbrücken erwähnt, welche zwischen dem N <sup>$\epsilon$</sup> -Atom des Lys108 und den beiden Sauerstoffatomen von Pro105 und Val106 des Peptidrückgrats entstehen (siehe Abbildung 6.2 A). Diese zusätzlichen Wasserstoffbrücken bedingen laut der Autoren eine größere Rigidität der  $\beta$ 4/ $\beta$ 5-Schleife von *hsCK2 $\alpha$ '<sup>1–334</sup>* und eine dementsprechend geänderte Konformation. Dieser Unterschied zwischen den beiden *hsCK2 $\alpha$* -Isoformen, so die Kernaussage der Publikation, könne evtl. als Ansatzpunkt für die Entwicklung selektiver Inhibitoren für eine der beiden *hsCK2 $\alpha$* -Isoformen dienen.



### 6.1.1 Die 3E3B-Kristallstruktur weist erhebliche Mängel auf

Die Verfeinerung von Protein-Kristallstrukturen erfolgt immer nach verschiedenen Qualitätskriterien, die jeweils möglichst gut erfüllt werden sollten. Neben einem möglichst niedrigen freien R-Wert sind wichtige Qualitätskriterien unter anderem die Einhaltung des Ramachandran-Diagramms für die Hauptkettentorsionswinkel und die Verwendung von erlaubten Rotameren für Aminosäureseitenketten. Der berichtete freie R-Wert von 27,1% (Nakaniwa *et al.* 2009) für 3E3B ist allerdings für die Qualität der Kristallstruktur nicht sehr aussagefähig, da dieser stark von der Qualität der vorhandenen Diffraktionsdaten abhängig ist und dementsprechende Grenzen vorgegeben sind. Die Betrachtung des Ramachandran-Diagramms und eine Analyse der verwendeten Rotamere einer Kristallstruktur lassen hingegen recht schnell und einfach einen Schluss über die Qualität zu und zeigen, inwiefern nach chemisch sinnvollen Kriterien verfeinert wurde.

Doch gerade in Bezug auf die eben genannten Qualitätskriterien weist die 3E3B-Struktur erhebliche Mängel auf, denn bei einer vernünftig verfeinerten Kristallstruktur sollten eigentlich möglichst wenige der Hauptkettentorsionswinkel  $\varphi$  und  $\psi$  in unerlaubten Bereichen des Ramachandran-Diagramms liegen. Wie Tabelle 8.1 in Kapitel 8 allerdings zeigt, wurden bei 3E3B viele der genannten Qualitätskriterien nicht beachtet. So zeigt das Ramachandran Diagramm knapp 10% der Aminosäuren in unerlaubten Bereichen an, ebenso weisen 18,15% aller Seitenketten unerlaubte Rotamere auf. Aufgrund dieser offensichtlichen Mängel der 3E3B-Struktur wurde beschlossen, die in der PDB hinterlegten Strukturdaten für eine Nachverfeinerung der Struktur zu nutzen.

Bei der aus diesem Grund mit CNS (Brünger *et al.* 1998) durchgeführten Nachverfeinerung stieg der freie R-Wert von 27,1% allerdings während des Laufes um bis zu neun Prozent an. Dieser Umstand lässt auf zu gering angesetzte Verfeinerungszyklen für die Berechnung des freien R-Wertes schließen. Das Ergebnis der Nachverfeinerung ist in Tabelle 8.1 in Kapitel 8 zusammengefasst. Insgesamt konnte der Prozentsatz der unerlaubten Torsionswinkel im Ramachandran-Diagramm auf 0,62% und der der unerlaubten Rotamere auf 2,35% reduziert werden (siehe Tabelle 8.2 und Abbildung 8.2 in Kapitel 8), der freie R-Wert der Nachverfeinerung erreichte schlussendlich einen Wert von 25,27%. Die Nachverfeinerung der Struktur brachte jedoch nicht nur eine statistische Verbesserung, sondern auch gravierendere strukturelle Fehler, welche die 3E3B-Struktur aufweist, konnten nachgewiesen und

verbessert werden. In den folgenden Kapiteln wird sich bei der Bezeichnung 3E3B auf die Originalstruktur bezogen, die korrigierte Struktur wird als 3E3Bkor (kor steht für korrigiert) bezeichnet.

### 6.1.2 Der N-Terminus der 3E3B-Struktur muss gekürzt werden

Ein recht offensichtlicher Mangel, welcher allerdings gravierende Fehlinterpretationen nach sich ziehen kann, zeigt sich im N-terminalen Bereich der 3E3B-Struktur. Wie Abbildung 6.1 A zeigt sind die N-terminalen Aminosäuren 1–7 nicht durch Elektronendichte definiert. Dennoch wurden sie nicht wie sonst hierbei üblich aus der Struktur entfernt. Die Folge ist, dass die sieben N-terminalen Aminosäuren in das nächste symmetrieäquivalente Molekül in dem Bereich um die Aminosäuren 70–72 hineinragen. Hierdurch wird die eigentlich dem Leu71 zugehörige Elektronendichte von Met1 eingenommen, Leu71 wird hingegen abgedrängt. Zusätzlich befindet sich Pro2 in unmittelbarer Nähe zu Ile70 und beeinflusst somit die Seitenkette der Aminosäure (siehe Abbildung 6.1 A).

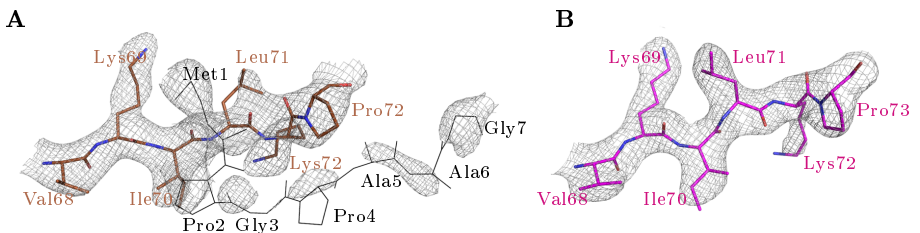


Abbildung 6.1: **N-Terminus von 3E3B**

A: Der Aminosäurebereich von 3E3B ist in braun dargestellt, in schwarz der N-Terminus aus einem symmetrieäquivalenten Molekül. B: Der Aminosäurebereich von 3E3Bkor ist in magenta dargestellt, der N-terminale Bereich wurde entfernt. Die Elektronendichte hat ein Konturlevel von  $1\sigma$ .

Da die ersten sieben N-terminalen Aminosäuren scheinbar ungeordnet vorliegen, wurden diese im Zuge der Nachverfeinerung aus der Struktur entfernt, das Resultat ist in Abbildung 6.1 B zu sehen. Leu71 nimmt nun den von Met1 zuvor blockierten Platz in der Elektronendichte ein und auch das Ile70 hat den nötigen Platz erhalten,

um die vorhandene Elektronendichte passend zu füllen.

Das gezeigte Beispiel der mangelnden Verfeinerung hatte mit Ausnahme falscher Seitenkettenrotamere keinen erheblichen Einfluss auf Struktur und Aussage der 3E3B-Struktur, dennoch könnte solch ein Fehler unter anderen Umständen leicht zu Fehlinterpretationen der *hsCK2 $\alpha$ '*-Struktur führen.

### 6.1.3 Die $\beta 4/\beta 5$ -Schleife der 3E3B-Struktur besitzt keine neuartige Konformation

Wie in Kapitel 6.1 erwähnt, wurde eine neuartige Konformation der  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife beschrieben (Nakaniwa *et al.* 2009), welche als möglicher Ansatzpunkt für spezifische Inhibitoren ausgemacht wurde. Da die  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife als Wechselwirkungsregion der *hsCK2 $\alpha$*  mit *hsCK2 $\beta$*  von besonderem Interesse ist, bedarf die gemachte Aussage einer erhöhten Aufmerksamkeit.

In Abbildung 6.2 A ist die  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife der 3E3B-Struktur mitsamt Elektronendichte dargestellt, zusätzlich sind die zwei von Nakaniwa erwähnten Wasserstoffbrücken (Nakaniwa *et al.* 2009) des Lys108 sowie die offene Konformation der  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife der *hsCK2 $\alpha$*  aus der *hsCK2*-Holoenzymstruktur 1JWH (Niefind *et al.* 2001) gezeigt. In Abbildung 6.2 C ist die gesamte N-terminale Domäne dargestellt, wobei in schwarz (1JWH) die offene Konformation und in grau (3BQC) die geschlossene Konformation der  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife der *hsCK2 $\alpha$*  zu sehen sind. In braun ist die Struktur von 3E3B Struktur gezeigt, welche eindeutig keiner der beiden bekannten  $\beta 4/\beta 5$ -Schleifenkonformationen zuzuordnen ist. Eine genauere Betrachtung der Abbildung 6.2 A zeigt jedoch, dass das Peptid-rückgrat zwischen Val106 und Ser107 nicht durch Elektronendichte definiert ist, die Seitenkette des Lys108 jedoch in etwa dem Hauptkettenverlauf der 1JWH-Struktur folgt.

Im Laufe der Nachverfeinerung wurde die  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife der vorhandenen Elektronendichte neu angepasst, das Ergebnis ist in Abbildung 6.2 B und D zu sehen. Die  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife wird nun vollständig durch Elektronendichte definiert (siehe Abbildung 6.2 B) und nimmt wie die *hsCK2 $\alpha$* -Struktur aus 1JWH die offene Konformation ein (siehe Abbildung 6.2 D). Die von Nakaniwa *et al.* berichtete neuartige Konformation der  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife von *hsCK2 $\alpha$ '*, welche durch Wasserstoffbrücken des Lys108 stabilisiert werden, kann aufgrund der Nachverfeinerung nicht bestätigt werden. Vielmehr handelt es sich mit der offenen Konformation um eine schon aus *hsCK2 $\alpha$* -Strukturen gut bekannten Konformation.

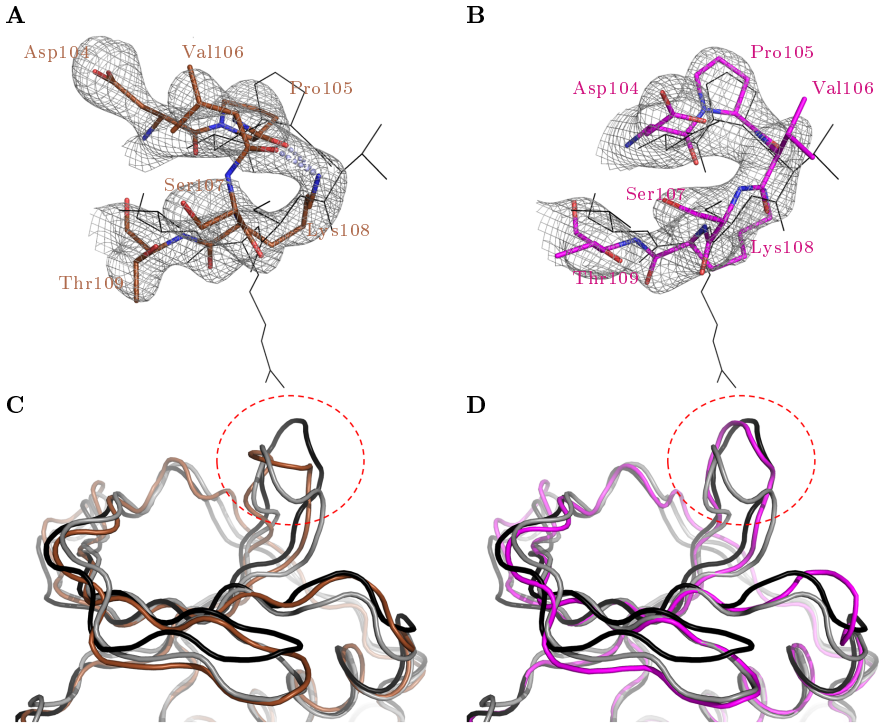


Abbildung 6.2: Die  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife

A: Die  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife der 3E3B-Struktur (braun), überlagert mit der Kette A der *hsCK2 $\alpha$*  Struktur von 1JWH (schwarz), welche in der offenen Konformation vorliegt. B: Die  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife der 3E3Bkor-Struktur (magenta), ebenfalls überlagert mit der Kette A der *hsCK2 $\alpha$*  Struktur von 1JWH (schwarz). C: Alignment der N-terminalen Domäne von 3E3B mit 1JWH und 3BQC (grau), die  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife ist eingekreist und zeigt eine neuartige Konformation von 3E3B. D: Alignment der N-terminalen Domäne von 3E3Bkor mit 1JWH und 3BQC, die  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife ist eingekreist und zeigt die offene Konformation von 3E3Bkor. Die Elektronendichte hat ein Konturlevel von  $0,8\sigma$ .

## 6.2 Die $hsCK2\alpha'^{Cys336Ser}$ -Mutante

### 6.2.1 Die $hsCK2\alpha'^{Cys336Ser}$ -Mutante ist vollständig aktiv

Die für diese Arbeit verwendete  $hsCK2\alpha'^{Cys336Ser}$ -Mutante konnte erfolgreich nach dem Standardprotokoll der  $hsCK2\alpha$  exprimiert und gereinigt werden (Kapitel 5.1). Bevor jedoch die ersten Kristallisationsbemühungen mit der  $hsCK2\alpha'^{Cys336Ser}$  anfangen, sollte zunächst die Aktivität der  $hsCK2\alpha'$ -Mutante überprüft werden.

Der zu diesem Zweck durchgeführte gekoppelten Aktivitätstest (siehe Kapitel 5.2 und Abbildung 5.2) erbrachte für die  $hsCK2\alpha'^{Cys336Ser}$  einen  $K_M$ -Wert für ATP von  $11,5 \mu\text{M}$ , sowie einen  $k_{cat}$ -Wert von  $2,72 \text{ min}^{-1}$ . Die mit derselben Methode ermittelten Werte für die  $hsCK2\alpha^{1-335}$  beliefen sich auf  $11,2 \mu\text{M}$  und  $4,92 \text{ min}^{-1}$  und zeigen somit keine auffälligen Differenzen zwischen den beiden  $hsCK2\alpha$ -Isoformen. Somit konnte die Funktionsfähigkeit der verwendeten  $hsCK2\alpha'^{Cys336Ser}$ -Mutante nachgewiesen werden.

### 6.2.2 Die $hsCK2\alpha'^{Cys336Ser}$ -Mutante hat eine geringere Affinität zu $hsCK2\beta^{1-193}$ als $hsCK2\alpha^{1-335}$

Die als nächstes durchgeführten ITC-Messungen (siehe Kapitel 5.3 und Tabelle 5.1) offenbarten hingegen schon deutlichere Unterschiede zwischen den beiden  $hsCK2\alpha$ -Isoformen. Die  $hsCK2\alpha'^{Cys336Ser}$  zeigte eine Dissoziationskonstante von  $45,5 \text{ nM}$  zu  $hsCK2\beta^{1-193}$ , bei der  $hsCK2\alpha^{1-335}$  wurde hingegen eine Dissoziationskonstante von  $3,7 \text{ nM}$  zu  $hsCK2\beta^{1-193}$  ermittelt. Dies bedeutet eine 12-fach geringere Affinität der  $hsCK2\alpha'^{Cys336Ser}$  zu  $hsCK2\beta^{1-193}$  im Gegensatz zur  $hsCK2\alpha^{1-335}$ . Diese deutlich geringere Affinität bestätigt zuvor gemachte Beobachtungen zur  $hsCK2\alpha'$ , bei denen eine geringere Thermostabilisierung der  $hsCK2\alpha'$ -Untereinheit durch die  $hsCK2\beta$ -Untereinheit als bei  $hsCK2\alpha$  ausgemacht wurde (Olsen *et al.* 2008). Auch dies spricht für eine geringere Affinität der  $hsCK2\alpha'$ -Untereinheit zur  $hsCK2\beta$ -Untereinheit. Weiterhin deutet ein  $\Delta H^\circ$  von lediglich  $-17,2 \text{ kJ/mol}$  bei der Interaktion mit  $hsCK2\beta^{1-193}$  auf eine enthalpisch sehr viel geringer getriebene Reaktion hin, als es zwischen  $hsCK2\alpha'^{1-335}$  und  $hsCK2\beta^{1-193}$  der Fall ist ( $\Delta H^\circ = -63,8 \text{ kJ/mol}$ ). Die vorhandenen Daten lassen bei der  $hsCK2\alpha'$  auf eine durch die  $hsCK2\beta$  weniger kontrollierte Isoform der  $hsCK2\alpha$  schließen.

### 6.3 globaler Strukturvergleich zwischen *hsCK2 $\alpha$ '* und *hsCK2 $\alpha$*

Im Folgenden werden drei *hsCK2 $\alpha$ '<sup>Cys336Ser</sup>*- und drei *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>*-Komplexstrukturen sowohl untereinander als auch mit bereits bekannten Strukturen verglichen. Als Übersicht über die einzelnen Strukturen sowie die einzelnen Regionen welche in der Folge diskutiert werden, dient Abbildung 6.3. Abbildung 6.3 A zeigt ein multiples Alignment aller *hsCK2 $\alpha$ '*-Komplexstrukturen gemeinsam mit zwei *hsCK2 $\alpha$* -Referenzstrukturen (1JWH und 3BQC). In Abbildung 6.3 B ist ein multiples Alignment mit den in dieser Arbeit präsentierten *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>*-Komplexstrukturen und 1JWH und 3BQC dargestellt.

Die beiden gewählten Referenzstrukturen 3BQC und 1JWH dienen vor allem der Veranschaulichung bereits bekannter struktureller Besonderheiten der *hsCK2 $\alpha$* , welche schon in Kapitel 1.4.1 beschrieben wurden. Kurz zusammengefasst steht die *hsCK2 $\alpha$* -Struktur 1JWH (schwarz) für eine offene Gelenkregion und eine offene  $\beta$ 4/ $\beta$ 5-Schleife, wohingegen die *hsCK2 $\alpha$* -Struktur 3BQC (grau) eine geschlossene Gelenkregion und eine geschlossene  $\beta$ 4/ $\beta$ 5-Schleife zeigt.

