

Proteinkinase CK2:
ein Enzym mit mehreren Bindestellen

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

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

vorgelegt von
Alexander Schnitzler

Köln

2016

Gutachter:

Prof. Dr. Karsten Niefind
Institut für Biochemie
Universität zu Köln

Prof. Dr. Ulrich Baumann
Institut für Biochemie
Universität zu Köln

Prüfungsvorsitzende:

Prof. Dr. Karin Schnetz
Institut für Genetik
Universität zu Köln

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2015

Die in dieser Dissertation beschriebenen Arbeiten wurden zwischen Juli 2011 und Oktober 2015 unter der Anleitung von Prof. Dr. Karsten Niefind am Institut für Biochemie (Department für Chemie) der Universität zu Köln, Otto-Fischer-Str. 12-14, 50674 Köln, Deutschland, durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Schnitzler, A., Olsen, B. B., Issinger, O.-G., Niefind, K. (2014). The protein kinase CK2^{Andante} holoenzyme structure supports proposed models of autoregulation and trans-autophosphorylation. *Journal of Molecular Biology*, 426(9), 1871–1882.

Guerra, B., Rasmussen, T. D. L., Schnitzler, A., Jensen, H. H., Boldyreff, B. S., Miyata, Y., Marcussen, N., Niefind, K., Issinger, O.-G. (2015). Protein kinase CK2 inhibition is associated with the destabilization of HIF-1 α in human cancer cells. *Cancer Letters*, 356(2), 751–761.

Weitere Veröffentlichungen:

Swider, R., Masłyk, M., Zapico, J. M., Coderch, C., Panchuk, R., Skorokhyd, N., Schnitzler, A., Niefind, K., de Pascual-Teresa, B., Ramos, A. (2015). Synthesis, biological activity and structural study of new benzotriazole-based protein kinase CK2 inhibitors. *RSC Adv.*, 5(89), 72482-72494.

Danksagung

Bei dieser Arbeit war die Hilfe und Assistenz vieler Personen notwendig, denen ich zu Dank verpflichtet bin. In vorderster Front gilt mein Dank Prof. Dr. Karsten Niefind, der mir ermöglicht hat an diesem spannenden Thema zu arbeiten und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Ulrich Baumann zum einen dafür bedanken, dass er sich bereit erklärt hat diese Arbeit zu prüfen, zum anderen dafür, dass er die Labor-Infrastruktur seiner Arbeitsgruppe selbstlos zur Verfügung gestellt hat und auch für anregende Diskussionen zur Verfügung stand. Prof. Dr. Karin Schnetz möchte ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Prof. Dr. Joachim Jose, Prof. Dr. Asko Uri, Prof. Dr. Claudia Götz und Prof. Dr. Olaf-Georg Issinger für die zur Verfügung gestellten Materialien, bei Dr. Markus Pietsch und Dr. Michael Lammers für die Hilfe bei der Datenauswertung und bei Prof. Dr. Günther Schwarz für die zur Verfügung gestellte Infrastruktur.

Auch bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Synchrotrons BESSY, ESRF und SLS möchte ich mich für die tolle Unterstützung bedanken. Des Weiteren gilt mein Dank Dr. Christine Dolde für die Einladung nach Bern und die entspannte und doch effiziente gemeinsame Arbeit.

Nicht vergessen darf ich natürlich meine Kolleginnen und Kollegen, die dafür mitverantwortlich waren, dass ich (fast) jeden Arbeitstag am Institut für Biochemie genossen habe und vermissen werde. Dazu gehören die aktuellen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der AG Niefind, Dr. Stephan Wagner, Dr. Jennifer Hochscherf, Dr. Nils Bischoff, Christine Tölzer, Dirk Lindenblatt und natürlich Raphael Klein.

Die Doktoranden-Gang der AG Baumann hat ebenfalls eine eigenständige Erwähnung verdient: Swantje, Anna, Sinan und Christian waren immer für einen Spaß zu haben, Sandra natürlich auch.

Besonderer Dank gebührt denjenigen, die sich die Zeit genommen haben meine Arbeit zu inspizieren: Jörn, Jenni, Stephan und Esther, ich danke euch.

Ich möchte nicht unterschlagen, dass mir die Unterstützung meiner Familie wichtigen Rückhalt gegeben hat. Besonderer Dank gilt hierbei Esther und unserem Sohn Paul, die mich unterstützt und angetrieben haben auch wenn Paul am Ende etwas schneller war als ich.

Inhaltsverzeichnis

Gutachter	I
Danksagung	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungen	IX
Zusammenfassung	XIII
Summary	XV
1. Einleitung	1
1.1. Eukaryotische Proteinkinasen	1
1.1.1. Funktionsweise von ePKs	2
1.1.2. ePKs in der Medizin	3
1.1.3. Entwicklung von Inhibitoren	4
1.1.4. Regulationsmechanismen bei ePKs	6
1.2. CK2	7
1.3. Die Bedeutung von CK2 im eukaryotischen Organismus	9
1.3.1. Apoptose	9
1.3.2. CK2 als zirkadianer Zeitgeber	10
1.4. CK2 α – eine CMGC-Kinase	11
1.4.1. Strukturelle Eigenschaften von CK2 α	13
1.4.2. Die ATP/GTP-Bindetasche von CK2 α	15
1.4.3. Duale Substratspezifität – Die Substratbindung	17
1.4.4. Die CK2 α /CK2 β -Interaktion	19
1.4.5. Regulation und die konstitutive Aktivität von CK2	20
1.5. Inhibition von CK2	22
1.5.1. Inhibition durch Heparin	22
1.5.2. ATP-kompetitive Inhibitoren	23
1.5.3. Inhibitoren in der klinischen Anwendung	24
1.5.4. Bisubstratinhibitoren	25
1.5.5. Inhibitoren der CK2 α / β -Interaktion	25
1.6. Aktivatoren von CK2	26
1.7. Zielsetzung	26

2. Material und Methoden	28
2.1. Chemikalien	28
2.2. DNA-Arbeiten	29
2.3. Stämme und Antibiotika	30
2.4. Medien und Lösungen	31
2.5. Software	34
2.6. Kristallisations-Screens	35
2.7. Arbeit mit DNA	36
2.7.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.7.2. Transformation	36
2.7.3. Plasmidpräparation und Glycerolstocks	37
2.7.4. Agarose-Gelelektrophorese	37
2.7.5. DNA-Restriktion	38
2.7.6. Ligation	38
2.7.7. Sequenzierung	38
2.8. Expression	38
2.8.1. Testexpression	38
2.8.2. Großexpression	39
2.9. Proteinreinigung	39
2.9.1. Zellaufschluss	39
2.9.2. Phosphocellulose-Chromatographie	40
2.9.3. Heparin-Affinitätschromatographie	40
2.9.4. NiNTA-Affinitätschromatographie	41
2.9.5. NiNTA-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen	41
2.9.6. Gelfiltration	41
2.9.7. Dialyse	42
2.9.8. Proteinkonzentrierung	42
2.10. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.10.1. Denaturierte Proteinproben bei der SDS-PAGE	43
2.11. Bestimmung von Protein- und DNA-Konzentrationen	44
2.12. Western Blot	45
2.13. Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	46
2.14. Fluoreszenzanisotropie-Assay	47
2.15. Schmelzpunktbestimmung	48
2.16. Dynamische Lichtstreuung (DLS)	48
2.17. Aktivitätsbestimmung der PIM3-Varianten	49

3. Röntgenkristallographische Methoden	50
3.1. Kristallisation	50
3.2. Röntgendiffraktion	53
3.3. Strukturlösung	56
3.4. Modellierung und Verfeinerung	59
4. Ergebnisse	61
4.1. Gentechnische Arbeiten	61
4.1.1. CK2	61
4.1.2. PIM3	61
4.1.3. P21WAF	62
4.2. Expression und Reinigung	62
4.2.1. CK2	62
4.2.2. PIM3	63
4.2.3. P21WAF	64
4.2.4. Proteinqualität	65
4.3. Charakterisierung der PIM3-Varianten	66
4.4. ATP-kompetitive Inhibitoren von CK2	68
4.4.1. Töberichfurane	68
4.4.2. E9	71
4.4.3. ARC3140 und ARC1502	74
4.5. Struktur von CK2 ^{Andante}	80
4.5.1. Reinigung des Proteins	80
4.5.2. Kristallisation	80
4.5.3. Auswertung des C2-Datensatzes	81
4.6. Die Proteinvarianten der Gelenkregion	83
4.6.1. Kristallisation	84
4.6.2. Daten und Strukturen	86
4.7. Kokristallisation von CK2 α mit Heparin	88
4.7.1. Kristallisation	88
4.7.2. Strukturen	90
5. Diskussion	94
5.1. PIM3	94
5.2. CK2	96
5.3. ATP-kompetitive Inhibitoren von CK2	97
5.3.1. Töberichfurane	97
5.3.2. E9	99
5.3.3. Bisubstratinhibitoren	101

Inhaltsverzeichnis

5.4.	CK2 ^{Andante}	106
5.4.1.	Die Oligomerisation als regulatorischer Mechanismus	107
5.4.2.	Trans-Interaktionen des CK2 ^{Andante} -Holoenzym	110
5.5.	Die Gelenkregion von CK2 α	112
5.5.1.	Kinetische Daten	113
5.5.2.	Die Spine-Theorie als Erklärungsansatz	115
5.5.3.	Die Gelenkregion – offen oder geschlossen?	117
5.5.4.	Einfluss der Bindung der CK2 β -Untereinheit auf die Gelenkregion von CK2 α	117
5.5.5.	Einschränkungen der Röntgenstrukturanalyse	118
5.6.	CK2-Inhibition durch Heparin	119
5.6.1.	Interaktion mit polyanionischen Molekülen	119
5.6.2.	Heparin und Heparansulfat	119
5.6.3.	CK2 α im Komplex mit Heparin	120
5.7.	Fazit und Ausblick	127
5.7.1.	Die ATP-Bindetasche	127
5.7.2.	CK2 α/β -Interaktionen	127
5.7.3.	Die Gelenkregion – Einfluss auf die ATP/GTP-Bindung	128
5.7.4.	Substratkompetitive Bindung	128
A.	Appendix	130
A.1.	Alignments	130
A.2.	PIM3-Modell	132
A.3.	Tabellen	133
	Abbildungsverzeichnis	145
	Tabellenverzeichnis	146
	Literatur	148
	Erklärung	174

Abkürzungen

Aminosäuren

A	ALA	Alanin
C	CYS	Cystein
D	ASP	Aspartat
E	GLU	Glutamat
F	PHE	Phenylalanin
G	GLY	Glycin
H	HIS	Histidin
I	ILE	Isoleucin
K	LYS	Lysin
L	LEU	Leucin
M	MET	Methionin
N	ASN	Asparagin
P	PRO	Prolin
Q	GLN	Glutamin
R	ARG	Arginin
S	SER	Serin
T	THR	Threonin
V	VAL	Valin
W	TRP	Tryptophan
Y	TYR	Tyrosin

Weitere Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Masse des Gelösten in g pro 100 ml Lösung
% (w/w)	Gewichtsprozent
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 0,1 \text{ nm}$)
Abb.	Abbildung
abl1	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog, Gen der Tyrosinkinase ABL auf Chromosom 9
AMP/ADP/ATP	Adenosin mono/di/triphosphat
AMPPCP	Adenosin (beta,gamma-methylene)triphosphat
AMPPNP	Adenosin (beta,gamma-imido)triphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AU	Absorptionseinheit bei einer Wellenlänge von 280 nm
bcr	breakpoint cluster region, ein Genlokus auf Chromosom 22

Abkürzungen

Bicin	2-(Bis(2-hydroxyethyl)amino)essigsäure; eine Puffersubstanz
BSA	Rinder-Serumalbumin
°C	Grad Celsius
C-terminal	Carboxy-terminal
Da	Dalton (1 Da = 1 g/mol)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FPLC	Fast performance liquid chromatography
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (1 <i>g</i> ≈ 9.81 m/s ²)
g	Gramm
GMP/GDP/GTP	Guanosin mono/di/triphosphat
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin Ethansulfonsäure; eine Puffersubstanz
His	Polyhistidin-Tag
<i>hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
I	Intensität
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration bei halbmaximaler Aktivität
<i>in vitro</i>	„Im Glas“; Experimente, die in einer künstlichen Umgebung durchgeführt wurden.
<i>in vivo</i>	„Im Lebendigen“; Experimente, die unter natürlichen Bedingungen im Organismus durchgeführt wurden.
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
K	Kelvin
kb	Kilobase
K _d	Dissoziationskonstante
K _i	Inhibitionskonstante
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
λ	Wellenlänge (nm)
LB	Lysogenic broth (Nährmedium für <i>E. coli</i>)
m	Meter
M	Molar (mol/l)

MAD	Multi-Wellenlängen anomale Dispersion
min	Minute(n)
MIR	Multipler isomorpher Ersatz
MR	Molekularer Ersatz
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-terminal	Amino-terminal
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
R _{free}	Freier R-Faktor
rmsd	Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
R _{work}	R-Faktor des work-Sets
SAD	Einzel-Wellenlängen anomale Diffraktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
$\sigma(I)$	Standardfehler der Intensität
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered saline; ein Tris-basierter Puffer
TBS-T	TBS-Puffer mit Tween-20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
T _m	mittlere Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan; eine Puffersubstanz
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
z. B.	zum Beispiel
<i>zm</i>	<i>Zea mays</i> , Mais

Inhibitoren

TBB	4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol
TBI	4,5,6,7-Tetrabromobenzimidazol
TIBI	4,5,6,7-Tetroiodobenzimidazol
DMAT	4,5,6,7-N,N-Dimethyl-Tetrabromobenzimidazol-Amin

Abkürzungen

Proteine

AGC	Kinasegruppe AGC (PKA, PKC, PKG)
BID	BH3-interagierende Domäne
CAMK	Calmodulinabhängige Proteinkinase
CDC37	HSP90 Kochaperon
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CDKL	Cyclin-abhängige Kinase-ähnliche Familie
CK1	Casein Kinase 1
CK2	Casein Kinase 2
GSK	Glycogensynthase-Kinase
MAP	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PKA	Proteinkinase A (oder auch cAMP-abhängige Proteinkinase)
PTEN	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat 3-phosphatase und dual-specificity Protein Phosphatase
TK	Tyrosinkinase
TKL	Tyrosinkinase-ähnliche Familie
STE	Kinasegruppe STE

Zusammenfassung

CK2 ist eine eukaryotische Proteinkinase der CMGC-Familie. Durch ihre pleiotrope Funktion, die ubiquitäre Lokalisation und ihre konstitutive Aktivität (*in vitro*) ist sie ein wichtiges Element in vielen Signalkaskaden. CK2 liegt in der Zelle sowohl als heterotetrameres Holoenzym (bestehend aus zwei katalytischen CK2 α -Untereinheiten und zwei regulatorischen CK2 β -Untereinheiten) als auch als monomeres CK2 α -Protein vor und kann sowohl ATP als auch GTP als Phosphodonor verwenden, ein Alleinstellungsmerkmal unter CMGC-Kinasen.

Die Bedeutung dieser seit vielen Jahrzehnten bekannten Serin/Threonin-Proteinkinase für zentrale Prozesse in der Zelle wurde in den letzten Jahrzehnten immer deutlicher. CK2 hat unter anderem eine wichtige antiapoptotische Funktion, die Krebszellen vor dem Zelltod schützt.

Sowohl wegen ihrer außerordentlichen Eigenschaften als auch durch die medizinische Relevanz ist CK2 Objekt intensiver Forschung. Um einen Beitrag zu den noch offenen Fragen zu leisten, habe ich mich in dieser Arbeit mit den Bindestellen des katalytischen CK2 α -Monomers beschäftigt.

Ich konnte zeigen, dass kleine Unterschiede innerhalb der neuartigen ATP-kompetitiven Töberichfuran-Inhibitoren einen erheblichen Anteil an der Orientierung dieser Inhibitoren an der ATP-Bindestelle haben und dass ein weiterer ATP-kompetitiver Inhibitor (E9) ein außergewöhnliches Bindungsmuster aufweist.

Der als Bisubstratinhibitor entwickelte Inhibitor ARC3140 zeigte in der Kristallstruktur mit CK2 α die überraschende Eigenschaft mit dem ATP-kompetitiven Anteil sowohl an der ATP-Bindetasche als auch an der CK2 α / β -Interaktionsstelle im Kristall zu binden. Diese Bindung an der CK2 α / β -Interaktionsstelle wurde näher charakterisiert und ist kein Kristallisationsartefakt, sondern findet ebenfalls in Lösung statt.

Durch die Kristallisation einer symmetrischen Holoenzymstruktur konnte ich einen Beitrag zum Verständnis der Oligomerisation von CK2 leisten. CK2 β bindet nicht ausschließlich an der primären CK2 α / β -Interaktionsstelle. Es ist ebenfalls eine Affinität für die sekundäre Interaktion der sauren Schleife von CK2 β im Holoenzym zu der basischen Substratbinderegion von CK2 α eines anderen Holoenzym vorhanden. Diese Affinität gibt der länger diskutierten Möglichkeit der Filamentbildung eine strukturelle Basis.

Die N- und C-terminalen Domänen von CK2 α werden durch die Gelenkregion an der ATP-Bindetasche miteinander verbunden. Das monomere humane CK2 α -Protein ist bislang das einzige CK2 α -Protein, bei dem diese Gelenkregion sowohl in einer offenen als auch in einer geschlossenen Konformation kristallisiert wurde. Um einen Einblick in die Funktion dieser Konformationen zu erhalten, wurden vier Proteinvarianten kristallisiert.

Zusammenfassung

Durch die Verknüpfung der Strukturdaten mit Kinetiken dieser Proteinvarianten konnte die Bedeutung einzelner Aminosäurereste für die Konformation herausgestellt werden.

Die Kristallisation von CK2 α mit dem substratkompetitiven Inhibitor Heparin konnte erstmalig die Bindung eines größeren Moleküls an die Substratbindestelle von CK2 α zeigen. Außerdem konnte eine zweite Bindungsstelle für Heparin identifiziert werden und daraus ein Modell für die Heparinbindung an CK2 α im Einklang mit Kinetikdaten der CK2-Literatur postuliert werden.

Summary

CK2 is an eucaryotic protein kinase of the CMGC-family. Due to its pleiotropic function, the ubiquitous localization and a constitutive *in vitro* activity, CK2 is an essential element of many signalling cascades. In the cell, CK2 exists as a heterotetrameric holoenzyme (consisting of two catalytic CK2 α -subunits and two regulatory CK2 β -subunits) but also as monomeric CK2 α -protein and CK2 α can either use ATP or GTP as phosphodonor, which is an outstanding feature for a CMGC-kinase.

Identified decades ago, the importance of this serine/threonine-protein kinase became increasingly clear over the last twenty years. Amongst other functions, CK2 has an important antiapoptotic role which can lead to cell survival in cancer cells. Because of its extraordinary properties and the medical relevance, CK2 has been subjected to intense research. In order to answer open questions, my work focused on the binding sites of the catalytically active monomeric CK2 α .

I could show that small differences within the recently discovered ATP-competitive Töberichfuran-inhibitors have a significant impact on the orientation of the inhibitor within the ATP binding site. Another ATP-competitive inhibitor (E9) shows an extraordinary mode of binding.

Initially developed as a bisubstrate inhibitor, ARC3140 has the unexpected property to not only bind within the ATP binding site but additionally at the CK2 α / β interaction interface within the crystal structure. This extraordinary binding was further characterised and is not merely a crystallisation artifact but also detectable in solution.

I could also contribute to the understanding of the oligomerisation of CK2 by crystallisation of a symmetric holoenzyme structure. CK2 β did not only bind to the primary CK2 α / β interaction site but also formed a secondary interaction between its acidic loop and the basic substrate binding site of CK2 α from another Holoenzyme. This affinity provides a structural basis for a widely discussed filament formation of CK2.

To get an insight into the function of the two known conformations of the hinge region that connects the N- and C-terminal Domain, four protein variants were crystallised. This open and closed conformation had only been shown for human CK2 α crystal structures. Integrating structural and kinetic data, I was able to highlight the importance of individual sidechains for the two different conformations.

The cocrystallisation of CK2 with the substrate-competitive inhibitor heparin is the first structure which includes the binding of a larger molecule to the substrate binding site of CK2 α . Moreover, I was able to identify a second heparin binding site and to postulate a model for heparin binding to CK2 α in agreement with known kinetic data from the CK2-literature.

1. Einleitung

Der eukaryotische Organismus ist ein komplexes Geflecht aus heterogenen, miteinander kommunizierenden Zellen. Um die Entwicklung und Funktionsfähigkeit jeder Zelle sicherzustellen ist eine strikte Regulation von Prozessen sowohl intra- als auch interzellulär absolut notwendig. Diese Regulation findet auf unterschiedlichen Ebenen statt: Zunächst wird die Genexpression reguliert. Ist ein Gen transkribiert kann die entstandene Boten-RNA durch posttranskriptionale Modifikationen verändert werden. Nach der Translation der Boten-RNA zu Protein ist die posttranslationale Modifikation von Proteinen die nächste Regulationsebene. Durch die (teilweise transienten) Modifikationen können Eigenschaften von Proteinen entscheidend verändert und dadurch Einfluss auf Lokalisation, Wechselwirkungen oder auch Aktivität genommen werden.

Eine wichtige posttranslationale Modifikation stellt die Phosphorylierung dar. Bei der Phosphorylierung werden durch die Übertragung einer Phosphogruppe von einem Phosphodonor (meist ATP, seltener GTP oder andere NTPs) auf ein Akzeptormolekül (kleine Moleküle wie Zucker, Proteine) die physischen Eigenschaften dieses Akzeptormoleküls verändert. Dies kann mehrere Folgen haben: die Lokalisation, die Interaktionsfähigkeit mit anderen Molekülen oder die intrinsische Funktion des phosphorylierten Moleküls können verändert werden.

Wird ein Protein phosphoryliert, ist für die Katalyse dieser Reaktion eine Proteinkinase verantwortlich. In eukaryotischen Organismen sind in der Regel eukaryotische Proteinkinasen (ePKs) für diese Aufgabe zuständig (Manning et al. [2002]). Im Folgenden möchte ich sowohl einen Einblick in die Bedeutsamkeit und die Funktionsweise von ePKs im Allgemeinen als auch von CK2 im Speziellen geben und auf für diese Arbeit entscheidende Besonderheiten aufmerksam machen.

1.1. Eukaryotische Proteinkinasen

Eukaryotische Proteinkinasen sind (zunächst in Eukaryoten) als Teil von Signalkaskaden entdeckt worden. Mehr als 500 putative Gene von eukaryotischen Proteinkinasen sind im menschlichen Genom bekannt (Fabbro et al. [2015]). Diese Kinasen wiederum wurden von Manning et al. [2002] nach verschiedenen Kriterien in Familien kategorisiert (vgl. Abb. 1.1). Gene von ePKs stellen zwei Prozent des menschlichen Genoms dar, bis zu 30 % des Proteoms werden phosphoryliert (Manning [2005]).

Innerhalb der ePKs wird zwischen Serin/Threonin-Kinasen und Tyrosin-Kinasen unterschieden, wobei Serin/Threonin-Kinasen für gewöhnlich sowohl Serin- als auch Threonin-Seitenketten phosphorylieren (Pinna und Ruzzene [1996]).

1. Einleitung

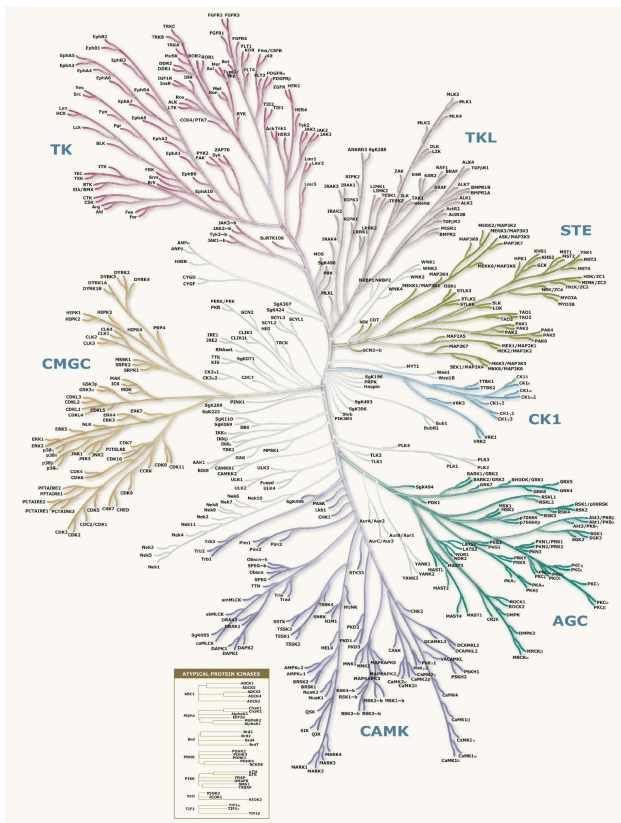


Abbildung 1.1 | Humane eukaryotische Proteinkinasen

Übersicht über alle bekannten ePKs des humanen Proteoms, zu denen sowohl Tyrosinkinase-Familien (TK, TKL) als auch eine Fülle von Serin/Threonin-Kinase-Familien (CAMK, STE, CK1, AGC, CMGC) sowie einige atypische Proteinkinasen gehören (Manning et al. [2002]). Abbildung reproduziert und verändert von dem Poster zu Manning et al. [2002], © 2002, 2006 Cell Signalling Technology, Inc..

Serinreste werden deutlich häufiger phosphoryliert als Threonine, Tyrosine werden am seltensten phosphoryliert (Ser = 1000 zu Thr = 100 zu Tyr = 1; Übersax und Ferrell Jr [2007]). Dies spiegelt wider, dass der Großteil aller ePKs Serin/Threonin-Kinasen sind (Fabbro et al. [2015]). Neben Serin/Threonin-Kinasen und Tyrosinkinase gibt es außerdem Kinasen mit dualer Spezifität, welche alle drei Seitenketten phosphorylieren können (Lindberg et al. [1992]). In jüngerer Vergangenheit konnten ebenfalls ePK-ähnliche Proteinkinasen in Prokaryoten und Archeen nachgewiesen werden (Leonard et al. [1998], Pérez et al. [2008]).

1.1.1. Funktionsweise von ePKs

Die Grundstruktur eukaryotischer Proteinkinasen setzt sich aus einer C-terminalen und einer N-terminalen Domäne zusammen. Die N-terminale Domäne besteht dabei sowohl aus α -Helices, hauptsächlich jedoch aus β -Faltblattsträngen (vgl. Abb. 1.2 (a), sandfarbene Domäne). Die größere C-terminale Domäne wiederum besteht hauptsächlich aus α -Helices (vgl. Abb. 1.2 (a), grüne Domäne). Im Gelenkbereich dieser beiden Domänen bindet sowohl der Phosphodonor als auch das Substrat.

Bei der Katalyse der Phosphorylierung eines Substrats durch eine ePK bindet diese zunächst ein ATP-Molekül, von dem der γ -Phosphat-Rest abgetrennt und die entstandene Energie dazu genutzt wird, diesen Rest auf das gebundene Substrat zu übertragen. Nachdem die Phosphogruppe übertragen wurde, wird das Substrat freigegeben, als letz-

ter Schritt folgt die Freigabe des ADPs. Die Kinase ist nun wieder in der Lage ATP zu binden und ein weiteres Substratmolekül zu phosphorylieren (Ubersax und Ferrell Jr [2007]; vgl. Abb. 1.2 (b)).

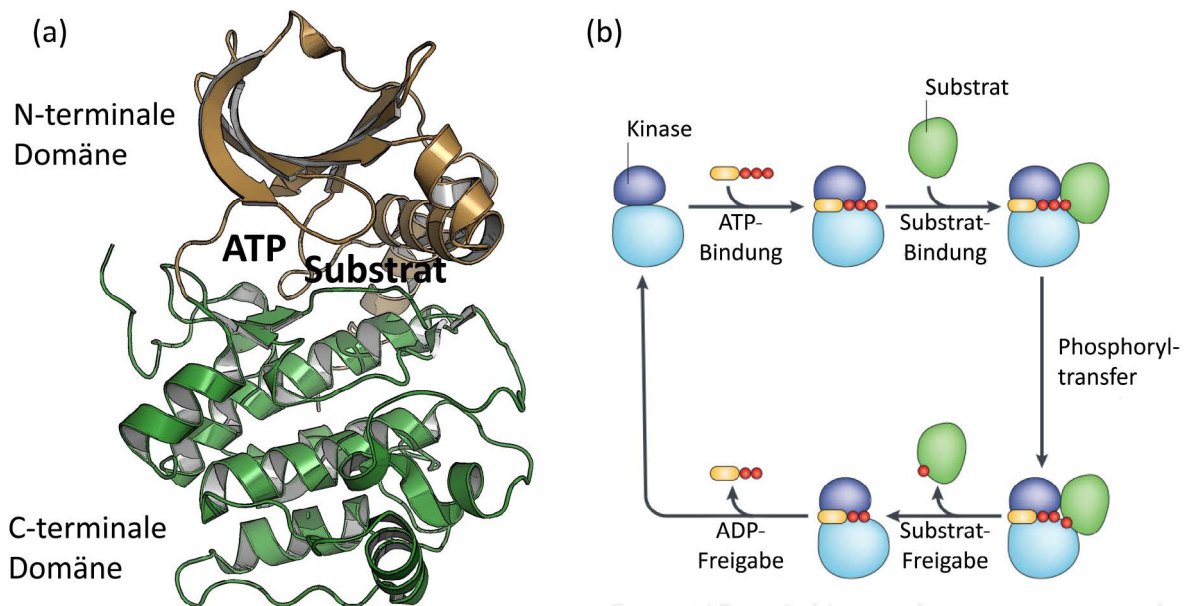


Abbildung 1.2 | Aufbau einer eukaryotischen Proteinkinase – Die Kinasereaktion

(a) EPKs bestehen grundsätzlich aus einer β -Strang-reichen N-terminalen Domäne und einer α -Helix-reichen C-terminalen Domäne. Zwischen diesen beiden Domänen binden sowohl das Kosubstrat als auch das Substrat (dargestellt: PKA; PDB-ID: 1J3H, Akamine et al. [2003]). (b) In einer typischen Kinasereaktion bindet zunächst das Kosubstrat ATP an die Kinase, bevor das Substrat mit diesem Komplex interagiert. Nachdem die Phosphogruppe übertragen wurde, wird das phosphorylierte Substrat entfernt, bevor sich auch das ADP von der Kinase löst (Abb. reproduziert und verändert aus Übersax und Ferrell Jr [2007], mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group).

1.1.2. ePKs in der Medizin

Eukaryotische Proteinkinasen, an nahezu allen Signalkaskaden im menschlichen Organismus beteiligt, sind in der Medizin von Relevanz. Beispielhaft soll hier die erste Kinase vorgestellt werden, die in den Fokus medizinischer Forschung gelangt ist, die Tyrosinkinase ABL.

Bei chromosomalen Auffälligkeiten (Nowell und Hungerford [1960]) in Fällen von chronischer myelotischer Leukämie konnte diese Kinase als Ursache identifiziert werden. Durch eine chromosomale Translokation entsteht eine Fusion eines Teils der bcr-Region (Groffen et al. [1984]) und des abl1-Gens (De Klein et al. [1982]), wodurch ein Fusionsprotein aus BCR und ABL-Kinase exprimiert wird (Ben-Neriah et al. [1986]). Das verkürzte Chromosom 22 wird, nach dem Ort der Entdeckung (Nowell und Hungerford [1960], Nowell [2007]), Philadelphia-Chromosom genannt.

1. Einleitung

Das Fusionsprotein aus BCR und ABL-Kinase, das BCR-ABL-Protein, zeigt Tyrosinkinase-Aktivität. Die Fusion hat dabei besonders Einfluss auf Wechselwirkungen mit anderen Proteinen (Ren [2005]). Die ursprünglichen wichtigen Funktionen der ABL-Kinase im Zellwachstum (Colicelli [2011]) werden dereguliert.

Die BCR-ABL-Kinase war die erste Kinase, für die ein wirkungsvoller Inhibitor entwickelt werden konnte (Buchdunger et al. [1996], Deininger et al. [2005], Ren [2005]): Imatinib (in Europa unter der Bezeichnung Glivec™ von Novartis vertrieben). Imatinib war ebenfalls der erste Kinase-Inhibitor, der für den klinischen Gebrauch zugelassen wurde (Cohen [2002]) und stellte damit einen Wendepunkt dar: Es war der erste Nachweis, dass ePKs (als Proteine großer Homologie mit sehr ähnlichen ATP-Bindestellen) spezifisch inhibiert werden können und inspirierte viele Forscherinnen und Forscher, sich der Entwicklung von Inhibitoren anderer klinisch relevanter Kinasen anzunehmen.