Ein besonderes Augenmerk soll zunächst auf die in den globalen Alignments markierten Bereiche gelegt werden:

1. :  $\beta$ 4/ $\beta$ 5-Schleife
2. : ATP-bindende Schleife
3. : Gelenkregion
4. : C-Terminus

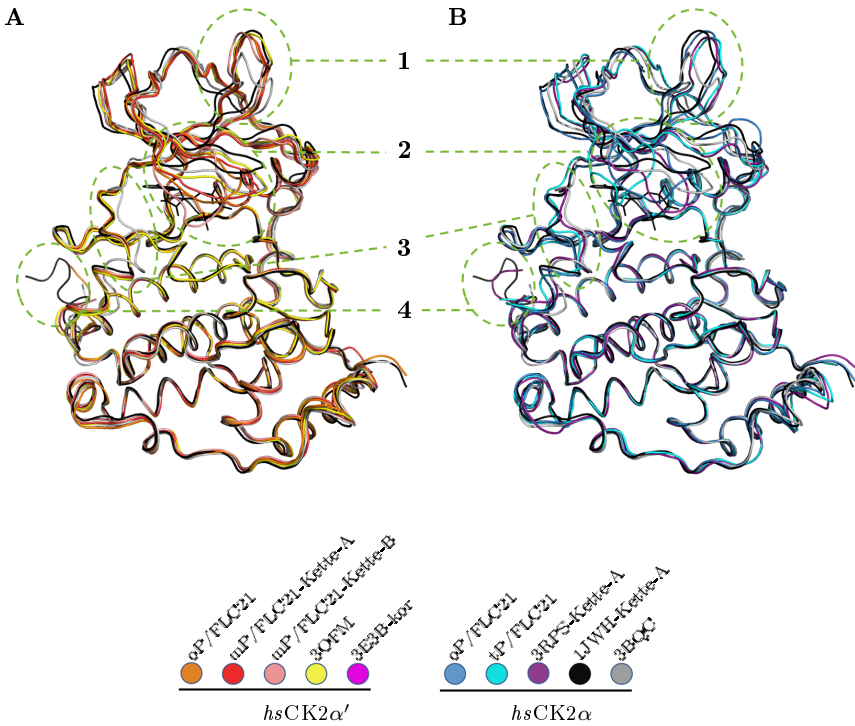


Abbildung 6.3: globale Übersicht der in dieser Arbeit vorgestellten  $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$ - und  $hsCK2\alpha^{1-335}$ -Komplexstrukturen

A: Alignment aller drei in dieser Arbeit vorgestellten  $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$ -Komplexstrukturen (insgesamt vier Ketten) mit 3E3Bkor sowie 3BQC (Raaf *et al.* 2008a) und 1JWH (Niefind *et al.* 2001) als Referenzstrukturen. B: Alignment aller drei in dieser Arbeit vorgestellten  $hsCK2\alpha^{1-335}$ -Komplexstrukturen, ebenfalls mit 3BQC und 1JWH als Referenzstrukturen. Für die Bindung von Liganden in der ATP-Bindetasche ist repräsentativ jeweils ANP aus 1JWH gezeigt. Die eingekreisten Bereiche markieren die in dieser Arbeit besonders diskutierten Bereiche. 1: Die  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife 2: die ATP-bindende Schleife und ATP-Bindetasche 3: die Gelenkregion 4: der C-Terminus.

Ein strukturell entscheidender Unterschied zwischen den *hsCK2 $\alpha$ '*-Strukturen in Abbildung 6.3 A und den *hsCK2 $\alpha$* -Strukturen in Abbildung 6.3 B zeigt sich in der  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife. Sämtliche in dieser Arbeit vorgestellten *hsCK2 $\alpha$ '<sup>Cys336Ser</sup>*-Komplexstrukturen sowie 3E3Bkor weisen eine offene  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife auf. Die in dieser Arbeit präsentierten *hsCK2 $\alpha$ '<sup>1-335</sup>*-Komplexstrukturen zeigen zugegebenermaßen ebenfalls alle eine offene  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife (siehe Abbildung 6.3 B), allerdings gibt es für *hsCK2 $\alpha$*  mehrere Kristallstrukturen wie z.B. 3BQC, die eine geschlossene  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife besitzen. Da bisher nur die vier hier gezeigten *hsCK2 $\alpha$ '*-Strukturen existieren, konnte eine geschlossene  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife für *hsCK2 $\alpha$ '* bisher nicht nachgewiesen werden. Die Tatsache dass somit alle vier vorhandenen *hsCK2 $\alpha$ '*-Strukturen eine offene  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife aufweisen, die vier Kristallstrukturen jedoch drei verschiedene Raumgruppen haben, lässt vermuten dass *hsCK2 $\alpha$ '* im Gegensatz zu *hsCK2 $\alpha$*  eine weniger flexible  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife besitzt und diese hauptsächlich in der offenen Konformation vorliegt.

Ein weiterer flexibler Bereich der *hsCK2 $\alpha$*  stellt die ATP-bindende Schleife dar. Diese zeigt sowohl in allen *hsCK2 $\alpha$ '*- als auch in allen *hsCK2 $\alpha$* -Strukturen in Abbildung 6.3 A und B eine extrem große Flexibilität, so dass in diesem Bereich keine größeren Unterschiede zwischen den beiden *hsCK2 $\alpha$* -Isoformen auszumachen ist.

Die Flexibilität der Gelenkregion ist wie in Kapitel 1.4.1 eine Besonderheit der *hsCK2 $\alpha$* . Diese Flexibilität zeigt sich auch erneut in den *hsCK2 $\alpha$* -Strukturen in Abbildung 6.3 B, so zeigt z.B. die *hsCK2 $\alpha$ '<sup>1-335</sup>oP/FLC21*-Komplexstruktur (hellblau) eine offene Gelenkregion, wohingegen 3RPS (lila) eine geschlossene Gelenkregion aufweist. Interessanterweise zeigen jedoch die *hsCK2 $\alpha$ '*-Strukturen diese Flexibilität nicht, alle vier Strukturen weisen eine offene Gelenkkonformation auf, so dass hier ebenso wie bei der  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife von einer größeren Rigidität der *hsCK2 $\alpha$ '* ausgegangen werden muss.

Schlussendlich zeigt sich in Abbildung 6.3 A noch, dass sich die Hoffnung mit Hilfe der *hsCK2 $\alpha$ '<sup>Cys336Ser</sup>*-Mutante mehr über den einzigartigen C-Terminus von *hsCK2 $\alpha$ '* zu erfahren nicht erfüllt hat. Der C-terminale Bereich liegt wie auch in allen *hsCK2 $\alpha$* -Strukturen spätestens ab der AS 335 ungeordnet vor und ist so nicht durch Elektronendichte definiert.



### 6.3.1 Die *hsCK2 $\alpha'$* bildet ein weiteres $\beta$ -Faltblatt aus

Für die Beantwortung der Frage, welche strukturellen Gründe es für die stets offene  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife von *hsCK2 $\alpha'$*  gibt, halfen Strukturalignments mit *hsCK2 $\alpha$*  Strukturen. Diese Alignments zeigten für alle *hsCK2 $\alpha'$* -Strukturen wie von Nakaniwa *et al.* berichtet, einen dicht an der  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife vorbeilaufenden N-terminalen Bereich. Zusätzlich zu der von Nakaniwa schon erwähnten Wasserstoffbrücke zwischen Gly35 und Lys107, bildet der Bereich durch seine Nähe zum  $\beta 4$ -Strang allerdings noch zwei weitere Wasserstoffbrücken zwischen Gln37 und Lys103 sowie zwischen Gly35 und Thr101 aus. Durch diese drei Wasserstoffbrücken welche zumeist in *hsCK2 $\alpha$* -Strukturen, mit Ausnahmen wie z.B. 3NSZ (Ferguson *et al.* 2011) nicht gefunden werden, wird ein sechster  $\beta$ -Strang gebildet, welcher parallel zum  $\beta 4$ -Strang verläuft (siehe Abbildung 6.4 A). Aufgrund seiner Position in der Aminosäuresequenz vor dem  $\beta 1$ -Strang wird dieser  $\beta 0$  genannt (Bischoff *et al.* 2011b).

Neben dem neu ausgeprägten  $\beta 0$ -Strang scheint insbesondere Gln37 eine entscheidende Rolle für die offene Konformation der  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife zu spielen. In allen vier *hsCK2 $\alpha'$* -Strukturen ragt Gln37 in Richtung der hydrophoben Oberfläche, an welche die *hsCK2 $\beta$* -Untereinheit bindet. Auch in den bisher beiden einzigen *hsCK2 $\alpha$* -Holoenzym-Strukturen 1JWH und 4DGL (Lolli *et al.* 2012) zeigt das äquivalente Gln36 in Richtung *CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$*  Bindungsregion, in den beiden *CK2*-Holoenzym-Strukturen liegt die  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife aufgrund der Bindung an *hsCK2 $\beta$*  in der offenen Konformation vor. In sämtlichen Monomeren *hsCK2 $\alpha$* -Strukturen mit geschlossener  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife ist die Seitenkette des Gln36 hingegen nicht in Richtung *CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$* -Bindungstasche gerichtet wie z.B. in 3BQC (siehe Abbildung 6.4 A). Bei den Monomeren *hsCK2 $\alpha$* - und *zmCK2 $\alpha$* -Strukturen mit offener  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife ist hingegen keine klare Ausrichtung des Gln36 auszumachen, welches teils in Richtung *CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$* -Bindungstasche ragt und teils von ihr weg. Erwähnenswert hierbei ist noch, dass die *hsCK2 $\alpha$* -Struktur 3NSZ, welche auch wie *hsCK2 $\alpha'$*  den  $\beta 0$ -Strang ausbildet, ebenfalls wie *hsCK2 $\alpha'$*  eine offene  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife und eine Gln36-Seitenkette in Richtung *CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$* -Bindungstasche zeigen. Die beiden *CK2*-Holoenzym-Strukturen weisen wie schon erwähnt ebenfalls eine offene  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife und ein Gln36 in Richtung *CK2 $\alpha$ /CK2 $\beta$* -Bindungstasche auf, in diesen Strukturen wird der  $\beta 0$ -Strang jedoch nicht ausgebildet.

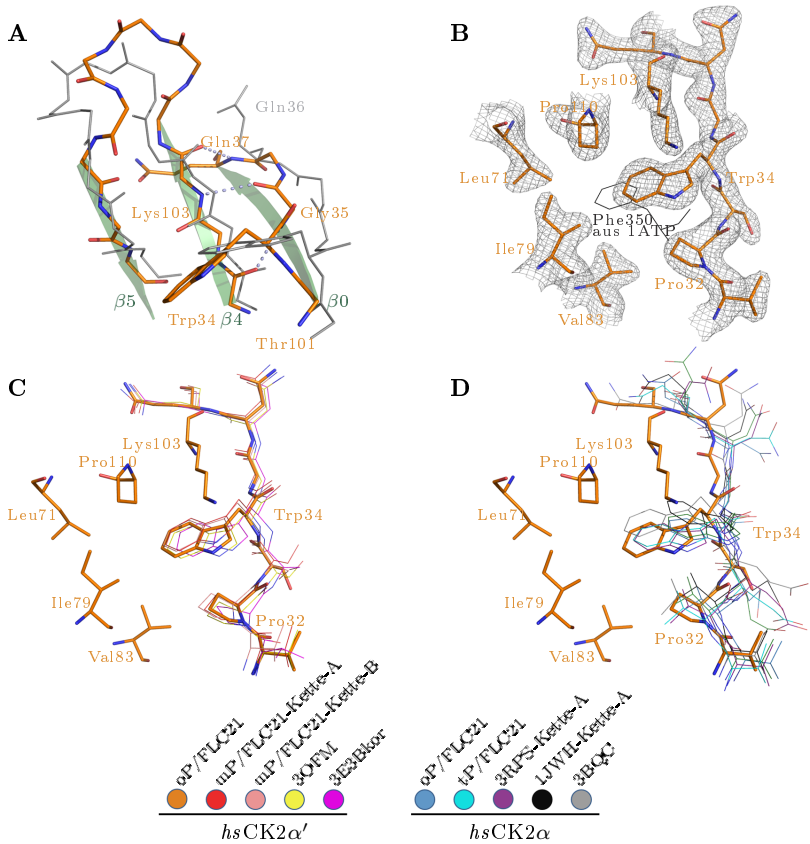


Abbildung 6.4: **Der N-Terminus um Trp34**

N-Terminus und  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife von *hsCK2 $\alpha'$* <sup>Cys336Ser</sup><sub>oP/FLC21</sub> (orange) A: Ausbildung eines weiteren  $\beta$ -Strangs am Rand der  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife, Wasserstoffbrücken sind blau gepunktet, Seitenketten sind bis auf Trp34 und Gln37 nicht gezeigt. B: Hydrophobe Tasche um Trp34, Elektronendichte ist mit einem Konturlevel von  $1\sigma$  dargestellt. C: Alignment des C-Terminus mit allen drei *hsCK2 $\alpha'$* -Strukturen aus dieser Arbeit sowie 3E3Bkor. D: Alignment des C-Terminus mit allen drei *hsCK2 $\alpha$* -Strukturen aus dieser Arbeit sowie 1JWH und 3BQC.

### 6.3.2 Trp34 stabilisiert $\beta$ 0-Strang

Auf der Oberfläche von eukaryotischen Proteinkinasen befinden sich für gewöhnlich verschiedene hydrophobe Taschen, welche den Proteinkinasen die Möglichkeit geben mit anderen Proteinen oder kleineren Liganden Wechselwirkungen einzugehen. Eine solche Tasche befindet sich unter anderem zwischen der Rückseite der  $\beta$ 4/ $\beta$ 5-Schleife und der Helix  $\alpha$ C (Thompson *et al.* 2009). Diese hydrophobe Tasche, welche unter anderem äquivalent zum PIF-pocket der PKA ist (Biondi *et al.* 2000), kann bei eukaryotischen Proteinkinasen z.B. durch ein Phenylalanin des Cyclins belegt werden, welches in CDKs die Helix  $\alpha$ C in der aktiven Konformation stabilisiert. Diese hydrophobe Tasche kann jedoch nicht nur von externen Liganden besetzt werden, es gibt auch Beispiele, dass Proteine mit Teilen ihres N- bzw. C-Terminus die Tasche selbst besetzen können, wie z.B. Phe350 aus CAPK (siehe Abbildung 6.4 B).

Die hydrophobe Tasche wird im Fall von *hsCK2 $\alpha$ '* von den Aminosäuren Pro32, Val83, Ile79, Pro110 und dem aliphatische Teil von Lys103 ausgebildet und wird durch Trp34 gefüllt, die Besetzung der Tasche erfolgt in allen vier *hsCK2 $\alpha$ '*-Strukturen an ziemlich derselben Position (siehe Abbildung 6.4 C). Die Position des äquivalenten Trp33 in der hydrophoben Tasche bei *hsCK2 $\alpha$*  ist hingegen deutlich flexibler wie Abbildung 6.4 D zeigt. Insgesamt ragt das Trp34 von *hsCK2 $\alpha$ '* etwas tiefer in die hydrophobe Tasche als Trp33 bei *hsCK2 $\alpha$*  und wird dementsprechend in der Position mehr fixiert.

Die leicht unterschiedliche Besetzung zwischen *hsCK2 $\alpha$ '* und *hsCK2 $\alpha$*  scheint in einem Aminosäureaustausch an Position 32 (*hsCK2 $\alpha$ '*) bzw. 31 (*hsCK2 $\alpha$* ) begründet zu liegen. *CK2 $\alpha$*  hat an Position 32 ein Valin, welches aufgrund seiner Seitenkette dem Trp33 etwas weniger Platz in der hydrophoben Tasche lässt. Die humane *CK2 $\alpha$ '* hat an der äquivalenten Position 31 hingegen ein Prolin, welches weniger Platz in Anspruch nimmt als ein Valin und so Trp34 die Möglichkeit bietet etwas tiefer in die hydrophobe Tasche hineinzuragen.

## 6.4 Die Bindung der ATP-kompetitiven Inhibitoren

### 6.4.1 MB002 nimmt keinen Einfluss auf die Konformation der Gelenkregion

Aufgrund der Kristallisation von  $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$  und  $hsCK2\alpha^{1-335}$  mit dem selben Inhibitor MB002 konnten erstmals die Bindungseigenschaften in der ATP-Bindetasche miteinander verglichen werden. Ein wichtiger Aspekt für die Bindung von ATP-kompetitiven Inhibitoren ist die Konformation der Gelenkregion. Wie in Kapitel 6.3 bereits beschrieben besitzt die  $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$ -MB002-Komplexstruktur (3OFM) eine offene Gelenkregion, die  $hsCK2\alpha^{1-335}$ -MB002-Komplexstruktur (3RPS) hingegen weist eine geschlossene Gelenkregion auf. In 3RPS kann der Inhibitor eine Halogenbindung mit dem Carbonylsauerstoff des Asn117 sowie mit Lys68 eingehen, welches sich in Richtung Inhibitor neigt (siehe Abbildung 6.5 B). In der 3OFM hingegen liegt der Inhibitor gespiegelt zu dem geraden beschrieben vor. Die Propanol-Seitenkette ragt in die ATP-Bindetasche in Richtung Phe114 und bildet eine Wasserstoffbrücke mit einem konservierten Wassermolekül aus (Battistutta *et al.* 2007). Mit der Gelenkregion werden zwei Halogenbindungen mit den Carbonylsauerstoffatomen des Peptidrückgrats von Glu115 und Ile117 gebildet, allerdings nicht mit Asn118, welches Asn117 aus  $hsCK2\alpha$  entspricht. Weiter wird noch eine Br- $\pi$  Wechselwirkung mit Phe114 eingegangen (siehe Abbildung 6.5 A).

Die unterschiedliche Bindung des MB002-Inhibitors bei  $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$  und  $hsCK2\alpha^{1-335}$  liegt in der unterschiedlichen Konformation der Gelenkregion begründet. Der auf den ersten Blick somit deutliche Unterschied im Bindungsmodus wird unter Berücksichtigung der Kristallisationsbedingungen etwas relativiert. Während die Kristallisation von 3OFM unter PEG-Bedingungen stattfand (Kapitel 5.4.1), wurde  $hsCK2\alpha^{1-335}$  mit MB002 unter Hochsalzbedingungen kristallisiert (Kapitel 5.4.4). Der Einfluss solcher Hochsalzbedingungen, die hydrophobe Interaktionen verstärken und so bei der  $hsCK2\alpha$  eine geschlossene Gelenkregion verursachen, wurde erst kürzlich gezeigt (Klopffleisch *et al.* 2012). Von daher ist zu vermuten, dass die verschiedenen Gelenkkonformationen Folge der sehr unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen sind und die Bindung des Inhibitors MB002 durch die hierdurch vorgegebenen Gelenkkonformation beeinflusst wird. Außerdem zeigt auch die zweite Kette der Struktur, in der MB002 nicht gebunden hat, ebenfalls die geschlossene Gelenkkonformation.

Ein Einfluss auf die Gelenkregion von MB002 ist somit recht unwahrscheinlich, auch wenn es anhand der vorhandenen Strukturen nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann.

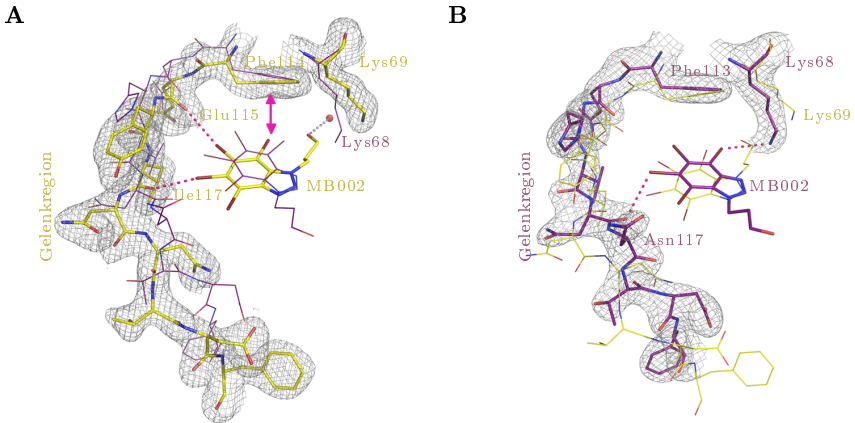


Abbildung 6.5: MB002 in der ATP-Bindetasche

A: Die ATP-Bindetasche von 3OFM. B: Die ATP-Bindetasche von 3RPS. Zur besseren Vergleichbarkeit der Bindung sind die Komplexstrukturen des jeweils anderen Isoenzym in beiden Abbildungen gezeigt, Wasserstoffbrücken sind hellblau und Halogenbindungen pink gepunktet, die Br- $\pi$ -Wechselwirkung ist als pinker Doppelpfeil gekennzeichnet und die Elektronendichte hat ein Konturlevel von  $1\sigma$ .

#### 6.4.2 FLC21 zeigt in beiden *hsCK2 $\alpha$* -Isoformen die selben Bindungseigenschaften

Die gelösten Komplexstrukturen mit FLC21 zeigten teils sehr gute Auflösungen, der Inhibitor FLC21 ist in allen Komplexstrukturen eindeutig durch Elektronendichte definiert (siehe die einzelnen Kapitel unter 5.4) und auch die Gelenkregion und umliegenden Aminosäuren sind sehr gut definiert, wie das Beispiel der Komplexstruktur *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>oP/FLC21* zeigt (siehe Abbildung 6.6 A). Die für FLC21 mittels molekularem Docking vorhergesagten Wechselwirkungen für 4'Carboxyflavonole (Golub *et al.* 2011) konnten somit überprüft und zum größten Teil auch bestätigt werden.

Die vorhergesagten Wechselwirkungen wären zum einen wie in Abbildung 6.6 B gezeigt zwei Wasserstoffbrücken zur Gelenkregion (zu Glu114 und zu Val116) und zum anderen zwei Wasserstoffbrücken zu Asp175 und Lys68. Weiterhin konnte die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung mit Phe114 nachgewiesen werden. Die allerdings ebenfalls durch Moleküldynamiken ausgemachte Wasserstoffbrücke der 4'Carboxylgruppe zum Ser51 kommt hingegen nicht zustande.

Wie bei den beiden Komplexstrukturen mit MB002 war auch mit FLC21 die Kristallisation mit beiden *hsCK2 $\alpha$* -Isoformen erfolgreich, so dass auch hier die Bindung des Inhibitors in der ATP-Bindetasche miteinander verglichen werden kann. Wie Abbildung 6.6 B jedoch deutlich zeigt ist die Bindung von FLC21 bei beiden *hsCK2 $\alpha$* -Isoformen absolut identisch. Selbst die Wassermoleküle, mit denen der Inhibitor Wasserstoffbrücken ausbildet, befinden sich an identischen Positionen.

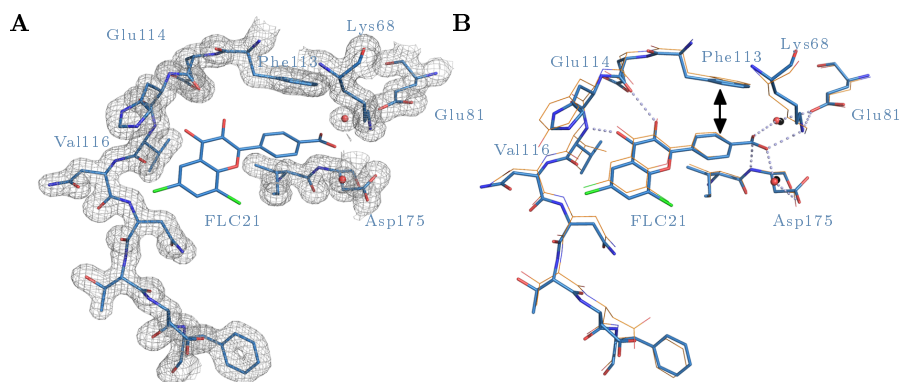


Abbildung 6.6: **FLC21 in der ATP-Bindetasche**

A: Die ATP-Bindetasche mit FLC21 der *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>OP/FLC21*-Struktur (blau), die Elektronendichte ist mit einem Konturlevel von  $1\sigma$  dargestellt. B: Bindungsmodus von FLC21, Wasserstoffbrücken werden mit hellblauen Punkten gezeigt, der schwarze Doppelpfeil zeigt  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkungen an, in orange ist zusätzlich die *hsCK2 $\alpha$ <sup>Cys336Ser</sup>OP/FLC21*-Struktur dargestellt.

Für die sehr gute Bindung des Inhibitors FLC21 ist vor allem die 4'Carboxylgruppe verantwortlich, wie schon von Golub *et al.* festgestellt wurde. Diese Aussage bestätigt sich vor allem durch ein ausgeprägtes Netz an Wasserstoffbrücken, welches von der 4'Carboxylgruppe ausgeht und in Abbildung 6.6 nur ansatzweise gezeigt werden kann, da die vier Wechselwirkungspartner ihrerseits wieder durch weitere

Wasserstoffbrücken in ihrer Position stabilisiert werden. Aus dieser Vielzahl an Wasserstoffbrücken, die FLC21 in seiner Lage stabilisieren, resultiert auch der sehr gute  $IC_{50}$ -Wert von  $0,04 \mu M$  (Golub *et al.* 2011). Dass insbesondere die 4'Carboxylgruppe eine sehr wichtige funktionelle Gruppe für CK2-Inhibitoren darstellt, zeigt sich unter anderem auch dadurch, dass der bisher einzige CK2-Inhibitor in klinischen Studien CX-4945 ebenfalls an derselben Position eine Carboxylgruppe besitzt (siehe Abbildung 6.7). Insgesamt lässt sich an dieser Stelle von CK2-Inhibitoren somit ein vorteilhafter Einfluss von negativ geladenen Seitenketten ausmachen, welche mit der positiv geladenen Region um Lys68 der ATP-Bindetasche Wechselwirkungen eingehen können (Battistutta 2009).

### 6.4.3 FLC21 stabilisiert die ATP-bindende Schleife in einer inaktiven Konformation

Neben den sehr guten Bindungseigenschaften von FLC21 in der ATP-Bindetasche, die weitestgehend den Erwartungen entsprechen, nimmt der Inhibitor zusätzlich noch einen unerwarteten Einfluss auf die ATP-Bindetasche. Durch die Bindung des Inhibitors kollabiert die ATP-bindende Schleife und Arg47 blockiert den Zugang zur Bindetasche, so dass auf diese Weise eine inaktiven Konformation stabilisiert wird (siehe Abbildung 6.7 A). Wie schon in Kapitel 1.4.1 erwähnt, ist für die CK2 $\alpha$  keine inaktive Konformation bekannt, wie sie für andere eukaryotische Proteinkinasen typisch ist. Lediglich in der *hsCK2 $\alpha$* -Struktur 3FWQ konnte schon einmal eine Blockade der ATP-Bindetasche durch Arg47 gezeigt werden, allerdings war in diesem Fall kein Inhibitor in der ATP-Bindetasche gebunden (Raaf *et al.* 2009).

Die Komplexstruktur *hsCK2 $\alpha^{1-335}$* <sub>oP</sub>/FLC21 zeigt ebenso wie die Komplexstrukturen der Isoform mit *hsCK2 $\alpha^{Cys336Ser}$* <sub>oP</sub>/FLC21 und *hsCK2 $\alpha^{Cys336Ser}$* <sub>mP</sub>/FLC21 eine kollabierete ATP-bindende Schleife. In sämtlichen Fällen wird die ATP-Bindetasche durch Arg47 in *hsCK2 $\alpha^{1-335}$*  bzw. dem äquivalenten Arg48 in *hsCK2 $\alpha^{Cys336Ser}$*  blockiert. Das Arginin selbst wird durch Wasserstoffbrücken der Guanidinogruppe zu His160 und Asn161 in dieser inaktiven Position stabilisiert. Bemerkenswert an dieser Konformation ist vor allem, dass das Arginin durch die Zucker-bindende Region ragt, d.h. die Region in der normalerweise die Ribose des ATPs ihren Platz findet. Dieser Bereich der ATP-Bindetasche ist ein beliebtes Ziel für Inhibitoren, so z.B. auch bei dem Inhibitor CX-4945 (siehe Abbildung 6.7 A) (Ferguson *et al.* 2011) oder auch bei Emodin (Raaf *et al.* 2008a).

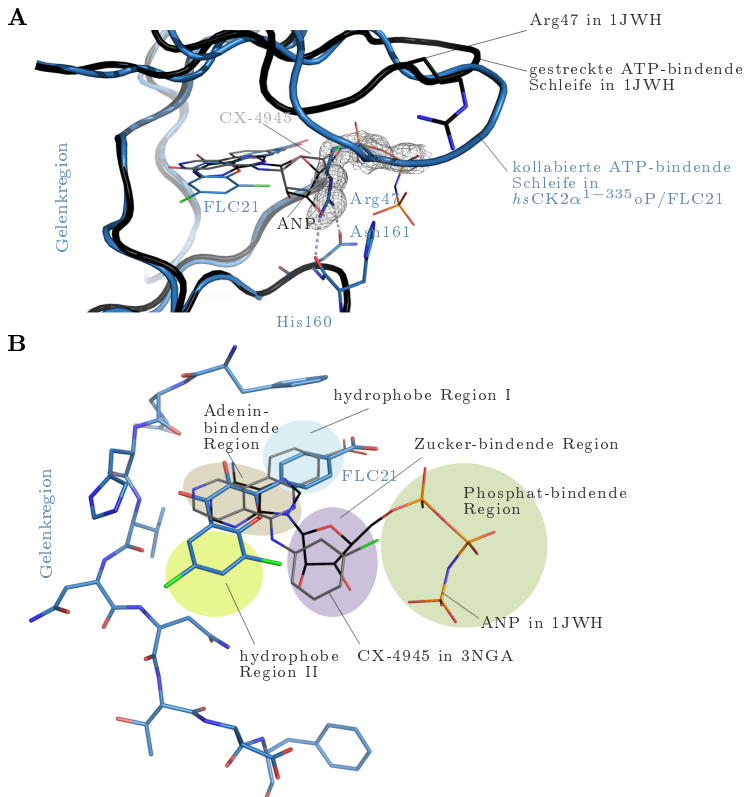


Abbildung 6.7: **Arg47 blockiert die ATP-Bindetasche**

A: Komplexstruktur von *hsCK2α<sup>1-335oP</sup>/FLC21* (blau) und 1JWH (schwarz) mit ANP. Elektronendichte ist mit einem Konturlevel von  $1\sigma$  dargestellt, Wasserstoffbrücken sind hellblau gepunktet. B: FLC21 (blau), CX-4945 (grau) und ANP (schwarz) in der ATP-Bindetasche, modifiziert mit den Pharmacophore-Modell nach Traxler und Furet.

Ein Vergleich zwischen CX-4945 mit FLC21 und ANP (einem ATP-Analogon) ergibt interessante Unterschiede in den Bindungseigenschaften der beiden Inhibitoren. Wie Abbildung 6.7 B zeigt füllt der Inhibitor CX-4945 sowohl die Adenin- als auch die Zucker-bindende Region ähnlich wie ANP aus. Weiter besetzt der Inhibitor die



hydrophobe Region I und besitzt zusätzlich an diesem Ende noch eine Carboxylgruppe. FLC21 besetzt auf sehr ähnliche Art und Weise die Adenin-bindende Region und hydrophobe Region I, ebenfalls wie schon angesprochen stabilisiert durch eine Carboxylgruppe. Anders als CX-4945 besetzt FLC21 hingegen noch die hydrophobe Region II, spart dafür allerdings die Zucker-bindende Region komplett aus. Besonders letzteres ist Voraussetzung für die inaktive Konformation der  $hsCK2\alpha^{1-335}$ - bzw.  $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$ -Komplexstrukturen. Somit ist FLC21 der erste bekannte Inhibitor, welcher die in 3FWQ erstmals beobachtete inaktive Konformation stabilisieren kann.

#### 6.4.4 FLC21 kann eine Halogenbindung zur ATP-bindenden Schleife ausbilden

Die Bindung des FLC21-Inhibitors für  $hsCK2\alpha$  und  $hsCK2\alpha'$  ist in Kapitel 6.4.2 bereits beschrieben worden, ebenso wie die Auswirkungen auf die ATP-bindende Schleife in Kapitel 6.4.3. Kette B der Komplexstruktur  $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}mP/FLC21$  zeigt bei der FLC21-Bindung allerdings eine weitere Besonderheit, welche eine Begründung für die Stabilisierung der inaktiven Konformation der ATP-bindenden Schleife liefern könnte.

Wie in Abbildung 6.3 A zu erkennen ist, ist die ATP-bindende Schleife von Kette B (hellrot) der  $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}mP/FLC21$  Komplexstruktur stärker kollabiert als in Kette A (rot) derselben Struktur und als die ATP-bindende Schleife der Komplexstruktur  $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}oP/FLC21$  (orange).

Diese Abweichung der ATP-bindenden Schleife ist ein Resultat aus intramolekularen Kristallkontakten. Der N-terminale Bereiche von Kette A der  $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}mP/FLC21$  führt direkt an der ATP-bindenden Schleife um Tyr51 vorbei und drückt diese tiefer in die ATP-Bindetasche als sie ohne Kristallkontakte normalerweise liegen würde (siehe Abbildung 6.8). Obwohl durch die Bewegung der ATP-bindenden Schleife in Richtung FLC21 die Position von Arg48 bestehen bleibt, entsteht eine Halogenbindung zwischen dem Chlorsubstituent des FLC21 an Position 8 von Ring A der Flavonoid Grundstruktur (siehe Abbildung 2.1 in Kapitel 2) und dem Carbonylsauerstoff von Gly47. Diese Halogenbindung kann in den anderen Kristallstrukturen mit FLC21 nicht nachgewiesen werden.

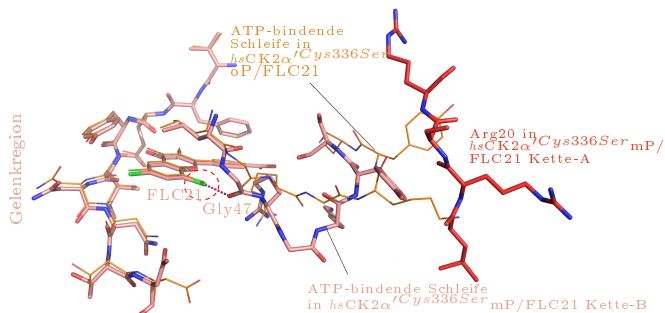


Abbildung 6.8: **Halogenbindung zwischen FLC21 und Gly47**

FLC21 Bindung in der *hsCK2α<sup>ICys336Ser</sup>mP/FLC21* Komplexstruktur. Durch den N-terminalen Bereich von Kette A (rot) bildet Kette B (hellrot) im Gegensatz zur *hsCK2α<sup>ICys336Ser</sup>oP/FLC21* Komplexstruktur (orange) eine Halogenbindung zwischen Gly47 und FLC21 aus. Die Halogenbindung ist hell gepunktet.