Bis zum Frühjahr 2015 wurden 33 Inhibitoren für verschiedene Krankheiten von der FDA (der amerikanischen Nahrungs- und Arzneimittel-Behörde) für den amerikanischen Markt zugelassen, des Weiteren befinden sich über 130 Kinaseinhibitoren in der zweiten oder dritten klinischen Testphase (Fabbro et al. [2015]).

1.1.3. Entwicklung von Inhibitoren

Die Entwicklung effizienter Inhibitoren für den Einsatz in der Behandlung von menschlichen Krankheiten ist eine herausfordernde Aufgabe, da solche Wirkstoffe einige Anforderungen zu erfüllen haben: Sie müssen mit hoher Affinität an dem Zielmolekül binden und dessen Aktivität effizient verhindern. Dabei ist es von großer Bedeutung, dass der Inhibitor möglichst selektiv hemmt, da eine unspezifische Inhibition zu unerwünschten Nebenwirkungen führen kann. Allerdings können Wirkstoffe auch – bewusst oder unbewusst – gegen mehrere Ziele entwickelt werden.

Des Weiteren muss ein effizienter Inhibitor den Weg von einer Tablette oder Injektion hin zu seinem Zielort überstehen. Dabei gilt es mehrere Hürden zu überwinden: Der Wirkstoff muss, falls oral aufgenommen, in das Blut gelangen und die Halbwertszeit im menschlichen Körper muss ausreichend hoch sein, damit der Inhibitor seinen Wirkort erreichen und wirken kann.

Selbst wenn der Inhibitor seinen Wirkort erreicht, muss er in die Zelle und dort in das Zellkompartiment gelangen, in dem sein Ziel zu finden ist. Teile dieser Anforderungen wurden, nachdem bereits existente Inhibitoren statistisch ausgewertet wurden, 1997 von Lipinski et al. als „rule of five“ zusammengefasst. Dies sind Voraussetzungen, die für eine gute Löslichkeit und Permeabilität von oral verfügbaren Wirkstoffen gegeben sein sollten (Lipinski et al. [1997]):

- Ein Inhibitor sollte ein Molekulargewicht von ≤ 500 Da haben.
- Die Anzahl der Wasserstoffbrücken-Donoren (NH- und OH-Gruppen) ist ≤ 5 .
- Der LogP als Ausdruck für die Lipophilie sollte unter 5 liegen.
- Die Anzahl der Wasserstoffbrücken-Akzeptoren (Summe aus Stickstoff- und Sauerstoffatomen) sollte ≤ 10 betragen.
- Derivate von Substraten biologischer Transporter sind Ausnahmen der Regel.

Da diese von Lipinski et al. [1997] aufgestellten Regeln aus statistisch erhobenen Daten erstellt wurden, muss nicht jeder Inhibitor diesen Regeln folgen, etwa 1/7 aller von der FDA zugelassenen Inhibitoren befolgen diese Lipinski-Regeln nicht (Leeson [2012]). Des Weiteren wurden ebenfalls andere Bewertungssysteme entwickelt (vgl. z. B. Bickerton et al. [2012]). Werden Moleküle auf ihre Tauglichkeit bewertet muss beachtet werden, dass während der Entwicklung von Inhibitoren Zwischenschritte erreicht werden können, die zwar nicht als Wirkstoff selbst geeignet sind, jedoch eine Leitstruktur als Ausgangspunkt für Wirkstoffe darstellen können (Oprea et al. [2001]). Inhibitoren, welche ausgehend von mit dem Zielprotein interagierenden und inhibierenden kleineren Fragmenten (Fragment-Screening, Hajduk und Greer [2007]) entwickelt wurden, können nicht mit der „rule of five“ (Lipinski et al. [1997]) bewertet werden (Lipinski [2004]). Die im Labor *in vitro* und *in vivo* als potent und nebenwirkungsarm identifizierten Inhibitoren müssen in klinischen Studien ihr Potenzial am Menschen erweisen, bevor sie für den Markt zugelassen werden. Auch dort spielen weitere Faktoren eine wichtige Rolle: So kann die Produktion von Wirkstoffen zum Flaschenhals werden, wenn die Produktionskosten nicht von den erwarteten Einnahmen gedeckt werden können.

Besondere Ansprüche an ATP-kompetitive Inhibitoren von Proteinkinasen Entwickelt man ATP-kompetitive Inhibitoren für ePKs (wie z. B. Imatinib) stellt, neben den vorangegangenen Erläuterungen, besonders die Selektivität eine Herausforderung dar. Dies liegt an der außerordentlichen Ähnlichkeit der ATP-Bindetasche von Proteinen dieser Proteinfamilie.

Traxler und Furet identifizierten 1999 in der ATP-Bindetasche von Tyrosinkinasen verschiedene Bereiche, die sich durch besondere Eigenschaften auszeichnen und mit Inhibitoren adressiert werden können (Traxler und Furet [1999]). Dieses Pharmakophor-Modell kann ein wichtiges Hilfsmittel darstellen, um Wirkstoffe für Kinasen unter rationalen Gesichtspunkten zu realisieren (Traxler und Furet [1999], Liu und Gray [2006]).

1. Einleitung

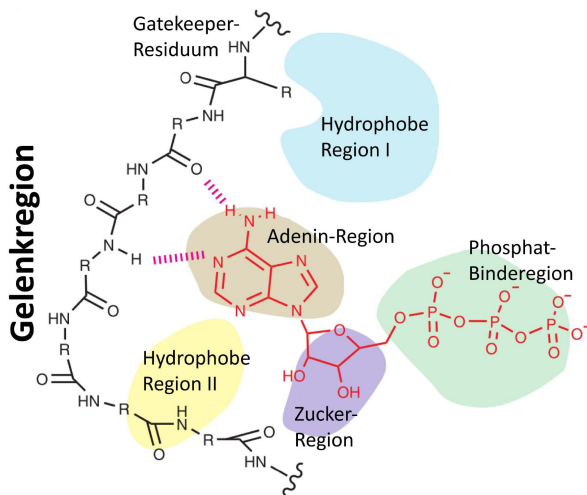


Abbildung 1.3 | Pharmakophor-Modell nach Taylor und Liu

Neben der Interaktion des Nucleotidtriphosphats (in diesem Fall ATP) mit der Gelenkregion wurden fünf Regionen identifiziert, die sich bei Proteinkinasen unterscheiden und durch ATP-kompetitive Inhibitoren adressiert werden können, um Selektivität zu erzeugen (nach Traxler und Furet [1999], Abb. verändert aus Liu und Gray [2006], mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group).

In dem Pharmakophor-Modell werden fünf Regionen in der ATP-Bindetasche unterschieden, die sich in Kinasen nur in kleinen Details unterscheiden (Vulpetti und Bosotti [2004]). Dadurch, dass diese fünf Regionen differenziert adressiert werden, ist es möglich eine hohe Selektivität zu erreichen (vgl. Abb. 1.3).

1.1.4. Regulationsmechanismen bei ePKs

Die meisten eukaryotischen Proteinkinasen sind strikt reguliert, damit eine Deregulation durch Überphosphorylierung der Substrate in der Zelle vermieden wird. Dazu tragen verschiedene Mechanismen bei, die im Folgenden kurz anhand von Beispielen vorgestellt werden: Protein-Protein-Interaktionen, Wechselwirkungen mit sekundären Botenstoffen und Phosphorylierung.

Protein-Protein-Interaktion: Viele Proteinkinasen sind durch Protein-Protein-Interaktionen reguliert. Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) beispielsweise werden durch die Interaktion mit Cyclin aktiviert. Zunächst bindet Cyclin an die Kinase, welche dadurch schwach aktiviert wird. In einem zweiten Schritt wird die Aktivierungsschleife von CDK phosphoryliert, wodurch der CDK-Cyclin-Komplex vollständig aktiviert vorliegt (Pavletich [1999]).

Ein weiteres Beispiel für eine Protein-Protein-Interaktion stellt PKA dar: Diese Kinase liegt in der Zelle als Heterotetramer vor, bestehend aus zwei katalytischen α -Untereinheiten und zwei β -Untereinheiten. Wenn cAMP an die regulatorische β -Untereinheit bindet lösen sich β - und α -Untereinheiten voneinander, das α -Monomer ist aktiv (Taylor et al. [2012a]).

Sekundäre Botenstoffe: Neben cAMP bei PKA sind weitere sekundären Botenstoffe bekannt, die mit Kinasen interagieren: Proteinkinase G (PKG) wird beispielsweise durch cGMP aktiviert (Lohmann et al. [1997]), bei Calmodulin-abhängigen Kinasen (CAMK) ist die Aktivität sowohl von Calmodulin als auch von der Ca^{2+} -Konzentration abhängig

(Braun und Schulman [1995]). Calcium spielt ebenfalls eine Rolle bei der Aktivierung der Proteinkinase C, welche außerdem von Diacylglycerol aktiviert wird (vgl. Newton [2001]).

Phosphorylierung: Bei manchen Kinasen ist eine Phosphorylierung ausreichend: Die p38MAP-Kinase wird, wie viele andere mitogen-aktivierte Kinasen, ausschließlich durch die Phosphorylierung zweier Aminosäuren aktiviert (Raingeaud et al. [1995]).

Es wird deutlich, dass die Regulation von Kinasen vielschichtig ist. Selten ist ein Mechanismus ausreichend für eine effiziente Regulation.

Die Regulation von Proteinkinasen ist in vielen Fällen allerdings noch deutlich komplexer als es aus dem vorangegangenen Erläuterungen erscheinen mag: Neben den primären Phosphorylierungsstellen können sekundäre Phosphorylierungen ebenfalls von Bedeutung sein, außerdem benötigen z. B. manche CDKs (CDK5, CDK6) lediglich die Wechselwirkung mit Cyclin und keine zusätzlichen Phosphorylierungen (Nolen et al. [2004]).

Bei vielen Kinasen, unter anderem der ABL-Kinase (Schindler et al. [2000]) oder der p38MAP-Kinase (Pargellis et al. [2002]), wurde des Weiteren eine „DFG-out“-Konformation beobachtet, bei der die Kinase eine Konformationsänderung des DFG-Motivs (welches eine große Rolle in der Bindung von ATP/GTP spielt, vgl. Abschnitt 1.4.1) erfährt und inaktiviert wird. Diese inaktive Konformation wurde bisher beobachtet, wenn Inhibitoren ausschließlich in der „DFG-out“-Konformation und nicht in der „DFG-in“-Konformation binden (Typ II-Inhibitoren, vgl. Liu und Gray [2006]). In der Zelle nimmt diese Konformation bei vielen Kinasen wahrscheinlich einen geringen Anteil ein (Treiber und Shah [2013]) und kann als Ansatzpunkt von allosterischen Inhibitoren genutzt werden (Badrinarayan und Sastry [2011]).

1.2. CK2

CK2 ist eine ubiquitär exprimierte pleiotrophe Serin/Threonin-Proteinkinase, die essentiell für die Zellviabilität ist. Dabei liegt diese ePK in der Zelle sowohl als monomeres CK2 α als auch als CK2-Holoenzym ($\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer) vor. Dieses Heterotetramer (vgl. Abb. 1.4) setzt sich aus zwei CK2 β -Untereinheiten und zwei CK2 α -Untereinheiten zusammen. Die CK2 β -Untereinheiten, deren Interaktion durch die beiden Zinkfinger-Domänen stabilisiert wird (Chantalat et al. [1999], vgl. Abb. 1.4, blauer Kreis), bilden ein Dimer, welches wiederum zwei CK2 α -Untereinheiten binden kann (Niefind et al. [2001]). Schmetterlingsartig bindet je eine CK2 α -Untereinheit mit einem K_d im niedrigen nM-Bereich (Raaf et al. [2008a], Raaf et al. [2011]) und einer Interaktionsfläche von ca. 1000 Å² (Lolli et al. [2014]) an das CK2 β -Dimer (vgl. Abb. 1.4, pinke Kreise).

1. Einleitung

Beide CK2 β -Untereinheiten sind an der Bindung beider CK2 α -Untereinheiten beteiligt. CK2 α überträgt als katalytische Untereinheit die Phosphogruppe vom Kosubstrat auf das Substrat. Die regulatorische CK2 β -Untereinheit moduliert die Aktivität bezüglich unterschiedlicher Substrate, wobei auch Funktionen außerhalb der Rolle im CK2-Holoenzym diskutiert werden (Bibby und Litchfield [2005], Bjørling-Poulsen et al. [2005], Mentzel et al. [2009]). Binden CK2 β und CK2 α aneinander, so führt dies zu einem Holoenzym, welches deutlich stabiler ist als das CK2 α -Monomer (Cochet und Chambaz [1983], Boldyreff et al. [1993], Raaf et al. [2008b]).

CK2 β stellt strukturell eine Besonderheit dar: Zwar gibt es Proteine mit partiellen Ähnlichkeiten in der Sekundärstruktur (Chantalat et al. [1999]), allerdings sind außer den Stellat-Proteinen aus *Drosophila melanogaster* (Livak [1990]) keine Proteine bekannt, die eine höhere Sequenzähnlichkeit zu CK2 β aufweisen (Pinna [1990]).

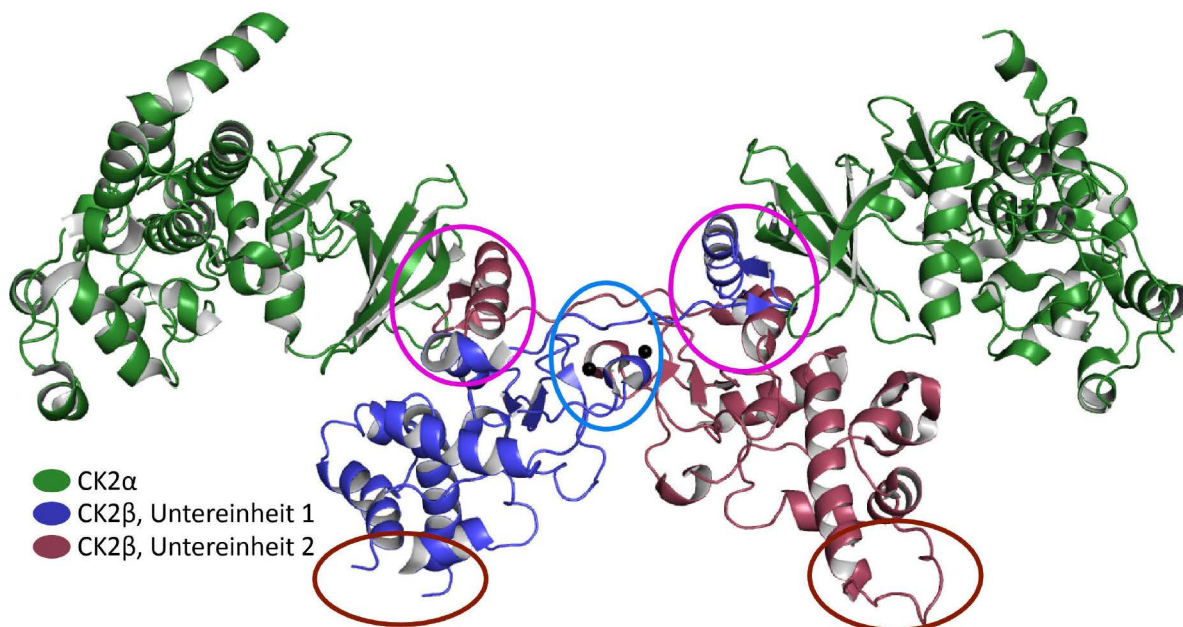


Abbildung 1.4 | Das CK2-Holoenzym

CK2 setzt sich aus einem Dimer von zwei CK2 β -Untereinheiten (blau und rot) zusammen, dessen Festigkeit in großem Maße durch die Interaktion zweier Zinkfinger-Domänen miteinander sichergestellt wird (blauer Kreis). Die sogenannten sauren Schleifen (rote Kreise) sind ungeordnete Bereiche von CK2 β . An dieses Dimer wiederum binden zwei CK2 α -Untereinheiten. Der Kontakt zwischen CK2 α und dem CK2 β -Dimer wird dabei jeweils von beiden CK2 β -Untereinheiten hergestellt (pinke Kreise). Abb. hergestellt mit PDB 1JWH (Niefind et al. [2001]).

1.3. Die Bedeutung von CK2 im eukaryotischen Organismus

In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass CK2 als ubiquitäre Proteinkinase in vielen wichtigen Prozessen in der Zelle und somit auch bei vielen Krankheiten eine zentrale Rolle spielt (für eine Übersicht: Guerra und Issinger [2008], Pinna [2013]). Dabei soll im Folgenden beispielhaft auf zwei unterschiedliche Prozesse und die Rolle von CK2 darin eingegangen werden, um die große Bedeutung von CK2 herauszustellen.

1.3.1. Apoptose

Apoptose ist ein Vorgang, der es dem Organismus ermöglicht, nicht mehr benötigte Zellen geordnet zu entsorgen (Kerr et al. [1972]). Gleichzeitig ist Apoptose ein Prozess, der auch in gesundem Gewebe, zum Beispiel wenn Zellschichten erneuert werden, eine Rolle spielt und unablässig abläuft. In vielen bösartigen Tumoren allerdings ist eine Deregulation der Apoptose ein wichtiger Faktor für Wachstum (Lowe und Lin [2000]). Wird der Ablauf der Apoptose gestört, können Zellen, die normalerweise als schadhaft identifiziert worden wären, nicht dem programmierten Zelltod erliegen.

Die CK2-Gene sind in Krebszellen weder Onkogen noch Proto-Onkogen: Bisher konnten keine Mutationen im CK2 α - oder CK2 β -Gen festgestellt werden, obwohl CK2 in Krebszellen aktiver als im umliegenden Gewebe ist (Issinger [1993], Guerra und Issinger [2008]). Die hohe CK2-Aktivität hat dabei eine sehr komplexe antiapoptotische Wirkung: Zum einen schützt CK2 durch die Phosphorylierung von Proteinen selbige vor dem Verdau durch Caspasen, zum anderen nimmt CK2 direkt und indirekt Einfluss auf die Aktivität von Caspasen. Caspasen sind Proteinasen, die maßgeblich am Ablauf des programmierten Zelltods beteiligt sind und ihre Proteinsubstrate hinter Aspartatresten schneiden. Sie stellen die zentralen Enzyme des programmierten Zelltods dar (McIlwain et al. [2013]).

Die Erkennungssequenzen von CK2 und Caspasen überschneiden sich teilweise, wodurch die Phosphorylierung eines Serin- oder Threoninrestes dazu führen kann, dass Caspasen nicht mehr in der Lage sind, ihre Zielproteine zu verdauen (Duncan et al. [2010], Duncan et al. [2011], Turowec et al. [2011], Turowec et al. [2013]), so dass keine Apoptose eingeleitet wird.

Exemplarisch sei der Transkriptionsfaktor YY1 genannt, welcher durch die Phosphorylierung von CK2 vor der Spaltung durch Caspase 7 geschützt wird (Riman et al. [2012]). Auch im Falle des BID-Proteins wird durch CK1- und CK2-abhängige Phosphorylierung die Spaltung von BID durch Caspase 8 moduliert (Desagher et al. [2001], Hellwig et al. [2010]). PTEN wird ebenfalls durch eine Phosphorylierung von CK2 vor Verdau durch Caspase 3 geschützt (Torres et al. [2003]).

1. Einleitung

Einige Caspasen sind selbst Substrate für CK2: Durch die Phosphorylierung von Caspase 2 kann diese nicht mehr dimerisieren und bleibt dadurch inaktiv (Shin et al. [2005]). Des Weiteren wird Procaspase 3 durch die Phosphorylierung von CK2 davor geschützt durch Caspase 8 und 9 aktiviert zu werden (Duncan et al. [2011]), wodurch Caspase 3-Substrate wie PARP (Chaitanya et al. [2010]) nicht gespalten werden.

Auch indirekt wird die Aktivität von Caspasen inhibiert: Die Phosphorylierung von ARC (das activity-regulated cytoskeleton-associated protein) zum Beispiel führt zu einer Interaktion zwischen ARC und Caspase 8, wodurch dessen Aktivität stark herabgesetzt wird (Li et al. [2002]).

Durch den starken Einfluss auf die Apoptose ist eine erhöhte Aktivität von CK2 in Krebszellen fatal, da Mechanismen, die in der normalen Zelle für den Zelltod verantwortlich wären, ausgeschaltet werden. CK2 wird daher zu einem attraktiven Ziel für die Entwicklung von Inhibitoren, da durch die Inhibition von CK2 auf viele Krebsarten eingewirkt werden kann.

1.3.2. CK2 als zirkadianer Zeitgeber

Neben zentralen Prozessen im menschlichen Körper konnte ebenfalls gezeigt werden, dass CK2 eine wichtige Rolle in der Zeitwahrnehmung von Insekten spielt. Konopka et al. konnten 1991 eine *Drosophila melanogaster*-Variante erstellen, die einen verlängerten Tagesrhythmus aufweist und daher „Andante“ genannt wurde. Die Ursache für den Andante-Phänotyp konnte als eine Mutation im Gen der CK2 β -Untereinheit identifiziert werden, die zu einem Austausch des Methionin 166 zu Isoleucin führt.

Diese Mutation hat zur Folge, dass der Eintritt sogenannter Uhr-Proteine in den Zellkern gestört wird (Akten et al. [2003]). Der M166I-Austausch liegt in der Region von CK2 β , die für die CK2 α/β -Interaktion zuständig ist, es konnten allerdings keinerlei Unterschiede in der Aktivität und im Verhalten zwischen wildtypischem Holoenzym und Andante-Holoenzym gefunden werden (Rasmussen et al. [2005]).

Eine weitere Mutation, die zu einem veränderten Tagesrhythmus bei *Drosophila melanogaster* führt, konnte im CK2 α -Gen gefunden werden. Dabei führen Mutationen im CK2 α -Gen zu zwei Aminosäure-Austauschen im Protein: Met161 zu Lysin und Glu165 zu Aspartat, die daraus resultierende CK2 α -Variante wird Timekeeper genannt. Diese Austausche führen zu einem starken Loss-of-function und dadurch, wie bei der Andante-Mutation, zu einem verlängerten Tagesrhythmus (Lin et al. [2002], Rasmussen et al. [2005]). Beide Untereinheiten, sowohl CK2 β als auch CK2 α , spielen somit eine Rolle im zirkadianen Rhythmus (Blau [2003]), wobei nicht nur die Verminderung der Aktivität der katalytischen Untereinheit zu einem Effekt führt, sondern auch kleinste Veränderungen an der regulatorischen Untereinheit ähnliche Effekte haben können.

Sowohl die Rolle von CK2 in der Apoptose als auch als zirkadianer Zeitgeber stellen kurze Beispiele für die Komplexität und die allgemeine Bedeutung von CK2-Aktivität ohne Anspruch auf Vollständigkeit dar.

1.4. CK2 α – eine CMGC-Kinase

Zu der Familie der CMGC-Kinasen gehören eine Vielzahl von Serin/Threonin-Kinasen, die sich in strukturellen Eigenschaften ähneln (Kannan und Neuwald [2004]). Die Familie besteht im Wesentlichen aus den namensgebenden CDK-, MAP-, GSK- und CDKL-Proteinkinasen. CK2 α findet darin ebenfalls seinen Platz (Manning et al. [2002]), unterscheidet sich allerdings stark von dem Gros der anderen CMGC-Kinasen (Kannan und Neuwald [2004]) und nimmt dadurch gemeinsam mit der paralogen Proteinkinase CK2 α' eine Sonderstellung ein.

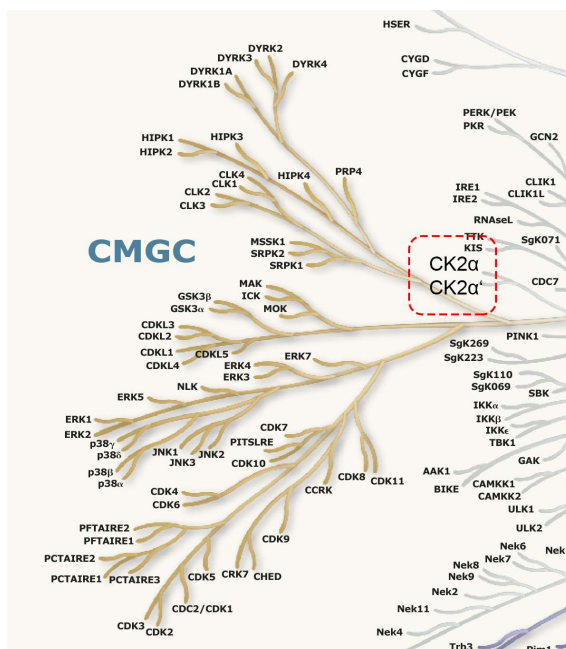


Abbildung 1.5 | CK2 α und CK2 α' in der CMGC-Proteinkinase-Familie

CK2 α und sein Paralog CK2 α' werden zu der CMGC-Proteinkinase-Familie gezählt und sind evolutionär weit entfernt von dem Hauptbaum der CMGC-Kinasen. Abbildung reproduziert und verändert von dem Poster zu Manning et al. [2002], © 2002, 2006 Cell Signalling Technology, Inc.

CK2 α und CK2 α' Diese beiden paralogen Kinasen ähneln sich stark, sowohl in der Primärsequenz der ersten 332 Aminosäuren als auch strukturell (Bischoff et al. [2011a]). Den größten Unterschied zwischen CK2 α und CK2 α' stellt der deutlich verlängerte C-Terminus von CK2 α dar, den CK2 α' nicht besitzt (Lozeman et al. [1990], vgl. A.2). Durch diesen kürzeren C-Terminus hat CK2 α' weniger Phosphorylierungsstellen, die bei der Interaktion mit Proteinen wie z. B. Pin1, einer Peptidyl-Prolyl-Isomerase, eine Rolle spielen (Messenger et al. [2002]). Durch diese Interaktion kann CK2 α am mitotischen Spindelapparat lokalisiert werden, CK2 α' jedoch nicht (St-Denis et al. [2009], St-Denis et al. [2011]).

1. Einleitung

Erste Ergebnisse deuteten darauf hin, dass CK2 α' nicht ubiquitär exprimiert wird, sondern vornehmlich in Gehirn und Testikeln (Guerra et al. [1999b]). Neuere Erkenntnisse deuten allerdings auf eine weitere Verbreitung von CK2 α' hin (vgl. dazu Welker et al. [2015]). Auch gibt es kleinere Unterschiede in der dreidimensionalen Struktur der Kinase-Domäne, CK2 β wird um einen Faktor 10 schwächer gebunden (Bischoff et al. [2011a]). CK2 α und CK2 α' können auch gemeinsam mit CK2 β ein $\alpha\alpha'\beta$ -Holoenzym bilden. Ein reines $\alpha\alpha'\beta$ -Holoenzym ist ebenfalls möglich, zeigt allerdings keine Autophosphorylierung (Olsen et al. [2006]). Des Weiteren ist die Sensitivität der beiden Isoformen gegenüber ATP-kompetitiven Inhibitoren unterschiedlich (Janeczko et al. [2011]), möglicherweise bedingt durch Unterschiede in der ATP-Bindestelle (Bischoff et al. [2011a]). Von CK2 α konnte bis jetzt keine lebensfähige Knockout-Mutante von Mäusen erzeugt werden, da es eine essentielle Rolle während der Embryogenese spielt (Lou et al. [2008]). Anders bei CK2 α' : Dort wird ein Knockout teilweise durch eine stärkere Expression von CK2 α ausgeglichen, die männlichen Tiere sind jedoch infertil (Xu et al. [1999]).

1.4.1. Strukturelle Eigenschaften von CK2 α

CK2 α ist eine ePK und weist somit auch die typische Faltung auf: Eine vornehmlich aus β -Faltblattsträngen bestehende N-terminale Domäne ist über eine Gelenkregion mit einer hauptsächlich aus α -Helices bestehenden C-terminalen Domäne verbunden (vgl. Abb. 1.6). Als CMGC-Kinase trägt die C-terminale Domäne die typische Insertion der Helices α H, α I und α J (Kannan und Neuwald [2004]). Die β 4/ β 5-Schleife in der N-terminalen Domäne ist das zentrale Motiv der CK2 α /CK2 β -Interaktion auf Seiten der CK2 α -Untereinheit. Ein weiteres wichtiges Element der CK2 α -Struktur ist die Aktivierungsschleife. Diese Aktivierungsschleife ist zum einen an der Substratbindung beteiligt, zum anderen bei vielen anderen Proteinkinasen ein wichtiges regulatorisches Element, welches durch Phosphorylierung oder Protein-Protein-Interaktion stabilisiert wird (vgl. Abschnitt 1.1.4).

In CK2 α finden auch Phosphorylierungen innerhalb der Aktivierungsschleife statt, allerdings ist eine solche Phosphorylierung für die Kinaseaktivität von CK2 α nicht obligatorisch (Donella-Deana et al. [2001]). Die Position der Aktivierungsschleife wird in CK2 α durch das N-terminale Segment stabilisiert, sodass sie immer in einer Konformation vorliegt, die der einer aktiven Kinase entspricht (vgl. Abb. 1.6). Deletiert man diesen N-Terminus, so büßt CK2 α Aktivität ein (Sarno et al. [2002a]). Der N-Terminus stellt damit ein wichtiges Element für die konstitutive Aktivität von CK2 α dar.

Das Kosubstrat von CK2 α (ATP oder GTP) wird in der ATP-Bindetasche gebunden, wobei die Purinbase sowohl über Wasserstoffbrückenbindungen zu der Gelenkregion als auch über hydrophobe Interaktionen gebunden wird (vgl. Abb. 1.6, Fenster). Die β - und γ -Phosphogruppen des Nukleotids werden dabei von der glycinreichen Schleife und zwei zweiwertigen Kationen, meist Magnesiumionen, koordiniert. Diese Ionen wiederum werden teilweise durch das DWG-Motiv der Magnesium-Bindeschleife positioniert (DFG in anderen ePKs, Taylor und Kornev [2011]) und haben ebenfalls eine katalytische Funktion (Herberg et al. [1999]).

Das DWG-Motiv ist kritisch für die Aktivität, da das Aspartat an der Bindung beider Kationen beteiligt ist (Kornev und Taylor [2010]). Dadurch, dass CK2 α ein Tryptophan anstelle eines Phenylalanins in diesem Motiv besitzt, ist CK2 α außerdem nicht in der Lage eine „DFG-out“-Konformation einzunehmen (vgl. Abschnitt 1.1.4).

1. Einleitung

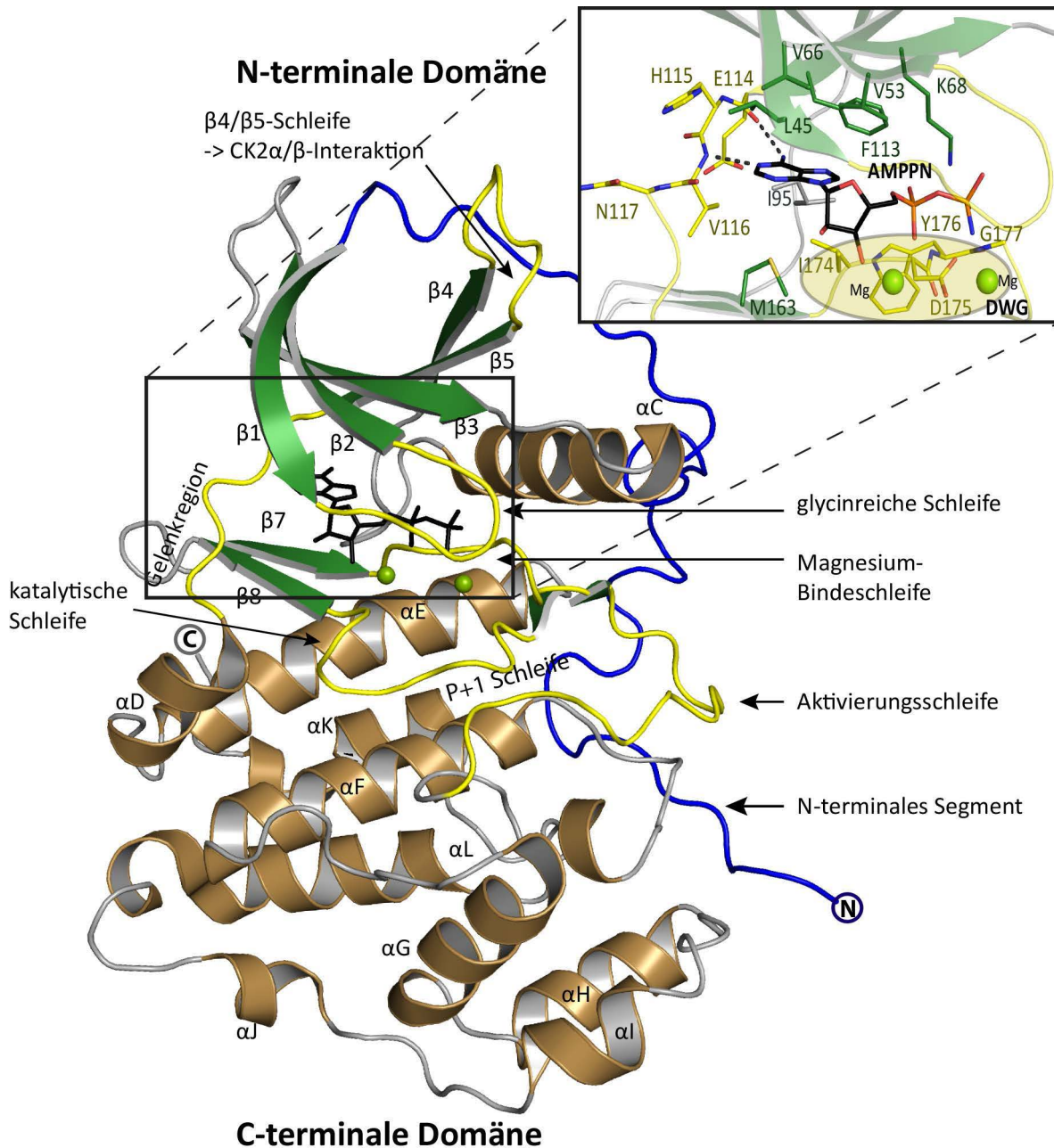


Abbildung 1.6 | Struktur von CK2α

CK2α als ePK weist die typische ePK-Faltung auf, das NTP (in diesem Fall ATP) wird durch die Gelenkregion und hydrophobe Interaktionen koordiniert. Sowohl die glycinreiche Schleife als auch die Magnesium-Bindeschleife sind an der Koordination der Phosphate beteiligt. Die katalytische Schleife und die Aktivierungsschleife binden das Substrat im Bereich der Phosphorylierungsstelle (Sarno et al. [1997b]). Die Helices αH, αI und αJ sind das CMGC-Kinase-typische Insert in der C-terminalen Domäne (Kannan und Neuwald [2004]). Die β4/β5-Schleife ist maßgeblich an der Interaktion mit der regulatorischen CK2β-Untereinheit beteiligt. Das lange N-terminale Segment (blau) interagiert mit der Aktivierungsschleife und stabilisiert die Position derselben. Die Gelenkregion verbindet die C- und N-terminale Domäne. Die Darstellung ist adaptiert von Niefind et al. [2009]; verwendete PDB-ID: 3NSZ (Ferguson et al. [2011]).

1.4.2. Die ATP/GTP-Bindetasche von CK2 α

Sowohl ATP als auch GTP können an der ATP-Bindetasche von CK2 α binden. Diese Bindetasche besteht in erster Linie aus einer Vielzahl hydrophober Reste, durch die die Nukleinbase (Adenin oder Guanin) orientiert wird. Über Wasserstoffbrückenbindungen wird die Nukleinbase ebenfalls an der Gelenkregion gebunden. Die Phosphate werden sowohl durch das DWG-Motiv als auch durch die glycinreiche Schleife koordiniert (vgl. Fenster in Abb. 1.6).

ATP/GTP-Kosubstratspezifität Schon früh konnte gezeigt werden, dass CK2, damals noch Phosvitin-Kinase genannt, sowohl ATP als auch GTP als Kosubstrat verwenden kann (Rodnight und Lavin [1964]). Über die Jahre konnten weitere Zeugnisse dafür erbracht werden, sodass diese (später als duale Kosubstratspezifität bezeichnete (Niefind et al. [1999])) ATP/GTP-Nutzbarkeit zum einen ein Unterscheidungsmerkmal zwischen CK1 und CK2 (z. B. Hathaway und Traugh [1979]) wurde, zum anderen dazu führte, dass CK2 als besondere Kinase unter den eukaryotischen Proteinkinasen Beachtung fand.

Bis heute ist CK2 die einzige bekannte Serin/Threonin-Proteinkinase, für die nachgewiesen wurde, dass ATP ein nur minimal besserer Phospho-Donor als GTP ist (Niefind et al. [1999]). Zwischen CK2 α -Proteinen aus verschiedenen Organismen konnten dabei kleinere Unterschiede festgestellt werden: So kann CK2 α aus Mais auch mit Magnesium als Kation GTP nur unwesentlich schlechter als ATP als Kosubstrat verwenden (Niefind et al. [1999]), bei CK2 α aus *Xenopus laevis* kann die Aktivität durch Austausch des katalytischen Kations (Mg^{2+} , Mn^{2+} oder Co^{2+}) so moduliert werden, dass GTP den besseren Donor darstellt (Gatica et al. [1993]).

Flexibilität der Gelenkregion Strukturelle Argumente für die duale Kosubstratspezifität konnten in der Konformation der Gelenkregion gefunden werden: Nachdem die Gelenkregion in Kristallstrukturen anderer eukaryotischer Proteinkinasen in einer identischen Form vorgefunden wurde (etwa bei PKA (PDB-ID: 1J3H; Akamine et al. [2003])), konnten zunächst diverse Kristallstrukturen von CK2 α (z. B.: *zmCK2 α* : Niefind et al. [1998], Niefind et al. [1999], *hsCK2 α* : Ermakova et al. [2003]) in einer zweiten Konformation (vgl. Abb. 1.7) dargestellt werden. Diese unterscheidet sich fundamental von der typischen ePK-Konformation und war der erste Nachweis einer alternativen Faltung bei einer ePK (Niefind et al. [1998]).

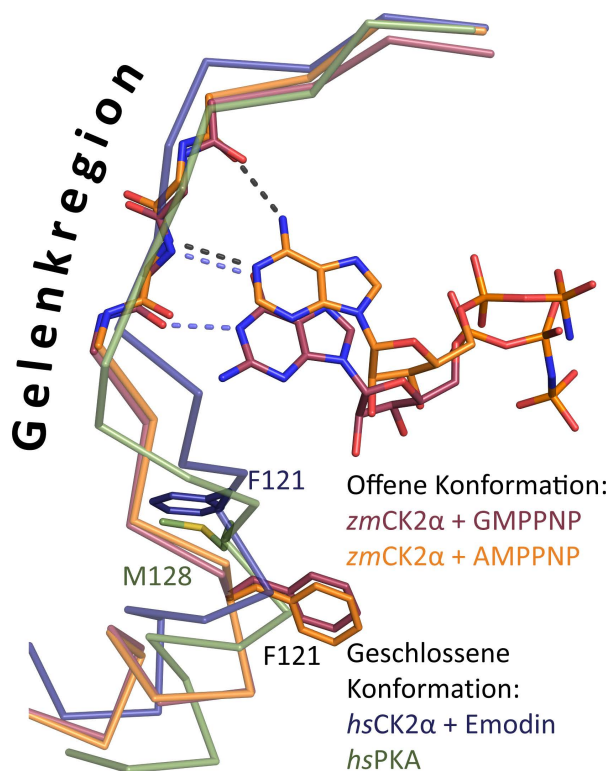


Abbildung 1.7 | Die beiden Konformationen der Gelenkregion von CK2α

In der offenen Konformation sind die humane CK2α (rot, PDB-ID: 3NSZ; Ferguson et al. [2011], AMPPNP gebunden) und die Mais-CK2α (orange, PDB-ID: 1DAY; Niefind et al. [1999], GMPPNP gebunden) in der Lage, entweder ATP oder GTP zu binden. In der geschlossenen Konformation (blau, PDB-ID: 3BQC; Raaf et al. [2008c]), welche bei der humanen CK2α ebenfalls gefunden wurde, wäre eine Bindung von GTP aus sterischen Gründen nicht möglich. F121 stabilisiert durch eine große Konformationsänderung jeweils die offene oder geschlossene Form, in der geschlossenen Konformation entspricht die Position M128 aus PKA (grün, PDB-ID: 1J3H; Akamine et al. [2003]).

Erst mit weiteren Strukturen fiel eine Besonderheit von humanem CK2α auf: Die Gelenkregion wurde in einer geschlossenen Konformation, ähnlich der bekannten ePK-Konformation wie etwa aus PKA bekannt (vgl. Abb. 1.7, grün), vorgefunden (Raaf et al. [2008c]; vgl. Abb. 1.7, blau). Markant dafür ist die Positionsveränderung der Seitenkette des Phenylalanins 121: In der geschlossenen Konformation besetzt diese Seitenkette den selben Raum wie das Methionin 128 in PKA, in der offenen Konformation zeigt Phe121 in die entgegengesetzte Richtung.

Bemerkenswert dabei ist, dass diese geschlossene Konformation nicht mit der aus der *zmCK2α*-GTP-Struktur bekannten Position des GTPs kompatibel ist (Niefind et al. [1999]) und somit GTP nur in der offenen Konformation der Gelenkregion binden kann. Es ist sterisch nicht möglich, dass in der geschlossenen Konformation GTP binden kann, da es mit der Position von Asn118 kollidieren würde.

Im CK2-Holoenzym wurde die wildtypische Gelenkregion sowohl in der geschlossenen (vgl. Lolli et al. [2014]) als auch in der offenen Konformation kristallisiert (vgl. Niefind et al. [2001], Lolli et al. [2012], Lolli et al. [2014], Schnitzler et al. [2014]). Bei gebundenem Nukleotid nahm die Gelenkregion allerdings bisher immer die offene Konformation ein (Niefind et al. [2001], Schnitzler et al. [2014]).

1.4.3. Duale Substratspezifität – Die Substratbindung

CK2 ist in der Lage, die Phosphorylierung von Proteinen an spezifischen Serin- und Threoninseitenketten zu katalysieren. Die Konsensus-Sequenz für die Phosphorylierungsstelle des Substrates wurde dabei von verschiedenen Quellen als sehr acidophil charakterisiert. Gerade an der ersten (P+1) und dritten (P+3) Stelle hinter dem zu phosphorylierenden Serin- oder Threoninrest sind besonders negativ geladene Aminosäuren vorzufinden (Asp, Glu oder Phospho-Ser bzw. -Thr; vgl. Marchiori et al. [1988], St-Denis et al. [2014], Abb. 1.8).

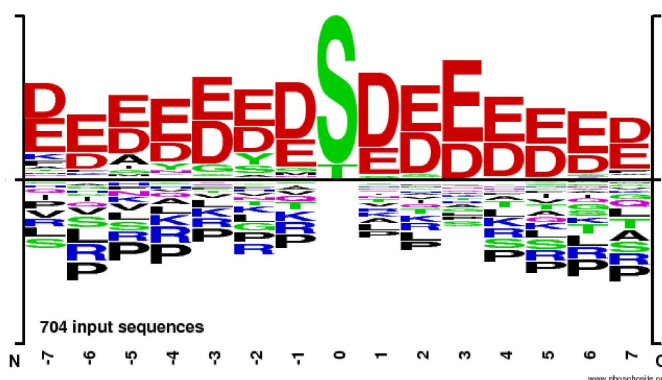


Abbildung 1.8 | Konsensus-Sequenz der CK2-abhängigen Phosphorylierung von Substratproteinen und -peptiden

CK2 α bevorzugt auf allen Positionen vor und hinter der Phosphorylierungsstelle Aminosäuren mit negativen Ladungen. An den Positionen P+1 und P+3 sind negative Ladungen besonders dominant^[1].

Die Minimal-Konsensus-Sequenz für die Substraterkennung ist dabei [S/T]-[D/E]-X-[D/E]. Ob dieser recht kurzen Konsensus-Sequenz kann CK2 eine Unzahl von Substraten phosphorylieren (Meggio und Pinna [2003]).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass CK2 α nicht nur Serin- und Threoninseitenketten phosphorylieren kann, sondern ebenfalls Tyrosinseitenketten. Dies unterscheidet CK2 von dem Gros anderer Serin/Threonin-Kinasen. Wenige als Ser/Thr-Kinase klassifizierte Kinasen verfügen über diese Eigenschaft (Lindberg et al. [1992]).

Die duale Substratspezifität von CK2 wurde Mitte der Neunzigerjahre entdeckt (Chardot et al. [1995], Wilson et al. [1997]) und es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von peptidischen Tyrosin-Substraten deutlich schlechter katalysiert wird als von vergleichbaren Serin-Substraten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Konsensus-Sequenz für Serin/Threonin-Substrate nicht gültig für Tyrosin-Substrate sein muss (Marin et al. [1999], Vilks et al. [2008]).

In den letzten Jahren konnte die Wichtigkeit dieser Tyrosin-Phosphorylierung auch für zelluläre Prozesse nachgewiesen werden (Basnet et al. [2014]). Eine Autophosphorylierung von Tyrosinresten bei CK2 α konnte ebenfalls gezeigt werden (Donella-Deana et al. [2001], Vilks et al. [2008]).

^[1]<http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=798&showAllSites=true>, abgerufen am 10.07.2015

1. Einleitung

Strukturelle Eigenschaften der Substratbindung Bei ePKs findet die Substratbindung zwischen der N- und C-terminalen Domäne statt. Während bei einigen wenigen ePKs bereits Strukturen von Komplexen aus Kinase und Substratpeptid gelöst werden konnten (Brown et al. [1999]: CDK; Zheng et al. [1993]: PKA; Bullock et al. [2005]: PIM1; Lowe et al. [1997]: PHK), konnte für CK2 α noch keine Komplexstruktur ermittelt werden.

Die an der Substratbindung von Serin/Threonin-Substraten beteiligten Residuen von CK2 α wurden daher zunächst durch aufwendige Mutagenese-Studien und mit Hilfe künstlicher Substratpeptide bestimmt (Sarno et al. [1995], Sarno et al. [1996], Sarno et al. [1997a], Guerra et al. [1999a]). Außerdem konnten wichtige strukturelle Informationen von an CK2 α gebundenen Anionen in Kristallstrukturen erhalten werden (Niefind et al. [2007], Raaf et al. [2008c]). So konnten Niefind et al. 2007 zeigen, dass Seitenketten von CK2 α das Substrat an den Positionen P+1 und P+3 binden, an denen in dem veröffentlichten Strukturmodell (PDB-ID: 2PVR) zwei Sulfat-Ionen binden (vgl. Abb. 1.9).

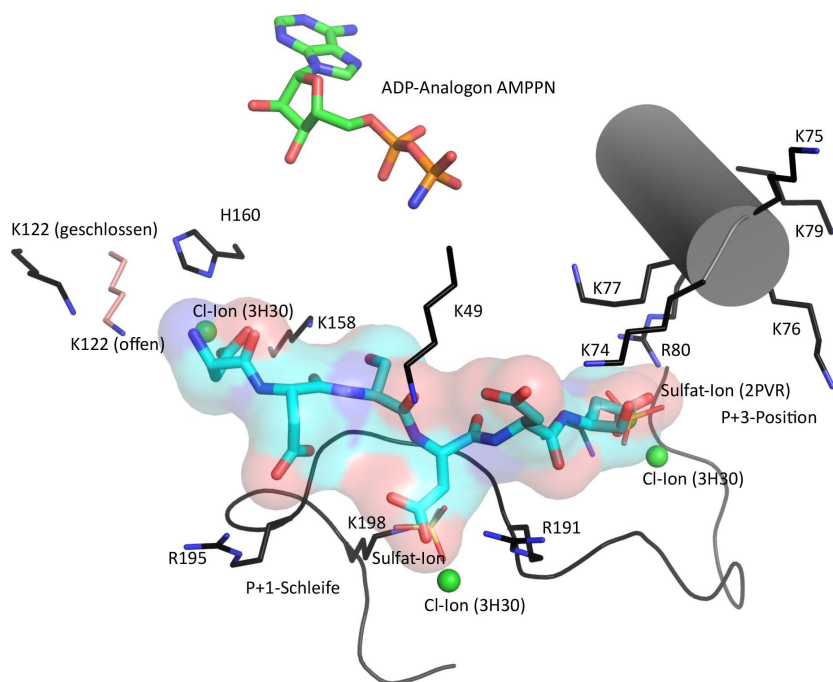


Abbildung 1.9 | Die Substratbindestelle

Strukturmodell eines ternären Komplexes aus CK2 α , ADP-Analogen und einem Substratpeptid (DDSDDD). Sowohl Sulfat-Ionen (Niefind et al. [2007]) als auch Chlorid-Ionen (grün, Raaf et al. [2008a]) wurden bereits mit CK2 α kokristallisiert, das ADP-Analogen wurde von der PDB-ID: 3NSZ (Ferguson et al. [2011]) verwendet. Von Lys122 sind die Positionen in der geschlossenen und der offenen Konformation der Gelenkregion angegeben (vgl. 1.4.2). Die Abbildung ist angelehnt an Niefind und Battistutta [2013], das Modell des Substratpeptids wurde von Niefind et al. [2007] veröffentlicht.

Aus allen verfügbaren Informationen wurde 2007 von Niefind et al. ein Modell erstellt (vgl. Abb. 1.9), nach dem folgende Aminosäurereste an der Bindung des Substrates von Position P-2 bis P+3 beteiligt sind: An der Bindung von der P+1-Position sind vor allem die Aminosäuren Arg191, Arg195 und Lys198 beteiligt, an der Bindung von Position P+3 hauptsächlich Arg155, Arg80 und Lys77. Die Positionen P-2 und P-1 des Substratpeptids werden von Lys122, Lys158 und His160 gebunden.

1.4.4. Die CK2 α /CK2 β -Interaktion

Primäre Interaktion Im CK2-Holoenzym (vgl. Abb. 1.4) binden beide CK2 α -Untereinheiten an ein CK2 β -Dimer, wobei beide CK2 β -Protomere an der Bindung beteiligt sind (vgl. Abb. 1.10 (a)). Jedes CK2 α -Molekül bindet sowohl an den C-Terminus des einen CK2 β -Protomers als auch an einen zentralen Bereich des anderen CK2 β -Protomers (Niefind et al. [2001], vgl. Abb. 1.10 (a)).

CK2 β wird an der N-terminalen Domäne von CK2 α gebunden. Bei der Bindung spielen vor allem die fünf β -Faltblattstränge eine wichtige Rolle. Residuen der β -Faltblattstränge 1-3 bilden hydrophobe Interaktionen mit Seitenketten der CK2 β -Protomere aus. Eine besondere Rolle kommt der β 4/ β 5-Schleife zu: Im Holoenzym liegt diese Schleife in der (in Abb. 1.10 (a) dargestellten) offenen Konformation vor, kann aber ebenfalls eine geschlossene Konformation einnehmen.

In der geschlossenen Konformation dieser Schleife besteht sterisch keine Möglichkeit, dass CK2 β an CK2 α bindet, da die Tasche, in die die Residuen Tyr188 und Phe190 des CK2 β -Protomers weisen, sterisch nicht erreichbar ist. In allen bisher veröffentlichten Holoenzym-Strukturen liegt diese Schleife in der geöffneten Konformation vor, bei Strukturen des CK2 α -Monomers konnten sowohl geschlossene als auch geöffnete Konformationen festgestellt werden. Die Bindung zwischen CK2 α und CK2 β ist trotz der kleinen Interaktionsfläche recht stark (K_d im niedrigen nM-Bereich, vgl. Raaf et al. [2008b], Raaf et al. [2011]) und führt zu einem stabilen Holoenzym.

Sekundäre Interaktionen Im CK2-Holoenzym werden weitere Interaktionen diskutiert: Es konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus von CK2 β autophosphoryliert wird und dies eher wie ein intramolekularer Vorgang abläuft (Meggio und Pinna [1984]), es sich tatsächlich jedoch um eine intermolekulare Trans-Autophosphorylierung zu handeln scheint (Pagano et al. [2005]). Des Weiteren konnte in Kristallstrukturen gezeigt und mit biochemischen Daten unterlegt werden, dass es eine Affinität der sauren Schleife (vgl. Abb. 1.4, Boldyreff et al. [1993], Leroy et al. [1997]) und des C-Terminus (Lolli et al. [2012]) von CK2 β gegenüber der Substratbindestelle von CK2 α gibt (vgl. Abb. 1.10 (b)). Diese sekundären Interaktionen werden als wichtiger Bestandteil für die Formierung von CK2-Holoenzym-Filamenten angesehen (vgl. dazu Abb. 1.4.5).

1. Einleitung

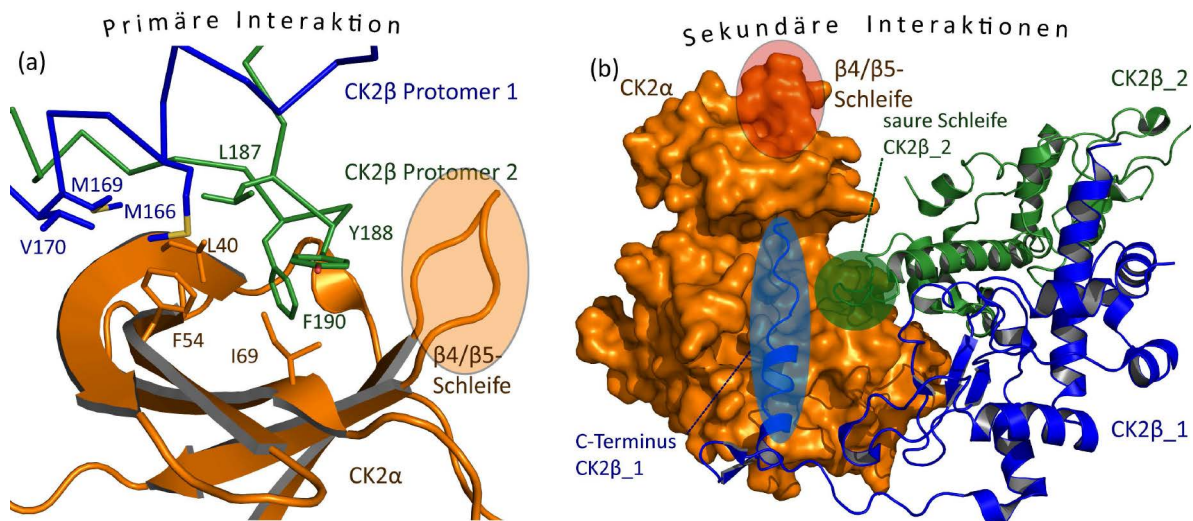


Abbildung 1.10 | Primäre und sekundäre Interaktionen zwischen CK2 α und CK2 β

(a) Beide CK2 β -Protomere eines Holoenzym interagieren mit einem CK2 α -Protomer, wobei F190 eines CK2 β -Protomers in eine Tasche von CK2 α ragt, das zweite CK2 β -Protomer bindet oberflächlicher. Die β 4/ β 5-Schleife von CK2 α muss in der geöffneten Konformation vorliegen. (b) Für die saure Schleife von CK2 β wird eine intermolekulare Interaktion mit der positiv geladenen Substratbindestelle von CK2 α postuliert (vgl. Rekha und Srinivasan [2003], Pagano et al. [2005], Niefind und Issinger [2005]). Auch der C-Terminus von CK2 β zeigte in einer Kristallstruktur eine Affinität zu CK2 α (Lolli et al. [2012]). Verwendete PDB-ID: 4DGL (Lolli et al. [2012]).

1.4.5. Regulation und die konstitutive Aktivität von CK2

Die Aktivität von CK2 ist in vielerlei Hinsicht komplex reguliert: Bildet sich das Holoenzym aus CK2 α -Monomeren und CK2 β -Dimeren, so führt dies mitnichten zu einer on/off-Regulation wie zum Beispiel bei der Disintegration des PKA-Tetramers durch die Bindung von cAMP an der regulatorischen Untereinheit (Taylor et al. [2012a]).

Im Gegensatz konnte gezeigt werden, dass die stabile Interaktion (Raaf et al. [2008b]) zwischen CK2 α und CK2 β einen Einfluss auf Aktivität, Stabilität (Grankowski et al. [1991], Meggio et al. [1992b]) und Substratspezifität (Meggio et al. [1992b], Pinna [2003], Poletto et al. [2008]) hat. Der Einfluss auf die Substratspezifität kann dabei so eklatant sein, dass erst die Assemblierung des Holoenzym zu Aktivität führt, sodass man tatsächlich von einer on/off-Regulation sprechen kann. Diese Regulation kann allerdings wiederum von Aktivatoren moduliert werden (wie im Fall des Substrats Calmodulin, vgl. Abschnitt 1.6). Im Allgemeinen ist das Holoenzym aktiver als das CK2 α -Monomer.

Von CK2 α ist keine „DFG-out“-Konformation, wie man sie zum Beispiel von der p38MAP Kinase (Pargellis et al. [2002], vgl. Abschnitt 1.1.4) kennt, möglich, da CK2 α an Stelle des DFG-Motivs ein DWG-Motiv besitzt (vgl. Abschnitt 1.4.1). CK2 α wird ebenfalls nicht durch eine Konformationsänderung der Aktivierungsschleife wie etwa bei CDK durch die Bindung von Cyclin (Pavletich [1999]) aktiviert. Die Aktivierungsschleife bei CK2 α wird durch ein N-terminales Segment in seiner Konformation (vgl. Abb. 1.6) ent-

sprechend der aktiven Konformation von CDK stabilisiert (Niefind et al. [1998]) und führt so zu einer konstitutiv aktiven Kinase.

Für eine Regulation der CK2-Aktivität werden zwei weitere Möglichkeiten diskutiert: Regulation durch Lokalisation und Regulation durch Oligomerisation.

Lokalisation Die Lokalisation von CK2 spielt eine große Rolle, da durch die Pleiotropie von CK2 in allen Zellkompartimenten Substrate von CK2 zu finden sind (Olsten und Litchfield [2004], Olsten et al. [2005]). Über die Lokalisation der CK2-Untereinheiten könnte somit ebenfalls die Phosphorylierung von Substraten beeinflusst werden. Sowohl CK2 α als auch CK2 β konnten allerdings bislang in allen getesteten Zelltypen des Körpers und dort auch in allen Zellkompartimenten nachgewiesen werden (Faust und Montemarh [2000], Issinger [1993]), jedoch in einigen Fällen mit Hinweisen auf freie Monomere (Guerra et al. [1999b], Faust et al. [2001]). Des Weiteren konnte CK2-Aktivität außerhalb der Zelle gefunden werden, ein Hinweis auf Ektokinase-Funktion (Faust und Montemarh [2000]).

Außerdem konnte für CK2 α eine Kolokalisation mit Tubulin bzw. Centrosomen (Faust et al. [1999], Faust et al. [2002]) für alle drei Untereinheiten zum Endoplasmatischen Retikulum und zum Golgi-Apparat (Faust et al. [2001]) gezeigt werden.

Unterschiede in der Lokalisation von CK2 α und CK2 α' lassen sich teilweise auf Sequenzunterschiede zurückführen (vgl. dazu Abschnitt 1.4). CK2 α kann durch einen längeren C-Terminus mit Phosphorylierungsstellen am mitotischen Spindelapparat lokalisiert werden, CK2 α' jedoch nicht (St-Denis et al. [2011]). In den meisten Fällen werden CK2 α und CK2 β gemeinsam detektiert, was auf stabile heterotetramere Komplexe in einem Großteil der Zellen hindeutet.

Oligomerisation Schon 1986 konnte von Glover gezeigt werden, dass das heterotetramere CK2 *in vitro* Filamente bildet und dass diese Filamente von der Salzkonzentration abhängig sind. Diese Aggregate konnten ebenfalls von Valero et al. [1995] nachgewiesen werden, wobei gezeigt wurde, dass ab einer Salzkonzentration von 0,4 M NaCl keinerlei Aggregate zu sehen sind. Bei niedrigeren Salzkonzentrationen konnten verschiedene Arten von Aggregaten detektiert werden, deren Formen unterschiedlich sind: Je niedriger die Salzkonzentration, desto größer die Aggregate. Daraus postulierten Valero et al. vier verschiedene Aggregatsformen (vgl. Abb. 1.11).

1. Einleitung





Molekulare Form	Protomer	Ringstruktur	Dickes Filament	Dünnes Filament
Putatives Modell	 $\alpha_2\beta_2$	 $(\alpha_2\beta_2)_4$	 $((\alpha_2\beta_2)_4)_n$	 $(\alpha_2\beta_2)_n$

Abbildung 1.11 | Postulierte Oligomere

Valero et al. postulierten 1995 vier Formen von möglichen CK2-Formen, von dem protomeren Holoenzym bis hin zu dünnen und dicken Filamentstrukturen. Abbildung aus Valero et al. [1995] reproduziert und verändert, mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Alle von Valero et al. [1995] spezifizierten Formen sind katalytisch aktiv, wobei die Zugabe von 20 mM Magnesiumchlorid oder 1 mM Spermin zu der Bildung von Ringstrukturen führte, die deutlich aktiver sind als längliche Filamente (Valero et al. [1995]). Sowohl die Art der Interaktion (vgl. Abschnitt 1.4.4) als auch die Rolle dieser Oligomerisation *in vivo* bei der Regulation ist allerdings nicht geklärt und aktueller Forschungsgegenstand (Lolli et al. [2012], Lolli et al. [2014], Schnitzler et al. [2014], Hübner et al. [2014]).

1.5. Inhibition von CK2

1.5.1. Inhibition durch Heparin

CK2 α hat als acidophile Proteinkinase viele basische Reste, an denen negativ geladene Moleküle binden können. Viele negativ geladene Kohlenhydrate wurden als Interaktoren von CK2 identifiziert, zu denen neben 2,3-Diphosphoglycerat (Hathaway und Traugh [1982]) und Inositolhexakiphosphat (Lee et al. [2013]) auch Heparin gehört.

Heparin ist ein effizienterer Inhibitor von CK2 als andere Polysaccharide wie Heparansulfat, Dermatansulfat (Hathaway et al. [1980]) oder auch Hyaluronsäure (Feige et al. [1980]). Dadurch unterscheidet sich CK2 von vielen anderen Proteinkinasen, sodass zu Beginn der Proteinkinase-Forschung die Eigenschaft von CK2 α , von Heparin inhibiert zu werden, zur Klassifikation und Identifikation von CK2 verwendet wurde (Rose et al. [1981]). Später konnte die Bindung von Heparin an CK2 α charakterisiert werden. Bei der Inhibition durch Heparin sind sowohl ein konserviertes Cluster aus Lysin (Lys74-Lys77) der Helix α C als auch zwei Arginine und ein weiteres Lysin der Aktivierungsschleife (Arg191, Arg195 und Lys198) beteiligt (Vaglio et al. [1996]).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Inhibition abhängig von dem verwendeten Substrat und der Länge des Heparins ist. Während die Länge des Saccharids einen

positiven Einfluss auf die Inhibition von CK2 hat (je länger das Saccharid desto stärker die Inhibition), ist der Einfluss auf verschiedene Substrate komplexer: Bei einem synthetischen, stark negativ geladenen Peptid stimmt die inhibitorische Bindestelle nicht mit der Peptidsubstrat-Bindestelle überein, ein produktiver Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex kann existieren (O'Farrell et al. [1999]). Im Gegensatz dazu ist die Inhibition von CK2 α in Bezug zu einem Proteinsubstrat wie Casein kompetitiv (Hathaway et al. [1980], O'Farrell et al. [1999]). Diese Substratabhängigkeit weist, im Gegensatz zu den beiden identifizierten Clustern, auf eine von der eigentlichen Substratbindungsstelle entferntere Bindestelle von Heparin hin, wodurch zwar Interaktionen mit Proteinsubstraten inhibiert werden, kurze peptidische Substrate allerdings relativ ungehindert parallel zu Heparin mit CK2 α interagieren können (O'Farrell et al. [1999]).

1.5.2. ATP-kompetitive Inhibitoren

Für CK2 wurden weitere Naturstoffe als Inhibitoren entdeckt, bei denen in erster Linie sekundäre Pflanzenstoffe (Hematein (Hung et al. [2009]), Ellagsäure (Cozza et al. [2006]), Anthrachinonderivate wie Emodin (Yim et al. [1999]) oder Flavone wie Apigenin (Sarno et al. [2002b])) zu nennen sind.