Besonderes Interesse erweckt besagter Chlorsubstituent aus zwei Gründen. Zum einen sind bereits Kristallstrukturen von CK2 $\alpha$  mit Apigenin bekannt (3AMY) und (4DGM (Lolli *et al.* 2012)), welches wie FLC21 eine Flavonoid Grundstruktur besitzt. Allerdings hat Apigenin keine Chlorsubstitution an Position 8 von Ring A des Flavonoids, dafür jedoch eine Hydroxylgruppe an Position 7 (Vergleiche Abbildung 1.8 in Kapitel 1.4.2 und Abbildung 2.1 in Kapitel 2). Die Ausrichtung des Apigenins in der ATP-Bindetasche ist in der Kristallstruktur 4DGM nahezu identisch mit FLC21, liegt in der Struktur 3AMY jedoch zu der FLC21 Ausrichtung gespiegelt vor. Die Struktur 3AMY weist allerdings trotz einer guten Auflösung von 2,3 Å eine schlecht definierte Elektronendichte für das Apigenin auf, so dass auch in dieser Struktur eine Ausrichtung wie im Falle von FLC21 und 3AMY als wahrscheinlich erscheint. Viel entscheidender als die richtige Ausrichtung von Apigenin in der ATP-Bindetasche ist jedoch, dass in beiden Fälle eine Kollabierung der ATP-bindenden Schleife nicht beobachtet werden kann. Ein weiterer interessanter Aspekt zu besagter Chlorsubstitution ist der, dass ohne diese Chlorsubstitution der IC<sub>50</sub>-Wert um über das 4-fache steigt. Während FLC21 einen IC<sub>50</sub>-Wert von 0,04  $\mu$ M hat, steigt dieser auf 0,18  $\mu$ M ohne die Chlorsubstitution (Golub *et al.* 2011).

Dieser positive Effekt auf die Inhibition von FLC21 scheint darin begründet zu liegen, dass insbesondere die Chlorsubstitution das Kollabieren der ATP-bindenden Schleife unterstützt. Wie die Struktur 3FWQ zeigt, ist ein Kollabieren der ATP-bindenden Schleife auch ohne gebundenen Inhibitor möglich. Das deutet darauf hin, dass die ATP-bindende Schleife im Protein sehr flexibel ist und wahrscheinlich ständig zwischen den zwei Positionen mit blockierter und offener ATP-Bindetasche wechselt. Während ATP nun allerdings durch die Ribosegruppe die ATP-bindende Schleife in die offene und aktive Konformation zwingt, bewirkt FLC21 das Gegenteil und stabilisiert die ATP-bindende Schleife in ihrer inaktiven Konformation. Abgesehen von den schon angesprochenen sehr guten Bindungseigenschaften von FLC21 in der ATP-Bindetasche (Kapitel 6.4.2) bewirkt somit vermutlich die zweite Chlorsubstitution am FLC21, dass durch das zeitweise Ausbilden einer Halogenbindung mit Gly47, das Umklappen der ATP-bindenden Schleife begünstigt und auf diese Weise die inaktive Konformation stabilisiert wird.

### 6.4.5 FLC21 zwingt die Gelenkregion in die offene Konformation

Sowohl die Flexibilität der Gelenkregion von *hsCK2 $\alpha$*  als auch der Einfluss von Hochsalzbedingungen wurden bereits in den Kapiteln 6.3 und 6.4.1 diskutiert. Weiter konnte schon eine enorme Flexibilität der ATP-bindenden Schleife sowie deren Bedeutung für eine inaktive Konformation der *CK2 $\alpha$*  in den Kapiteln 6.4.3 und 6.4.4 gezeigt werden. Eine weitere unter Hochsalzbedingungen entstandene Komplexstruktur *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>tP/FLC21* hilft dabei weitere Eigenschaften über die Flexibilität der Gelenkregion und ATP-bindenden Schleife sowie über die Bindungseigenschaft von FLC21 zu verstehen.

Abbildung 6.9 A zeigt zunächst die Gelenkregion von *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>* und dem Inhibitor FLC21. Deutlich ist zu erkennen, dass der obere Bereich der Gelenkregion von Phe113 bis Asn118 sehr gut durch Elektronendichte definiert ist, der untere Bereich weist hingegen ab Phe121 eine merklich schlechtere Elektronendichte auf. Ein Vergleich der Gelenkregion von *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>tP/FLC21* zum einen mit der offenen Gelenkregion aus *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>oP/FLC21* und zum anderen mit der geschlossenen Gelenkregion aus 3RPS, zeigt Erstaunliches.

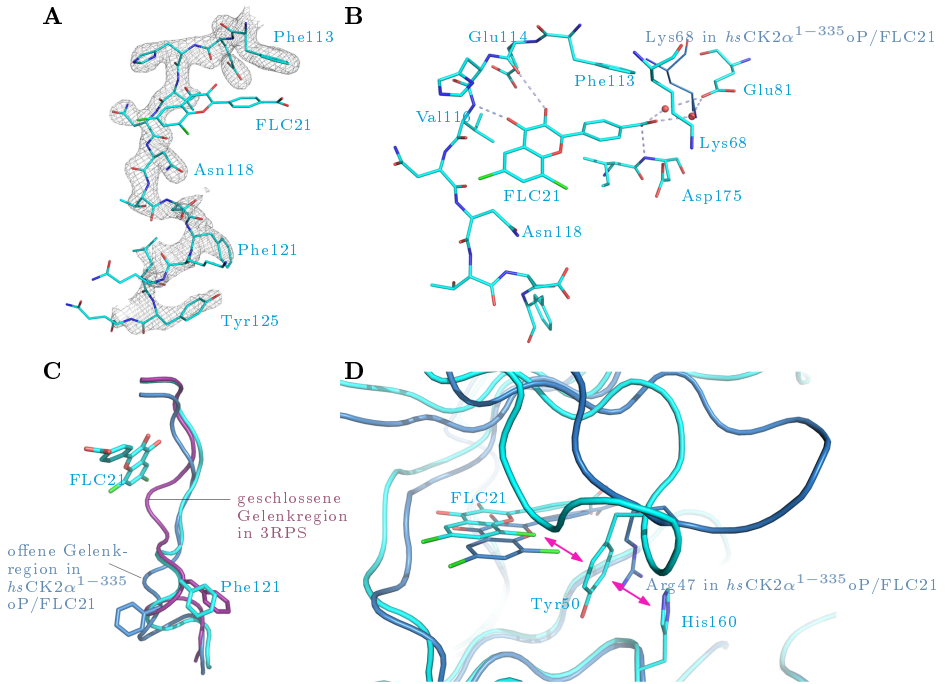


Abbildung 6.9: **FLC21-Bindung in  $hsCK2\alpha^{1-335}tP/FLC21$**

A: Gelenkregion von FLC21-Bindung in  $hsCK2\alpha^{1-335}tP/FLC21$  (cyan), Elektronendichte ist mit einem Konturlevel von  $1\sigma$  dargestellt. Die gut-definierte Elektronendichte von Phe113 bis Asn118 nimmt in der Folge deutlich ab.

B: Die Bindung von FLC21 in der ATP-Bindetasche, Wasserstoffbrücken sind hellblau gepunktet.

C: Gelenkregion von der Rückseite der kanonischen Ansicht aus betrachtet mit 3RPS (lila) und  $hsCK2\alpha^{1-335}tP/FLC21$  (hellblau).

D: Vergleich der ATP-bindenden Schleifen von  $hsCK2\alpha^{1-335}tP/FLC21$  (cyan) und  $hsCK2\alpha^{1-335}tP/FLC21$  (hellblau), Cl- $\pi$ - und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen sind als pinke Pfeile dargestellt.

So folgt die Gelenkregion von  $hsCK2\alpha^{1-335}tP/FLC21$  eindeutig der offenen Konformation der Gelenkregion, wohingegen der untere Bereich der geschlossenen Gelenkregion folgt. Besonders deutlich wird dies an der Position von Phe121, welches die Position einnimmt, die für eine geschlossene Gelenkregion typisch ist (siehe Abbildung 6.9 C).

Zusätzlich zu dieser ungewöhnlichen Zwitterkonformation der Gelenkregion zeigt die ATP-bindende Schleife ebenfalls eine sehr einmalige Konformation. Ähnlich wie in den anderen  $hsCK2\alpha$ - und  $hsCK2\alpha'$ -Komplexstrukturen, wird die ATP-Bindetasche durch das Kollabieren der ATP-bindenden Schleife blockiert. In dem Fall der  $hsCK2\alpha^{1-335}tP/FLC21$  Komplexstruktur belegt allerdings nicht Arg47, (bzw. Arg48 in  $hsCK2\alpha'$ ), sondern Tyr50 die Zucker-bindende Region (siehe Abbildung 6.9). Das Tyrosin schiebt sich hierbei zwischen den schon besprochenen Chlorsubstituenten von FLC21 und His160, so dass es zur einen Seite durch Cl- $\pi$ - und zur anderen Seite durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen stabilisiert wird. Hierdurch drückt Tyr50 den Inhibitor FLC21 allerdings weiter in Richtung Gelenkregion, welche dadurch selbst wiederum etwas weiter nach außen geschoben wird (siehe Abbildung 6.9 D).

Trotz dieser deutlichen Verschiebung des FLC21 sowie der starken Konformationsänderung der ATP-bindenden Schleife, bindet FLC21 fast wie aus den anderen Komplexstrukturen bekannt in der ATP-Bindetasche. Einzig das Lys68 bildet keine Wasserstoffbrücke zur 4'Carboxylgruppe von FLC21 aus, da es aufgrund der starken Konformationsänderung der ATP-bindenden Schleife eine neue Wasserstoffbrücke mit dem Carbonylsauerstoff von Ser51 eingeht. Die ursprüngliche Position von Lys68 wird in der  $hsCK2\alpha^{1-335}tP/FLC21$  Komplexstruktur allerdings durch ein Wassermolekül ersetzt, welches eine Wasserstoffbrücke zur 4'Carboxylgruppe von FLC21 ausbildet. Besonders interessant ist diese Struktur allerdings wegen der oben genannten Zwitterkonformation der Gelenkregion, welche in dieser Form einzigartig ist. Wie in Abbildung 6.7 B gut zu erkennen ist, belegt FLC21 die hydrophobe Region II der ATP-Bindetasche. In der offenen Konformation der  $hsCK2\alpha$  ist diese Region allerdings im Vergleich zu der geschlossenen Gelenkkonformation recht groß, dennoch wird sie von FLC21 vollständig ausgefüllt. Wie in Abbildung 6.9 B in etwa zu erkennen ist, kann aufgrund der Belegung der hydrophoben Region II die Gelenkregion nicht in die geschlossene Konformation wechseln. Dem entgegen steht jedoch die Kristallisation der  $hsCK2\alpha^{1-335}tP/FLC21$  unter Hochsalzbedingungen (Kapitel 5.4.6). Wie bereits in Kapitel 6.4.1 berichtet, verstärken hohe Salzkonzen-

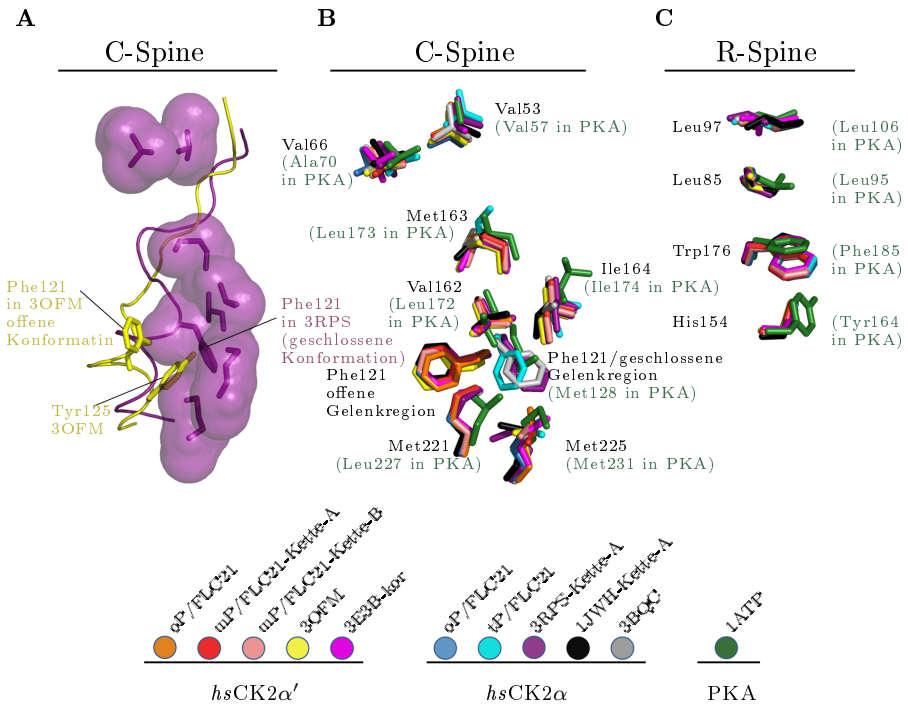
trationen hydrophobe Wechselwirkungen, woraufhin die Gelenkregion der *hsCK2 $\alpha$*  vornehmlich die geschlossene Konformation einnimmt. Somit konkurrieren in dieser Komplexstruktur zwei Kräfte miteinander, zum einen FLC21 das die offene Konformation bewirkt und zum anderen die hohe Salzkonzentration, die normalerweise die geschlossene Konformation zur Folge hat. Aus diesem Grund resultiert eine hohe Spannung in der Gelenkregion unterhalb der hydrophoben Region II, so dass hohe B-Faktoren und eine schlechte Elektronendichte die Folge sind.

#### 6.4.6 CK2 $\alpha$ besitzt katalytische Aktivität trotz eines unvollständigen C-Spines

Die in Kapitel 1.3.2 vorgestellte Spine-Theorie besagt, dass als Grundvoraussetzung für voll aktive ePKs sowohl der R- als auch der C-Spine voll ausgebildet sein müssen. In einem multiplen Alignment mit aktiven ePKs, unter anderem mit der CK2 $\alpha$ , konnte gezeigt werden, dass die vier am R-Spine beteiligten Aminosäuren in allen Kinasen an denselben hochkonservierten Positionen liegen und so den R-Spine ausbilden. Interessanterweise wurde dasselbe Prinzip ebenso für den C-Spine gezeigt, allerdings wurde in diesem Alignment die CK2 $\alpha$  nicht mit aufgeführt (Taylor und Kornev 2011).

In Abbildung 6.10 B und C sind die multiplen Alignments der beiden Spines aus Taylor & Kornev mit den beteiligten Aminosäuren der in dieser Arbeit vorgestellten *hsCK2 $\alpha$* - und *hsCK2 $\alpha$ '*-Strukturen nachempfunden. Während der R-Spine (siehe Abbildung 6.10 C) von allen Aminosäuren der *hsCK2 $\alpha$* - und *hsCK2 $\alpha$ '*-Strukturen ebenso ausgebildet wird wie in PKA, liefert Abbildung 6.10 B die Erklärung für das Weglassen der CK2 $\alpha$  im C-Spine.

In der humanen CK2 $\alpha$  ist Phe121 die äquivalente Aminosäure zu Met128 in PKA, welche Teil eines vollständigen C-Spines ist. Phe121 der *hsCK2 $\alpha$*  ist jedoch nicht in allen Strukturen am C-Spine beteiligt, so dass diese Aminosäure nicht zu 100% dem Spine zuzuordnen ist. Diese Uneindeutigkeit dürfte dazu geführt haben, dass CK2 $\alpha$  in den Abbildungen von Taylor & Kornev keine Berücksichtigung fand. Die Begründung für die uneindeutige Zuordnung des Phe121 von CK2 $\alpha$  ist in der ungewöhnlichen Flexibilität der Gelenkregion zu finden (siehe Abbildung 6.10 A).

Abbildung 6.10: R- und C-Spine in *hsCK2α* und *hsCK2α'*

A: 3RPS (lila) repräsentiert den vollständigen C-Spine, 3OFM (gelb) repräsentiert den unvollständigen C-Spine. B und C: Multiples Alignment der einzelnen Aminosäureseitenketten von C- und R-Spine (Taylor & Kornev nachempfunden). Die Nummerierung richtet sich nach der Aminosäuresequenz von *hsCK2α*.

In der geschlossenen Konformation, welche für andere ePKs die kanonische Konformation darstellt, ist Phe121 Teil des C-Spines und dieser ist dementsprechend vollständig. In der offenen Konformation zeigt Phe121 allerdings vom C-Spine weg, eingenommen wird der freigewordenen Platz in diesem Fall durch Tyr125, aus diesem Grund wurde Tyr125 auch bereits einmal in einer Abbildung als Mitglied des C-Spines dargestellt (Prudent *et al.* 2010). Grundsätzlich muss allerdings festgehalten werden, dass Tyr125 nicht den tatsächlichen Platz des Phe121 einnimmt

(siehe Abbildung 6.10 A) und des weiteren auch etwas weniger hydrophob ist, von daher kann der C-Spine in der offenen Gelenkregion der CK2 $\alpha$  als unvollständig angesehen werden (Bischoff *et al.* 2011a). Da allerdings insbesondere für *hsCK2 $\alpha$ '* und *zmCK2 $\alpha$*  durch Kristallstrukturen ausschließlich die offene Gelenkkonformation mit unvollständigem C-Spine nachgewiesen werden konnte, muss nach derzeitiger Kenntnis davon ausgegangen werden, dass CK2 $\alpha$  auch in nativer Form einen unvollständigen C-Spine besitzt und dennoch katalytisch aktiv ist.

### 6.4.7 Ist die offene Gelenkkonformation die aktive Konformation?

Eine der zentralen Fragen der CK2 $\alpha$  betrifft schon seit geraumer Zeit die Bedeutung der Gelenkregion. Ist eine der beiden bekannten Konformationen die aktive und die andere eine inaktive Form der CK2 $\alpha$ ? Welche Gründe gibt es für die Flexibilität der Gelenkregion in der *hsCK2 $\alpha$*  und aus welchen Gründen wird diese Flexibilität nicht für *hsCK2 $\alpha$ '* und *zmCK2 $\alpha$*  beobachtet?