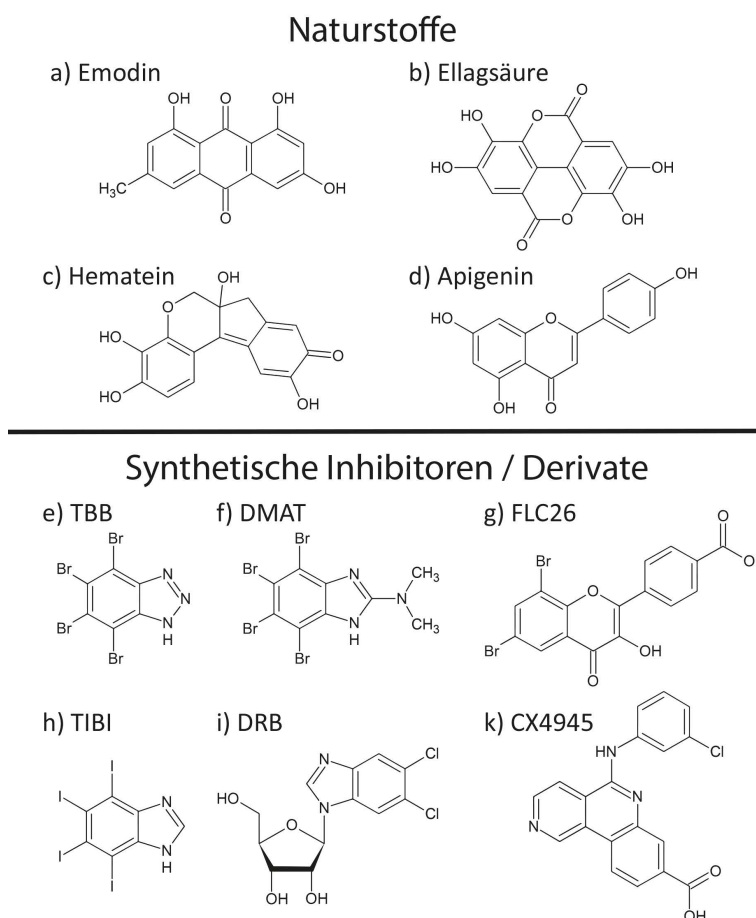


Abbildung 1.12 | ATP-kompetitive Inhibitoren

Strukturformeln einiger ATP-kompetitiver Inhibitoren; (a - d) Naturstoffe: Emodin (ein Anthrachinonderivat), Ellagsäure, Hematein, Apigenin (ein Flavon); (e - k) synthetische CK2-Inhibitoren: TBB, DMAT, FLC26, TIBI, DRB und CX4945.

1. Einleitung

Als erster synthetischer Inhibitor von CK2 wurde 1986 das Nucleotidanalogen 5,6-Dichlororibofuranosylbenzimidazol (DRB) (Zandomeni et al. [1986]) entdeckt, aus dem in den folgenden Jahren weitere halogenierte Derivate wie TBI (Sarno et al. [2001]), TBB (Zieñ et al. [2003]), DMAT (Pagano et al. [2004]) oder TIBI (Gianoncelli et al. [2009]) entwickelt wurden. Ein weiterer synthetischer Inhibitor ist CX4945, ein erster Inhibitor in klinischen Studien (Pierre et al. [2011a]).

Das Flavon Apigenin diente bereits als Leitstruktur für das Design von effizienten CK2-Inhibitoren. Ausgehend von diesem Inhibitor konnten, gekoppelt mit einer gezielten Halogenierung, weitere Inhibitoren mit sehr guten Bindeeigenschaften entwickelt werden. Dadurch konnte z. B. die Konzentration, die für eine halbmaximale Aktivität benötigt wird (IC_{50}), von 0,8 μ M bei Apigenin (Sarno et al. [2002b]) auf 9 nM bei FLC26 durch strukturbasiertes Design reduziert werden (Golub et al. [2011]).

1.5.3. Inhibitoren in der klinischen Anwendung

Silmitasertib Ein erster synthetischer Wirkstoff, der in vorklinischen Studien getestet wird und wurde, ist Silmitasertib. Dabei handelt es sich um den Inhibitor CX4945 (Pierre et al. [2011a], vgl. Abb. 1.12 (k)), optimiert ausgehend von einem aus einer Inhibitor-Bibliothek entnommenen Stoff (4-oxo-4,5-dihydrothieno[3,2]-quinolin-7-carbonsäure, Pierre et al. [2011b]). Dieser Stoff inhibiert CK2 α mit einem IC_{50} -Wert von 1 nM (Pierre et al. [2011b]). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass dieser Inhibitor oral verfügbar gemacht werden kann und in vielen Tumoren eine antiproliferative Wirkung zeigt (Siddiqui-Jain et al. [2010]).

In den letzten Jahren wurden die klinischen Studien zu Silmitasertib umgelagert, von der Verwendung als Einzelwirkstoff hin zu Studien in denen Silmitasertib als Kombinationspräparat gemeinsam mit Cisplatin (Rosenberg [1973]) oder Gemcitabin (Heinemann et al. [1988]) verwendet wird (Senhwa Biosciences [2015]). Sowohl Cisplatin als auch Gemcitabin sind etablierte Cytostatika, es bleibt abzuwarten als wie effektiv sich diese kombinierte Gabe erweist.

CIGB-300 CIGB-300 ist ein peptidischer Inhibitor, der an das zellpenetrierende Tat-Peptid gekoppelt wurde. Bei der Entwicklung war das Ziel einen peptidischen Inhibitor zu entwickeln, der nicht an CK2, sondern an potenzielle Substrate bindet. *In vitro* konnte eine reduzierte Phosphorylierung durch CK2 gezeigt werden, *in vivo* wirkte CIGB-300 sowohl proapoptotisch als auch antitumoral (Perea et al. [2004], Perea et al. [2008]). Dieser Inhibitor wurde in ersten vorklinischen Studien eingesetzt (Solares et al. [2009]). Es konnte gezeigt werden, dass nicht alle CK2-Substrate von CIGB-300 geblockt werden. Hauptziel scheint Nucleophosmin zu sein, welches vor der Phosphorylierung durch CK2 geschützt wird. CIGB-300 wird von Tumoren aufgenommen, die innerhalb eines Jahres sehr stark schrumpfen können (Perera et al. [2008], Perea et al. [2011]).

Ähnlich wie Silmitasertib gehen auch bei CIGB-300 aktuelle Entwicklungen in Richtung einer Verwendung als kombiniertes Präparat, gemeinsam mit Cytostatika wie Cisplatin (Perera et al. [2014]).

1.5.4. Bisubstratinhibitoren

Um ein höheres Maß an Effizienz und Selektivität zu erzielen, wurden erste Bisubstratinhibitoren gegen ePKs entwickelt (Lavogina et al. [2010]). Dazu nutzt man an ATP-kompetitive Inhibitoren gekoppelte Substratderivate. Dieser Ansatz hat den Vorteil, dass eine hohe Selektivität dadurch erzeugt wird, dass das Molekül an zwei Stellen des Zielinhibitors binden kann. Diese Inhibitoren sind somit nicht nur ATP-, sondern ebenfalls substratkompetitiv.

Durch die starke Acidophilie von CK2 kann sich ein solches Verfahren als zielführend erweisen, da der substratkompetitive Teil sehr spezifisch für CK2 α angefertigt werden kann.

Diese Inhibitoren erfüllen allerdings nicht die „rule of five“ (Lipinski et al. [1997], vgl. 1.1.3) und der peptidische Teil des Inhibitors kann sehr anfällig gegenüber Proteasen sein. Solche Inhibitoren können ebenfalls als Ausgangspunkt für die Entwicklung von Methoden verwendet werden, da an den peptidischen Teil relativ einfach funktionale Gruppen wie zum Beispiel fluoreszierende Moleküle integrierbar sind. Solche CK2-Inhibitoren werden bereits in Fluoreszenzanisotropie-Assays eingesetzt, um neue Inhibitoren effizient charakterisieren zu können (Enkvist et al. [2012]).

1.5.5. Inhibitoren der CK2 α / β -Interaktion

Bei der Analyse des Inhibitors DRB (vgl. Abb. 1.12) wurde in der Kristallstruktur eine zweite Bindestelle neben der ATP-Bindestelle identifiziert. Diese Bindestelle entspricht der der CK2 α / β -Interaktionsstelle. In anderen Kristallstrukturen kann dort Glycerol gebunden sein (Raaf et al. [2008a]).

Diese Bindestelle konnte in der Folgezeit auch mit weiteren Inhibitoren adressiert werden. Dabei erschien ein zyklisches Peptid, welches die CK2 β -Seite der Interaktion imitiert, als sinnvoller und effizienter Inhibitor (Laudet et al. [2008]). Genau wie bei CK2 β ragt ein Phenylalanin dieses zyklischen Peptids in die Bindetasche (vgl. Abb. 1.10 (a)). Bei der Analyse dieses Inhibitors zeigte sich, dass dieses zyklische Peptid in der Lage ist, die Interaktion zwischen CK2 α und CK2 β effizient zu inhibieren (Raaf et al. [2013]). Für die Analyse weiterer Interaktoren wurde auf Grundlage dieses zyklischen Peptids ein Test entwickelt (Hochscherf et al. [2015]).

1.6. Aktivatoren von CK2

CK2 kann nicht nur inhibiert, sondern ebenfalls aktiviert werden. Dabei haben besonders positiv geladene Moleküle einen Einfluss auf die Aktivität. Schon 1977 konnte Mäenpää zeigen, dass CK2 unter anderem von Spermin und Spermidin aktiviert wird. Kurze Zeit darauf konnten diese Ergebnisse bekräftigt werden (Cochet et al. [1980]), bei niedrigen Konzentrationen kann auch ein inhibitorischer Effekt von Heparin aufgehoben werden (Feige et al. [1980]).

Eine *in vivo*-Aktivierung in Zellen mit hohem Spermidin- oder Spermingehalt wie Retikulozyten oder Erythrozyten scheint dabei möglich (Hathaway und Traugh [1984]). Auch andere basische Polypeptide wie Polylysin sind in der Lage, CK2 zu aktivieren und die Autophosphorylierung und Oligomerisation zu beeinflussen (Meggio et al. [1983]).

Diese Polypeptide sind ebenfalls in der Lage, einen Einfluss auf die Substratspezifität zu nehmen: Das CK2-Substrat Calmodulin wird ohne Polylysin von CK2 α gut phosphoryliert, für das Holoenzym stellt es ein schlechtes Substrat dar. Anders ist es gemeinsam mit Polylysin: Monomeres CK2 α wird nicht von Polylysin aktiviert, Calmodulin bleibt ein gutes Substrat. Das Holoenzym wird in Bezug auf das Substrat Calmodulin von Polylysin stark aktiviert (Meggio et al. [1992a], Bidwai et al. [1993]). Allerdings ist Spermin in der Lage, diese Aktivierung des Holoenzym wieder aufzuheben (Sarno et al. [1993]).

1.7. Zielsetzung

CK2 ist eine Proteinkinase, deren komplexe Funktion weder *in vivo* noch auf struktureller Ebene gänzlich verstanden wird. Wie ich in der Einleitung aufzeigen konnte, ist CK2 in vielerlei Hinsicht aktueller Forschungsgegenstand. Viele Eigenschaften von CK2 wurden bereits intensiv untersucht, allerdings blieben einige Fragen bisher unbeantwortet, denen ich mich in dieser Arbeit widmen möchte.

- Einige ATP-kompetitive Inhibitoren von CK2 sind ebenfalls in der Lage die PIM-Kinasefamilie zu inhibieren (vgl. López-Ramos et al. [2010], Cozza et al. [2014]). Hier ist es Ziel erste strukturelle Informationen über PIM3 zu sammeln.
- Die Entwicklung ATP-kompetitiver Inhibitoren gegen CK2 nimmt immer weiter Züge an, sodass ein erster Inhibitor (Silmitasertib, vgl. Pierre et al. [2011b]) bereits in klinischen Studien getestet wird. Es muss jedoch weiter Ziel bleiben, neue Inhibitoren zu entdecken und (weiterzu-) entwickeln, um die Inhibition von CK2 im medizinischen Einsatz gegen Krebs bestmöglich nutzen zu können. In dieser Arbeit sollte ein Beitrag dazu geleistet werden, indem die strukturellen Besonderheiten der Bindung zweier neuartiger ATP-kompetitiver Inhibitorgruppen von CK2 beleuchtet werden.

- Sowohl die primäre als auch die sekundäre Interaktion zwischen CK2 α und CK2 β sind markant: Während die primäre Interaktion stark und widerstandsfähig erscheint (vgl. Raaf et al. [2011]) sind die sekundären Interaktionen eher schwach, können allerdings bei der Oligomerisation des CK2-Holoenzym von Bedeutung sein (Niefind und Issinger [2005]; Lolli et al. [2012]). Durch die Kristallisation eines symmetrischen Holoenzym sollte ermittelt werden, inwiefern sekundäre Interaktionen im Kristall zwischen CK2 α und CK2 β vorhanden sind und bei der Oligomerisation eine Rolle spielen können.

Die überraschende Observation, dass der ATP-kompetitive Teil eines Bisubstratinhibitors in der Kristallstruktur ebenfalls an der CK2 α/β -Interaktionsstelle bindet, sollte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden.

- Die Gelenkregion von *hsCK2 α* kann zwei verschiedene Konformationen einnehmen (vgl. 1.4.2). Diese Konformationen wurden bisher ausschließlich in Kristallstrukturen von *hsCK2 α* beobachtet. Durch die Kristallisation von vier Proteinvarianten sollte die Rolle einzelner Seitenketten auf die Konformation der Gelenkregion und damit die Verwendung von ATP oder GTP als Kosubstrat untersucht werden.
- Von der Substratbindestelle von CK2 α sind bislang wenige strukturelle Informationen bekannt, da es nicht möglich war ein Substratpeptid mit CK2 α zu kokristallisieren. Um einen Einblick in die Substratbindestelle zu erhalten, war es Ziel dieser Arbeit einen substratkompetitiven Inhibitor gemeinsam mit CK2 α zu kristallisieren. Bei diesem Inhibitor handelte es sich um Heparin. Heparin ist bereits lange für die Inhibition von CK2 bekannt (Hathaway et al. [1980]) und ist als polyanionisches Molekül in der Lage an der acidophilen Substratbindestelle von CK2 α zu binden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in der höchsten Reinheit bei großen Anbietern wie Carl Roth, Merck, Sigma-Aldrich oder VWR erworben. Relevante spezielle Chemikalien, Kits und Proteine sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 2.1 | Inhibitoren

Inhibitor	Angriffspunkt	Quelle
ARC3140	Bisubstratinhibitor	Prof. Dr. Uri, Tartu
ARC1502	Bisubstratinhibitor	Prof. Dr. Uri, Tartu
E9 (freie Säure)	ATP-kompetitiver Inhibitor	Prof. Dr. Issinger, Odense
E9 (Natriumsalz)	ATP-kompetitiver Inhibitor	Prof. Dr. Issinger, Odense
Emodin	ATP-kompetitiver Inhibitor	Sigma-Aldrich
TF	ATP-kompetitiver Inhibitor	Prof. Dr. Jose, Münster
TF85	ATP-kompetitiver Inhibitor	Prof. Dr. Jose, Münster
TF107	ATP-kompetitiver Inhibitor	Prof. Dr. Jose, Münster
Heparin (ID1010)	Substratkompetitiv	Dextra Laboratories Ltd.

Tabelle 2.2 | Enzyme und Kits

Enzyme	Puffer	Anbieter
DNase I	jeweiliger Lysis-Puffer	Roche
Lysozym	jeweiliger Lysis-Puffer	Merck
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	10 × PCR Reaktionspuffer	Stratagene
Restriktionsenzyme	10 × Reaktionspuffer	Fermentas
T4 DNA Ligase	T4 DNA Ligationspuffer	Fermentas
Trypsin	verschiedene	Roche
MicroElute Gel Extraction	Kit	VWR
Plasmid Miniprep	Kit	Peqlab
CyclePure PCR Purification	Kit	EZNA
6 × His Protein Tag Stain	Kit	Pierce

Tabelle 2.3 | Zur Verfügung gestellte Proteine

Protein	Quelle
<i>hsCK2α</i> ¹⁻³³⁵ F121A	Prof. Dr. Issinger, Odense
<i>hsCK2α</i> ¹⁻³³⁵ F121M	Prof. Dr. Issinger, Odense
<i>hsCK2α</i> ¹⁻³³⁵ H115Y	Prof. Dr. Issinger, Odense
<i>hsCK2α</i> ¹⁻³³⁵ Y125A	Prof. Dr. Issinger, Odense
<i>hsCK2</i> ^{Andante} (<i>CK2α</i> ¹⁻³³⁵) ₂ (<i>CK2β</i> ^{M166I}) ₂	Prof. Dr. Issinger, Odense
<i>hsP21WAF</i>	Prof. Dr. Götz, Homburg

2.2. DNA-Arbeiten

Für die Produktion von Protein wurden zum einen bereits vorhandene Konstrukte verwendet, zum anderen weitere Konstrukte erstellt, welche in den folgenden Tabellen aufgeführt sind.

Tabelle 2.4 | Zur Verfügung gestellte Konstrukte

Gen	Plasmid	Quelle
<i>hsPIM3</i> ¹⁻²⁹³	pQe-T7-1	Prof. Dr. Issinger, Odense
<i>hsPIM3</i> ^{FL}	pQe-T7-1	Prof. Dr. Issinger, Odense
<i>hsP21WAF</i>	modifizierter pQE30	Prof. Dr. Götz, Homburg
<i>hsCK2α</i> ¹⁻³³⁵	pT7-7	Prof. Dr. Niefind, Köln
<i>zmCK2α</i> ^{FL}	pT7-7	Prof. Dr. Niefind, Köln

Tabelle 2.5 | Während der Arbeit erstellte Konstrukte

Gen	Plasmid
<i>hsPIM3</i> ¹⁻³¹⁷ CN	pET28a(+)
<i>hsPIM3</i> ¹⁻³¹⁷ N	pET28a(+)
<i>hsPIM3</i> ¹⁻³¹⁷ C	pET22b

Tabelle 2.6 | Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung von *PIM3*¹⁻³¹⁷

Sequenz	Verwendung
GTCCATATGCTGTTGTCGAAATTTGGGTCAC	Vorwärts-Primer
ATTACTCGAGTTATGCCACATCATCCGGATCCAGCG	Rückwärts-Primer pET28a(+)
ATTACTCGAGTGCCACATCATCCGGATCCAGCG	Rückwärts-Primer pET22b

2. Material und Methoden

2.3. Stämme und Antibiotika

Sowohl für die Vervielfältigung von Plasmid-DNA als auch für die Expression wurden verschiedene Stämme von *E. coli* verwendet, die im Folgenden aufgeführt sind. Ebenfalls aufgeführt sind die verwendeten Antibiotika.

Tabelle 2.7 | Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Quelle	Genotyp
DH5 α TM	Invitrogen	F ⁻ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK ⁻ , mK ⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1
BL21DE03 TM	Invitrogen	F ⁻ ompT hsdSB(rB ⁻ , mB ⁻) gal dcm (DE3)
BL21DE03 C+RP TM	Agilent	F ⁻ ompT hsdSB(rB ⁻ , mB ⁻) gal dcm (DE3) argU (AGA,AGG), proL (CCC)
BL21DE03 C+RIPL TM	Agilent	F ⁻ ompT hsdSB(rB ⁻ , mB ⁻) gal dcm (DE3) argU (AGA, AGG), ileY (AUA), proL (CCC), leuW (CUA)

Tabelle 2.8 | Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration im jeweiligen Medium
Ampicillin	100 μ g/ml
Kanamycin	50 μ g/ml
Chloramphenicol	50 μ g/ml

2.4. Medien und Lösungen

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente benötigte man Puffer und Medien als Lösungsmittel. Die verwendeten Lösungen sind nachfolgend aufgeführt.

Tabelle 2.9 | Puffer für die Proteinreinigung

CK2 α		
Puffer	Reinigungsschritt	Zusammensetzung
Niedrigsalzpuffer	Phosphocellulose	25 mM Tris, pH 8,5 300 mM NaCl
Niedrigsalzpuffer	Heparin	25 mM Tris, pH 8,5 400 M NaCl
Hochsalzpuffer	Phosphocellulose/Heparin	25 mM Tris, pH 8,5 1 M NaCl
Lagerpuffer	Gelfiltration	25 mM Tris, pH 8,5 500 mM NaCl
PIM3		
Puffer	Reinigungsschritt	Zusammensetzung
Niedrig-Imidazolpuffer	NiNTA	50 mM Hepes, pH 7,5 300 mM NaCl 10 mM Imidazol 5 % (v/v) Glycerol 0,5 mM TCEP
Hoch-Imidazolpuffer	NiNTA	50 mM Hepes, pH 7,5 300 mM NaCl 250 mM Imidazol 5 % (v/v) Glycerol 0,5 mM TCEP
Lagerpuffer	Gelfiltration	50 mM Hepes, pH 7,5 300 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerol
P21WAF (Substrat von PIM3)		
Puffer	Reinigungsschritt	Zusammensetzung
Niedrig-pH-Puffer	NiNTA	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 5 6 M Guanidiniumhydrochlorid
Hoch-pH-Puffer	NiNTA	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8 6 M Guanidiniumhydrochlorid
Dialysepuffer	Dialyse	50 mM Tris, pH 8,5 100 mM NaCl 0,1 % Tween 20

2. Material und Methoden

Tabelle 2.10 | Puffer für SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Lösung	Verwendung	Zusammensetzung
10 × Tris-Glycin Laufpuffer	SDS- Gelelektrophorese	250 mM Tris pH 8.8 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS
Färbelösung	SDS- Gelelektrophorese	40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,025 % Coomassie G250
Entfärbelösung	SDS- Gelelektrophorese	40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure
6 × SDS-Probenpuffer	SDS- Gelelektrophorese	60 mM Tris, pH 6,8 12 % (w/v) SDS 600 mM DTT 40 % (v/v) Glycerol 0,6 % (w/v) Bromphenolblau
Transferpuffer	Western Blot	6 g Tris 8,2 g Bicin 200 ml Ethanol ad 2 l mit Wasser
20 × TBS	Western Blot	500 mM Tris, pH 7,4 2,8 M NaCl 60 mM KCl
20 × TBS-T	Western Blot	TBS + 1 % (v/v) Tween 20

Tabelle 2.11 | Weitere Puffer, Medien und Lösungen

Lösung	Verwendung	Zusammensetzung
Kochsalzlösung	Zellernte	0,9 % NaCl
50 × TAE-Puffer	Agarose- Gelelektrophorese	242 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100 ml 500 mM EDTA, pH 8 ad 1 l mit Wasser
LB-Medium	Bakterienkultur	10 g/l NaCl 10 g/l Pepton 5 g/l Hefeextrakt
LB-Agar	Bakterienkultur	10 g/l NaCl 10 g/l Pepton 5 g/l Hefeextrakt 1,5 % (w/v) Agar Agar
SOC-Medium	Bakterienkultur	5 g/l Hefeextrakt 20 g/l Trypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose (separat sterilisiert)
Kinasepuffer	PIM3-Aktivitätstest	30 mM HEPES, pH 7,5 7 mM MgCl ₂ 100 µg/ml BSA 75 µM ATP 0,5 mM DTT

2.5. Software

Für Datenauswertung, Darstellung und Schreifarbeiten wurden verschiedene Softwareprodukte verwendet, die im Folgenden aufgeführt sind.

Tabelle 2.12 | Verwendete Software

Software	Verwendung	Referenz/Anbieter
Adobe Illustrator	Abbildungen	Adobe Systems Software Ireland Ltd.
Adobe Photoshop	Abbildungen	Adobe Systems Software Ireland Ltd.
Powerpoint	Abbildungen	Microsoft Corporation
Pymol	Strukturmodell-Abbildungen	Schrodinger LLC [2010]
OriginPro	Datenauswertung/Graphen	OriginLab Corporation
GraphPad Prism	Datenauswertung/Graphen	GraphPad Software, Inc.
ACD/ChemSketch (Freeware) 2012	Strukturformeln	Advanced Chemistry Development, Inc.
LaTeX	Text	Leslie Lamport, LaTeX Project Team
Word	Text	Microsoft Corporation
Referenzmanager	Mendeley Desktop	Mendeley Ltd.
Struktursoftware		
XDS	Diffraktionsdatenauswertung	Kabsch [2010]
Phenix	Phasierung/Verfeinerung	Adams et al. [2010]
CCP4	Phasierung/Verfeinerung	Winn et al. [2011]
BUSTER	Verfeinerung	Bricogne et al. [2011]
Coot	Modellbildung	Emsley und Cowtan [2004]
DNA-Software		
Serial Cloner	<i>in silico</i> Klonierung	Serial Basics
Sequence Scanner	Sequenzierdaten	Applied Biosystems

2.6. Kristallisations-Screens

Für initiale Kristallisationsexperimente kann man sich kommerzieller Screens bedienen, die in dieser Arbeit verwendeten Screens sind nachfolgend aufgelistet.

Tabelle 2.13 | Verwendete Kristallisations-Screens

Screenname	Anbieter
Crystal Screen 1+2	Hampton Research Corporation
Index Screen	Hampton Research Corporation
SaltRX Screen	Hampton Research Corporation
PEG/Ion Screen	Hampton Research Corporation
JBScreen Basic 1+2	Jena Bioscience GmbH
JBScreen Classic	Jena Bioscience GmbH
JBScreen Kinase	Jena Bioscience GmbH
JBScreen Wizard	Jena Bioscience GmbH
Morpheus Screen	Molecular Dimensions
JCSG Core I-IV	Qiagen

2.7. Arbeit mit DNA

2.7.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR können DNA-Fragmente amplifiziert werden. Man nutzt dabei den Umstand, dass Polymerasen von thermophilen Organismen sehr hitzestabil sind. Dadurch ist es möglich, in einem dreischrittigen Verfahren kleinere Fragmente einer längeren Matrizen-DNA zu vervielfältigen.

Dabei wird zunächst die doppelsträngige Matrizen-DNA denaturiert. In einem zweiten Schritt werden artifizielle Oligonukleotide, die zumindest in Teilen mit der Matrize übereinstimmen, bei einer spezifischen Temperatur an die Matrize gebunden (Annealing). In einem dritten und letzten Schritt wird durch eine hitzestabile DNA-Polymerase und dNTPs neue DNA synthetisiert (Elongation). Diese drei Schritte werden 20-30 Mal wiederholt, es folgt eine finale Elongation. Bei der in dieser Arbeit durchgeführten PCR wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

5 µl 10 × Reaktionspuffer
1 µl 1 mM dNTP
4 µl 10 µM Vorwärts-Primer
4 µl 10 µM Rückwärts-Primer
2 µl Pfu-Polymerase
20 ng Matrizen-Plasmid
mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt

Als letzter Schritt wurde die Polymerase hinzu pipettiert, bevor die komplettierte Lösung in einem PCR-Gerät (Thermocycler, Eppendorf) eingesetzt wurde (vgl. Tab. 2.14).

Tabelle 2.14 | Protokoll einer Standard-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
Denaturierung	95	300
Denaturierung	95	30
Annealing	50-65	30
Elongation	68	120 (pro kb)
finale Elongation	68	600

2.7.2. Transformation

Um Plasmide in Expressionsstämme oder zur Plasmidvervielfältigung in DH5α einzubringen, wurde eine chemische Transformation verwendet. Dazu wurden kompetente Zellen, die bei -80 °C gelagert waren, auf Eis aufgetaut und mit 2-20 ng der zu transformierenden Plasmid-DNA vermengt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten auf Eis wurden die Zellen für zwei Minuten einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt.

Nach weiteren zwei Minuten auf Eis folgte die Durchmischung der Zellsuspension wahlweise mit handwarmen 600 µl LB-Medium (bei Retransformationen) oder 400 µl SOC-Medium (bei Ligationen) und eine Inkubation für 45 Minuten bei 37 °C ohne den Einsatz von Antibiotika. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 5000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde daraufhin in 50 µl LB-Medium resuspendiert. Diese 50 µl wurden auf einer LB-Agar-Platte, welche zuvor mit dem jeweiligen Antibiotikum hergestellt wurde, ausplattiert. Nach einer Inkubation dieser Platte wahlweise über Nacht bei 37 °C oder für 48 h bei RT konnten die entstandenen Kolonien weiterverwendet werden.

2.7.3. Plasmidpräparation und Glycerolstocks

Transformierte Zellen wurden in 5 ml LB-Medium, welches zuvor mit den entsprechenden Antibiotika versetzt wurde, überimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Morgen wurde, um Glycerolstocks anzulegen, 1 ml dieser Bakteriensuspension mit 600 µl einer sterilen 80 % (w/v) Glycerol-Lösung versetzt, verschlossen und bei -80 °C eingefroren.

Bakterien, die für die Extraktion von Plasmiden aufgezogen wurden, wurden abzentrifugiert und für die Plasmidpräparation mit Hilfe eines Kits verwendet.

2.7.4. Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen, wird die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. DNA bewegt sich als gleichmäßig negativ geladenes Molekül im elektrischen Feld relativ zu seiner Größe, wodurch eine Auftrennung und, mit einem spezifischen Marker, eine Bestimmung der Fragmentgröße möglich ist.

Das Agarosegel bestand aus 1 % Agarose (gelöst in TAE-Puffer) und wurde für die Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 500 bp und 10000 bp verwendet. Nach dem Lösen der Agarose durch Aufkochen in 50 ml TAE-Puffer wurden 3 µl des DNA-Farbstoffes Midori Green (Biozym GmbH) zu der Lösung hinzugegeben. Daraufhin wurde gründlich gemischt und die Lösung in eine Kammer gegossen. Während die Lösung abkühlte gelierte es, sodass ein festes Gel entstand, das für die Elektrophorese eingesetzt werden konnte. Mit Hilfe eines Kammes waren zuvor Taschen für Proben in das Gel eingebracht worden.

Nachdem das Gel mit TAE-Puffer bedeckt und die Proben auf das Gel gegeben worden waren, wurde eine Spannung von 80 V angelegt, wodurch sowohl die Proben als auch der Marker aufgetrennt werden. Die Laufstrecke wurde mit Hilfe einer UV-Kamera dokumentiert und bei Bedarf die Proben mit einem Skalpell unter UV-Licht exzidiert. Die Gelextraktion dieser Proben fand durch ein Gelextraktions-Kit statt.

2.7.5. DNA-Restriktion

Für die Restriktion von DNA wurden Endonukleasen verwendet. Dabei wurde DNA in einem Restriktionspuffer verdünnt und mit Restriktionsendonukleasen versetzt. Nach der Inkubationsdauer, welche abhängig von den Restriktionsenzymen war, konnte die geschnittene DNA mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese getrennt und Fragmentstücke weiter verwendet werden. Für die Restriktion von DNA wurden Produkte von Fermentas verwendet.

2.7.6. Ligation

Um DNA in einen Vektor einzubringen, wurden sowohl die mit Restriktionsendonukleasen verdauten Fragmente als auch die verdauten Vektoren zusammen mit einer DNA-Ligase inkubiert. Die DNA-Ligase ligiert dabei die übereinstimmenden Überhänge, wodurch eine zirkuläre DNA entsteht, welche in *E. coli* transformiert werden kann. Für die Ligation von DNA wurde das T4-Ligase-Kit von Fermentas verwendet und nach Protokoll vorgegangen.

2.7.7. Sequenzierung

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden sequenziert. Dabei wurde das Plasmid in einer Konzentration von mindestens 30 ng/ μ l an das Unternehmen GATC Biotech übergeben, welches die eingeschickten Plasmide mittels Sequenzierprimern sequenzierte. Die erhaltenen Sequenzen wurden begutachtet und auf Richtigkeit überprüft.

2.8. Expression

2.8.1. Testexpression

Um das Expressionsniveau eines Proteins zu überprüfen, konnten kleinvolumige Kulturen von *E. coli*-Zellen angelegt werden. Dabei wurden jeweils 5 ml LB-Medium (versetzt mit relevanten Antibiotika) mit 50 μ l einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,7 angezogen. Daraufhin wurde die Expression dieser Vorkulturen mit IPTG in einer Endkonzentration von 0,5 mM induziert. Dabei wurde unter verschiedenen Bedingungen exprimiert, d. h. durch Variation von Parametern wie Temperatur und Expressionsdauer konnte die effektivste Art der Expression ermittelt werden.

Die Proben der Testexpressionen wurden in 100 μ l Wasser pro ml OD₆₀₀ = 1 mit Hilfe von Lysozym (4 mg/ml Endkonzentration) und fünf Tau-Gefrierzyklen aufgeschlossen. Nach dem Zellaufschluss wurde die erhaltene Suspension bei einer Geschwindigkeit von 14000 rpm und einer Temperatur von 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand enthält die löslichen Proteine der Testkultur, das Pellet hingegen die unlöslichen Bestandteile. Der Überstand wurde mit 6 \times SDS-Probenpuffer versetzt, das Pellet mit einem

äquivalenten Volumen (Überstand + 6 × SDS-Probenpuffer) 1 × SDS-Probenpuffer. Die Proben wurden für 5 - 10 Minuten bei 95 °C aufgeköcht und konnten für weitere Analysen verwendet werden.

2.8.2. Großexpression

Für eine Großexpression wurden am Abend zuvor je zwei Kolben mit 50 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und mit je 5 µl einer Glycerol-Lagerkultur (vgl. Abschnitt 2.7.3) inokuliert. Diese Vorkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und unter Schütteln bei 180 rpm inkubiert.

Am folgenden Morgen wurden diese Vorkulturen verwendet, um insgesamt 4,8 l LB-Medium, aufgeteilt auf acht 2 l Erlenmeyerkolben (mit Schikane), im Verhältnis 1:50 zu inokulieren. Benötigte Antibiotika wurden dem LB-Medium wiederum vor der Inokulation hinzugefügt. Die Kulturen wurden nach der Inokulation unter ständigem Schütteln bei 180 rpm bei der gewünschten Temperatur (meist 30 oder 37 °C) inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 erreicht war.

Anschließend wurde die Expression des Zielproteins durch die Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 0,5 mM induziert. Nach der Inkubation für weitere 3 - 6 Stunden konnte die Zellsuspension durch Zentrifugation (30 min, 4000 rpm) geerntet und in 100 ml Kochsalzlösung resuspendiert und gewaschen werden. Diese Lösung wiederum wurde zentrifugiert (15 min, 10000 rpm in einer Tischzentrifuge), der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet für weitere Versuche bei -80 °C eingefroren.

2.9. Proteinreinigung

Um Protein aus den exprimierenden *E. coli*-Zellen extrahieren zu können, wurden verschiedene auf das Protein optimierte Aufreinigungsstrategien angewendet und miteinander kombiniert. Zwischen den jeweiligen Aufreinigungsschritten wurde der Erfolg der Aufreinigung mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese überprüft. Alle Chromatographie-Aufreinigungsschritte wurden an FPLC-Systemen (Äkta Prime, Äkta Explorer, Pharmacia FPLC) unter Beobachtung der Absorption bei $\lambda = 280$ nm durchgeführt.

2.9.1. Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und in 40 ml Puffer (jeweils des Niedrigsalzpuffers des ersten Aufreinigungsschritts) resuspendiert. Der Puffer wurde zuvor mit DNase und Lysozym mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml bzw. 1 mg/ml versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall, dabei wurde für 4 × 60 Sekunden mit einer Amplitude von 40 % beschallt, wobei sich 2 Sekunden Puls mit 2 Sekunden Pause abwechselten. Die aufgeschlossene Zellsuspension wurde daraufhin für 40 Minuten abzentrifugiert, wobei wahlweise eine Ultrazentrifuge (4 °C, 40000 g, 30 min) oder

2. Material und Methoden

eine Standzentrifuge (4 °C, 20000 rpm, 40 min) verwendet wurde. Der Überstand der Zentrifugation wurde dekantiert und durch einen Papierfilter filtriert. Das filtrierte Lysat konnte im Folgenden für den ersten Chromatographieschritt verwendet werden.

2.9.2. Phosphocellulose-Chromatographie

Bei der Aufreinigung von CK2-Proteinen wurde zunächst eine Chromatographie mit Phosphocellulose durchgeführt. Dabei wurde das Lysat auf eine selbst assemblierte Säule aus ca. 8 - 10 ml Phosphocellulose (Phosphocellulose P11, Whatman) aufgetragen. Dieses Material ist ein inhomogener Kationenaustauscher, der sowohl schwache als auch starke Ionenwechselwirkungen eingehen kann. Das Material kann als klassischer Kationenaustauscher verwendet werden, einige Proteine können allerdings, ähnlich einer Affinitätschromatographie, spezifisch an das Material binden. Dies gilt vor allem für RNA-bindende Proteine wie RNA-Polymerasen, aber auch CK2 α bindet spezifisch an das Säulenmaterial.

Die Säule wurde zunächst mit 4 Säulenvolumina Niedrigsalzpuffer äquilibriert, woraufhin das Lysat mit Hilfe eines Superloops auf die Säule aufgetragen wurde. Danach wurden die nicht-bindenden Bestandteile mit Niedrigsalzpuffer ausgewaschen, bis die Absorption bei 280 nm auf ein Basisniveau gesunken war. Daraufhin wurde das gebundene Protein mit einem linearen Gradienten mit 12 Säulenvolumina bis zu einer Salzkonzentration von 1 M NaCl (100 % Hochsalzpuffer) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min eluiert.

Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden im nächsten Schritt vereinigt und, abhängig von der Reinheit des Proteins, entweder in den Niedrigsalzpuffer für die Heparin-Affinitätschromatographie umpuffered oder auf ca. 2 ml aufkonzentriert. Sowohl für die Umpufferung als auch für die Aufkonzentrierung wurden Konzentratoren (Amicon-Ultra, Merck-Millipore) verwendet.

2.9.3. Heparin-Affinitätschromatographie

Bei der Heparin-Chromatographie bindet das Zielprotein spezifisch an das Säulenmaterial, es handelt sich um eine Affinitätschromatographie. Die Eigenschaft von CK2 α , durch Heparin inhibiert zu werden und daran zu binden (vgl. Abb. 1.5.1), ist dabei sehr spezifisch.

Die vorgepackte 5 ml Heparinsäule (GE Healthcare) wurde, ähnlich der Phosphocellulose-Säule, zunächst mit 4 Säulenvolumina Niedrigsalzpuffer äquilibriert; es folgte das Beladen mit dem bei der Phosphocellulose-Chromatographie eluierten Protein. Nachdem das ungebundene Protein von der Säule gewaschen worden war und die Absorption bei 280 nm eine Basislinie erreicht hatte, wurde mit einem linearen Salzgradienten bis 1 M NaCl (100 % Hochsalzpuffer) über 26 Säulenvolumina bei einer Flussrate von 0,8 ml/min eluiert. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, aufkonzentriert und, ab-

hängig von Verwendungszweck und Reinheit, entweder in Lager-Puffer umgepuffert oder durch Gelfiltration weiter gereinigt.

2.9.4. NiNTA-Affinitätschromatographie

Bei der Verwendung von NiNTA als Säulenmaterial macht man sich zunutze, dass ein Polyhistidin, welches C- oder N-terminal an das Protein angebracht wurde, mit diesem Material spezifisch interagiert. Dadurch kann ein Protein mit His-tag durch die Verwendung von NiNTA aus einer komplexen Lösung extrahiert werden. Zur Aufreinigung von diesen His-getaggten Proteinen wurden daher immobilisierte, mit NTA an Agarose gekoppelte, Nickel-Ionen verwendet. Die NiNTA-Säule (1 ml und 5 ml HisTrap, GE Healthcare) wurde zunächst mit Niedrig-Imidazolpuffer äquilibriert, bevor das Lysat auf die Säule gegeben wurde.

Nachdem das Lysat aufgetragen war, wurde die Säule mit 4 Säulenvolumina Niedrig-Imidazolpuffer bis zu einer gleichbleibenden Absorption bei 280 nm gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit einem Gradienten von 10 mM bis 250 mM Imidazol (100 % Hoch-Imidazolpuffer) über 10 Säulenvolumina bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Nach der Elution wurde das Protein bei ausreichender Reinheit in Lagerpuffer umgepuffert, bevor es weiter verwendet wurde. Bei weiteren Verunreinigungen wurde das Protein durch Gelfiltration gereinigt.

2.9.5. NiNTA-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen

Ungefaltete Proteine wurden, anders als gefaltete Proteine, denaturiert gereinigt. Dabei wurden die für die Aufreinigung verwendeten Zellen direkt in einer Lösung mit hochmolarem Guanidiniumhydrochlorid (Hoch-pH-Puffer) gelöst und das enthaltene Protein denaturiert. Durch Zentrifugation bei 6000 rpm für 30 min wurden alle festen Bestandteile von der löslichen Fraktion, die alle Proteine in denaturierter Form enthält, separiert. In einem nächsten Schritt folgte die Filtration dieses Lysats durch einen Papierfilter. Nach dieser Filtration wurde die Suspension auf die mit Hoch-pH-Puffer äquilibrierte vorgepackte NiNTA-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte nicht mit einem Imidazol-Gradienten, sondern über eine pH-Veränderung: Während der pH des Auftragspuffers pH 8 betrug, wurde das Protein bei pH 5 (100 % Niedrig-pH-Puffer) eluiert. Dabei wurde ein Stufengradient verwendet.

2.9.6. Gelfiltration

Bei der Gelfiltration wird Protein anhand seiner dreidimensionalen Ausmaße aufgetrennt, welche sowohl abhängig von dem Molekulargewicht als auch von der räumlichen Struktur des jeweiligen Proteins sind. Dabei ist die Gelfiltration eine adäquate Methode, um be-

2. Material und Methoden

reits gereinigtes Protein von verbliebenen Verunreinigungen zu befreien und das Protein gleichzeitig umzupuffern.

Die Proteinlösung wurde auf ein kleines Volumen konzentriert (ca. 2 ml) und mit Hilfe eines Loops auf die präparative Gelfiltrationssäule aufgetragen (HiLoad Superdex 16/60 (200 oder 75)). Nach der Äquilibration der Säule mit dem jeweiligen Lagerpuffer wurde die Proteinlösung aufgetragen. Es folgte die Elution über ein Säulenvolumen (124 ml), wobei die enthaltenen Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt wurden. Das eluierte Protein konnte daraufhin konzentriert und bei -80 °C eingefroren werden.

2.9.7. Dialyse

Für das langsame Umpuffern von Proteinlösungen hat sich die Dialyse als effiziente Methode durchgesetzt. Die Proteinlösung wurde dabei in einen Dialyseschlauch gefüllt und von beiden Seiten dicht verschlossen. Dieser gefüllte Dialyseschlauch wurde in ein großes Volumen (1-5 l) desjenigen Puffers gelegt, in dem das Protein verwendet oder aufbewahrt werden sollte.

Der Dialyseschlauch lässt nur Diffusion bis zu einer bestimmten Molekülgröße zu, wodurch Lösungsmittel-Moleküle ungehindert zwischen den Lösungen inner- und außerhalb des Schlauchs diffundieren können, die Proteinmoleküle allerdings im Inneren des Schlauchs verbleiben. Für die Dialyse von P21WAF (einem Substratprotein von der Proteinkinase PIM3) wurde eine Dialysemembran verwendet, bei der Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 5000 kDa die Membran passieren konnten.

2.9.8. Proteinkonzentrierung

Um das Protein auf eine bestimmte Konzentration einstellen zu können, muss nach der Aufreinigung meist die Proteinkonzentration erhöht werden. Dazu wurden Konzentratoren verwendet, die eine halbdurchlässige Membran (ähnlich der Dialysemembran) besitzen und in der Zentrifuge eingesetzt werden konnten. Durch die Zentrifugation bei 5000 rpm in der Tischzentrifuge wurde das Lösungsmittel durch die Membran getrieben, während das Protein in höherer Konzentration auf der Membran bleibt. Für die Konzentrierung wurden Amicon Ultra-Einheiten von Millipore mit einer Ausschlussgröße von 10 und 30 kDa verwendet.

2.10. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur qualitativen und quantitativen Überprüfung der Reinheit der Proteine während und nach der Reinigung wurden Proben durch die SDS-PAGE analysiert. Die Proteinlösung wurde dazu mit einem SDS-Probenpuffer (Laemmli [1970]) vermengt und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Dabei wird die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine durch Erhitzen auf 95 °C und durch SDS und DTT aus dem SDS-Probenpuffer zerstört und das entfal-

tete Protein gleichmäßig mit SDS beladen, wodurch die Proteine relativ zu ihrer Größe negativ geladen werden und im elektrischen Feld aufgetrennt werden können. Die Gelmatrix besteht dabei aus einem Gemisch aus Acrylamid und Bisacrylamid, welches durch Zugabe von TEMED und APS polymerisiert wird. Dabei wird unterschieden zwischen dem Sammelgel und dem Trenngel, wobei die denaturierten Proteine im Sammelgel gestapelt und räumlich konzentriert werden, um im Trenngel nach ihrer Größe/Ladung aufgetrennt zu werden.

Tabelle 2.15 | Rezept für SDS-Gele

	Sammelgel	Trenngel 10 %	Trenngel 12 %
Acrylamid	1,25 ml	5 ml	6 ml
1 M Tris, pH 6.8	1,25 ml	—	—
1.5 M Tris, pH 8.8	—	5 ml	5 ml
10 % SDS	100 µl	200 µl	200 µl
Wasser	7,4 ml	9,6 ml	8,6 ml
10 % APS	100 µl	200 µl	200 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Zur Auftrennung der Proben wurde eine Mini-Protean-Kammer von BioRad verwendet. Nachdem die Kammer mit SDS-Laufpuffer gefüllt und die Gele in die Kammer eingeführt worden waren, konnte das Gel mit den vorbereiteten Proben sowie einem Proteinmarker (Prestained Protein Ladder, Fermentas) beladen werden. Die Kammer wurde zunächst für ca. 15 min bei 80 V betrieben bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten. Daraufhin wurde die Spannung auf 130 V erhöht bis der Proteinmarker vollständig aufgetrennt war und die Lauffront das Gel verlassen hatte.

Um das Protein auf dem Gel sichtbar zu machen, wurde es mit einem Farbstoff angefärbt. Dazu wurde das Gel zunächst für eine Minute in einer Färbelösung in der Mikrowelle erwärmt und danach für fünf Minuten geschwenkt. Es folgte die Entfärbung in Entfärbelösung wiederum für eine Minute, bevor das Gel in Wasser bis zur Dokumentation (ChemiDoc, BioRad) gelagert wurde.

2.10.1. Denaturierte Proteinproben bei der SDS-PAGE

Proteinlösungen, die hochmolar Guanidiniumhydrochlorid oder Harnstoff enthalten, können nicht direkt für das Beladen eines SDS-Gels verwendet werden, hochmolare Puffer sind inkompatibel zur SDS-PAGE. Diese Proteine müssen zunächst mit einem Fällungsmittel gefällt und in einer kompatiblen Lösung gelöst werden.

In dieser Arbeit wurde dazu die Proteinlösung zunächst 1:10 mit eiskaltem Ethanol (100 %) vermischt und für mindestens 60 min bei -20 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde diese Lösung zentrifugiert (15 min bei 4 °C und 14000 rpm in der

2. Material und Methoden

Tischzentrifuge), wodurch das präzipitierte Protein pelletiert wurde.

Dieses Pellet wurde daraufhin mit frischem eiskalten Ethanol (90 %) gewaschen, abermals zentrifugiert, getrocknet und dadurch von Ethanol befreit. Nach der Trocknung wurden die Pellets in $1 \times$ SDS-Probenpuffer unter Schütteln gelöst und konnten auf ein SDS-Gel appliziert werden.

2.11. Bestimmung von Protein- und DNA-Konzentrationen

Sowohl Protein- als auch DNA-Konzentrationen können durch die Bestimmung der Absorption bei $\lambda = 280$ nm bestimmt werden. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ergibt sich aus dem molaren Absorptionskoeffizienten ϵ , der Konzentration c , der Schichtdicke d und der gemessenen Absorption A , dass man unter Kenntnis von Schichtdicke und Absorptionskoeffizient aus der Messung der Absorption auf die molare Konzentration rückschließen kann:

$$A = \epsilon * c * d, \text{ mit } \epsilon \text{ in } M^{-1} * cm^{-1}, c \text{ in } M \text{ und } d \text{ in } cm.$$

Diese Messungen wurden an einem Nanodrop 2000 durchgeführt.

DNA-Konzentrationsbestimmung Bei Nukleinsäuren arbeitet man normalerweise mit Massenkonzentrationen (in ng/l) anstatt mit Stoffmengenkonzentrationen. Für die Berechnung der Massenkonzentration doppelsträngiger DNA von Plasmiden wurde von dem verwendeten Nanodrop ein Absorptionskoeffizient von $50 \text{ ng} * cm/\mu l$ eingesetzt.

Proteinkonzentrationsbestimmung Bei Proteinen ergibt sich der Absorptionskoeffizient aus der Primärsequenz und der Tertiärstruktur und ist somit für jedes Protein einzigartig. Aus Gründen der Praktikabilität wurden diese Koeffizienten nicht experimentell bestimmt, sondern von der Primärstruktur mit Hilfe des Online-Werkzeugs protparam (Gasteiger et al. [2005]) abgeleitet.

Bei der Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit niedrigen Absorptionskoeffizienten wurde zusätzlich eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (Bradford [1976]). Dabei wurden $50 \mu l$ der Proteinlösung mit $750 \mu l$ Wasser verdünnt und mit $200 \mu l$ Bradford-Reagenz (Roti-Quant, Carl Roth) versetzt. Nach 5 min Inkubationszeit konnte ein Farbumschlag bei $\lambda = 595$ nm gemessen werden und die Proteinkonzentration durch den Vergleich mit einer Standardgerade (hergestellt mit dem Standardprotein BSA) bestimmt werden. Diese Methode ermöglichte ebenfalls die Bestimmung der Massenkonzentration von Proteingemischen.

2.12. Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots ist es möglich, Proteine von einem SDS-Gel auf eine PVDF- oder Nitrocellulosemembran zu transferieren, zu fixieren und daraufhin Proteine spezifisch immunologisch zu detektieren.

In dieser Arbeit wurde eine Mini-Protean-Kammer von BioRad verwendet. Zunächst wurde die PVDF-Membran vorbereitet, indem sie durch Einlegen in 100 % Methanol aktiviert wurde, es folgte eine Äquilibrierung in Transferpuffer. Nachdem ein Stapel aus drei Whatman-Papieren, dem SDS-Gel, der aktivierten und äquilibrierten Membran und drei weiteren Whatman-Papieren assembliert wurde, wurde dieses Paket in die Kammer gefüllt und mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer fand für mindestens 13 Stunden bei 100 mA und 4 °C unter ständigem Rühren statt.

Die beladene Membran wurde in einem nächsten Schritt für eine Stunde in TBS-T inkubiert, welcher mit 3 % BSA versetzt war. Dadurch sollte die Membran gesättigt werden, um mögliche Kreuzdetektionen zu minimieren. Es folgten drei Waschschriffe von je fünf Minuten Länge mit TBS-T, woraufhin die Membran 1 h lang bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (Anti-Penta-His, Qiagen, 1:1000 verdünnt) unter Schütteln inkubiert wurde. Nach drei weiteren Waschschriffen mit TBS-T für fünf Minuten folgte die Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper (HRP-anti-mouse-IgG, 1:2000 verdünnt), an welchen das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist. Nach einer Inkubation von 1 h wurde die Membran wiederum zweimal mit TBS-T und ein letztes Mal mit TBS gewaschen.

Als letzter Schritt wurde die Waschlösung entfernt und durch die Zugabe von 1 ml Detektionslösung (West Zol plus, Intron) auf die Membran die Nachweisreaktion gestartet, welche direkt darauf detektiert und dokumentiert werden konnte.

2.13. Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Bei der isothermalen Titrationskalorimetrie handelt es sich um eine Methode, mit der es möglich ist geringste Temperaturunterschiede zwischen zwei Lösungen zu quantifizieren, somit auch induzierte Temperaturänderungen. Bei der Charakterisierung von Bindungspartnern macht man sich dies zunutze: Es werden zwei Kammern (eine mit Wasser gefüllte Referenzkammer und eine mit dem ersten Analyt gefüllte Analysekkammer) auf exakt die gleiche Temperatur erhitzt.

Der zweite Analyt wird in die Analysekkammer titriert. Durch die Reaktion der beiden Bindungspartner wird die Lösung entweder erwärmt oder abgekühlt. Diese Temperaturänderung wird quantifiziert, indem die elektrische Energie gemessen wird, die notwendig ist um die Temperaturunterschiede der Referenz- und der Messzelle wieder auszugleichen. Wenn die Temperaturen in beiden Kammern wieder identisch sind, folgen weitere Injektion des Analyten. Die stoßweise Zugabe des zweiten Analyten wird so lange fortgesetzt bis keine Änderung zwischen zwei Titrationspunkten mehr messbar ist. Die Messungen werden zeitaufgelöst gemessen, mit Hilfe von Softwareprogrammen kann eine Basislinie erstellt und die Integrale der einzelnen Titrations bestimmt werden. Jedes Integral gibt dabei die Wärmemengenänderung eines Titrationspunktes wieder. Durch die Approximation eines Kurvenverlaufs aus den Wärmemengenänderungen der Titrations kann in einem nächsten Schritt ein mathematisches Modell für die Bindung erstellt und angepasst werden. Daraus wiederum kann man sowohl die Dissoziationskonstante der Bindung als auch die Stöchiometrie der Interaktion ermitteln.

Des Weiteren lassen sich thermodynamische Parameter bestimmen. Die während der Bindung abgegebene Wärmemenge entspricht dem enthalpischen Anteil der Bindung ΔH^* . Da die Dissoziationskonstante direkt aus den Daten bestimmt werden kann, ist es ebenfalls möglich, die Änderung der Gibbs-Energie ΔG^* zu bestimmen. Bei bekanntem ΔG^* und ΔH^* kann außerdem der entropische Anteil der Bindung ΔS^* nach $\Delta G^* = \Delta H^* - T * \Delta S^*$ bestimmt werden.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten ITC-Messungen wurde ein MicroCal Auto-iTC200-Gerät verwendet. Ein Bindungspartner wurde schwach konzentriert (15-30 μM) in der Zelle vorgelegt, der zweite Bindungspartner (mit einer ca. zehnfach höheren Konzentration) wurde in 10–30 Injektionen hinzutitriert. Die erhaltenen Wärmemengenänderungen wurden gegen das Volumen aufgetragen, mit Hilfe von nitpic (Keller et al. [2012]) ausgewertet und eine Basislinie erstellt. Mit sedphat (Houtman et al. [2007]) wurden diese Daten verwendet, um ein mathematisches Modell für die untersuchte Bindung zu erhalten.

2.14. Fluoreszenzanisotropie-Assay

Um die Wechselwirkung von Molekülen mit der CK2 β -Interaktionsseite von CK2 α zu untersuchen, wurde ein Fluoreszenzanisotropie-Assay (Hochscherf et al. [2015]) verwendet. Dieser Test beruht darauf, dass ein bekannter fluoreszenzmarkierter Antagonist der CK2 α / β -Interaktionsstelle, ein zyklisches Peptid (Raaf et al. [2013]), an CK2 α gebunden wird und durch einen putativen Antagonisten verdrängt werden soll. Durch die Verdrängung des fluoreszenzmarkierten Antagonisten liegen mehr Moleküle dieses Antagonisten ungebunden in der Lösung vor, wodurch sich die Fluoreszenzanisotropie verringert. Falls das fluoreszenzmarkierte zyklische Peptid allerdings nicht verdrängt wird, bleiben immer ähnlich viele Moleküle gebunden an CK2 α , die Fluoreszenzanisotropie bleibt demnach gleich hoch.

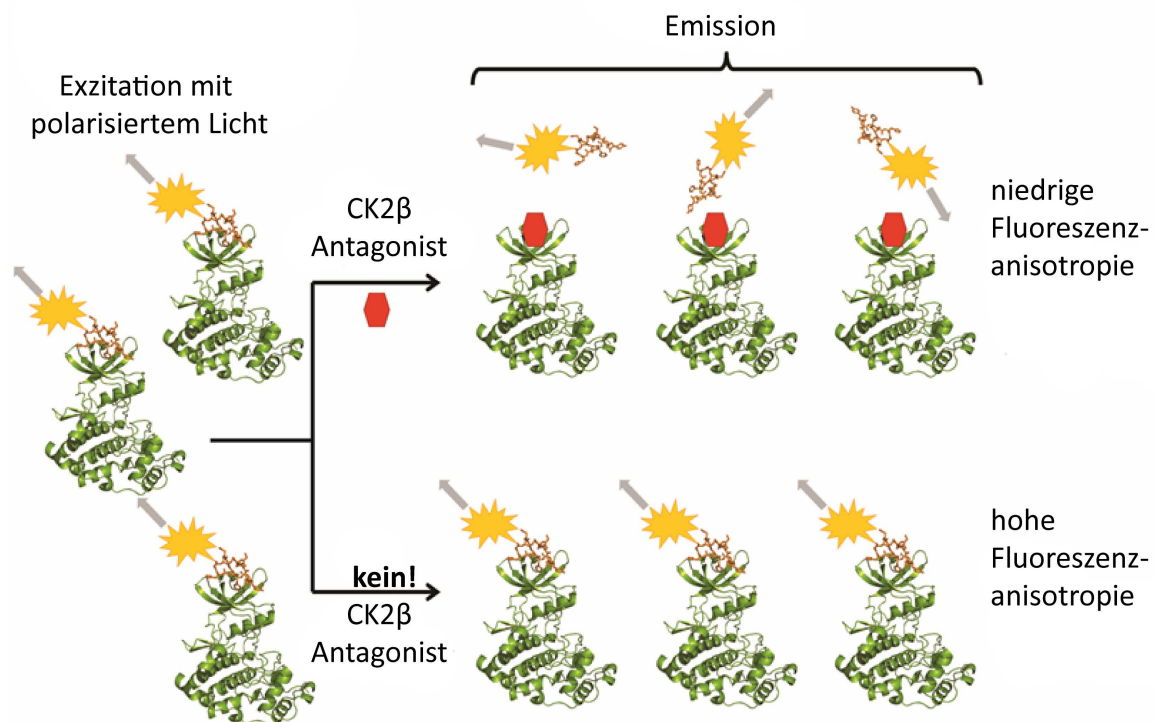


Abbildung 2.1 | Fluoreszenzanisotropie-Assay nach Hochscherf

CK2 α wird mit einem CK2 β -antagonistischen fluoreszenzmarkierten zyklischen Peptid beladen, es folgt die Inkubation mit einem putativen neuen CK2 β -Antagonisten. In jedem Fall wird Fluoreszenz emittiert, unabhängig von der Effizienz des putativen Antagonisten. Ist dieser in der Lage, das zyklische Peptid zu verdrängen, ändert sich allerdings die ausgelesene Fluoreszenzpolarisierung. Abbildung angelehnt an Berg [2003], mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.

Die Messungen wurden im 96-Well Plattenformat durchgeführt, die Ansätze wurden dabei im 200 μ l Standard angesetzt. Je 160 μ l Puffer (500 mM NaCl, 25 mM Tris pH 8,5) wurden mit CK2 α (Endkonzentration: 3 μ M) und zyklischem Peptid (Endkonzentration: 0,1 μ M) versetzt. Der putative Antagonist wurde in dem gleichen Puffer, welcher

2. Material und Methoden

allerdings zusätzlich 10 % (v/v) DMSO enthielt, vorverdünnt und in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Alle Ansätze enthielten final 1 % (v/v) DMSO. Die Konzentration des putativen Antagonisten wurde von 2 nM bis 75 μ M variiert. Die Werte für die Fluoreszenzanisotropie wurden direkt nach dem Ansetzen der Proben ausgelesen.

2.15. Schmelzpunktbestimmung

Um die strukturelle Stabilität eines Proteins in einer Pufferlösung zu untersuchen, kann das Schmelzverhalten des Proteins untersucht werden. Strukturelle Stabilität ist für die Kristallisation eines Proteins eminent wichtig, da ein ungeordnetes Protein nur schwerlich in ein gleichförmiges Gitter angeordnet werden kann. Des Weiteren kann dieses Experiment verwendet werden, um Pufferbedingungen zu optimieren. Dazu wurde eine Proteinlösung mit Sypro Orange versetzt. Sypro Orange ist ein Farbstoff, der durch die Interaktion mit hydrophoben Bereichen von Proteinen zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Wird nun eine Lösung bestehend aus Puffer, Proteinlösung und Sypro Orange erhitzt, so kann der Farbstoff mit den hydrophoben Bereichen des Proteins interagieren sobald die Denaturierung einsetzt. Die mittlere Schmelztemperatur (T_m) des Proteins ergibt sich aus dem Wendepunkt der Schmelzkurve, leichter abzulesen im Minimum der ersten Ableitung.

Für dieses Thermal shift (Pantoliano et al. [2001])- bzw. Thermofluor-Verfahren (Ericsson et al. [2006]) wurden 5 μ l einer Proteinlösung mit einer Konzentration zwischen 1 mg/ml und 3 mg/ml in 40 μ l einer Pufferlösung verdünnt. Diese 45 μ l wurden wiederum mit 5 μ l 10 \times Sypro Orange-Lösung versetzt, welche durch die Verdünnung der Stammlösung um den Faktor 500 mit H₂O hergestellt wurde.

In dieser Arbeit wurde die Protein-Farbstofflösung um ein Grad Celsius pro Minute kontinuierlich von 20 °C auf 95 °C erhitzt und die Fluoreszenz kontinuierlich ausgelesen. Um dieses Experiment durchzuführen, wurde ein RT-PCR System (CFX96-System von Bio-Rad) verwendet. Dabei wurde der FRET-Kanal dieses Gerätes für Exzitation und Emission verwendet. Es wurde darauf geachtet, dass lichtdurchlässige PCR-Reaktionsgefäße und -deckel verwendet wurden, um das Signal zuverlässig auslesen zu können.

2.16. Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Um einen Einblick in die Dispersität einer Proteinprobe zu erhalten, kann die dynamische Lichtstreuung eines Proteins bestimmt werden. Dabei kann der hydrodynamische Radius des Proteins in der Lösung bestimmt werden, um dadurch ein Einblick in den Aggregationszustand des untersuchten Proteins zu erhalten.

Für die Durchführung wurde eine Proteinlösung direkt nach der Gelfiltration bei 20 °C in

dem DLS-Gerät (NanoStar™, Wyatt Technology) vermessen. Dazu wurden die Proteinproben zunächst bei 4 °C für 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert, um grobe Bestandteile zu pelletieren und dadurch aus der Lösung zu entfernen. Von dem Überstand wurden 100 µl blasenfrei in eine spezielle Küvette (UVette, Eppendorf) gefüllt und in dieser Küvette in das Gerät eingeführt. Die dynamische Lichtstreuung wurde bei einer Wellenlänge von 658 nm gemessen, die ermittelte Polydispersität (%Pd) gibt dabei ein Maß der Gleichförmigkeit der Moleküle in der Lösung an (je geringer %Pd desto monodisperser ist die Probe). Aus dem hydrodynamischen Radius wurde des Weiteren ein Molekulargewicht berechnet. Das Ergebnis setzte sich aus der Mittelung 5 unabhängiger Messungen mit je 10 Iterationen zusammen.

2.17. Aktivitätsbestimmung der PIM3-Varianten

Um zu bestimmen, ob die drei PIM3-Varianten eine Kinase-Aktivität aufzeigen, wurden Aktivitätsbestimmungen durchgeführt. Als Substrat wurde dabei das Substratprotein P21WAF verwendet. Die Kinase wurde in dem Kinasepuffer mit dem Substratprotein und 0,5 µl γ -[³²P]ATP (Hartmann Analytik, 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurde die Reaktion durch die Zugabe einer entsprechenden Menge 5 × Ladegelpuffer beendet. Es folgte eine SDS-Gelelektrophorese. Nach der Gelelektrophorese, bei der die Bromphenolblau-Lauffront (und somit auch überschüssiges ATP) zwingend das Gel verlassen haben musste, wurden die Gele mit der SDS-PAGE Färbelösung gefärbt. Durch Inkubation in einer Entfärbelösung (für 3 × 15 min) wurden die Gele wiederum entfärbt. Anschließend erfolgte die Trocknung der Gele für 3 h bei 80 °C bei Unterdruck. Nach der Trocknung wurde die Strahlung der Gele ausgelesen, indem die getrockneten Gele in Speicher-Phosphorschirmen (SP-Schirme) ausgelesen wurden. Dabei wurden Zeiten von einer Minute bis zu einem Tag verwendet, um die SP-Schirme zu belichten.

Nach der erwünschten Belichtungszeit wurden die SP-Schirme an einem Phosphoimager ausgelesen. Je mehr Protein mit radioaktivem ATP umgesetzt wurde, desto stärker wurde dieses Protein phosphoryliert. Die Belichtung der SPS wurde so lange optimiert bis die entstandenen Signale ohne Überbelichtung klar voneinander trennbar waren.