Wird versucht die ersten Frage mit Hilfe der Spine-Theorie zu beantworten, so müsste dieser folgend die geschlossene Gelenkregion die aktive Form darstellen, da nur in diesem Fall sowohl R- und C-Spine vollständig ausgebildet sind, was als Voraussetzung für eine aktive Proteinkinase gesehen wird (Kornev *et al.* 2006) (Kornev und Taylor 2010). Unterstützt wird diese These unter anderem durch die Struktur 3JUH (Yde *et al.* 2005), in der ein ATP-Analogon in der ATP-Bindetasche bei einer geschlossenen Gelenkregion gebunden hat.

Allerdings gibt es deutlich mehr Strukturen der *hsCK2 $\alpha$*  mit einem gebundenem ATP-Analogon und einer offenen Gelenkregion (1JWH, 1PJK, 2PVR, 3NSZ, 3U87), weiterhin wurde bislang sowohl in allen *zmCK2 $\alpha$ '*- und *hsCK2 $\alpha$ '*-Strukturen ausschließlich die offene Gelenkregion vorgefunden, so dass dies zumeist als Indiz für die aktive Konformation angesehen wird (Niefind und Issinger 2010). Zusätzlich wurde, wie in den Kapiteln 6.4.1 und 6.4.5 bereits erwähnt gezeigt, dass die geschlossene Gelenkkonformation der *hsCK2 $\alpha$*  zumeist mit einer hohen Salzkonzentration einhergeht, wobei die geschlossene Konformation in Ausnahmen auch unter anderen Bedingungen beobachtet werden konnte (Klopffleisch *et al.* 2012). Die oben genannte Struktur 3JUH wurde allerdings unter stark salzhaltigen Bedingungen kristallisiert, so dass die geschlossene Gelenkregion höchstwahrscheinlich eher auf diesen Effekt zurückzuführen ist. Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass eine Erhöhung der Chloridkonzentration zu einer Abnahme der katalytischen Aktivität bei *hsCK2 $\alpha$*  führt (Grankowski *et al.* 1991), was ebenfalls ein Indiz für die Inaktivität



der geschlossenen Gelenkkonformation ist.

Die in dieser Arbeit vorgestellten *hsCK2 $\alpha$ '*-Komplexstrukturen weisen ebenfalls alle die offene Gelenkregion auf, was vermuten lässt, dass es sich bei der offenen Gelenkregion eher um die native und somit aktive Form der *CK2 $\alpha$*  handelt. Außerdem bestätigen die beiden *hsCK2 $\alpha$* -Komplexstrukturen, welche unter Hochsalzbedingungen entstanden sind (3RPS und *hsCK2 $\alpha$ '<sup>1-335</sup>tP/FLC21*), die These von Klopffleisch *et. al.*, dass hohe Salzkonzentrationen für die geschlossene Gelenkregion verantwortlich sind. Intramolekulare Kristallkontakte konnten bislang nicht als Grund für die unterschiedliche Konformation ausgemacht werden. Somit unterstützen die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse die These, dass die offene Gelenkregion die aktive Konformation der *CK2 $\alpha$*  darstellt.

Die zweite Frage, welche Faktoren für die unterschiedliche Flexibilität der *hsCK2 $\alpha$* -Isoformen bzw. der *zmCK2 $\alpha$*  verantwortlich sind, kann ebenfalls nicht endgültig beantwortet werden. Grundsätzlich zeigen *hsCK2 $\alpha$ '* und *zmCK2 $\alpha$*  eine größere Rigidität in der Gelenkregion als *hsCK2 $\alpha$* , die Gründe hierfür müssen in intrinsischen Zwängen zu finden sein. Ein Versuch, diese größere Rigidität zu begründen, wurde bereits unternommen, so wurde das Valin an Aminosäureposition 67 (siehe Abbildung 8.1 in Kapitel 8) als möglicher Grund für die größere Flexibilität der *hsCK2 $\alpha$*  vermutet (Battistutta und Lolli 2011). Da in *zmCK2 $\alpha$*  an derselben Position ein Isoleucin zu finden ist, wurde vermutet, dass dieser größere hydrophobe Rest die Adenin-bindende Ebene etwas weiter in Richtung Helix  $\alpha$ D schiebt. Dies könnte wiederum verhindern, dass die Gelenkregion die Möglichkeit erhält die geschlossene Konformation einzunehmen und deshalb in der offenen Konformation verbleiben muss. Nach den nun vorhandenen *hsCK2 $\alpha$ '*-Strukturen wird jedoch erkenntlich, dass das Val67 in *hsCK2 $\alpha$*  nicht die größere Flexibilität bedingen kann. Da in *hsCK2 $\alpha$ '* ebenso wie in *hsCK2 $\alpha$*  an der entsprechenden Position 68 ein Valin vorhanden und auch in der Struktur nicht in der Lage verschoben ist, kann die größere Rigidität der Gelenkregion von *hsCK2 $\alpha$ '* nicht in dieser Aminosäure begründet liegen.

## 6.5 *hsCK2 $\alpha$ '<sup>Cys336Ser</sup>*-Mutante besitzt zweite Mutation

Eine Sequenzierung der *hsCK2 $\alpha$ '<sup>Cys336Ser</sup>*-Mutante erbrachte eine zweite ungewollte Mutation in der Aminosäuresequenz zum Vorschein. Der entscheidende Bereich der Sequenzierung ist in Abbildung 8.3 in Kapitel 8 gezeigt, an der Basenposition 267 ist in der *hsCK2 $\alpha$ '<sup>Cys336Ser</sup>*-Mutante ein Adenin gegen ein Guanin ausge-

tauscht. Dieser Basenaustausch hat eine Mutation an Aminosäureposition 39 zur Konsequenz, so dass ein Glycin die Position der ursprünglichen Asparaginsäure einnimmt.

Diese Mutation konnte im Rückblick auch in der Kristallstruktur der bereits veröffentlichten Struktur 3OFM bestätigt werden. Hier ist deutlich eine negative  $F_o-F_c$ -Elektronendichte um die Seitenkette der Asparaginsäure zu erkennen (siehe Abbildung 6.11 A). Nach dem Anpassen der Aminosäure zu einem Glycin passt die  $2F_o-F_c$ -Elektronendichte wieder sehr gut zur Aminosäurekette, die negative  $F_o-F_c$ -Elektronendichte hingegen ist verschwunden (siehe Abbildung 6.11 B). Bei den beiden neuen Komplexstrukturen der *hsCK2 $\alpha^{ICys336Ser}$*  mit dem Inhibitor FLC21 wurde die bestehende Mutation bereits berücksichtigt.

Ein Einfluss der Mutation auf die Struktur der *hsCK2 $\alpha^{ICys336Ser}$*  konnte allerdings nicht ausgemacht werden. Obwohl sich die Mutation am Ende des  $\beta$ 0-Strangs befindet und somit direkt an der Rückseite der besprochenen  $\beta$ 4/ $\beta$ 5 Schleife, hat die Aminosäure weder einen Einfluss auf den  $\beta$ 0-Strang noch auf die  $\beta$ 4/ $\beta$ 5 Schleife. Dies zeigt sich im Besonderen durch den Vergleich der *hsCK2 $\alpha^{ICys336Ser}$* -Komplexstrukturen mit 3E3Bkor. In dieser Struktur ist die Aminosäure Asp39 an der ursprünglichen Position, dennoch sind zwischen 3E3Bkor und den *hsCK2 $\alpha^{ICys336Ser}$* -Komplexstrukturen keine Unterschiede auszumachen.

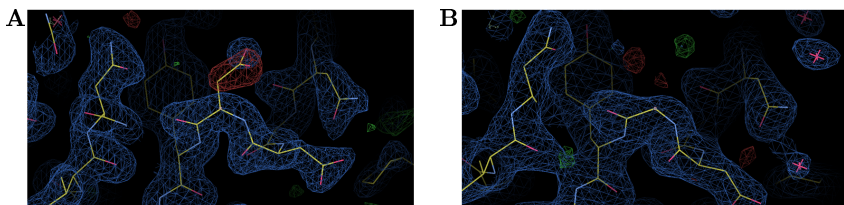


Abbildung 6.11: **Aminosäureposition 39 in 3OFM**

Die Aminosäureposition 39 in 3OFM. A: Asp39 in 3OFM, Seitenkette mit deutlicher negativer  $F_o-F_c$ -Elektronendichte. B: Gly39 in 3OFM ohne negative  $F_o-F_c$ -Elektronendichte.  $F_o-F_c$ -Elektronendichte ist mit einem Konturlevel von  $3\sigma$  und  $2F_o-F_c$ -Elektronendichte mit einem Konturlevel von  $1\sigma$  dargestellt, angefertigt wurde die Abbildung mit Coot.



## 7 Schlussfolgerungen und Aussichten

Die vorliegende Arbeit zeigt strukturelle Besonderheiten und Gemeinsamkeiten zwischen der humanen CK $\alpha$  und einer voll aktiven Vollängenmutante der humanen CK2 $\alpha'$ , weiter konnte eine falsche Aussage über die Konformation der  $\beta 4/\beta 5$ -Schleife von CK2 $\alpha'$  korrigiert werden. Zusätzlich wurden die Bindungseigenschaften von den zwei potenten ATP-kompetitiven Inhibitoren MB002 und FLC21 unter Berücksichtigung der Kristallisationsbedingungen und Kristallpackungen aufgeklärt, wobei insbesondere FLC21 durch die Stabilisierung einer inaktiven Konformation der ATP-bindenden Schleife als aussichtsreiche Leitstruktur für die Entwicklung von weiteren CK2-Inhibitoren ausgemacht wurde.

Die detaillierten Erkenntnisse aus dieser Arbeit und daraus resultierenden möglichen Folgearbeiten sowie Fragen sind im Folgenden zusammengefasst:

- **Die *hsCK2 $\alpha$ <sup>Cys336Ser</sup>* Vollängenmutante**

Die vorliegende Arbeit behandelt eine *hsCK2 $\alpha$ <sup>Cys336Ser</sup>* Vollängenmutante, die gut löslich ist und volle Aktivität zeigt, außerdem war die Kristallisation mit verschiedenen Inhibitoren möglich, so dass sie sich für weitere Folgearbeiten anbietet. Zu diesem Zweck sollte allerdings zunächst die zweite ungewollte Asp39Gly Mutation rückgängig gemacht werden. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass die Mutation keinen Einfluss auf Funktion und Struktur des Proteins nimmt, sollte dies vor weiteren Folgearbeiten durchgeführt werden.

- **Kristallisation von *hsCK2 $\alpha$ <sup>Cys336Ser</sup>* und *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>***

Für die zukünftige Kristallisation der beiden *hsCK2 $\alpha$* -Isoformen muss man in Bezug auf *hsCK2 $\alpha$*  keine großen Empfehlungen aussprechen, hier gibt es ausreichend bekannte und reproduzierbare Kristallisationsbedingungen, bei Bedarf ist auch das Screening von neuen Bedingungen sehr gut möglich.

Für weitere Kristallisationsbemühungen von *hsCK2 $\alpha$ <sup>Cys336Ser</sup>* wird nach den gemachten Erfahrungen die Kristallisation bei 4° C empfohlen. Insbesondere

die Bedingung aus 25 % PEG 5000 MME; 0,1M MES; 0,2M Am-Sulfat; pH 6,5 (Bedingung von *hsCK2 $\alpha$ '<sup>Cys336Ser</sup>oP/FLC21*) machte den Eindruck relativ beständig reproduzierbare Kristalle in Stäbchenform hervorzubringen.

- **Die Gelenkregion der CK2 $\alpha$**

Die Gelenkregion der CK2 $\alpha$  ist wie beschrieben eine sehr interessante und einzigartige Region und ist somit einem besonderen Interesse ausgesetzt. Die ungewöhnliche Flexibilität der Gelenkregion von *hsCK2 $\alpha$*  steht hierbei in Kontrast zu den scheinbar rigideren Gelenkregionen der *hsCK2 $\alpha$ '* und der *zmCK2 $\alpha$* .

Die in dieser Arbeit durch die Strukturen von 3RPS und *hsCK2 $\alpha$ <sup>1-335</sup>tP/FLC21* gewonnenen Ergebnisse unterstützen zum einen die These, dass Hochsalzbedingungen oftmals für die geschlossene Konformation in Kristallstrukturen der *hsCK2 $\alpha$*  verantwortlich sind. Um diese These weiter zu überprüfen wären Kristallisationsversuche von *hsCK2 $\alpha$*  mit MB002 unter PEG-Bedingungen hilfreich. Sollten tatsächlich die Hochsalzbedingungen in 3RPS und nicht MB002 für die geschlossene Konformation verantwortlich sein, so müsste es möglich sein einen *hsCK2 $\alpha$ /MB002* Komplex mit offener Gelenkregion zu kristallisieren.

Die Grundlage für die strukturellen Unterschiede konnte bislang jedoch nicht aufgezeigt werden. Der Versuch von Lolli und Battistutta die größere Flexibilität der *hsCK2 $\alpha$*  mit einem Valin anstelle eines Isoleucins an Position 67 (bei *hsCK2 $\alpha$* ) zu begründen, konnte aufgrund der in dieser Arbeit vorgestellten Strukturen widerlegt werden (Kapitel 6.4.7). Sollte die unterschiedliche Rigidität in der Sequenz der CK2 $\alpha$  zu finden sein, so lohnt natürlich der Blick auf ein Sequenzalignment zwischen *hsCK2 $\alpha$* , *hsCK2 $\alpha$ '* und *zmCK2 $\alpha$*  (siehe Abbildung 8.1 in 8). Grundsätzlich fällt hierbei im Bereich der Gelenkregion (AS 112–121 bei *hsCK2 $\alpha$* ) auf, dass die Sequenzen in diesem Bereich zwischen *hsCK2 $\alpha$*  und *hsCK2 $\alpha$ '* nahezu identisch sind, lediglich an Position 115 wird ein Histidin (*hsCK2 $\alpha$* ) gegen ein Tyrosin (*hsCK2 $\alpha$ '*) und an Position 116 ein Valin (*hsCK2 $\alpha$* ) gegen ein Isoleucin (*hsCK2 $\alpha$ '*) getauscht. In der Sequenz von *zmCK2 $\alpha$*  ist der Austausch eines Valins in ein Isoleucin an Position 112 auszumachen, dafür aber nicht an Position 116. Auffällig hierbei ist allerdings besonders AS 115, hier wurde das Histidin in *hsCK2 $\alpha$*  ebenfalls durch ein Tyrosin in *zmCK2 $\alpha$*  ersetzt. Somit gibt es mit dem Histidin in der Gelenkre-

---

gion eine Gemeinsamkeit zwischen *hsCK2 $\alpha$ '* und *zmCK2 $\alpha$* , welche die beiden Proteine zusammen mit ihrer Eigenschaft nur die offene Gelenkregion aufzuweisen, von *hsCK2 $\alpha$*  unterscheidet. Von daher bietet es sich für die Zukunft an, die beiden Aminosäuren jeweils durch Mutation auszutauschen, um die Bedeutung des Histidins bzw. des Tyrosins näher zu untersuchen.

Weiter unterstützen die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse die These, dass es sich bei der offenen Gelenkkonformation, trotz eines unvollständigen katalytischen Spines, um die aktive Form der *CK2 $\alpha$*  handelt. Zum einen basiert diese Vermutung darauf, dass wie oben beschrieben die geschlossene Gelenkkonformation vornehmlich durch Hochsalzkonzentrationen zustande kommt. Zum anderen unterstützen die Kristallstrukturen, von *hsCK2 $\alpha$ '*, welche durch diese Arbeit immerhin auf vier Stück angewachsen sind, die These. Da *hsCK2 $\alpha$ '* wie *zmCK2 $\alpha$*  unter verschiedenen Kristallisationsbedingungen und Raumgruppen ausschließlich die offene Konformation der Gelenkregion zeigen, ist es sehr wahrscheinlich dass es sich hierbei um die native Form der *CK2 $\alpha$*  handelt. Das Lösen weiterer Kristallstrukturen von *hsCK2 $\alpha$ '* ist aber ebenfalls sehr wichtig, um diese These weiter zu überprüfen.

- **Die  $\beta$ 4/ $\beta$ 5-Schleife**

In dieser Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass *hsCK2 $\alpha$ '* keine einzigartige Konformation der  $\beta$ 4/ $\beta$ 5-Schleife hat, und diese Region somit vermutlich für *hsCK2 $\alpha$ /*hsCK2 $\alpha$ '* selektive Inhibitoren nicht geeignet ist. Weiter wurde die offene Konformation der  $\beta$ 4/ $\beta$ 5-Schleife für alle vier vorhandenen *hsCK2 $\alpha$ '*-Strukturen nachgewiesen, was wie im Fall der Gelenkregion ebenfalls für eine größere Rigidität der *hsCK2 $\alpha$ '* im Gegensatz zur *hsCK2 $\alpha$*  spricht.*

In diesem Bereich konnte die größere Rigidität allerdings durch einen weiteren N-terminalen  $\beta$ -Strang begründet werden, der dadurch stabilisiert wird, dass Trp34 tiefer und somit fester in einer konservierten hydrophoben Tasche bindet, als es für das äquivalente Trp33 in *hsCK2 $\alpha$*  möglich ist. Dieser Unterschied lässt sich vermutlich durch den Aminosäureaustausch eines Valins (AS 31 in *hsCK2 $\alpha$* ) in ein Prolin (AS32 in *hsCK2 $\alpha$ '*) erklären. Die Bedeutung dieser Aminosäure könnte in Zukunft ebenfalls durch *hsCK2 $\alpha$ -/*hsCK2 $\alpha$ '*-Mutanten geklärt werden.*

Ein weiterer interessanter Aspekt für die Zukunft ist auch die Kristallisation eines *CK2*-Holoenzym mit *hsCK2 $\alpha$ '*, um mögliche Unterschiede der Bindung

an *hsCK2 $\beta$*  von *hsCK2 $\alpha$*  und *hsCK2 $\alpha'$*  aufzudecken. Hierbei muss allerdings erwähnt werden, dass sowohl die geringere Affinität von *hsCK2 $\alpha'$*  zu *hsCK2 $\beta$*  als auch die problematischere Kristallisation im Gegensatz zu *hsCK2 $\alpha$* , das ohnehin schon schwierige Unterfangen wahrscheinlich nicht einfacher machen werden. Durch die aus dieser Arbeit gemachten Lehren, würde für dieses Vorhaben vermutlich eine Kristallisation bei 4° C die größten Erfolgsaussichten versprechen.