3. Röntgenkristallographische Methoden

Die Röntgenstrukturanalyse ist eine sehr effiziente Methode, um strukturelle Informationen sowohl von Proteinen als auch von anderen Makro- aber auch kleinen Molekülen zu erlangen. Essentieller Bestandteil im Arbeitsablauf der klassischen Röntgenstrukturanalyse ist dabei die Erstellung eines hochgeordneten Einkristalls, der in der Lage ist, Röntgenstrahlen zu beugen. Aus den resultierenden Beugungsmustern kann in weiteren Schritten die Struktur des kristallisierten Proteins ermittelt werden.

Zur Zeit sind insgesamt 103114 Strukturen in der PDB abgelegt, davon 92596 Röntgenstrukturen^[2]. Diese Zahlen unterstreichen die Bedeutung dieser Technik in der Lösung von Proteinstrukturen.

In diesem Abschnitt sollen einige grundlegende Prinzipien vorgestellt werden, ohne einen Anspruch auf Vollständigkeit zu erheben. Für die ausführliche Lektüre empfehle ich Rupp [2009], eine der wichtigsten aktuellen Informationsquellen für den Proteinkristallographen.

3.1. Kristallisation

Die Kristallisation eines Zielproteins ist (nach erfolgreicher Expression und Aufreinigung) ein essentieller Schritt für die Röntgenstrukturanalyse. Um Kristalle des Proteins züchten zu können, sind zunächst ausreichende Mengen des Proteins in genügender Reinheit notwendig. Sind die Bedingungen für die Kristallisation eines Proteins unbekannt, werden erste Kristallisationsversuche häufig mit kommerziell erhältlichen Kristallisations-Screens (vgl. Tab. 2.13) durchgeführt. Diese Screens ermöglichen dem Kristallographen, viele verschiedene Kristallisationsbedingungen mit relativ geringem Aufwand und Proteinverbrauch testen zu können.

^[2]<http://www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do>, abgerufen am 06. August 2015.

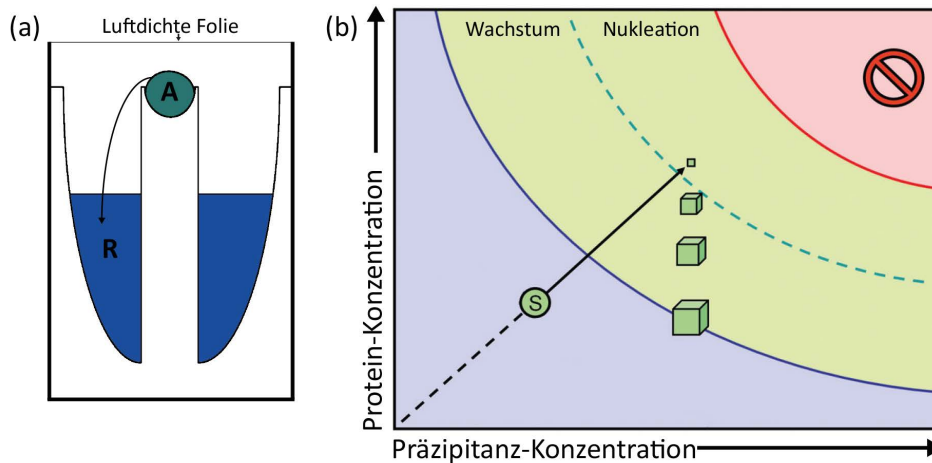


Abbildung 3.1 | Der Weg zu erfolgreicher Kristallisation

(a) Als Standardmethode zur Kristallisation von Proteinen wird die Dampfdiffusion verwendet. Bei der Methode des sitzenden Tropfen (oder sitting drop) diffundiert Lösungsmittel aus dem Protein-Reservoir-Gemisch (A) in die Reservoirlösung (R), sodass sowohl die Präzipitant- als auch die Protein-Konzentration im Tropfen steigt. (b) Der Kristallisationstropfen (S) wird der Dampfdiffusion ausgesetzt. Sobald in der Nukleationszone eine erste Keimbildung stattgefunden hat sinkt die Proteinkonzentration und die entstandenen Keime wachsen zu größeren Kristallen. Abb. (b) wurde reproduziert und verändert aus Rupp [2009], mit der freundlichen Genehmigung von Biomolecular Crystallography von Bernhard Rupp, ©2009-2014 Garland Science/Taylor & Francis LLC.

Eine Kristallisationsbedingung besteht dabei typischerweise aus der wässrigen Lösung einer Puffersubstanz und einem oder mehreren Fällungsmitteln, wie z. B. Polyethylenglycole oder Salze. Erzielt man erste Kristalle in Kristallisations-Screens, so kann diese Kristallisationsbedingung in nächsten Schritten durch Variation von Parametern (pH, Temperatur, Fällungsmittelkonzentration, Proteinkonzentration, Protein-Reservoir-Verhältnis usw.) optimiert werden (vgl. Abb. 3.1 (b)).

In Kristallisationsansätzen wird die Proteinlösung mit der Reservoirlösung (typischerweise in einem Verhältnis zwischen 1:5 und 5:1) vermengt und dieses Gemisch gegen ein deutlich größeres Volumen Reservoirlösung äquilibriert. Durch die räumliche Trennung des Protein-Reservoir-Gemischs und des Reservoirs findet deren Gleichgewichtseinstellung durch Dampfdiffusion statt (vgl. Abb. 3.1 (a)). Dadurch steigt sowohl die Protein- als auch die Präzipitantkonzentration. Ziel ist es, das Protein-Reservoir-Gemisch in einen Konzentrationsbereich zu führen, in dem sich Kristallisationskeime bilden. Durch diese Nukleation sinkt die Proteinkonzentration in der Lösung und es bilden sich keine neuen Keime mehr. Vorhandene Keime können allerdings weiter wachsen bis der Tropfen komplett äquilibriert oder die Proteinkonzentration im Tropfen zu niedrig geworden ist (vgl. Abb. 3.1 (b)). Es gilt zu beachten, dass Größe und Form eines Kristalls nicht mit der Qualität der zu erreichenden Diffraktionsdaten korrelieren müssen.

Liefern initiale Screens nur sehr kleine oder stark verwachsene Kristalle, können Kristalle

3. Röntgenkristallographische Methoden

nicht reproduziert werden. Findet die Kristallisation sehr langsam statt oder möchte man die Anzahl der entstandenen Keime kontrollieren, kann es sinnvoll sein, ein Impf- (oder Seeding-) Experiment durchzuführen.

Dazu wird ein bereits vorhandener Kristall aus dem Tropfen entnommen und in 1 μ l frischen Reservoirs aufgenommen. Es folgt die mechanische Zerstörung dieses Kristalls. Diese Suspension aus kleinsten Kristallsplittern wird nun in einem Verhältnis von 1:100 bis 1:5000 mit der Reservoirolösung verdünnt. Es besteht die Möglichkeit, aber nicht die Notwendigkeit, diese Lösungen zu zentrifugieren und den Überstand weiterzuverwenden, um größere Kristall-Bruchstücke zu entfernen. Von dieser Lösung kann nun ein geringes Volumen zu einem Kristallisationsansatz hinzugefügt werden, um eine spontane Nukleation vermeiden zu können. In dieser Arbeit wurde Kristallbildung ebenfalls durch Seeding induziert; dabei wurde die Seedlösung nicht zentrifugiert.

Sobald Kristalle gewonnen werden konnten ist es elementar, dass diese Kristalle auch Röntgenstrahlen beugen. Dabei spielen viele Faktoren eine Rolle: Zum einen können äußerlich gut geformte Einkristalle im Inneren erheblich ungeordnet sein, sodass sie nicht in der Lage sind Röntgenstrahlen zu beugen, zum anderen kann die Diffraktionseigenschaft eines Kristalls maßgeblich von der Vitrifikationslösung beeinflusst werden. Klarheit kann allerdings nur ein Diffraktionsexperiment geben.

Vitrifikation Da Kristalle während der Röntgendiffraktion recht hohen Strahlendosen ausgesetzt werden, wird die Datensammlung hauptsächlich unter Niedrigtemperatur-Bedingungen (100 K) durchgeführt. Während des Herabkühlens der Kristalle muss verhindert werden, dass das in den Kristallen vorhandene Wasser Eiskristalle ausbilden kann. Diese Kristalle können zum einen ebenfalls Röntgenstrahlen beugen und die Diffraktion des Kristalls überlagern, zum anderen kann durch die Dichteanomalie von Wasser erheblicher Schaden am Proteinkristall entstehen, der zu 30 - 80 % aus Wasser besteht. Dieser Schutz kann erreicht werden, indem die Kristalle in einer Kristallisationslösung wachsen, die bei 100 K und schneller Absenkung der Temperatur keine Eiskristalle ausbildet.

Ist dies nicht möglich, wird der Kristall vor dem Abkühlen in einer Vitrifikationslösung inkubiert. Sowohl die Art des Vitrifikationsmittels (PEGs, Glycerol, Ethylenglycol, hohe Zuckerkonzentrationen, Öle) als auch die Art der Inkubation (kurze Inkubation mit hoher Konzentration, lange Inkubation mit langsam steigender Konzentration, sehr kurzes Eintauchen in Öl, Reservoirwechsel) können dabei erheblichen Einfluss auf die Qualität der Diffraktionseigenschaften eines Kristalls haben. Nicht nur die Wahl des Vitrifikationsmittels und der eingesetzten Konzentration (vgl. z. B. Garman und Mitchell [1996]) spielen bei dem Erfolg der Vitrifikation eine große Rolle, sondern ebenfalls die Technik des Herunterkühlens.

In dieser Arbeit wurden alle Kristalle mit Hilfe von Glycerol in geeigneten Konzentrationen vor der Bildung von Eiskristallen geschützt und vitrifiziert.

3.2. Röntgendiffraktion

Strahlenquellen Als Strahlenquellen für Röntgendiffraktionsexperimente stehen typischerweise zwei Arten von Systemen zur Verfügung: Im Laborbereich der Proteinkristallographie werden meist Röntgeneratoren mit einer Kupferanode verwendet. Durch den Beschuss mit Elektronen wird, neben der Bremsstrahlung, ebenfalls die charakteristische Strahlung emittiert. Die im Labor verwendete charakteristische Strahlung der K_{α} -Linie von Kupfer emittiert bei einer Wellenlänge von 1,54 Å.

Die zweite verwendete Strahlenquelle ist die am Synchrotron generierte Synchrotronstrahlung. Im Synchrotron werden beschleunigte Elektronen auf einer Kreisbahn gehalten, wodurch bereits elektromagnetische Strahlung emittiert wird. Durch besondere Bauteile im Synchrotron (z. B. Undulatoren) kann die Flugbahn der beschleunigten Elektronen weiter abgelenkt werden. Die starke Richtungsänderung der beschleunigten Elektronen in diesen Bauteilen führt zu einer brillanten Synchrotronstrahlung, wodurch die Qualität der Daten verbessert und die Messzeit deutlich verringert werden kann. Durch das breite Spektrum dieser Strahlung ist es ebenfalls möglich, mit Hilfe von Monochromatoren die Wellenlänge der auf den Kristall gelenkten Röntgenstrahlung zu modulieren. Die in dieser Arbeit diskutierten Daten wurden an drei europäischen Synchrotrons aufgezeichnet: An der SLS in der Schweiz, am ESRF in Frankreich und am Berliner BESSY. Die Röntgenquelle im benachbarten Labor (Rigaku Micromax HF-007 mit einem mar345-Detektor) wurde für Testmessungen an Kristallen und Vitrifikationslösungen verwendet.

Kristalle Ein Einkristall besteht aus der gleichmäßigen Anordnung von gleichförmigen Molekülen im dreidimensionalen Raum. Dabei sind nur bestimmte Symmetrioperationen mit der grundsätzlichen Translationssymmetrie, mit der jeder Kristall ausgestattet ist, vereinbar. Auch diese Symmetrioperationen sind dabei nicht beliebig miteinander kompatibel, aus gruppentheoretischen Überlegungen ergeben sich insgesamt 230 Symmetriegruppen für dreidimensionale Kristalle, die sogenannten Raumgruppen. Jeder Kristall gehört einer dieser Raumgruppen an. Die kleinste Einheit, mit der durch Translation der komplette Kristall rekonstruiert werden kann, ist dabei die Einheitszelle. Diese Einheitszelle kann aus nur einem Molekül bestehen oder aber mehrere Moleküle enthalten, welche über Operationen wie Rotation oder Translation miteinander in Beziehung stehen. Die kleinste Einheit dieser Einheitszelle wiederum ist die asymmetrische Einheit. Durch Symmetrioperation füllt die asymmetrische Einheit wiederum die Einheitszelle aus.

3. Röntgenkristallographische Methoden

Die Einheitszelle besteht zu ca. 30 - 80 % aus Lösungsmittel. Durch diesen hohen Lösungsmittelgehalt sind Proteinkristalle recht weiche und häufig fragile Objekte, nicht vergleichbar mit z. B. Salzkristallen. Da es sich bei Proteinen um chirale Moleküle handelt, sind als Symmetrioperationen Punkt- und Achsenspiegelungen für Kristalle natürlicher Proteine nicht möglich, wodurch die Anzahl der möglichen Raumgruppen von 230 auf 65 sinkt.

Diffraction Durch die hochsymmetrische Anordnung der Proteinmoleküle im Kristall wirkt dieser wie ein Beugungsgitter und es kann Diffraction beobachtet werden. Dabei werden Röntgenstrahlen an den Elektronen der Atome im Kristall gestreut. Durch die regelmäßige Anordnung der Moleküle innerhalb des Kristalls kann dabei Interferenz beobachtet werden. Die Streuwelle eines Elektrons in eine bestimmte Richtung trifft in den meisten Fällen auf eine Streuwelle mit genau entgegengesetzter Phase, sodass destruktive Interferenz stattfindet und sich die beiden Wellen gegenseitig auslöschen. In einigen wenigen Fällen und in bestimmten Richtungen (beschrieben durch das Bragg'sche Gesetz, Formel (1), vgl. Abb. 3.2) allerdings kann konstruktive Interferenz und damit ein Diffractionsmaximum beobachtet werden.

$$n * \lambda = 2d_{hkl} * \sin(\theta) \quad (1)$$

Die Bragg-Bedingung besagt, dass immer dann Diffraction auftritt, wenn die Streckendifferenz, die der einfallende Strahl zwischen zwei sogenannten Netzebenen mit dem Abstand d im Kristall zurückgelegt hat ($2d_{hkl} * \sin(\theta)$) einem Vielfachen n der Wellenlänge λ der einfallenden Röntgenstrahlen entspricht. Dies liegt darin begründet, dass nur in diesem Fall maximale konstruktive Interferenz auftritt.

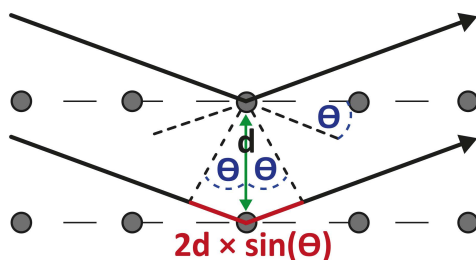


Abbildung 3.2 | Darstellung der Röntgenbeugung nach Bragg

Nach Bragg tritt positive Interferenz nur dann auf, wenn $2d * \sin(\theta)$ ein Vielfaches der Wellenlänge λ ist.

Aus der Bragg-Gleichung ergibt sich ebenfalls die theoretische maximale Auflösung der Röntgenbeugung: Beugung kann es nur bis zu einem Beugungswinkel θ von maximal 90° ($\hat{=}$ Rückwärtsstreuung, $2\theta = 180^\circ$) geben. Somit ergibt sich aus Formel 1, dass die theoretische maximale Auflösung der Hälfte der eingesetzten Wellenlänge entspricht ($d_{hkl} = \lambda/2$), was an einer typischen Synchrotron-Strahlenquelle bei einer Wellenlänge

von 1 Å eine mögliche Auflösung von 0,5 Å bedeuten würde. Solche idealen Werte werden unter realen Bedingungen schwerlich erreicht.

Das Bragg'sche Gesetz sagt allerdings nur etwas über die Richtung aus, in der konstruktive Interferenz beobachtet werden kann, nichts jedoch über die Intensität oder Phase der jeweiligen Röntgenreflexe. Diese ergeben sich aus der Verteilung der Atome (und damit der streuenden Elektronen) innerhalb der kristallographischen Einheitszelle entsprechend folgender Gleichung (2):

$$F(h, k, l) = \sum_{n=1}^N f_n^{(hkl)} * e^{2\pi i(hx_n + ky_n + lz_n)} = |F_{hkl}| * e^{i\alpha_{hkl}} \quad (2)$$

Dabei berücksichtigen f_n (die sogenannten atomaren Streufaktoren) bereits alle innerhalb eines Atoms stattfindenden destruktiven Interferenzen. Die Strukturfaktoramplituden $|F_{hkl}|$ können experimentell bestimmt werden, die Phaseninformation α allerdings nicht.

Da der Einfallswinkel und damit die Bedingung für konstruktive Interferenz für jede Ebene von der Orientierung des Strahlengangs zum Kristall abhängig ist, wird der Kristall während der Messung gedreht. Um alle Reflexe aufzeichnen zu können, wird die Datensammlung in einzelne Aufnahmen geteilt. Während jeder Einzelaufnahme wird der Kristall orthogonal zum Strahlengang um den gleichen Winkel gedreht, typischerweise um 0,001 - 1° pro Aufnahme. Insgesamt wird zwischen 45° und 360° aufgezeichnet, abhängig von der Raumgruppe des Kristalls und dem Verwendungszweck.

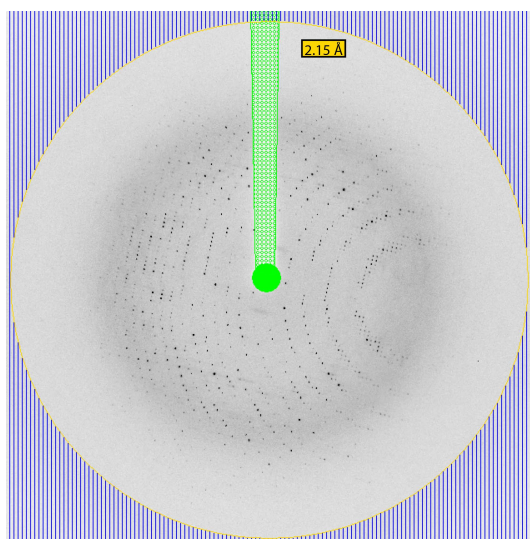


Abbildung 3.3 | Diffractionsaufnahme eines Proteinkristalls

Die Beugung am Kristall führt zu Diffractionsaufnahmen, auf denen die Reflexe (abhängig von Kristallposition, Detektorentfernung, Drehwinkel, Raumgruppe und Zellkonstanten) abgebildet werden. Grün markiert ist der Primärstrahlfänger, die Auflösung dieser Aufnahme beträgt 2,15 Å. Blau markiert ist der bei der Auswertung nicht verwendete Auflösungsbereich; Bild hergestellt mit Mosfilm (Leslie und Powell [2007]).

3. Röntgenkristallographische Methoden

Bei der Durchführung eines Diffraktionsexperiments wird nur der gebeugte Anteil des Röntgenstrahls auf dem Detektor registriert. Der Großteil der Strahlung, der nicht gebeugt wird, wird von einem Primärstrahlfänger absorbiert, damit der Detektor nicht geschädigt wird.

3.3. Strukturlösung

Aus Aufnahmen werden Reflexe Die gesammelten Daten können entweder von Hand oder mit geeigneter Software integriert werden. Dazu wird für jede Observation eines Reflexes auf jeder einzelnen Diffraktionsaufnahme sowohl die Position der Observationen als auch die Intensität und die Standardabweichung derselben bestimmt.

Bei diesen Observationen kann es sich, je nach Kristall und Drehwinkel pro Bild, um die komplette Aufzeichnung eines Reflexes handeln oder um Teilreflexe. Heutige Standardprogramme (XDS (Kabsch [2010]), imosfilm (Leslie und Powell [2007])) sind in der Lage, zwei oder mehr zu einem Reflex gehörende Observationen diesem Reflex zuzuordnen und zu verarbeiten, sodass eine Liste aus Reflexen entsteht.

Das Phasenproblem Für die Berechnung der Elektronendichte aus den gemessenen Reflexen sind nicht nur die Strukturfaktoramplituden $|F_{hkl}|$ der Reflexe (welche aus den gemessenen Intensitäten berechnet werden können) von Belang, sondern ebenfalls die Phaseninformation. Durch die Aufzeichnung der Reflexe auf einem zweidimensionalen Detektor geht die Phaseninformation α verloren. Ohne diese Phaseninformation ist es jedoch nicht möglich, aus den gemessenen Daten durch Fouriertransformation die Elektronendichte ρ zu konstruieren (vgl. Formel (3)).

$$\rho_{xyz} = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{+\infty} \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \sum_{l=-\infty}^{+\infty} |F_{hkl}| * e^{(i\alpha_{hkl})} * e^{(-2\pi i(hx+ky+lz))} \quad (3)$$

Ohne weitere Hilfsmittel ist die Lösung dieses Phasenproblems für Kristalle von Makromolekülen nicht möglich. Patterson konnte 1934 allerdings eine Methode aufzeigen, durch die aus den ermittelten Strukturfaktoramplituden $|F_{hkl}|$ relative Positionen der in der Einheitszelle enthaltenen Atome zueinander ermittelt werden können (vgl. Formel (4)).

$$P_{xyz} = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{+\infty} \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \sum_{l=-\infty}^{+\infty} |F_{hkl}|^2 * e^{(-2\pi i(hx+ky+lz))} \quad (4)$$

Anhand der erhaltenen Patterson-Karte P_{xyz} können bei kleinen Molekülen direkt die relativen dreidimensionalen Positionen aller Atome bestimmt werden. Bei großen Molekülen wie Proteinen, mit vielen ähnlich schweren Atomen, ist dies durch die schiere

Anzahl der Peaks ($N * (N - 1)$) der Pattersonfunktion, mit N = Atomanzahl ohne Wasserstoffatome) nicht möglich. Für die Lösung des Phasenproblems für Proteinkristalle wurden daher mehrere Methoden entwickelt:

- MAD (anomale Dispersion/Diffraktion bei mehreren Wellenlängen)
- SAD (anomale Diffraktion bei einer Wellenlänge)
- MIR (mehrfacher isomorpher Ersatz)
- MR (molekularer Ersatz)
- RIP (Strahlenschaden-induzierte Phasierung, Ravelli et al. [2003])
- weitere Systeme, bei denen Methoden gekoppelt werden (MIRAS, SIRAS)

Da in dieser Arbeit sowohl anomale Diffraktion als auch der molekulare Ersatz zur Strukturlösung verwendet wurden, möchte ich im Folgenden auf diese beiden Methoden detaillierter eingehen.

SAD- und MAD-Phasierung Die klassische Röntgendiffraktion ist ein reines Streuphänomen, bei dem Röntgenstrahlen an Elektronen (den Streuzentren) verteilt werden ohne absorbiert zu werden. Da reale Elektronen jedoch an Atomkerne gebunden sind und sich in Orbitalen bewegen, kann elektromagnetische Strahlung absorbiert werden. Diese Absorption ist abhängig von der Wellenlänge und den interagierenden Atomen: Nähert sich die Energie des einfallenden Strahls an die sogenannten Absorptionskanten des jeweiligen Elements an, ändert sich das Streuverhalten dieser Atome, sie streuen anomal. Dies verändert den atomaren Streufaktor f um einen realen f' - und einen imaginären f'' -Anteil ($f = f_0 + f' + f''$). Die anomale Streuung führt insbesondere zu einer Phasenverschiebung durch das Streueignis selbst.

Die Absorptionskanten mancher Elemente wie Gold, Quecksilber, Platin, Xenon oder Selen liegen dabei bei Energien von 25000 - 5000 keV (und somit im Wellenlängenbereich von $\sim 0,5$ bis ~ 2 Å) und können mit Synchrotronstrahlung angesteuert werden (vgl. Abb. 3.4 (a,b)). Diese Absorptionskanten können durch Fluoreszenzscans experimentell bestimmt werden.

SAD- und MAD-Phasierung nutzen beide die anomalen Diffraktionseigenschaften von Atomen bei unterschiedlichen Wellenlängen der Röntgenstrahlung und unterscheiden sich dabei in der technischen Umsetzung.

Durch die Aufnahme von Datensätzen bei unterschiedlichen Wellenlängen eines mit anomalen Streuern besetzten Proteinkristalls können bei der **MAD-Phasierung** sowohl der dispersive f' -Anteil als auch der absorbierende f'' -Anteil der anomalen Diffraktion bestimmt werden (vgl. Taylor [2010], Abb. 3.4). Diese Information kann daraufhin genutzt werden, um die Position dieser Schweratome zu bestimmen und damit erste Phaseninformationen für die anomalen Streuer zu erhalten. Bei hoher Datenqualität kann anhand dieser Daten sehr effizient Phasen für die gesamte Einheitszelle erhalten und dadurch

3. Röntgenkristallographische Methoden

die Kristallstruktur gelöst werden.

Allerdings hat MAD-Phasierung einige Flaschenhälse: So muss zum einen eine hohe Datenqualität vorhanden sein, damit die häufig geringen anomalen Differenzen nicht im Hintergrund untergehen, zum anderen benötigt man einen Kristall, der anomale Streuer enthält. Des Weiteren sollten alle Datensätze mit dem gleichen Kristall gemessen werden, Strahlenschäden stellen somit immer ein reales Problem dar.

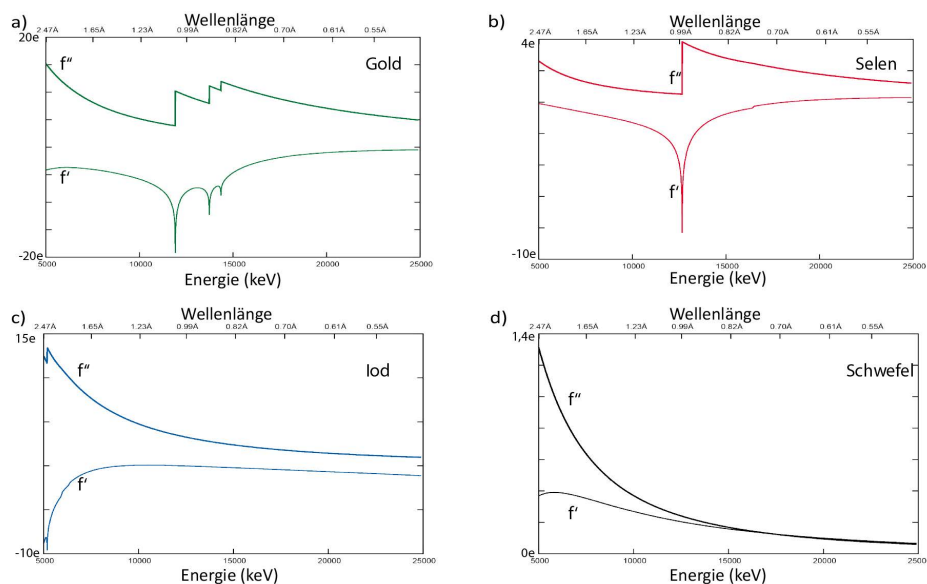


Abbildung 3.4 | f' und f'' verschiedener Atome

Anomale Diffraktion ist wellenlängenabhängig, der anomale Anteil des Strukturformfaktors setzt sich aus einer dispersiven (f') und einer anomalen (f'') Komponente zusammen. Gibt es eine Absorptionskante im verwendbaren Wellenlängenbereich, kann mit Hilfe der MAD-Technik phasiert werden. Dies ist zum Beispiel bei Gold (a) oder Selen (b) möglich. Besitzt ein Element keine Absorptionskante, kann das anomale Signal mit SAD ausgewertet werden, wie bei Iod (c) oder Schwefel (d). Die Abbildung wurde erstellt mit Hilfe des X-ray-Onlinewerkzeugs^[3].

Bei der **SAD-Phasierung** sammelt man lediglich einen Datensatz, bei dem man ein möglichst hohes anomales Signal (entspricht einem möglichst großen Unterschied zwischen f' und f'') messen möchte. Bei anomalen Streuern ist die Auswahl der Wellenlänge für dieses Experiment häufig weniger relevant als bei einem MAD-Experiment: Besitzt der Streuer eine Absorptionskante im ansteuerbaren Bereich, so wird die Peak-Wellenlänge gewählt.

Bei einem anomalen Streuer ohne Absorptionskante kann die Wellenlänge so gewählt werden, dass man sowohl ein ausreichendes anomales Signal als auch eine gute Auflösung (vgl. Abschnitt 3.2) erhalten kann. Beispielsweise im Fall von Iod (vgl. Abb. 3.4 (c)) spielt die Wahl der Wellenlänge eine untergeordnete Rolle, da das anomale Signal gleichbleibend hoch bleibt. Die **Schwefel-SAD-Phasierung** stellt eine Besonderheit dar, da dies die einzige Möglichkeit einer Phasierung von Kristallen nativer Proteine ohne

^[3]http://skuld.bmsc.washington.edu/scatter/AS_index.html, verwendet am 06. August 2015

die Verwendung von zusätzlichen anomalen Streuern ist. Durch den sehr geringen Unterschied zwischen f' und f'' bei schwachen anomalen Streuern wie Schwefel-Atomen (vgl. Abb. 3.4 (d)) ist eine hohe Multiplizität notwendig, um ein hohes Signal/Rausch-Verhältnis zu erreichen. Ebenso ist ein hohes Signal/Rausch-Verhältnis für eine ausreichende Quantifizierung des anomalen Signals Voraussetzung (Liu et al. [2012]).

Des Weiteren muss eine recht hohe Wellenlänge gewählt werden, um ein ausreichendes anomales Signal zu erfassen (vgl. Abb. 3.4).

Sowohl für Selen-SAD als auch für Schwefel-SAD gilt, dass ohne schwefelhaltige Aminosäuren im Protein (Methionine oder Cysteine) ein solches Experiment unmöglich ist.

Molekularer Ersatz Wenn man bereits Strukturinformationen, entweder eines ähnlich gefalteten Proteins (sei es homolog oder analog) oder eines Teils des kristallisierten Protein(komplexe)s, in Händen hält, ist es möglich diese Strukturinformationen für die Gewinnung erster Phasen zu nutzen. Dabei sind eine Sequenz-Similarität von mindestens 35 % und eine Standardabweichung der $C\alpha$ -Atome von maximal 1,5 Å gute Voraussetzungen für einen erfolgreichen molekularen Ersatz (Abergel [2013]). Bei dem molekularen Ersatz wird eine bekannte Struktur in der Einheitszelle der unbekanntes Struktur platziert. Je exakter die Position der platzierten Matrize mit der tatsächlichen Situation in der Einheitszelle übereinstimmt, desto besser wird diese Platzierung bewertet bis eine oder mehrere Positionen gefunden wurden.

Bei dieser Technik muss das Phasenproblem nicht gelöst werden, sondern es wird umgangen. Durch die Patterson-Karte, die bereits aus den gemessenen Strukturfaktoramplituden erstellt werden kann (vgl. Gleichung (4)), sind die interatomaren Vektoren bekannt. Mit dem Abgleich dieser Patterson-Karte mit den interatomaren Vektoren der Vergleichsstruktur kann die unbekanntes Struktur gelöst werden. Dazu werden die interatomaren Vektoren der bekannten Struktur durch Rotations- und Translationsoperationen an die Vektoren der unbekanntes Struktur angepasst. Bei der Suche nach der richtigen Position werden diese Operationen nacheinander durchgeführt, wodurch der Rechen- und Zeitaufwand deutlich verringert werden kann.

3.4. Modellierung und Verfeinerung

Nachdem eine erste Phasierung abgeschlossen ist, folgt die Modellierung. Diese Arbeit kann heutzutage zu einem großen Teil von Programmen übernommen werden, die in der Lage sind durch einige Iterationen komplette Proteinmoleküle aus den Positionen weniger Atome (bei MAD oder SAD) oder eines Teils des Proteins (MR) zu berechnen. Dabei bleibt allerdings manuelle Bearbeitung in nahezu allen Fällen unabdingbar.