- **Optimierung des Inhibitors FLC21**

Die Entwicklung von selektiven und potenten CK2-Inhibitoren ist wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben von großer Bedeutung. Mit den Kristallstrukturen von *hsCK2 $\alpha$*  und *hsCK2 $\alpha'$*  mit FLC21 konnte gezeigt werden, dass dies der erste Inhibitor ist, der CK2 $\alpha$  in einer bislang erst einmal beobachteten, inaktiven Konformation stabilisieren kann. Vor allem diese Tatsache ist es, die FLC21 neben den guten Bindungseigenschaften, zu einer aussichtsreichen Leitstruktur für die Zukunft machen.

Die Gründe für die Stabilisierung der inaktiven Konformation können bislang nur vermutet werden, allerdings zeigte sich insbesondere die Chlorsubstitution an Position 8 von Ring A als aussichtsreicher Kandidat, verantwortlich für die inaktive Konformation zu sein. Von daher könnte die Kristallisation von *hsCK2 $\alpha$*  bzw. *hsCK2 $\alpha'$*  mit FLC21 ohne diese Chlorsubstitution Aufklärung über dessen Rolle geben. Sollte sich bestätigen, dass ein Halogen an dieser Position zu der inaktiven Konformation führt, wäre dieses Wissen auch für die Entwicklung andersartiger Inhibitoren von großer Bedeutung.

Da die Selektivität von Kinase-Inhibitoren eine wichtige Rolle spielt, wird zumeist versucht deren Selektivität zu Erhöhen, indem die Anzahl der drehbaren Bindungen bei den Inhibitoren reduziert wird. Eine drehbare Bindung, die große Auswirkung auf die Flexibilität und Form von FLC21 hat, befindet sich zwischen Ring B und C der Flavonoid-Grundstruktur. Wie Abbildung 6.7 in Kapitel 6.4.3 zeigt, haben CX-4945 und ANP genau an dieser Position eine Ringstruktur, so dass es möglich sein müsste die drehbare Bindung bei FLC21 durch einen Ringschluss zu vermeiden.

Durch diese Modifizierung könnte es möglich sein, aus dem bisherigen Inhibitor FLC21 einen hochpotenten und selektiven CK2 $\alpha$ -Inhibitor zu entwickeln.

## 8 Anhang

hsCK2_alpha	1	MSGPvp-SRA	RVTYDYNTHR	PREYWDYESH	VVEWGNQDDY	QLVRKLGKGG
hsCK2_alpha	1	MPGPaagSRA	RVVAEVNSLR	SREYWDYEAH	VVSWGNGDDY	QLVRKLGKGG
zmCK2_alpha	1	m-----SKA	RVYADVNVLR	PKEYWDYEAAL	TQWGEQDDY	EVVRKVGKGG
hsCK2_alpha	50	YSEVF EAINI	TNNEKVVVKI	LKPVKGGKKIK	REIKILENLR	GGPNIIITLAD
hsCK2_alpha	51	YSEVF EAINI	TNNEKVVVKI	LKPVKGGKKIK	REIKILENLR	GGTNI IKLID
zmCK2_alpha	45	YSEVF EGINV	NNNEKVVVKI	LKPVKGGKKIK	REIKILQNLC	GGPNIVKLLD
hsCK2_alpha	100	IVKDFVSRTP	ALVFEVNNNT	DFKQLYQILT	DYDIRFYMVE	ILKALDYCHS
hsCK2_alpha	101	TVKDFVSKTP	ALVFEVNNNT	DFKQLYQILT	DFDIRFYMVE	LLKALDYCHS
zmCK2_alpha	95	IVRDqhsKTP	SLIFEVNNNT	DFKVLVPTLT	DYDIRVYIYE	LLKALDYCHS
hsCK2_alpha	150	MGIMHRDVVKP	HNVMIDHEHR	KLRLLDWGLA	EFYHPGQEYN	VRVASRYFKG
hsCK2_alpha	151	KGIMHRDVVKP	HNVMIDHQGK	KLRLLDWGLA	EFYHPAQEYN	VRVASRYFKG
zmCK2_alpha	145	QSIMHRDVVKP	HNVMIDHELR	KLRLLDWGLA	EFYHPGKEYN	VRVASRYFKG
hsCK2_alpha	200	PELLVDYQMY	DYSLDMNSLG	CMLASMIFRK	EPFFGHNDNY	DQLVRIAKVL
hsCK2_alpha	201	PELLVDYQMY	DYSLDMNSLG	CMLASMIFRK	EPFFGHQDNY	DQLVRIAKVL
zmCK2_alpha	195	PELLVDLQDY	DYSLDMNSLG	CMFAGMIFRK	EPFFVGHNDN	DQLVKIAKVL
hsCK2_alpha	250	GTEELYDYVID	KYNIELDPRF	NDILGRHSRK	RWERFVHSEN	QHLVSEPALD
hsCK2_alpha	251	GTEELYGVLIK	KYHIELDPRF	NDILGQHSRK	RWENFVHSEN	RHLVSEPALD
zmCK2_alpha	245	GTDELnvYLN	KYRIELDPQL	EALVGRHSRK	PWLKFMNADN	QHLVSEPAID
hsCK2_alpha	300	FLDKLLRYDH	QSRLTAREAM	EHYPFYTVVK	DQarmgssSM	PGSGTFVSSA
hsCK2_alpha	301	LLDKLLRYDH	QORLTAREAM	EHYPFYFPVVK	EQ-----SQ	PCADNAVLSA
zmCK2_alpha	295	FLDKLLRYDH	QERLTAREAM	THPYFPqqvra	aenartra-----	---
hsCK2_alpha	350	NMSGGissvvp	tpsplgplag	spvriaaanpl	gmpvpaaga	qq
hsCK2_alpha	345	GLTAAr----	-----	-----	-----	--
zmCK2_alpha	333	-----	-----	-----	-----	--

Abbildung 8.1: **Alignment**

Die Sequenzen der Isoenzyme *hsCK2 $\alpha$*  und *hsCK2 $\alpha$ '* sind bis zu Aminosäure 330 zu 85 % identisch, die C-terminalen Enden stimmen jedoch weder in Länge noch Sequenz miteinander überein. Bei der *hsCK2 $\alpha$* -Sequenz existiert eine Lücke von einer Aminosäure am N-Terminus. Aus diesem Grund verschiebt sich die Nummerierung aller Aminosäuren der *hsCK2 $\alpha$ '* um eine Stelle zu der kanonischen *hsCK2 $\alpha$* -Nummerierung. *ZmCK2 $\alpha$*  wurde als dritte Sequenz hinzugenommen, farbig hinterlegt sind Aminosäuren, die für strukturelle Unterschiede zwischen *hsCK2 $\alpha$*  und *hsCK2 $\alpha$ '* verantwortlich sein könnten. Das Alignment wurde erstellt mit DIALIGN-TX (Subramanian *et al.* 2008).



Tabelle 8.1: Verfeinerungstabelle  $hsCK2\alpha'^{1-334}$  3E3B

Datensammlung	3E3B
Temperatur (K)	100
Wellenlänge (Å)	0,978
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Gitterkonstanten	
<i>a, b, c</i> (Å)	69,81-102,13,46,62
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90,0-90,0-90,0
Auflösung: Gesamt (höchste Schale)(Å)	57,64-3,18 (3,31-3,18)
<i>R<sub>sym</sub></i>	20,0 (41,4)
Signal Rausch Verhältnis ( <i>I</i> / $\sigma$ <i>I</i> )	18,6 (8,8)
Vollständigkeit (%)	99,0 (95,2)
Redundanz	9,2 (9,5)
<i>B</i> -Faktor von Wilson Plot (Å <sup>2</sup> )	keine Angabe in (Nakaniwa <i>et al.</i> 2009)
Verfeinerung	
Auflösung (Å)	57,64-3,18
Anzahl der Reflexe Arbeits Set/Test Set	5680/273
<i>R<sub>work</sub></i> / <i>R<sub>free</sub></i>	24,8/34,8
Anzahl der Atome	
Protein	2804
Ligand/Ion	28
Wasser	104
Durchschnittliche <i>B</i> -Faktoren (Å <sup>2</sup> )	11,7
Standardabweichungen	
Bindungslängen (Å)	0,008
Bindungswinkel (°)	1,7
Ramachandran Diagramm Qualität	
favorisierte Regionen(%)	75,9
erlaubte Regionen (%)	14,46
unerlaubte Regionen (%)	9,64
unerlaubte Rotamere (%)	18,15

Tabelle 8.2: Verfeinerungstabelle  $hsCK2\alpha^{1-334}$  3E3Bkor

Datensammlung	3E3Bkor
Temperatur (K)	100
Wellenlänge (Å)	0,978
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Gitterkonstanten	
<i>a, b, c</i> (Å)	69,81-102,13,46,62
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90,0-90,0-90,0
Auflösung: Gesamt (höchste Schale)(Å)	57,64-3,18 (3,31-3,18)
$R_{sym}$	20,0 (41,4)
Signal Rausch Verhältnis ( $I/\sigma I$ )	18,6 (8,8)
Vollständigkeit (%)	99,0 (95,2)
Redundanz	9,2 (9,5)
<i>B</i> -Faktor von Wilson Plot (Å <sup>2</sup> )	keine Angabe in (Nakaniwa <i>et al.</i> 2009)
<hr/>	
Verfeinerung	
Auflösung (Å)	57,64-3,18
Anzahl der Reflexe Arbeits Set/Test Set	5704/249
$R_{work}/R_{free}$	19,8/27,9
Anzahl der Atome	
Protein	2759
Ligand/Ion	28
Wasser	24
durchschnittliche <i>B</i> -Faktoren (Å <sup>2</sup> )	12,9
Standardabweichungen	
Bindungslängen (Å)	0,003
Bindungswinkel (°)	0,888
Ramachandran Diagramm Qualität	
favorisierte Regionen(%)	92,0
erlaubte Regionen (%)	7,38
unerlaubte Regionen (%)	0,62
unerlaubte Rotamere (%)	2,35

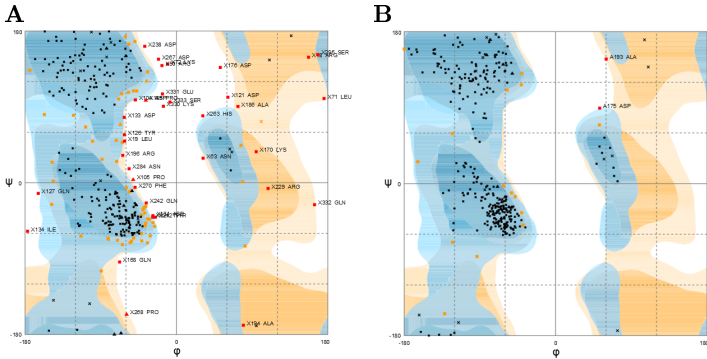


Abbildung 8.2: **Ramachandran-Diagramm von 3E3B und 3E3Bkor**  
 A: Ramachandran-Diagramm der Original 3E3B-Struktur. B: Ramachandran-Diagramm der nachverfeinerten 3E3B-Struktur (Bischoff *et al.* 2011b)

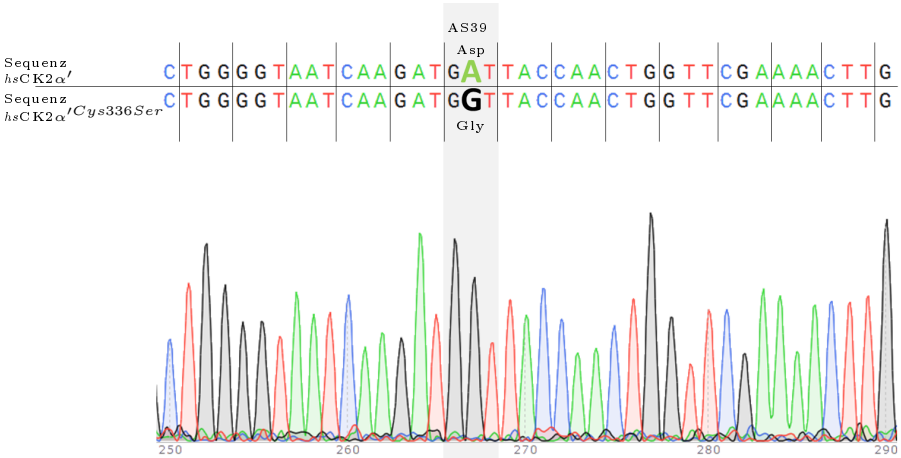


Abbildung 8.3: **Sequenzierung von *hsCK2α<sup>1</sup>Cys336Ser***  
 Der Bereich der Mutation ist grau hinterlegt, die Abbildung der Sequenzierung wurde erstellt mittels SnapGene Viewer.

Tabelle 8.3: Drei- und Einbuchstabencode der Aminosäuren

Aminosäure			Aminosäure		
Alanin	Ala	A	Methionin	Met	M
Cystein	Cys	C	Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D	Prolin	Pro	P
Glutamat	Glu	E	Glutamin	Gln	Q
Phenylalanin	Phe	F	Arginin	Arg	R
Glycin	Gly	G	Serin	Ser	S
Histidin	His	H	Threonin	Thr	T
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V
Lysin	Lys	K	Threonin	Trp	W
Leucin	Leu	L	Tyrosin	Tyr	Y

Tabelle 8.4: Verwendete Abkürzungen

Sonstige Abkürzungen	
Å	Ångström
AGC	eukaryotische Proteinkinasefamilie bestehend aus PKA, PKG und PKC
AMPPNP	Adenylimidodiphosphat
ANP	Phosphoaminophosphonicacid-adenylat-ester
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BESSY	Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung
°C	Grad Celsius
CAMK	Calmodulin-abhängige Kinase
CDK	Cyclin abhängige Kinase
CK1	Casein Kinase 1
CK2	Casein Kinase 2
CK2 $\alpha$ /CK2 $\alpha'$	katalytische Untereinheiten der CK2
CK2 $\beta$	nicht-katalytische Untereinheit der CK2

## Sonstige Abkürzungen

---

CLK	CDK-ähnliche Kinasen
CMGC-Kinasen	eukaryotische Proteinkinasefamilie bestehend aus CDK, MAPK, GSK3, CLK und CK2
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRB	5,6-Dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	und weitere
ePK	eukaryotische Proteinkinase
eV	elektronen Volt
$F_{(calc)}$	berechnete Strukturfaktoramplituden
$F_{(obs)}$	gemessene Strukturfaktoramplituden
g	Gramm
GSK3	Glycogensynthase-Kinase 3
h	Stunde
<i>hs</i>	<i>homo sapiens</i>
I	Intensität
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
K	Kelvin
$K_B$	Bindungskonstante
$K_D$	Dissoziationskonstante
$K_I$	Inhibitionskonstante
$k_{cat}$	Wechselzahl
$K_M$	Michaelis-Konstante
MAPK	Mitogen-aktivierte Kinasen
min	Minute
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLS	Swiss Light Source
STE	MAPK-Kaskade-Kinasen
TK	Tyrosinkinase
TKL	Tyrosinkinase ähnliche Kinasen
V-Src	virale Tyrosinkinase
WT	Wild-Typ

---

## Abbildungsverzeichnis

1.1	Die Proteinphosphorylierung . . . . .	8
1.2	Das humane Kinom . . . . .	11
1.3	aktive und inaktive Konformation einer Kinase . . . . .	12
1.4	Der regulatorische-Spine . . . . .	14
1.5	Die Spines einer aktiven Proteinkinase . . . . .	16
1.6	Das Pharmacophore Modell . . . . .	17
1.7	Die Struktur der CK2 $\alpha$ . . . . .	21
1.8	CK2-Inhibitoren . . . . .	23
1.9	Spermatozoon von WT- und <i>Csnk2a2</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen . . . . .	24
2.1	Verwendete CK2-Inhibitoren . . . . .	28
3.1	Die Arbeitsschritte der Röntgenstrukturanalyse . . . . .	30
3.2	Grundlagen der Proteinkristallisation . . . . .	33
3.3	Erzeugung von Röntgenstrahlung . . . . .	36
3.4	Darstellung der Röntgenbeugung gemäß dem Bragg'schen Gesetz . . . . .	37
4.1	ITC-Gerät und Messung . . . . .	49
4.2	Schema des gekoppelten Aktivitätstests . . . . .	51
5.1	Reinigung der <i>hsCK2<math>\alpha</math></i> -Isoformen . . . . .	58
5.2	Aktivitätstest der <i>hsCK2<math>\alpha</math></i> -Isoformen . . . . .	59
5.3	ITC-Spektren der beiden <i>hsCK2<math>\alpha</math></i> Isoenzyme . . . . .	60
5.4	Der <i>hsCK2<math>\alpha</math></i> <sup>1-335</sup> /MB002 Komplex . . . . .	63
5.5	Der <i>hsCK2<math>\alpha</math></i> <sup>Cys336Ser</sup> <sub>mP</sub> /FLC21 Komplex . . . . .	65
5.6	Der <i>hsCK2<math>\alpha</math></i> <sup>Cys336Ser</sup> <sub>oP</sub> /FLC21 Komplex . . . . .	67
5.7	Der <i>hsCK2<math>\alpha</math></i> <sup>1-335</sup> /MB002 Komplex . . . . .	69
5.8	Der <i>hsCK2<math>\alpha</math></i> <sup>1-335</sup> <sub>oP</sub> /FLC21 Komplex . . . . .	72