Zum einen sind Programme meist nicht in der Lage, Bereiche des Proteins mit einer geringen Besetzung durch Elektronendichte effizient zu modellieren, zum anderen sind

3. Röntgenkristallographische Methoden

viele kleinere Modifikationen von Hand besser zu beurteilen, wie die Positionierung von Seitenketten mit schlechter Elektronendichte, die Überprüfung von Ramachandran- und Rotamerausreißern, die Positionierung von Lösungsmittel- oder Inhibitormolekülen oder die Beurteilung von cis-Peptidbindungen.

Als Maß für die Qualität der Verfeinerungen werden zwei Werte zur Beurteilung der Übereinstimmung zwischen Modell und gemessenen Daten berechnet, R_{work} und R_{free} (vgl. Formel (5)).

$$R_{work} = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|} \quad (5)$$

Die Formel beider R-Faktoren ist identisch, allerdings unterscheiden sich die für die Berechnung verwendeten Datensätze: Während für den R_{work} der Großteil der gesammelten Daten in die Auswertung mit einbezogen wird, die an das Modell angepasst wurden, setzt sich das Testset, mit dem R_{free} berechnet wird, aus Reflexen zusammen, die von vornherein isoliert wurden und nicht in die Verfeinerungsrechnung eingehen. Diese beiden R-Faktoren erlauben zum einen eine Aussage über die Qualität des Strukturmodells, zum anderen kann durch den R_{free} die Validität des Strukturmodells überprüft werden. Sinkt der R_{work} und der R_{free} steigt gleichzeitig, ist dies ein Zeichen für eine Überanpassung des Modells. Sinken sowohl der R_{work} als auch der R_{free} , so befindet man sich bei der Verfeinerung (unter regulären Umständen) auf dem richtigen Weg.

Für die Auswertung der generierten Daten, die in dieser Arbeit diskutiert werden, wurden verschiedene Softwarepakete verwendet (vgl. Tab. 2.12). Diese Arbeit beinhaltet die Auswertung von zwei SAD-Datensätzen und ca. 20 Datensätzen, die entweder mit Hilfe von MR gelöst werden konnten oder bei denen bereits gelöste Strukturen als erstes Modell verwendet wurden.

4. Ergebnisse

4.1. Gentechnische Arbeiten

4.1.1. CK2

Die Klonierung von CK2-Genen wurde bereits in Vorarbeiten (*hsCK2α¹⁻³³⁵*, *zmCK2α*) durchgeführt. Die C-terminal verkürzte *hsCK2α¹⁻³³⁵* beruht dabei auf Ermakova et al. [2003] und wurde als aktives und stabiles Protein anstelle von Vollängen-*hsCK2α* verwendet. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Labortätigkeiten beschränkten sich daher auf die Retransformation verschiedener *E. coli*-Expressionsstämme mit Expressionsplasmiden, die verschiedene CK2-Gene enthalten. Bei allen CK2-Genen wurde der Vektor pT7-7 als Expressionsplasmid verwendet, alle humanen CK2-Proteine wurden in BL21 DE03 exprimiert, Mais-CK2α in BL21 DE03 C+ RP.

4.1.2. PIM3

Das Vollängen-PIM3 Gen wurde, optimiert für die Codon-Nutzung von *E. coli*, von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Olaf-Georg Issinger zur Verfügung gestellt, ebenso wie eine verkürzte Variante PIM3¹⁻²⁹³ in einem Expressionsvektor (vgl. 2.4). Es wurden weitere Konstrukte von PIM3 angefertigt, bei denen eine kleinere C-terminale Deletion durchgeführt wurde, angelehnt an Harrington et al. [2013]. Für die Klonierung dieses Gens wurden durch eine PCR auf das Vollängen-Gen von PIM3 Restriktionsschnittstellen eingefügt. Dabei wurde in Vorwärts-Richtung ein Primer verwendet, an den eine Restriktionsschnittstelle für die Restriktionsendonuklease NdeI angefügt wurde. Der Primer in die reverse Richtung wurde mit einer XhoI-Schnittstelle versehen. Aus diesen Arbeiten resultierte PIM3¹⁻³¹⁷.

Die beiden Vektoren, die für die Klonierung verwendet wurden (pET22b und pET28a(+)), wurden von Kolleginnen und Kollegen bereits geschnitten und gereinigt zur Verfügung gestellt. Von PIM3¹⁻³¹⁷ wurden daraufhin drei verschiedene Konstrukte geplant und kloniert (vgl. Abb. 4.1). Im Folgenden wird die Proteinvariante PIM3¹⁻³¹⁷ als PIM3 bezeichnet.

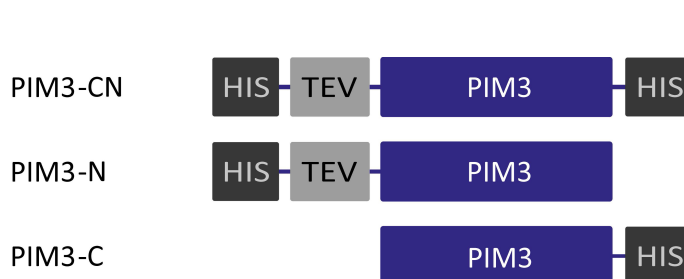


Abbildung 4.1 | PIM3-Varianten

Drei PIM3-Varianten wurden kloniert: eine sowohl N- als auch C-terminal getaggte Variante (PIM3¹⁻³¹⁷-CN) im Vektor pET28a(+); eine N-terminal getaggte Variante (PIM3¹⁻³¹⁷-N) im Vektor pET28a(+) und eine C-terminal getaggte Variante (PIM3¹⁻³¹⁷-C) im Vektor pET22b.

4. Ergebnisse

4.1.3. P21WAF

P21WAF wurde, ebenso wie CK2, nicht im Rahmen dieser Arbeit kloniert, sondern in einem Expressionsvektor zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich, anders als bei allen anderen Plasmiden, nicht um einen Expressionsvektor, bei dem das exprimierte Gen unter der Kontrolle eines T7-Promotors steht. Statt dessen wurde ein T5-Promotor verwendet, der (anders als der T7-Promotor) von allen *E. coli*-Stämmen erkannt wird und zur Expression führt. Das exprimierte Konstrukt ist dabei His-getaggt (vgl. Abb. 4.2). Zusätzlich verfügt es über eine PKA-Erkennungssequenz zwischen dem His-Tag und dem P21WAF-Gen. P21WAF wurde immer in BL21 DE03-Zellen exprimiert.



Abbildung 4.2 | P21WAF-Variante

P21WAF wurde mit einem N-terminalen His-Tag in dem pQE30-Vektor exprimiert.

4.2. Expression und Reinigung

4.2.1. CK2

Großexpression von CK2 α Für alle CK2-Untereinheiten (sowohl humanes als auch Mais-Protein) wurde dasselbe Protokoll verwendet. Nach der Transformation der Plasmide in BL21 DE03-Zellen (humanes Protein) oder BL21 DE03 C+ RP (Mais-Protein) wurden die Zellen in LB-Medium inkubiert. Das Protein wurde nach der Induktion bei einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,7 mit IPTG bei 37 °C für vier Stunden exprimiert. Diese Zellen wurden nach der Ernte durch Ultraschall aufgeschlossen und das Lysat mit der Ultrazentrifuge von Zelltrümmern befreit.

Reinigung von CK2 α Sowohl bei *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* als auch bei *zmCK2 α* wurde das geklärte Lysat in einem ersten Schritt mit einer Phosphozellulose-Säule aufgereinigt, worauf eine weitere Affinitätschromatographie mittels einer Heparinsäule folgte. Als letzter Schritt wurde eine Gelfiltration angeschlossen.

Von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* konnte deutlich mehr Protein aufgereinigt werden als bei *zmCK2 α* (8 mg Protein/l Kultur gegenüber 0,8 mg Protein/l Kultur). Durch die Gelfiltration konnte bei *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* reines Protein gewonnen werden. Bei *zmCK2 α* wurde keine Gelfiltration durchgeführt. Die Aufreinigung von CK2 α ist eine etablierte Methode und wurde bereits vielfach ausführlich beschrieben (Grankowski et al. [1991], Raaf [2009], Bischoff [2013], Klein [2014]).

CK2^{Andante}-Holoenzym und CK2 α -Proteinvarianten Sowohl das CK2^{Andante}-Holoenzym als auch die vier Proteinvarianten von CK2 α ¹⁻³³⁵ F121A, F121M, Y125A und H115Y wurden bereits in reiner Form zur Verfügung gestellt. Eine Überprüfung der Qualität des Proteins zeigte hochreines Protein (vgl. Abb. 4.4).

4.2.2. PIM3

Testexpression von PIM3 Um Protein für die Kristallisation von PIM3 zu erhalten, wurde zunächst die stark verkürzte PIM3-Variante PIM3¹⁻²⁹³ in verschiedenen Expressionsstämmen getestet. Die C-terminale Deletion beruhte dabei auf der *in silico*-Vorhersage der Kinasedomäne^[4]. Bei dieser Proteinvariante konnte keine Produktion von löslichem Protein festgestellt werden, allerdings wurden große Mengen unlösliches Protein exprimiert (Daten nicht gezeigt). Bei dem Versuch lösliches Protein über Affinitätschromatographie aufzureinigen, konnte ein 25 kDa großes Protein gewonnen werden, welches als SlyD, einem *E. coli*-eigenen Protein, identifiziert wurde (vgl. dazu z. B. Andersen et al. [2013]). Diese Proteinvariante war nicht aufzureinigen, daher wurden drei neue Konstrukte (vgl. Abb. 4.1) in verschiedene Expressionsstämme transformiert. Der Expressionsstamm BL21 DE03 C+ RIPL erwies sich bei der Expression als besonders effizient. Bei der Testexpression wurde PIM3 auch in den als geeignet befundenen Expressionsstämmen zu ca. 80 % unlöslich exprimiert.

Großexpression von PIM3 Die Expression im größeren Maßstab (5 l) der drei Proteinvarianten im Expressionsstamm C+ RIPL verlief unproblematisch. Die in den Testexpressionen ermittelten Bedingungen (Expression in LB-Medium bei 30 °C für fünf Stunden, Induktion mit 0,5 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ = 0,4 - 0,7) erwiesen sich auch in größerem Maßstab als effizient. Dabei war der Anteil an löslichem Protein deutlich höher (ca. 90 %) als bei der Testexpression.

Reinigung von PIM3 Nach der Expression konnten alle drei Proteinvarianten äquivalent gereinigt werden. Beispielhaft soll im Folgenden die Aufreinigung von PIM3-CN gezeigt werden. Als erster Aufreinigungsschritt nach der Expression und dem Aufschluss durch Ultraschall konnte das Lysat durch Ultrazentrifugation von den Zelltrümmern getrennt werden. Nach der Zentrifugation wurde das geklärte Lysat auf die NiNTA-Säule aufgebracht. Das Protein wurde durch einen Imidazolgradienten eluiert und konnte in großer Reinheit gewonnen werden. Um zu überprüfen, ob es sich bei dem erhaltenen Protein um ein His-getagtes Protein und somit PIM3 handelt, wurden zwei Methoden angewandt: Der Histidin-Tag wurde sowohl durch Western Blot als auch durch ein His-Färbungskit nachgewiesen, bei beiden Methoden ist ein klares Signal bei der erwarteten Größe von 38 kDa zu erkennen (vgl. Abb. 4.3). Die jeweiligen Kontrollen zu den Expe-

^[4]<http://www.uniprot.org/uniprot/Q86V86#showFeatures>, abgerufen am 12.10.2015

4. Ergebnisse

rimenten (Coomassie-Gelfärbung für die His-Färbung und Coomassie-Membranfärbung für den Western Blot) zeigen eine dazu korrespondierende Bande auf derselben Höhe. Der Western Blot zeigt eine deutlich schwächere zweite Bande bei ca. 35 kDa unterhalb der sehr starken Bande.

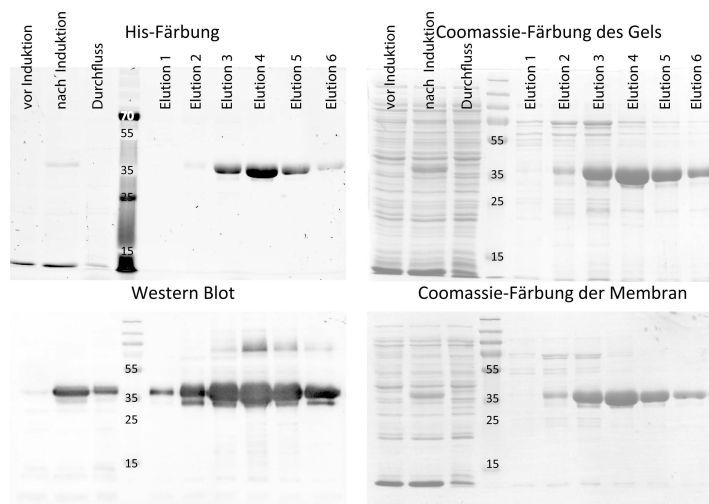


Abbildung 4.3 | PIM3-CN Western Blot

Jeweils 2 μ l der Totallysate vor und nach Induktion bzw. 5 μ l der Elutionsfraktionen wurden auf 12 % SDS-Gelen aufgetrennt. Ein Gel wurde zunächst mittels His-Tag-Färbung gefärbt und entwickelt, später wurde es in Färbelösung gefärbt. Die Proteine aus einem zweiten identischen Gel wurden auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Hilfe eines Western Blots entwickelt, die Membran im Nachhinein mit Färbelösung gefärbt.

Als zweiter und letzter Reinigungsschritt wurde daraufhin eine Gelfiltration durchgeführt, auf eine Konzentration von 10 - 30 mg/ml aufkonzentriert und das Protein bei -80 °C eingefroren.

4.2.3. P21WAF

Um die Aktivität von PIM3 überprüfen zu können, wurde mit P21WAF ein Protein exprimiert und gereinigt, welches von PIM1 (Wang et al. [2002]) und somit mit hoher Wahrscheinlichkeit auch von PIM3 (Zhang et al. [2013]) phosphoryliert werden kann.

Expression von P21WAF Nach der Transformation des Plasmids in *E. coli* BL21 DE03-Zellen wurde die Expression von P21WAF wie von Götz et al. [2000] beschrieben durchgeführt.

Reinigung von P21WAF Die Reinigung von P21WAF unterschied sich von den vorher beschriebenen Aufreinigungen, da P21WAF zwar ein His-Tag besitzt, jedoch nicht als gefaltetes Protein, sondern im ungefalteten Zustand gereinigt wurde (vgl. 2.9.5, Götz et al. [2000]). Eine Überprüfung der Reinheit erfolgte nach einer Ethanol-fällung des Proteins, da hohe Guanidiniumhydrochlorid-Konzentrationen nicht kompatibel mit der SDS-PAGE sind. Nach der Dialyse gegen den Lagerpuffer, bei der eine große Menge des Proteins (ca. 90 %) ausfiel, wurde das aufgereinigte Protein für die Aktivitätsbestimmung der PIM3-Varianten verwendet. Versuche, die maximal erreichte Löslichkeit von 18 μ M zu erhöhen, blieben erfolglos.

4.2.4. Proteinqualität

Alle in der Arbeit verwendeten Proteine konnten in der für ihren Verwendungszweck notwendigen Reinheit entweder produziert werden oder wurden zur Verfügung gestellt. *ZmCK2 α* und P21WAF wurden nicht gefiltert, weisen allerdings eine ausreichende Proteinqualität auf. *ZmCK2 α* und P21WAF wurden nicht gefiltert, weisen allerdings eine ausreichende Proteinqualität auf. Sowohl die drei PIM3-Varianten als auch *hsCK2 α* wurden gefiltert. Die drei PIM3-Varianten zeigen eine hohe Sauberkeit, allerdings waren trotz Gelfiltration kleinere Verunreinigungen, besonders im hochmolekularen Bereich der PIM3-Varianten, erkennbar (vgl. Abb. 4.4).

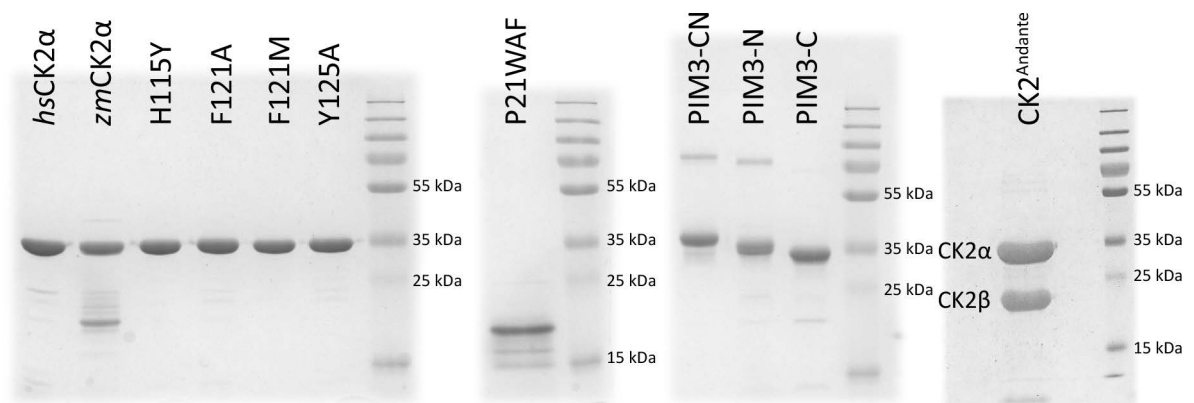


Abbildung 4.4 | Reinheit der verwendeten Proteine

Die Qualität der Proteine wurde mit Hilfe der Auftragung von jeweils 2,5 μg (5 μg bei $\text{CK2}^{\text{Andante}}$) der Proteinlösungen auf 12 %igen SDS-Polyacrylamidgelen überprüft.

4.3. Charakterisierung der PIM3-Varianten

Durch die präparative Gelfiltration von PIM3 wird zum einen deutlich, dass alle drei Proteinvarianten größtenteils als Monomere eluieren, zum anderen ein Teil des Proteins allerdings auch immer im Totvolumen der Gelfiltrations-Säule (HiLoad 16/60 Superdex 75) eluiert. Bei dieser Fraktion handelt es sich teilweise ebenfalls um PIM3 (vgl. Abb. 4.5, Gelbild, Bande "Tot"), sodass alle PIM3-Varianten zu einer gewissen Aggregation zu neigen scheinen.

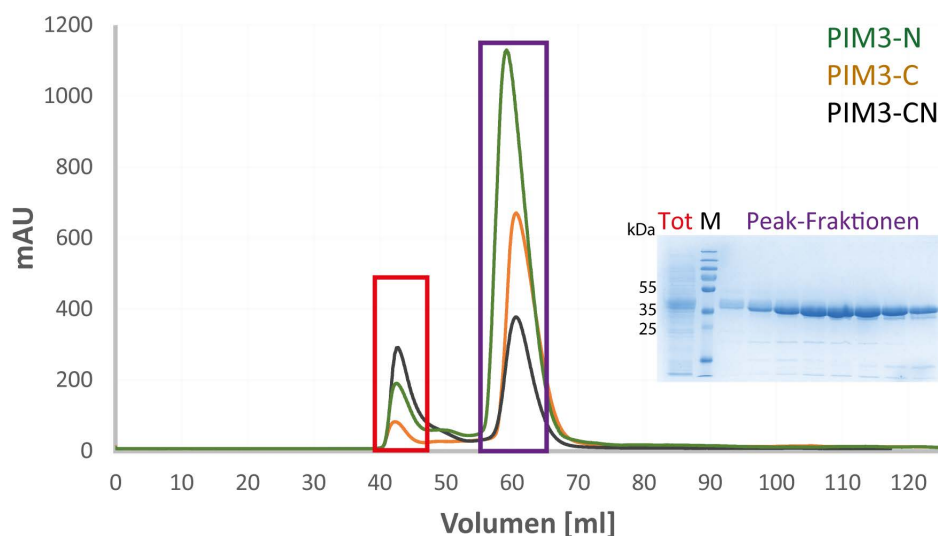


Abbildung 4.5 | Gelfiltration der PIM3-Varianten

Die Gelfiltrationen aller drei PIM3-Varianten zeigen sowohl einen Peak im Totvolumen der Gelfiltrations-Säule (rot umrandet) als auch einen zweiten Peak (violett umrandet) bei ca. 60 ml Elutionsvolumen. Bei dem zweiten Peak handelt es sich um monomeres PIM3, der erste Peak beinhaltet ebenfalls nicht unwesentliche Mengen PIM3. Das Gel wurde mit Elutionsfraktionen von PIM3-CN durchgeführt.

Für die Validierung der nativen Faltung der aufgereinigten PIM3-Varianten wurden mit PIM3-CN verschiedene Experimente durchgeführt, um die Proteinqualität für die spätere Anwendung in der Kristallisation abschätzen und bei Bedarf optimieren zu können. Dabei sind mehrere Faktoren maßgeblich: Ein aktives Protein, welches in der Lage ist ein natives Substrat zu phosphorylieren, weist auf eine korrekte Faltung hin und macht Experimente zur Proteinfaltung (wie CD- (circular dichroism-) oder FTIR- (Barth [2007], Fourier-transformierte Infrarot-)Spektroskopie) überflüssig.

Natives PIM3 ist wahrscheinlich in der Lage, P21WAF zu phosphorylieren (Li und Mukaida [2014]). Auch das in dieser Arbeit rekombinant in *E. coli* exprimierte PIM3-CN konnte im Aktivitätstest rekombinantes P21WAF konzentrationsabhängig phosphorylieren (vgl. Abb. 4.6 (a)). Durch die Phosphorylierung von P21WAF verändert sich das Laufverhalten desselben drastisch, die Proteinbande von P21WAF wird abhängig von

der PIM3-Konzentration zu höheren Molekulargewichten verschoben und es sind mehrere Proteinbanden sichtbar. Des Weiteren ist im Radiogramm zu sehen, dass die Proteinphosphorylierung nicht nur von der Enzymkonzentration, sondern ebenfalls von der E9-Inhibitorkonzentration (vgl. Abb. 4.6 (b)) abhängig ist. E9 ist ein ATP-kompetitiver CK2- und PIM3-Inhibitor (vgl. 4.4.2). Dies ist besonders deutlich an der Abnahme der Autophosphorylierung von PIM3 zu erkennen (vgl. Abb. 4.6 (b), Banden 2, 5 und 8).

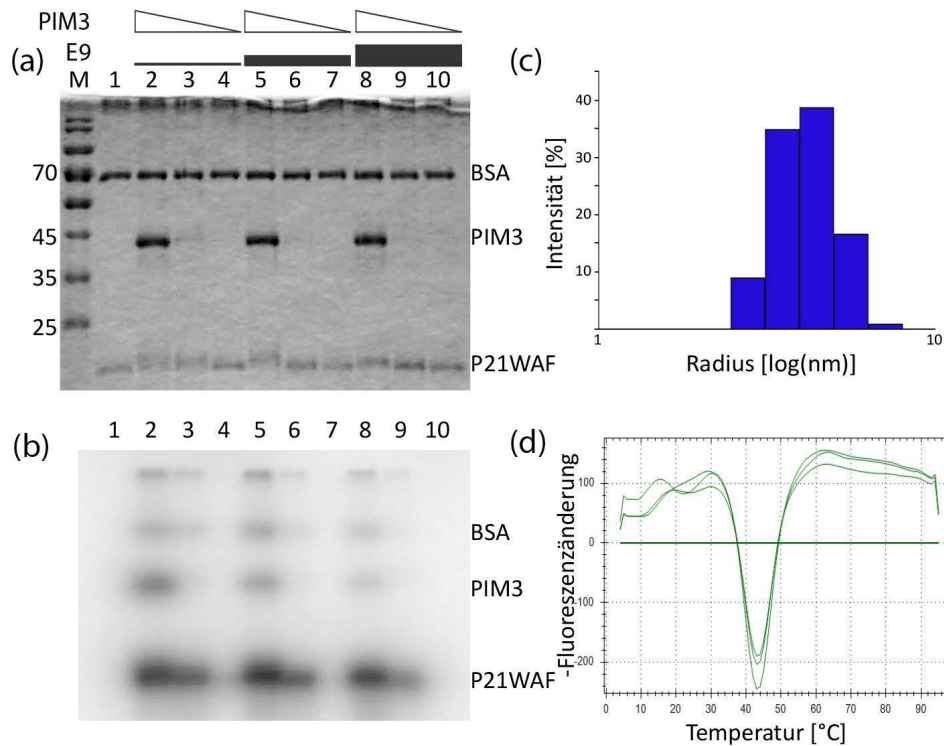


Abbildung 4.6 | Charakterisierung von PIM3-CN

Jeweils 10 µl der Phosphorylierungs-Ansätze wurden auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen; a) Coomassie-Färbung, b) Radiogramm (5 Minuten Belichtung). Spuren 1-10: jeweils 1 µM P21WAF. Spuren 2, 5 und 8: 1,5 µM PIM3; Spuren 3, 6 und 9: 0,15 µM PIM3, Spuren 4, 7 und 10: 15 nM PIM3. Spuren 5-7: 20 µM E9, Spuren 8-10: 100 µM E9. (c) Die Polydispersität von PIM3-CN wurde von Fraktionen der Gelfiltration gemessen. (d) Thermofluor-Messung von PIM3-CN (1 mg/ml), erste Ableitung der Schmelzkurve. Das Minimum dieser Kurve markiert die mittlere Schmelztemperatur von 43 °C.

Durch die Bestimmung der dynamischen Lichtstreuung des Proteins (vgl. Zulauf und D'Arcy [1992]) kann die Dispersität des Proteins und dadurch Informationen über die Homogenität der Proteinlösung gewonnen werden (vgl. Abb. 4.6 (c)). PIM3 ist nach der Gelfiltration, mit einer durchschnittlichen Dispersität von $20,36 \pm 3,7$ %Pd, monodispers.

Durch den Thermofluor-Assay (vgl. Pantoliano et al. [2000]) konnte die mittlere Schmelztemperatur des Proteins in der Pufferlösung bestimmt werden, die bei PIM3-CN 43 °C beträgt (vgl. Abb. 4.6 (d)).

4.4. ATP-kompetitive Inhibitoren von CK2

4.4.1. Töberichfurane

Götz et al. [2012] konnten vor wenigen Jahren zeigen, dass das Töberichfuran TF (6,7-dichloro-8-hydroxy-4-[(4-methyl-phenylamino)methylen]-1,2-dihydrodibenzofuran-3-on), von Kuckländer und Töberich [1983] synthetisiert, in der Lage ist, CK2 *in vitro* ATP-kompetitiv zu inhibieren. TF wurde dabei im Rahmen eines Screenings einer Bibliothek kleiner Moleküle entdeckt (Gratz [2010]). Es beeinflusst *in vivo* das Wachstum von Tumorzellen und wirkt proapoptotisch in Prostata-Krebszellen. Des Weiteren ist TF ein selektiver Inhibitor von CK2 (Götz et al. [2012]). In Münster wurden von der Arbeitsgruppe um Professor Jose zwei weitere Töberichfuran-Inhibitoren identifiziert, welche sich in erster Linie durch die Position der beiden Chlor-Atome am Dibenzofuran-Grundgerüst unterscheiden: Während bei TF die Chlor-Atome an den Positionen 6 und 7 angebracht sind, befinden sie sich bei TF85 (7,9-dichloro-8-hydroxy-4-[(4-methoxyphenylamino)methylen]-1,2-dihydrodibenzofuran-3-on) und TF107 (7,9-dichloro-4-[(4-methoxyphenyl-imino)methyl]dibenzofuran-3,8-diol) an den Positionen 7 und 9 (vgl. Abb. 4.7).

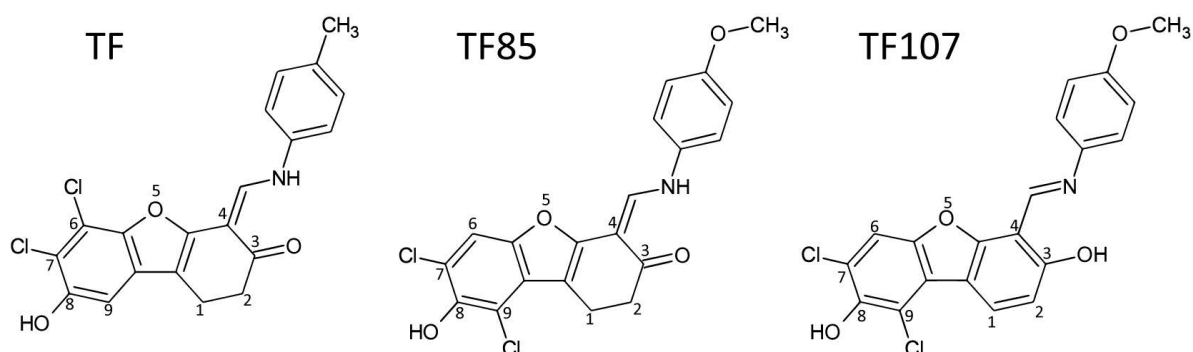


Abbildung 4.7 | Töberichfurane als Inhibitoren

Strukturformel der Töberichfurane, von der AG Jose identifizierte ATP-kompetitive Inhibitoren von CK2 α ; von links nach rechts: TF, TF85 und TF107.

Kristallisation Um den Bindungsmodus dieser Inhibitoren an CK2 α zu ermitteln, wurden TF, TF85 und TF107 mit *hsCK2 α* kokristallisiert. Die Inhibitoren wurden von der Arbeitsgruppe Jose zur Verfügung gestellt und in 100 % DMSO in einer Konzentration von 10 mM gelöst. Diese Inhibitorlösungen wurden in einem Verhältnis von 1:10 (TF85, TF107) bzw. 1:5 (TF) mit der CK2 α -Proteinlösung (8-10 mg/ml, in Lagerpuffer) vermischt. Nach einer kurzen Inkubationszeit (20 - 30 Minuten bei 20 °C) wurden diese Gemische in einem Verhältnis von 2,5:1 mit der Reservoirolösung (32 % (w/v) PEG4000, 0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 M Citrat pH 5,6) gemischt und im Sitting-Drop-Verfahren gegen die Reservoirolösung (TF und TF85: 1 ml in 24 Well-Kristallisationsplatten, TF107: 100 μ l in 96 Well-Kristallisationsplatte) äquilibriert. Nach einer Äquilibrierungszeit von

zwei Tagen wurde durch die Zugabe von je 150 nl Seedinglösung (1:1000) die Kristallbildung induziert, nach einer Woche konnten plattenförmige Kristalle gewonnen werden.

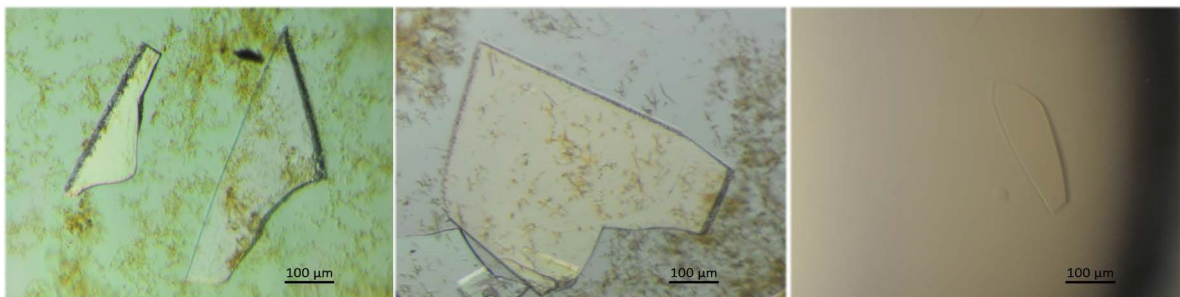


Abbildung 4.8 | Kristalle von CK2 α mit Töberichfuran-Inhibitoren

In allen Kristallisationsansätzen von CK2 α mit einem der drei Töberichfurane konnten plattenförmige Kristalle gewonnen werden. Von links nach rechts CK2 α -Kristalle mit TF, TF85 und TF107.

Diese Kristalle (vgl. Abb. 4.8) wurden in einer Vitrifikationslösung (Reservoirlösung inklusive 5 % (v/v) Glycerol und 2 mM Inhibitor) für eine Minute inkubiert und daraufhin in flüssigem Stickstoff vitrifiziert.

Strukturlösung Die Datensammlung fand am Synchrotron statt. Zusätzlich zu je einem Datensatz bei einer Wellenlänge von 1 Å wurden von Kristallen mit TF und TF85 ebenfalls Datensätze bei einer Wellenlänge von 2 Å gesammelt, um über anomale Daten Informationen zu den Positionen der Chlor-Atome der Inhibitoren zu erhalten. Alle Datensätze konnten in der Raumgruppe P2₁ gelöst und ausgewertet werden.