5.9	Der $hsCK2\alpha^{1-335}$ tP/FLC21 Komplex . . . . .	74
6.1	N-Terminus von 3E3B . . . . .	79
6.2	Die $\beta 4/\beta 5$ -Schleife . . . . .	81
6.3	globale Übersicht der in dieser Arbeit vorgestellten $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$ - und $hsCK2\alpha^{1-335}$ -Komplexstrukturen . . . . .	84
6.4	Der N-Terminus um Trp34 . . . . .	87
6.5	MB002 in der ATP-Bindetasche . . . . .	90
6.6	FLC21 in der ATP-Bindetasche . . . . .	91
6.7	Arg47 blockiert die ATP-Bindetasche . . . . .	93
6.8	Halogenbindung zwischen FLC21 und Gly47 . . . . .	95
6.9	FLC21-Bindung in $hsCK2\alpha^{1-335}$ tP/FLC21 . . . . .	97
6.10	R- und C-Spine in $hsCK2\alpha$ und $hsCK2\alpha'$ . . . . .	100
6.11	Aminosäureposition 39 in 3OFM . . . . .	103
8.1	Alignment . . . . .	109
8.2	Ramachandran-Diagramm von 3E3B und 3E3Bkor . . . . .	112
8.3	Sequenzierung von $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$ . . . . .	112

## Tabellenverzeichnis

4.1	Verwendete Geräte . . . . .	43
4.2	Verwendete Kristallisationsscreens . . . . .	43
4.3	Verwendete Software . . . . .	44
4.4	Verwendete Puffer . . . . .	45
5.1	Daten der ITC-Messung . . . . .	60
5.2	Zusammenfassung der gelösten Kristallstrukturen . . . . .	62
5.3	Datensatz und Verfeinerung $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$ /MB002 (3OFM) . . . . .	64
5.4	Datensatz und Verfeinerung $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$ mP/FLC21 . . . . .	66
5.5	Datensatz und Verfeinerung $hsCK2\alpha^{Cys336Ser}$ op/FLC21 . . . . .	68

5.6 Datensatz und Verfeinerung <i>hsCK2<math>\alpha</math>/MB002 (3RPS)</i> . . . . .	70
5.7 Datensatz und Verfeinerung <i>hsCK2<math>\alpha</math><sup>1-335</sup>oP/FLC21</i> . . . . .	73
5.8 Datensatz und Verfeinerung <i>hsCK2<math>\alpha</math><sup>1-335</sup>tP/FLC21</i> . . . . .	75
8.1 Verfeinerungstabelle <i>hsCK2<math>\alpha</math><sup>1-334</sup> 3E3B</i> . . . . .	110
8.2 Verfeinerungstabelle <i>hsCK2<math>\alpha</math><sup>1-334</sup> 3E3Bkor</i> . . . . .	111
8.3 Drei- und Einbuchstabencode der Aminosäuren . . . . .	113
8.4 Verwendete Abkürzungen . . . . .	113





## Literatur

Adams, P D; Afonine, P V; Bunkóczi, G; Chen, V B; Davis, I W; Echols, N; Headd, J J; Hung, L-W; Kapral, G J; Grosse-Kunstleve, R W; McCoy, A J; Moriarty, N W; Oeffner, R; Read, R J; Richardson, D C; Richardson, J S; Terwilliger, T C und Zwart, P H (2010). »PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution.« In: *Acta Cryst. D* 66, S. 213–21.

(Siehe S. 44, 54.).

Allende, J E und Allende, C C (1995). »Protein kinase an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation.« In: *FASEB J.* 9, S. 313–323.

(Siehe S. 19.).

Battistutta, R (2009). »Protein kinase CK2 in health and disease: Structural bases of protein kinase CK2 inhibition.« In: *Cell. Mol. Life Sci.* 66.11-12, S. 1868–1889.

(Siehe S. 22, 92.).

Battistutta, R; Mazzorana, M; Cendron, L; Bortolato, A; Sarno, S; Kazimierczuk, Z; Zanotti, G; Moro, S und Pinna, L A (2007). »The ATP-binding site of protein kinase CK2 holds a positive electrostatic area and conserved water molecules.« In: *Chembiochem.* 8.15, S. 1804–9.

(Siehe S. 89.).

Battistutta, Roberto und Lolli, Graziano (2011). »Structural and functional determinants of protein kinase CK2 $\alpha$ : facts and open questions.« In: *Mol. Cell. Biol.* 356, S. 67–73.

(Siehe S. 102.).

Battye, T G G; Kontogiannis, L; Johnson, O; Powell, H R und Leslie, A G W (2011). »iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM.« In: *Acta Cryst. D* 67, S. 271–81.

(Siehe S. 44, 54.).

Bergfors, T (2003). »Seeds to crystals.« In: *J. Struct. Biol.* 142.1, S. 66–76.

(Siehe S. 34.).

Biondi, R M; Cheung, P C; Casamayor, A; Deak, M; Currie, R A und Alessi, D R (2000). »Identification of a pocket in the PDK1 kinase domain that interacts with PIF and the C-terminal residues of PKA.« In: *EMBO J.* 19, S. 979–988.

(Siehe S. 88.).

Bischoff, N; Raaf, J; Olsen, B; Bretner, M; Issinger, O G und Niefind, K (2011a). »Enzymatic activity with an incomplete catalytic spine: insights from a comparative structural analysis of human CK2 $\alpha$  and its paralogous isoform CK2 $\alpha'$ «. In: *Mol. Cell. Biochem.* 356.1-2, S. 57–65.

(Siehe S. 69, 101.).

Bischoff, N; Olsen, B; Raaf, J; Bretner, M; Issinger, O G und Niefind, K (2011b). »Structure of the human protein kinase CK2 catalytic subunit CK2 $\alpha'$  and interaction thermodynamics with the regulatory subunit CK2 $\beta$ «. In: *J. Mol. Biol.* 407, S. 1–12.

(Siehe S. 63, 86, 112.).

Boldyreff, B; Meggio, F; Pinna, L A und Issinger, O G (1993). »Reconstitution of normal and hyperactivated forms of casein kinase-2 by variably mutated beta-subunits«. In: *Biochemistry* 32, S. 12672–7.

(Siehe S. 59.).

Bosc, D G; Slominski, E; Sichler, C und Litchfield, D W (1995). »Phosphorylation of Casein Kinase II by p34 cdc2 cally phosphorylated in cells that are arrested in mitosis«. In: *J. Biol. Chem.* 270.43, S. 25872–25878.

(Siehe S. 25.).

Bretner, M; Najda-Bernatowicz, A; Łebska, M; Muszyńska, G; Kilanowicz, A und Sapota, A (2008). »New inhibitors of protein kinase CK2, analogues of benzimidazole and benzotriazole«. In: *Mol. Cell. Biochem.* 316.1-2, S. 87–9.

(Siehe S. 28.).

Brünger, A T (1992). »Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures«. In: *Nature* 355, S. 472–475.

(Siehe S. 42.).

Brünger, A T; Adams, P D; Clore, 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 und Gregory, L (1998). »Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination«. In: *Acta Cryst. D* D54, S. 905–921.

(Siehe S. 44, 78.).

- Burnett, G und Kennedy, E P (1954). »The enzymatic phosphorylation of proteins«. In: *J. Biol. Chem.* 211, S. 969–980.  
(Siehe S. 6, 19.).
- Carlisle, D; Rowley, C und Mittelbach, F (1997). »The LATEX3 Programming Language - a proposed system for TEX macro programming«. In: *TUGboat* 18.4.  
(Siehe S. 44.).
- Chantalat, L; Leroy, D; Fillhol, O; Nueda, a; Benitez, M J; Chambaz, E M; Cochet, C und Dideberg, O (1999). »Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization.« In: *EMBO J.* 18.11, S. 2930–40.  
(Siehe S. 21.).
- Cohen, P (2001). »The role of protein phosphorylation in human health and disease«. In: *Eur. J. Biochem.* 268, S. 5001–5010.  
(Siehe S. 6.).
- (2002a). »Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century?« In: *Nat. Rev. Drug. Discov.* 1, S. 309–15.  
(Siehe S. 6, 16.).
- (2002b). »The origins of protein phosphorylation«. In: *Nat. Cell Biol.* 4.5, E127–E130.  
(Siehe S. 10.).
- Collett, M S und Erikson, R L (1978). »Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product«. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, S. 2021–2024.  
(Siehe S. 6.).
- Corbin, A S; La Rosée, P; Stoffregen, E P; Druker, B J und Deininger, M W (2003). »Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib«. In: *Blood* 101.11, S. 4611–4.  
(Siehe S. 17.).
- Cozza, G; Pinna, L A und Moro, S (2012). »Protein kinase CK2 inhibitors: a patent review«. In: *Expert Opin. Ther. Pat.* 22.9, S. 1081–97.  
(Siehe S. 22.).
- Eglen, R M und Reisine, T (2009). »The current status of drug discovery against the human kinome«. In: *Assay Drug Dev. Technol.* 7.1, S. 22–43.  
(Siehe S. 7, 16.).

Emsley, P und Cowtan, K (2004). »Coot: model-building tools for molecular graphics.« In: *Acta Cryst. D* 60, S. 2126–32.

(Siehe S. 44.).

Emsley, P; Lohkamp, B; Scott, W G und Cowtan, K (2010). »Features and development of Coot.« In: *Acta Cryst. D* 66, S. 486–501.

(Siehe S. 54.).

Farah, M; Parhar, K; Moussavi, M; Eivemark, S und Salh, B (2003). »5,6-Dichlororibifuranosyl-benzimidazole- and apigenin-induced sensitization of colon cancer cells to TNF-alpha-mediated apoptosis.« In: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285.5, G919–28.

(Siehe S. 22.).

Faust, M und Montenarh, M (2000). »Subcellular localization of protein kinase CK2.« In: *Cell Tissue Res.* 301.3, S. 329–340.

(Siehe S. 19.).

Ferguson, A D; Sheth, P R; Basso, A D; Paliwal, S; Gray, K; Fischmann, T O und Le, H V (Jan. 2011). »Structural basis of CX-4945 binding to human protein kinase CK2.« In: *FEBS Lett.* 585.1, S. 104–10.

(Siehe S. 71, 86, 92.).

Filhol, O; Martiel, J L und Cochet, C (2004). »Protein kinase CK2: a new view of an old molecular complex.« In: *EMBO Rep.* 5.4, S. 351–5.

(Siehe S. 19.).

Fischer, E und Krebs, E G (1955). »Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts.« In: *J. Biol. Chem.* 216, S. 121–132.

(Siehe S. 6.).

Garman, E F und Owen, R L (2006). »Cryocooling and radiation damage in macromolecular crystallography.« In: *Acta Cryst. D* 62, S. 32–47.

(Siehe S. 34.).

Golub, A G; Bdzholo, V G; Kyshenia, Y V; Sapelkin, V M; Prykhod'ko, A O; Kukharensko, O P; Ostrynska, O V und Yarmoluk, S M (2011). »Structure-based discovery of novel flavonol inhibitors of human protein kinase CK2.« In: *Mol. Cell. Biochem.* 356.1-2, S. 107–15.

(Siehe S. 28, 90, 92, 95.).

Gorre, M E; Mohammed, M; Ellwood, K; Hsu, N; Paquette, R; Rao, P N und Sawyers, C L (2001). »Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by

BCR-ABL gene mutation or amplification«. In: *Science* 293.5531, S. 876–80.

(Siehe S. 17.).

Grankowski, N; Boldyreff, B und Issinger, O G (1991). »Isolation and characterization of recombinant human casein kinase II subunits alpha and beta from bacteria«. In: *Eur. J. Biochem.* 198, S. 25–30.

(Siehe S. 101.).

Guerra, B und Issinger, O G (1999). »Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology«. In: *Electrophoresis* 20, S. 391–408.

(Siehe S. 19, 20.).

Guerra, B; Siemer, S; Boldyreff, B und Issinger, O G (1999). »Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2beta subunit fraction, devoid of the catalytic CK2alpha subunit, in mouse brain and testicles«. In: *FEBS Letters* 462.3, S. 353–357.

(Siehe S. 25.).

Helliwell, J R (1998). »Synchrotron Radiation and Crystallography: the First 50 Years«. In: *Acta Cryst. A* 54.6, S. 738–749.

(Siehe S. 36.).

Hubbard, S R (1997). »Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog«. In: *EMBO J.* 16.18, S. 5572–81.

(Siehe S. 12.).

Hubbard, S R; Wei, L; Ellis, L und Hendrickson, W A (1994). »Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor«. In: *Nature* 372, S. 746–754.

(Siehe S. 12.).

Huse, M und Kuriyan, J (2002). »The conformational plasticity of protein kinases«. In: *Cell* 109.3, S. 275–282.

(Siehe S. 13.).

Issinger, O G (1993). »CASEIN KINASES : Pleiotropic mediators of cellular regulation«. In: *Pharmac. Ther.* 59, S. 1–30.

(Siehe S. 19.).

Johnson, L N; Noble, M E M und Owen, D J (1996). »Active and Inactive Protein Kinases : Structural Basis for Regulation«. In: *Cell* 85, S. 149–158.

(Siehe S. 13.).

Kabsch, W (2010). »XDS«. In: *Acta Cryst. D* 66, S. 125–132.

(Siehe S. 44, 54.).

Kawai, S; Mukai, T; Mori, S; Mikami, B und Murata, K (2005). »Hypothesis: structures, evolution, and ancestor of glucose kinases in the hexokinase family«. In: *J. Biosci. and Bioeng.* 99.4, S. 320–30.

(Siehe S. 10.).

Kim, C; Cheng, C Y; Saldanha, S A und Taylor, S S (2007). »PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation.« In: *Cell* 130, S. 1032–43.

(Siehe S. 13.).

Kloppfleisch, K; Issinger, O G und Niefind, K (2012). »Low-density crystal packing of human protein kinase CK2 catalytic subunit in complex with resorufin or other ligands: a tool to study the unique hinge-region plasticity of the enzyme without packing bias«. In: *Acta Cryst. D* 68, S. 883–92.

(Siehe S. 89, 101.).

Klug, W S; Cummings, M R und Spencer, C A (2009). »Genetik«. In: *PEARSON Studium* 8. Auflage.

(Siehe S. 9.).

Klumpp, S und Krieglstein, J (2005). »Reversible phosphorylation of histidine residues in vertebrate proteins«. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1754.1-2, S. 291–5.

(Siehe S. 7.).

Kornev, A P und Taylor, S S (2010). »Defining the conserved internal architecture of a protein kinase.« In: *Biochim. Biophys. Acta* 1804.3, S. 440–444.

(Siehe S. 101.).

Kornev, A P; Haste, N M; Taylor, S S und Ten Eyck, L F (2006). »Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism«. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103.47, S. 17783–17788.

(Siehe S. 14, 101.).

Kornev, A P; Taylor, S S und Ten Eyck, L F (Apr. 2008a). »A generalized allosteric mechanism for cis-regulated cyclic nucleotide binding domains«. In: *PLoS Comput. Biol.* 4.4, e1000056.

(Siehe S. 14.).

– (2008b). »A helix scaffold for the assembly of active protein kinases«. In: *PNAS* 105.38, S. 14377–14382.

(Siehe S. 15.).

Kramerov, A A; Saghizadeh, M; Caballero, S; Shaw, L C; Calzi, S L; Bretner, M; Montenarh, M; Pinna, L A; Grant, M B und Ljubimov, A V (2008). »Inhibition of protein kinase CK2 suppresses angiogenesis and hematopoietic stem cell recruitment to retinal neovascularization sites«. In: *Mol. Cell. Biochem.* 316.September 2007, S. 177–186.

(Siehe S. 22.).

Kramerov, Andrei a und Ljubimov, Alexander V (2012). »Focus on molecules: protein kinase CK2«. In: *Exp. Eye Res.* 101, S. 111–2.

(Siehe S. 22.).

Lammlı, U K (1970). »Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4«. In: *Nature* 227, S. 680–685.

(Siehe S. 48.).

Laudet, B; Moucadel, V; Prudent, R; Filhol, O; Wong, Y S; Royer, D und Cochet, C (2008). »Identification of chemical inhibitors of protein-kinase CK2 subunit interaction«. In: *Mol. Cell. Biochem.* 316.1-2, S. 63–9.

(Siehe S. 23.).

Lavogina, D; Enkvist, E und Uri, A (2010). »Bisubstrate inhibitors of protein kinases: from principle to practical applications«. In: *ChemMedChem* 5.1, S. 23–34.

(Siehe S. 18.).

Leonard, C J; Aravind, L; Koonin, E V; Leonard, C J; Aravind, L und Koonin, E V (1998). »Novel Families of Putative Protein Kinases in Bacteria and Archaea : Evolution of the “ Eukaryotic ” Protein Kinase Superfamily«. In: *Genome Res.* 8, S. 1038–1047.

(Siehe S. 10.).

Lipinski, C A; Lombardo, F; Dominy, B W und Feeney, P J (2001). »Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings«. In: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46.1-3, S. 3–26.

(Siehe S. 18.).

Litchfield, D W (2003). »Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death«. In: *Biochem. J.* 369.Pt 1, S. 1–15.

(Siehe S. 20.).

Litchfield, D W; Bosc, D G; Canton, D a; Saulnier, R B; Vilks, G und Zhang, C (2001). »Functional specialization of CK2 isoforms and characterization of isoform-specific binding partners.« In: *Mol. Cell. Biochem.* 227.1-2, S. 21–9.

(Siehe S. 24.).



Liu, Y und Gray, N S (2006). »Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations«. In: *Nat. Chem. Biol.* 2.7, S. 358–64.

(Siehe S. 17.).

Lolli, G; Cozza, G; Mazzorana, M; Tibaldi, E; Cesaro, L; Donella-deana, A; Meggio, F; Venerando, A; Franchin, C; Sarno, S; Battistutta, R und Pinna, L A (2012). »Inhibition of Protein Kinase CK2 by Flavonoids and Tyrphostins. A Structural Insight«. In: *Biochemistry* 51, S. 6097–6107.

(Siehe S. 86, 95.).

Lottspeich, F und Engels, W E (2006). »Bioanalytik«. In: *SPEKTRUM* 2.Auflage.

(Siehe S. 41.).

Lou, D Y; Dominguez, I; Toselli, P; Landesman-Bollag, E; O'Brien, C und Seldin, D C (2008). »The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development«. In: *Mol. Cell. Biol.* 28, S. 131–9.

(Siehe S. 25.).

Lovell, S C; Word, J M; Richardson, J S und Richardson, D C (Aug. 2000). »The penultimate rotamer library.« In: *Proteins*. 40.3, S. 389–408.

(Siehe S. 54.).

Lovell, S C; Davis, I W; Iii, W B A; Bakker, P I; Word, J M; Prisant, M G; Richardson, J S und Richardson, D C (2003). »Structure Validation by C $\alpha$  Geometry: $\phi$ , $\psi$  and C $\beta$  Deviation«. In: *Proteins*. 50.August 2002, S. 437–450.

(Siehe S. 54.).

Lozemann, F J; Litchfield, D W; Piening, C; Takio, K; Walsh, K A und Krebs, E G (1990). »Isolation and Characterization of Human cDNA Clones Encoding the  $\alpha$  and the  $\alpha'$  Subunits of Casein Kinase II«. In: *Biochemistry* 29, S. 8436–8447.

(Siehe S. 24.).

Manning, G; Whyte, D B; Martinez, R; Hunter, T und Sudarsanam, S (2002). »The protein kinase complement of the human genome«. In: *Science* 298, S. 1912–34.

(Siehe S. 6, 10, 11.).

Marchiori, F; Meggio, F; Marin, O; Borin, G; Calderan, A; Ruzza, P und Pinna, L A (1988). »Synthetic pepfide substrates for casein kinase 2 . Assessment of minimum structural requirements for phosphorylation«. In: *Biochim. Biophys. Acta* 971, S. 332–338.

(Siehe S. 19.).

- McCoy, A J; Grosse-Kunstleve, R W; Adams, P D; Winn, M D und Storoni, L (2007). »Phaser crystallographic software«. In: *J. Appl. Cryst.* 40, S. 658–674.  
(Siehe S. 54.).
- McPherson, A (1990). »Current approaches to macromolecular crystallization«. In: *Proteins*. 189.1, S. 1–23.  
(Siehe S. 32.).
- Meggio, F und Pinna, L A (2003). »One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?«. In: *FASEB J.* 17.3, S. 349–68.  
(Siehe S. 19.).
- Mottet, D; Ruys, S P D; Demazy, C; Raes, M und Michiels, C (Dez. 2005). »Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity«. In: *Int. J. Cancer* 117.5, S. 764–74.  
(Siehe S. 20.).
- Nakaniwa, T; Kinoshita, T; Sekiguchi, Y; Tada, T; Nakanishi, I; Kitaura, K; Suzuki, Y; Ohno, H; Hirasawa, A und Tsujimoto, G (2009). »Structure of human protein kinase CK2 alpha 2 with a potent indazole-derivative inhibitor«. In: *Acta Cryst. F* 65, S. 75–79.  
(Siehe S. 27, 61, 77, 78, 80, 110, 111.).
- Niefind, K und Issinger, O G (2010). »Conformational plasticity of the catalytic subunit of protein kinase CK2 and its consequences for regulation and drug design«. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1804.3, S. 484–492.  
(Siehe S. 22, 101.).
- Niefind, K; Guerra, B; Pinna, L a; Issinger, O G und Schomburg, D (1998). »Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays* at 2.1 Å resolution«. In: *EMBO J* 17, S. 2451–62.  
(Siehe S. 20.).
- Niefind, K; Pütter, M; Guerra, B; Issinger, O G und Schomburg, D (1999). »GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2«. In: *Nat. Struct. Biol.* 6.12, S. 4–7.  
(Siehe S. 21.).
- Niefind, K; Guerra, B; Ermakowa, I und Issinger, O G (2001). »Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme«. In: *EMBO J.* 20.19, S. 5320–5331.  
(Siehe S. 21, 80, 84.).

- Niefind, K; Yde, C W; Ermakova, I und Issinger, O G (2007). »Evolved to be active: sulfate ions define substrate recognition sites of CK2alpha and emphasise its exceptional role within the CMGC family of eukaryotic protein kinases.« In: *J. Mol. Biol.* 370, S. 427–38.  
(Siehe S. 47, 63, 69.).
- Niefind, K; Raaf, J und Issinger, O G (2009). »Protein kinase CK2: from structures to insights«. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 66.11-12, S. 1800–16.  
(Siehe S. 21.).
- Noble, M E M; Endicott, J A und Johnson, L N (2004). »Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure«. In: *Science* 303.5665, S. 1800–5.  
(Siehe S. 18.).
- Olsen, B B; Boldyreff, B; Niefind, K und Issinger, O G (2006). »Purification and characterization of the CK2alpha'-based holoenzyme, an isozyme of CK2alpha: A comparative analysis«. In: *Protein Expression and Purification* 47.2, S. 651–661.  
(Siehe S. 25, 27.).
- Olsen, B B; Poulsen, M B; rling und Guerra, B (2007). »Emodin negatively affects the phosphoinositide 3-kinase/AKT signalling pathway: A study on its mechanism of action«. In: *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39.1, S. 227–237.  
(Siehe S. 22.).
- Olsen, B B; Rasmussen, T; Niefind, K und Issinger, O G (2008). »Biochemical characterization of CK2alpha and alpha' paralogues and their derived holoenzymes: evidence for the existence of a heterotrimeric CK2alpha'-holoenzyme forming trimeric complexes«. In: *Mol. Cell. Biochem.* 316.1-2, S. 37–47.  
(Siehe S. 25, 82.).
- Pierre, F; Chua, Peter C; O'Brien, Sean E; Siddiqui-Jain, Adam; Bourbon, Pauline; Haddach, Mustapha; Michaux, Jerome; Nagasawa, Johnny; Schwaebe, Michael K; Stefan, Eric; Vialettes, Anne; Whitten, Jeffrey P; Chen, Ta Kung; Darjania, Levan; Stansfield, Ryan; Anderes, Kenna; Bliesath, Josh; Drygin, Denis; Ho, Caroline; Omori, May; Proffitt, Chris; Streiner, Nicole; Trent, Katy; Rice, William G und Ryckman, David M (2011). »Discovery and SAR of 5-(3-chlorophenylamino)benzo[c][2,6]naphthyridine-8-carboxylic acid (CX-4945), the first clinical stage inhibitor of protein kinase CK2 for the treatment of cancer«. In: *J. Med. Chem.* 54.2, S. 635–54.  
(Siehe S. 23.).

- Pinna, L. a. (2002). »Protein kinase CK2: a challenge to canons«. In: *J. Cell. Sci.* 115.20, S. 3873–3878.  
(Siehe S. 24.).
- Praefcke, G J K und Hermann, C (2011). »Isotherme Titrationskalorimetrie ( ITC ) Wechselwirkungen Methoden«. In: *BIOspektrum Methoden* 05, S. 10–12.  
(Siehe S. 49.).
- Prudent, Renaud und Cochet, Claude (2009). »New protein kinase CK2 inhibitors: jumping out of the catalytic box«. In: *Chem. Biol.* 16.2, S. 112–120.  
(Siehe S. 22.).
- Prudent, Renaud; Sautel, Céline F und Cochet, Claude (2010). »Structure-based discovery of small molecules targeting different surfaces of protein-kinase CK2.« In: *Biochim. Biophys. Acta* 1804.3, S. 493–8.  
(Siehe S. 100.).
- Raaf, J; Klopffleisch, K; Issinger, O G und Niefind, K (2008a). »The catalytic subunit of human protein kinase CK2 structurally deviates from its maize homologue in complex with the nucleotide competitive inhibitor emodin«. In: *J. Mol. Biol.* 377.1, S. 1–8.  
(Siehe S. 59, 84, 92.).
- Raaf, J; Brunstein, E; Issinger, O G und Niefind, K (2008b). »The CK2 alpha/CK2 beta interface of human protein kinase CK2 harbors a binding pocket for small molecules«. In: *Chem. Biol.* 15.2, S. 111–117.  
(Siehe S. 23.).
- Raaf, J; Issinger, O G und Niefind, K (2009). »First inactive conformation of CK2 alpha, the catalytic subunit of protein kinase CK2«. In: *J. Mol. Biol.* 386.5, S. 1212–1221.  
(Siehe S. 22, 92.).
- Roskoski, R (1983). »Assays of Protein Kinase«. In: *Methods Enzymol.* 99, S. 3–6.  
(Siehe S. 51.).
- Rupp, B (2009). »Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology«. In: *Garland Science* 1.Auflage.  
(Siehe S. 33, 36, 37.).
- Ruzzene, M; Penzo, D; Pinna, L A; Colombo, V G; Veneto, I; Orus, V und Biologica, C (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«. In: *Biochem. J.* 364, S. 41–47.

(Siehe S. 20.).

Salah, E; Ugochukwu, E; Barr, A J; Von Delft, F; Knapp, S und Elkins, J M (2011). »Crystal Structures of ABL-Related Gene (ABL2) in Complex with Imatinib, Tozasertib (VX-680), and a Type I Inhibitor of the Triazole Carbothioamide Class«. In: *J. Med. Chem.* 54, S. 2359–2367.

(Siehe S. 17.).

Salvi, M; Sarno, S; Cesaro, L; Nakamura, H und Pinna, L A (2009). »Extraordinary pleiotropy of protein kinase CK2 revealed by weblogo phosphoproteome analysis«. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1793.5, S. 847–59.

(Siehe S. 19.).

Sarno, S; Salvi, M; Battistutta, R; Zanotti, G und Pinna, L A (2005). »Features and potentials of ATP-site directed CK2 inhibitors«. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1754.1-2, S. 263–70.

(Siehe S. 22.).

Sawyer, T K (2004). »Cancer metastasis therapeutic targets and drug discovery: emerging small-molecule protein kinase inhibitors«. In: *Expert Opin. Investig. Drugs* 13.1, S. 1–19.

(Siehe S. 16.).

Schrödinger, LLC (2010). »The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1«. In:

(Siehe S. 44, 55.).

Schüttelkopf, A W und Aalten, D M F van (2004). »PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes«. In: *Acta Cryst. D* 60.Pt 8, S. 1355–63.

(Siehe S. 44, 55.).

Seldin, D C und Leder, P (1995). »Casein kinase II alpha transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle«. In: *Science* 267.5199, S. 894–7.

(Siehe S. 20.).

Shi, X; Potvin, B; Huang, T; Hilgard, P; Spray, D C; Suadicani, S O; Wolkoff, a W; Stanley, P und Stockert, R J (2001). »A novel casein kinase 2 alpha-subunit regulates membrane protein traffic in the human hepatoma cell line HuH-7«. In: *J. Biol. Chem.* 276.3, S. 2075–82.

(Siehe S. 24.).

- Sliz, P; Harrison, S C und Rosenbaum, G (2003). »How does Radiation Damage in Protein Crystals Depend on X-Ray Dose ?« In: *Structure* 11.02, S. 13–19.  
(Siehe S. 34.).
- St-Denis, N A; Derksen, D R und Litchfield, DW (2009). »Evidence for Regulation of Mitotic Progression through Temporal Phosphorylation and Dephosphorylation of CK2«. In: *Mol. Cell. Biol.* 29.8, S. 2068–2081.  
(Siehe S. 25.).
- Subramanian, A R; Kaufmann, M und Morgenstern, B (Jan. 2008). »DIALIGN-TX: greedy and progressive approaches for segment-based multiple sequence alignment«. In: *Algorithms Mol. Biol.* 3, S. 6.  
(Siehe S. 109.).
- Tarrant, M K; Rho, H S; Xie, Z; Jiang, Y L; Gross, C; Culhane, J C; Yan, G; Qian, J; Ichikawa, Y; Matsuoka, T; Zachara, N; Etkorn, F A; Hart, G W; Jeong, J S; Zhu, H und Cole, P A (2012). »Regulation of CK2 by Phosphorylation and O-GlcNAcylation Revealed by Semisynthesis«. In: *Nat. Chem. Biol.* 8, S. 262–269.  
(Siehe S. 25.).
- Taylor, S S und Kornev, A P (2011). »Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins«. In: *Trends Biochem. Sci.* 36, S. 65–77.  
(Siehe S. 16, 99.).
- The Mendeley Support Team (2011). *Getting Started with Mendeley*. London.  
(Siehe S. 44.).
- Thompson, E E; Kornev, A P; Kannan, N; Kim, C; Ten Eyck, L F und Taylor, Susan S (2009). »Comparative surface geometry of the protein kinase family«. In: *Protein Sci.* 18.10, S. 2016–2026.  
(Siehe S. 88.).
- Traugh, J A und Traut, R R (1974). »Characterization of Protein Kinases from Rabbit Reticulocytes«. In: *J. Biol. Chem.* 249.4.  
(Siehe S. 19.).
- Traxler, P und Furet, P (1999). »Strategies toward the design of novel and selective protein tyrosine kinase inhibitors«. In: *Pharmacol. Ther.* 82.2-3, S. 195–206.  
(Siehe S. 18.).
- Trembley, J H; Wang, G; Unger, G; Slaton, J und Ahmed, K (2009). »Protein kinase CK2 in health and disease: CK2: a key player in cancer biology«. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 66.11-12, S. 1858–1867.  
(Siehe S. 20.).

Ubersax, J A und Ferrell, J E (2007). »Mechanisms of specificity in protein phosphorylation«. In: *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8, S. 530–41.

(Siehe S. 7, 8.).

Wilkins, M R; Gasteiger, E; Bairoch, A; Sanchez, J C; Williams, K L; Appel, R D und Hochstrasser, D F (1999). »Protein identification and analysis tools in the ExPASy server«. In: *Methods Mol. Biol.* 112, S. 531–52.

(Siehe S. 48.).

Wilson, J E (2003). »Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function«. In: *J. Exp. Biol.* 206.12, S. 2049–2057.

(Siehe S. 10.).

Winn, M D; Ballard, C C; Cowtan, K D; Dodson, E J; Emsley, P; Evans, P R; Keegan, R M; Krissinel, E B; Leslie, A G W; McCoy, A; McNicholas, S J; Murshudov, G N; Pannu, N S; Potterton, E A; Powell, H R; Read, R J; Vagin, A und Wilson, K S (2011). »Overview of the CCP4 suite and current developments«. In: *Acta Cryst. D* 67, S. 235–42.

(Siehe S. 44, 54.).

Xu, X; Toselli, P A; Russell, L D und Seldin, D C (1999). »Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit«. In: *Nat. Genet.* 23.1, S. 118–121.

(Siehe S. 24, 25.).

Yan, J X; Packer, N H; Gooley, A A und Williams, K L (1998). »Protein phosphorylation: technologies for the identification of phosphoamino acids«. In: *J. Chromatogr. A* 808.1-2, S. 23–41.

(Siehe S. 7.).

Yang-Feng, T L; Naiman, T; Kopatz, I; Eli, D; Dafni, N und Canaani, D (1994). »Assignment of the Human Casein Kinase II  $\alpha'$  Subunit Gene (CSNK2A1) to Chromosome 16p13.2-p13.3«. In: *Genomics* 19, S. 173.

(Siehe S. 24.).

Yde, C W; Ermakova, I; Issinger, O G und Niefind, K (2005). »Inclining the purine base binding plane in protein kinase CK2 by exchanging the flanking side-chains generates a preference for ATP as a cosubstrate.« In: *J. Mol. Biol.* 347.2, S. 399–414.

(Siehe S. 101.).

Yu, W; Gu, K; Yu, Z; Yuan, D; He, M; Ma, N; Lai, S; Zhao, J; Ren, Z; Zhang, X; Shao, C und Jiang, G L (2013). »Sorafenib potentiates irradiation effect in

hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo«. In: *Cancer Lett.* 329.1, S. 109–17.  
(Siehe S. 17.).





## Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

**Structure of the human protein kinase CK2 catalytic subunit CK2 $\alpha$ ' and interaction thermodynamics with the regulatory subunit CK2 $\beta$ .**

Bischoff N, Olsen B, Raaf J, Bretner M, Issinger OG, Niefind K.

J Mol Biol. 2011 Mar 18;407(1):1-12. doi: 10.1016/j.jmb.2011.01.020. Epub 2011 Jan 15.

**Enzymatic activity with an incomplete catalytic spine: insights from a comparative structural analysis of human CK2 $\alpha$  and its paralogous isoform CK2 $\alpha$ '.**

Bischoff N, Raaf J, Olsen B, Bretner M, Issinger OG, Niefind K.

Mol Cell Biochem. 2011 Oct;356(1-2):57-65. doi: 10.1007/s11010-011-0948-5. Epub 2011 Jul 8.

Weitere Veröffentlichungen:

**A subnanomolar fluorescent probe for protein kinase CK2 interaction studies.**

Enkvist E, Viht K, Bischoff N, Vahter J, Saaver S, Raidaru G, Issinger OG, Niefind K, Uri A.

Org Biomol Chem. 2012 Nov 21;10(43):8645-53. doi: 10.1039/c2ob26022k.

**Interaction between CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$ , the subunits of protein kinase CK2: thermodynamic contributions of key residues on the CK2 $\alpha$  surface.**

Raaf J, Bischoff N, Klopffleisch K, Brunstein E, Olsen BB, Vilck G, Litchfield DW, Issinger OG, Niefind K.

Biochemistry. 2011 Feb 1;50(4):512-22. doi: 10.1021/bi1013563. Epub 2010 Dec 31.



## Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von den auf der vorigen Seite angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von PD Dr. Karsten Niefind betreut worden.

---

Ort, Datum

Nils Bischoff