Für die Lösung der Strukturen wurden die am Synchrotron erhaltenen Daten mit XDS (Kabsch [2010]) integriert und skaliert, mit Phaser (McCoy et al. [2007]) wurde der MR unter der Verwendung der PDB 2PVR (Niefind et al. [2007]) durchgeführt. Die Verfeinerung der Strukturen erfolgte mit Phenix (Adams et al. [2010]), die manuelle Bearbeitung wurde mit Coot (Emsley und Cowtan [2004]) durchgeführt. Die Topologie der Inhibitoren wurde mit Hilfe von Prodrgr (Schüttelkopf und van Aalten [2004]) und phenix.elbow (Moriarty et al. [2009]) erstellt. Die Elektronendichtekarten der anomalen Daten wurden mit Hilfe von phenix.maps erstellt. Statistiken zu den Datensätzen können dem Anhang entnommen werden (vgl. A.1, A.2).

Bindung der Töberichfurane Die drei gelösten Strukturen unterscheiden sich in erster Linie in der Orientierung der Töberichfurane in der ATP-Bindetasche, die Proteinstruktur ist identisch (vgl. Abb. 4.9 (a)). TF und TF85/TF107 unterscheiden sich in erster Linie durch die Position eines der Chlor-Substituenten (vgl. Abb. 4.7). Bei TF befindet sich an Position 6 ein Chlor-Atom, bei TF85/TF107 an Position 9. Dadurch binden die

4. Ergebnisse

Dibenzofuran-Grundgerüste von TF und TF85/TF107 spiegelsymmetrisch an die ATP-Bindetasche.

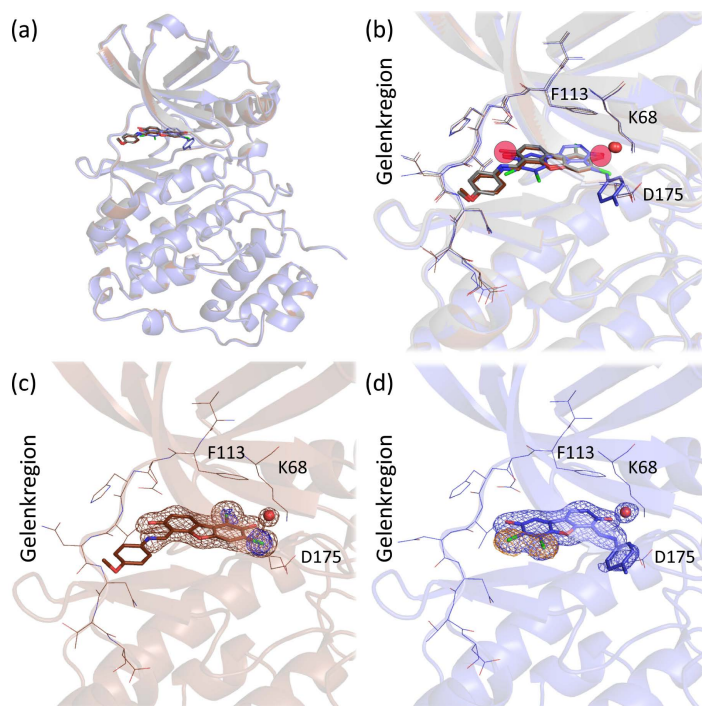


Abbildung 4.9 | Bindung der Töberichfurane an CK2α

(a) Überlagerung der drei gewonnenen CK2α-Strukturen im Komplex mit den drei Inhibitoren. Grau: TF107, blau: TF85, braun: TF. (b) Lage der drei Inhibitoren in der ATP-Bindetasche: Die Position von TF107 und TF85 sind nahezu identisch. (c) Darstellung von TF85 mit Elektronendichte, in braun: Elektronendichte bei 1 σ , blau: anomales Signal bei 4 σ . (d) Darstellung von TF mit Elektronendichte, in blau: Elektronendichte bei 1 σ , braun: anomale Elektronendichte bei 4 σ .

Während bei TF85 und TF107 die beiden Chloratome in Richtung von Phe113 und Lys68 zeigen (vgl. Abb. 4.9 (c)) sind sie bei TF in Richtung der Gelenkregion (vgl. Abb. 4.9 (d)) gerichtet und zeigen aus der ATP-Bindetasche heraus. Durch die spiegelsymmetrische Bindung sind auch parallelen in den Bindungsmodi erkennbar. Bei allen drei Inhibitoren werden sowohl zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einer Hydroxylgruppe des Inhibitors zu Lys68 und einem konservierten Wassermolekül hergestellt als auch Wasserstoffbrückenbindungen zu der Gelenkregion von CK2α (vgl. Abb. 4.9 (b), rote Kreise).

Wie in Abb. 4.9 (c/d) zu erkennen ist, sind dabei die Inhibitoren durch Elektronendichte definiert, ausgenommen der aus der ATP-Bindetasche herausragenden 4-Methylphenyl- (TF) bzw. 4-Methoxyphenylgruppe (TF85/TF107). Durch das anomale Signal der Chloratome war es des Weiteren möglich, die unterschiedliche Positionierung von TF und TF85/TF107 eindeutig zu verifizieren.

4.4.2. E9

E9 (4-[(E)-(fluoren-9-ylidenhydrazinyliden)-methyl]benzoesäure) ist ein ATP-kompetitiver Inhibitor, der sich von bisherigen bekannten Inhibitoren (vgl. Abschnitt 1.5.2) durch eine neuartige Leitstruktur unterscheidet und, ähnlich wie bereits beschriebene Inhibitoren (López-Ramos et al. [2010]), neben der CK2-Kinasefamilie auch PIM-Kinasen inhibieren kann, insbesondere PIM3. Dieser Inhibitor wurde von Prof. Dr. Issinger aus Odense zur Verfügung gestellt. Um einen Einblick in den Bindungsmodus von E9 an CK2 α zu erhalten, wurde E9 mit *hsCK2 α* und *zmCK2 α* kokristallisiert.

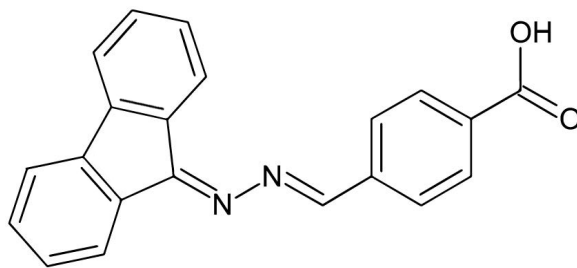


Abbildung 4.10 | Der Inhibitor E9

E9 ist ein ATP-kompetitiver Inhibitor, bestehend aus einer Fluorengruppe, die über ein Hydrazin mit einer Carboxyphenylgruppe verbunden ist.

Die Struktur mit *zmCK2 α* wurde mit der freien Säure E9 erhalten. Durch zur Verfügung gestelltes E9-Natriumsalz konnte die Löslichkeit verbessert und somit ebenfalls Kristalle mit *hsCK2 α* erhalten werden.

Kristallisation von E9 mit Mais-CK2 α Um E9 erfolgreich mit CK2 α zu kristallisieren, wurde zunächst CK2 α unter Zugabe von E9 (gelöst in 100 % DMSO) inkubiert (6,5 mg/ml *zmCK2 α* , 666 μ M E9, 466 mM NaCl, 23,3 mM Tris pH 8,5, 6,6 % (v/v) DMSO). 1,5 μ l dieser Lösung wurden nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 20 °C mit 1,5 μ l Wasser vermengt, es folgte die Durchmischung mit 1 μ l der Reservoirlösung (20 % (w/v) PEG4000, 0,1 M HEPES pH 7,5, 0,2 M Natriumacetat). Dieses Protein-Reservoir-Gemisch wurde daraufhin im Sitting-Drop-Verfahren gegen 500 μ l Reservoirlösung äquilibriert. Nachdem Kristalle gewachsen waren, wurden 150 nl einer 10 mM E9-Lösung als Inhibitordepot zu dem Kristallisationsansatz hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von wenigen Tagen konnten die erhaltenen Kristalle weiterverarbeitet werden. Die Kristalle konnten mit einem Nylonloop erfolgreich in eine Lösung aus 20 % (w/v) PEG4000, 25 % (v/v) Glycerol, 1 mM E9, 0,2 M Natriumcitrat und 0,1 M HEPES pH 7,5 überführt und für eine Minute inkubiert werden, um sie auf den Vitrifikationsprozess vorzubereiten. Nach dieser Minute wurden die Kristalle wiederum mit Hilfe eines Nylonloops in Flüssigstickstoff überführt und bis zur Vermessung an einer Röntgenquelle darin gelagert. Diese Kristalle wurden an der im Labor zur Verfügung stehenden Röntgenquelle bis zu einer Auflösung von über 1,8 Å vorcharakterisiert. Die Mais-CK2 α -Kristalle streuten am Elektronensynchrotron bis zu einer Auflösung von 1,24 Å. Der Datensatz wurde mit Hilfe von XDS (Kabsch [2010]) prozessiert, nach mo-

4. Ergebnisse

lekularem Ersatz mit Phaser (McCoy et al. [2007]) unter Verwendung der PDB 1LP4 (vgl. Yde et al. [2005]) konnte eine Kristallstruktur bis zu einem R_{free} von 17,53 % verfeinert werden. Weitere Details zur Qualität des Datensatzes sind dem Anhang (A.3) zu entnehmen.

Kristallisation von E9 mit humanem CK2 α Nachdem die Kristallisation der freien E9-Säure mit humanem CK2 α zunächst fehlschlug, wurde das Natriumsalz dieses Moleküls für die Kokristallisation mit humanem CK2 α verwendet. Es wurde ähnlich vorgegangen wie bei der Kristallisation mit dem Mais-Protein: Zunächst wurde CK2 α mit E9 vermengt (10 mg/ml *hsCK2 α* , 3 mM NaE9, 24,5 mM Tris pH 8,5, 455 mM Natriumchlorid) und für eine Stunde bei 20 °C inkubiert. Für die Kokristallisation wurde 1 μ l dieser Lösung mit 2,5 μ l der Reservoirolösung (30 % (w/v) PEG4000, 200 mM Ammoniumacetat, 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6) gemischt und im Sitting-Drop-Verfahren gegen 800 μ l Reservoirolösung äquilibriert.

Es folgte die Überführung der Kristalle in mit Glycerol versetzter Reservoirolösung (30 % (w/v) PEG4000, 5 % (v/v) Glycerol, 2 mM NaE9, 0,2 M Ammoniumacetat und 0,1 M Tris pH 7,5), bevor die Kristalle mit einem Nylonloop in flüssigem Stickstoff vitrifiziert wurden. Diese Kristalle wurden ebenfalls bis zur Vermessung am Elektronensynchrotron in Flüssigstickstoff gelagert. Der ausgewertete Datensatz konnte von einem Kristall gewonnen werden, der bis zu einer Auflösung von 1,85 Å streute. Dieser Datensatz wurde mit XDS (Kabsch [2010]) prozessiert. Das Strukturmodell konnte mit molekularem Ersatz unter Verwendung der PDB 2PVR (Niefind et al. [2007]) mit Phaser (McCoy et al. [2007]) gelöst und bis zu einem R_{free} von 21,33 % verfeinert werden. Weitere Details zur Strukturqualität können dem Anhang (A.3) entnommen werden. Sowohl Mais- als auch humanes CK2 α kristallisierten in für diese Proteine typische Raumgruppen mit ebenfalls typischen Zellparametern (vgl. Tabelle A.3).

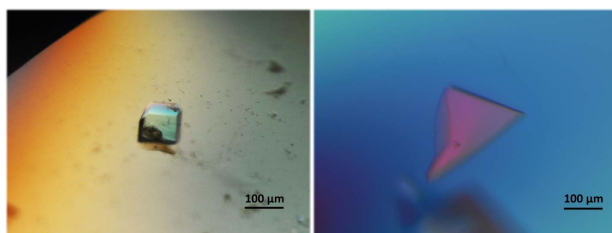


Abbildung 4.11 | Kristalle von CK2 α mit E9 Sowohl von Mais-CK2 α (l) als auch humanem CK2 α (r) konnten große Kristalle gewonnen werden, deren Streueigenschaften vollkommen ausreichend waren, um ein Strukturmodell zu erstellen. Die Bilder wurden mit Polarisationsfilter erstellt.

Bindung von E9 In den Kristallstrukturen wird deutlich, dass die Position des E9 sowohl in *hs-* als auch in *zmCK2 α* sehr ähnlich ist. Lediglich die Position der größten funktionellen Gruppe von E9, der Fluorenylgruppe, weicht zwischen den Strukturen ab. Die Fluorenylgruppe von E9 weist in der Mais-Struktur deutlich stärker in Richtung der N-terminalen Domäne, ohne dass dies eine starke Änderung des Bindungsmodus hervorruft. Diese Gruppe zeigt eine ungewöhnliche Positionierung, sie liegt auf der Gelenkregion, speziell auf Asn118, auf und ragt somit etwas aus der ATP-Bindetasche heraus (vgl. Abb. 4.12 (a)).

Die tiefere Lage der Fluorenylgruppe von E9 bei *zmCK2 α* ist dabei auf sequenzielle Unterschiede humaner und *zmCK2 α* zurückzuführen. In beiden Strukturen werden sowohl die Fluorenylgruppe als auch die Phenylgruppe durch hydrophobe Interaktionen mit Seitenketten (Met163, Val/Leu45, Val53, Ile/Val66, Phe113, Ile174, bei unterschiedlichen Aminosäuren ist Mais-CK2 α zuerst genannt) stabilisiert.

Die Carboxyphenylgruppe bildet eine Salzbrücke zu Lys68 aus. Durch ein Geflecht aus Wasserstoffbrücken mit Wassermolekülen wird die Positionierung weiter gestärkt. Das Netz aus Wasserstoffbrücken führt bis zum Ser51 der glycinreichen Schleife (vgl. Abb. 4.12 (b)). Des Weiteren ist eine weitere Wasserstoffbrücke zwischen dem hinteren Stickstoffatom der Hydrazingruppe und der Carbonylgruppe des Peptidrückgrats von Val116 durch ein Wassermolekül überbrückt (vgl. Abb. 4.12 (b); Wasser5 mit der Amino- und der Carbonylgruppe von Val116). Die Gelenkregion (vgl. 1.4.2) nimmt in beiden Strukturen eine offene Konformation ein.

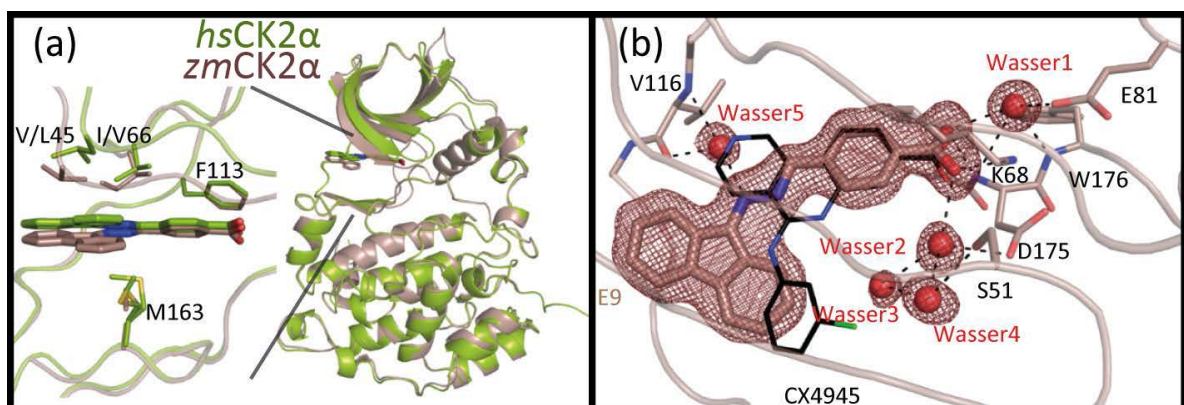


Abbildung 4.12 | Bindung von E9 an CK2 α

(a) E9 bindet sowohl an humanem (grün) als auch an Mais-CK2 α (braun) in ähnlicher Weise, die sequenziellen Unterschiede zwischen den Enzymen (V/L45, I/V66; Mais-CK2 α zuerst genannt) führen zu einer unterschiedlichen Positionierung der Fluorenylgruppe. (b) Die Interaktion von E9 mit CK2 α wird, neben den hydrophoben Interaktionen, über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert, die teilweise über Wassermoleküle überbrückt werden. Die Positionierung der Carboxyphenylgruppe entspricht derjenigen bei CX4945 (Ferguson et al. [2011], vgl. 1.5.3). Abbildungen reproduziert und verändert aus Guerra et al. [2015c], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

4. Ergebnisse

4.4.3. ARC3140 und ARC1502

Sowohl ARC3140 als auch ARC1502 sind Bisubstratinhibitoren, die von dem Kooperationspartner Prof. Dr. Uri aus Tartu, Estland, entwickelt und produziert wurden. ARC1502 bindet an CK2 mit einem K_d von 0.52 nM (Enkvist et al. [2012]), die Bindung von ARC3140 ist etwas stärker (K_d ca. 0,2 nM, persönliche Mitteilung). Diese Inhibitoren wurden entwickelt, um zwei unterschiedliche Bindestellen von CK2 α mit einem Molekül anzusteuern: Zum einen die ATP/GTP-Bindestelle über einen ATP-kompetitiven Teil, zum anderen die Substratbindestelle über einen peptidischen Teil, der über einen Linker mit dem ATP-kompetitiven Teil verbunden ist.

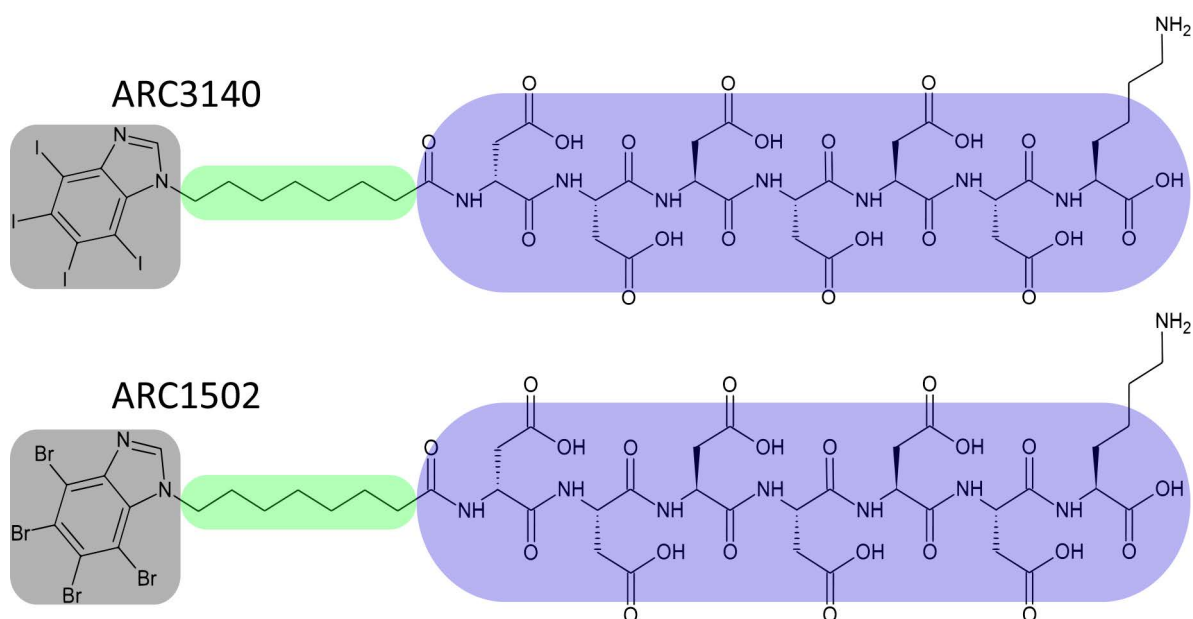


Abbildung 4.13 | Die Inhibitoren ARC1502 und ARC3140

ARC3140 und ARC1502 sind Bisubstratinhibitoren, zusammengesetzt aus einem ATP-kompetitiven Teil (TIBI bei ARC3140 und TBI bei ARC1502, in grau), einem aliphatischen Linker (grün) und einem substratkompetitiven peptidischen Teil (blau).

Bei dem peptidischen Teil dieser Inhibitoren handelt es sich um ein D-Aspartat und fünf L-Aspartate, abgeschlossen durch ein L-Lysin. Der ATP-kompetitive Teil ist bei beiden Inhibitoren über einen aliphatischen Linker mit dem peptidischen Teil verbunden. Der Unterschied beider Inhibitoren liegt im ATP-kompetitiven Teil der Inhibitoren: Während der ATP-kompetitive Teil von ARC1502 von Tetrabromobenzimidazol (TBI) abgeleitet ist, basiert der ATP-kompetitive Teil von ARC3140 auf Tetraiodobenzimidazol (TIBI). Sowohl TBI als auch TIBI sind seit längerem bekannte ATP-kompetitive Inhibitoren von CK2 α (Gianoncelli et al. [2009], Zien et al. [2005]).

Kristallisation ARC3140 und ARC1502 wurden wie viele andere Bisubstratinhibitoren kristallisiert. 1 μl einer CK2 α -Lösung (6-8 mg/ml, 1 mM Inhibitor in 10 % DMSO, 22,5 mM Tris pH 8,5, 450 mM NaCl) wurde in einem Verhältnis von 1:2,5 mit der Reservoirlösung (30 % (w/v) PEG4000, 0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6) vermischt und in einer 96-Well-Kristallisationsplatte gegen 100 μl Reservoirlösung äquibriert. Dabei musste bei ARC1502 nach ein bis zwei Tagen der Äquilibrierung mit 200 nl einer Seedlösung (1:1000) das Kristallwachstum induziert werden, in dem Ansatz mit ARC3140 wuchsen Kristalle auch ohne Animpfen. Die CK2 α -ARC3140 Kristalle waren kleiner als diejenigen von ARC1502, dafür jedoch dreidimensionaler (vgl. Abb. 4.14).

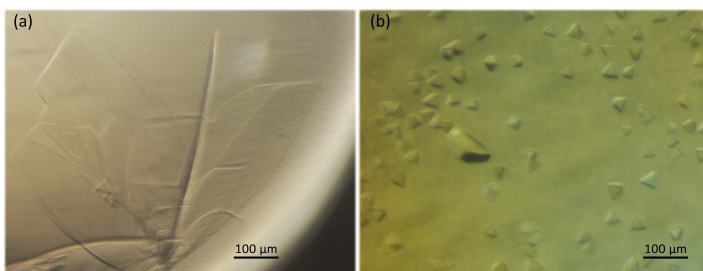


Abbildung 4.14 | Kristalle von CK2 α mit ARC3140 oder ARC1502

Sowohl ARC1502 (a) als auch ARC3140 (b) wurden mit CK2 α kokristallisiert, ARC1502 in breiten Platten, ARC3140 eher globulär. (Die Bilder wurden unter Verwendung eines Polarisationsfilters erstellt).

Strukturlösung Beide Kristalle zeigten am Synchrotron ein gutes Streuverhalten. Von ARC1502 konnte ein Datensatz bis zu einer Auflösung von 2,35 \AA in der Raumgruppe $P2_1$ gesammelt werden. Nach der Auswertung der Rohdaten mit XDS (Kabsch [2010]) folgte die Strukturlösung durch molekularen Ersatz mit Phaser (McCoy et al. [2007]), die Struktur 2PVR (Niefind et al. [2007]) wurde als Matrize verwendet.

Von CK2 α in Komplex mit ARC3140 konnte ein Datensatz bis zu einer Auflösung von 1,59 \AA gesammelt werden. Durch die gewählte Wellenlänge von 1,12713 \AA konnte ein starkes anomales Signal gemessen werden. Diese Daten konnten in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ mit XDS (Kabsch [2010]) indiziert und integriert werden, sodass eine experimentelle SAD-Phasierung möglich war. Die Verwendung des anomalen Signals der Iod-Atome des Inhibitors (bis zu einer Auflösung von 2,7 \AA) ermöglichte die Bestimmung der Positionen von 14 Iod-Atomen mit Hilfe von phenix.autosol (Terwilliger et al. [2009], vgl. Abb. 4.15 (a)).

4. Ergebnisse

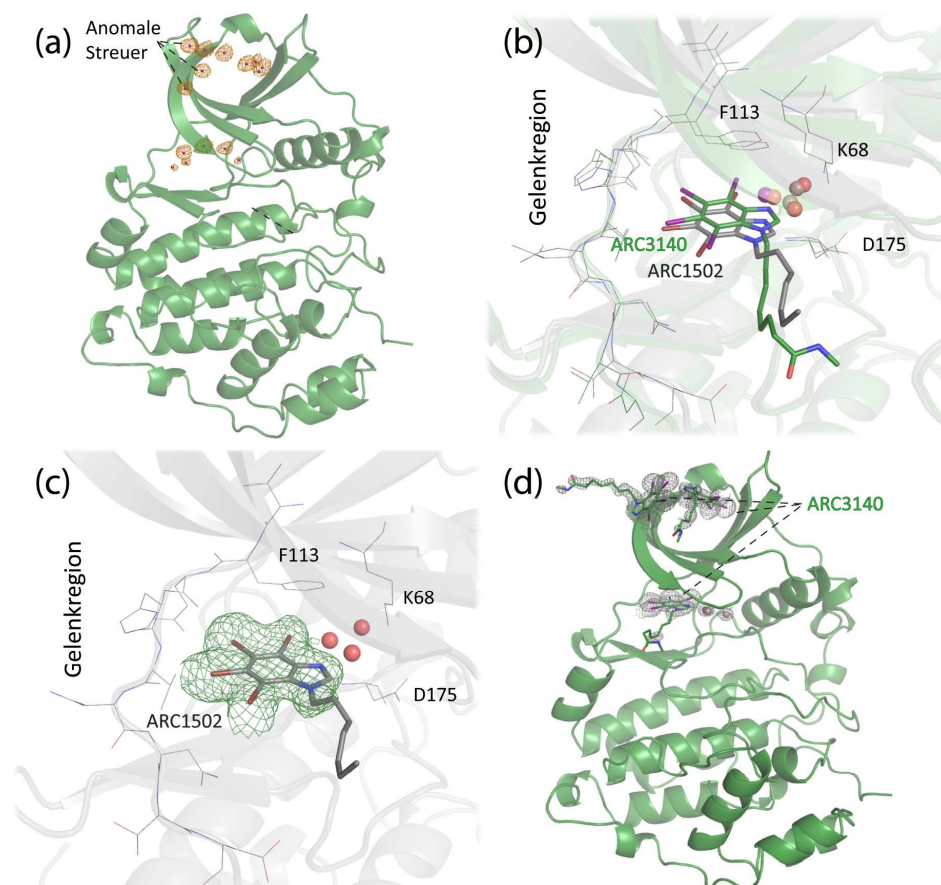


Abbildung 4.15 | CK2 α interagiert mit ARC3140 und ARC1502

(a) Durch Autosol wurden bei der CK2 α -ARC3140-Struktur 14 Positionen von anomalen Streuern erkannt, die zur Strukturlösung verwendet wurden (anomale Elektronendichte in orange, 3,5 σ). (b) Beide Inhibitoren binden ähnlich in der ATP-Bindetasche, wobei ARC3140 etwas tiefer in die Tasche hineinragt und ARC1502 näher an der Gelenkregion positioniert ist. (c) Der ATP-kompetitive Teil von ARC1502 ist gut durch Elektronendichte definiert (Elektronendichte in grün auf 1 σ Level). (d) ARC3140 bindet dreimal an CK2 α , wobei der TIBI-Teil bei allen drei Untereinheiten von Elektronendichte umgeben ist (1 σ Level).

Sowohl der ARC3140- als auch der ARC1502-Datensatz konnten zu akzeptablen R-Werten verfeinert werden, die Topologie der Inhibitoren wurde mit Prodrgr (Schüttelkopf und van Aalten [2004]) und phenix.elbow (Moriarty et al. [2009]) erstellt. Statistische Daten zu den Kristallstrukturen können dem Anhang (Tabelle A.4) entnommen werden. Von den 14 lokalisierten anomalen Streuern in der ARC3140-*hsCK2 α* -Struktur gehörten zwölf Iod-Atome zu den drei an CK2 α gebundenen ARC3140-Molekülen. Zwei weitere anomale Streuer stammen anscheinend von Strahlenschäden an gebundenen Iod-Atomen die – zumindest partiell – von den ARC3140-Molekülen abgespalten wurden. Ein dritter anomaler Streuer wurde nicht von Autosol für die Strukturlösung verwendet und liegt tief in der ATP-Bindetasche. Bei der ARC1502-Struktur wurde an der gleichen Position ein Wassermolekül modelliert (vgl. Abb. 4.15 (b, c), violette Sphäre unterhalb von Phe113). Es ist zu sehen, dass der Inhibitor nicht nur an der ATP-Bindetasche bindet, sondern auch

zweimal an der C-terminalen Domäne von CK2 α (vgl. 4.15 (d)). Dabei entspricht eine dieser beiden Bindestellen der CK2 α / β -Interaktionsstelle, die zweite Bindestelle scheint einen Kristallkontakt darzustellen.

ARC3140: Die ATP-kompetitive Bindestelle Der ATP-kompetitive Teil des Inhibitors bindet in der ATP-Bindetasche. Dabei weisen die beiden zentralen Iod-Atome in Richtung der Gelenkregion und bilden mit den Carbonylgruppen der Peptidbindungen von Glu114 und Val116 Halogenbindungen aus. Das am weitesten innen liegende Iod-Atom wird durch eine I- π -Bindung mit Phe113 orientiert. Die Bindungslänge zwischen dem Iod-Atom und dem Zentroid der Phe113-Seitenkette beträgt dabei 3,7 Å in einem Winkel von 167,3°. Die vielen hydrophoben Seitenketten (Met163, Ile95+174, Leu45, Val53+66) auf der oberen und unteren Seite der ATP-Bindetasche stabilisieren ebenfalls die Lage des Inhibitors. Sowohl der Linker als auch der peptidische Teil des Inhibitors sind nicht durch Elektronendichte definiert (vgl. Abb. 4.16 (a)).

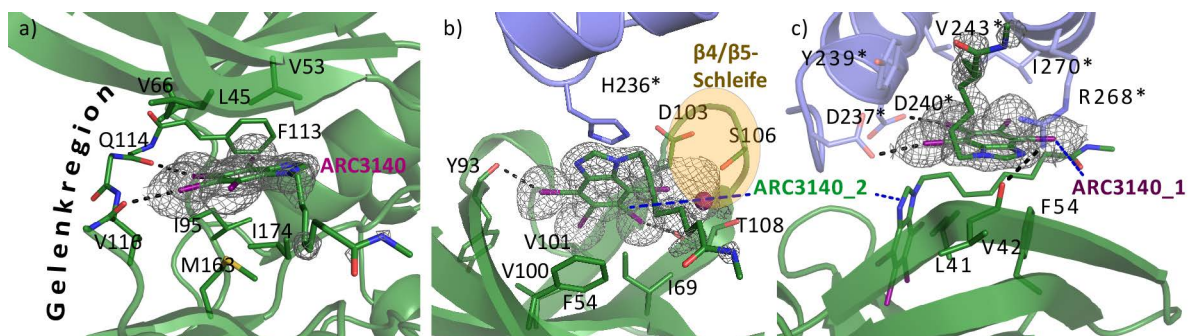


Abbildung 4.16 | Drei Bindungsstellen von ARC3140

(a) ATP-kompetitive Bindung von ARC3140 an CK2 α : Zwei Iod-Atome bilden Halogenbindungen zu Carbonylgruppen der Gelenkregionen aus, ein drittes Iod-Atom wird durch eine I- π -Bindung mit F113 gebunden. (b) Bindung von ARC3140 an der CK2 α / β -Bindestelle: Neben Interaktionen mit der CK2 α / β -Bindestelle interagiert dieses ARC3140-Molekül ebenfalls mit H236 eines symmetrieäquivalenten CK2 α . (c) Bindung am Kristallkontakt: ARC3140 ist auf der Oberfläche von CK2 α positioniert und interagiert stark mit der C-terminalen Domäne des symmetrieäquivalenten CK2 α (blau, Residuen sind mit * markiert). Bei allen Inhibitor-Molekülen ist sowohl der Linker als auch der peptidische Teil des Inhibitors nur rudimentär von Elektronendichte umgeben (Elektronendichte: 1 σ Level).

ARC3140: Die CK2 α /CK2 β -Interaktionsstelle ARC3140 bindet an der Position, an der auch CK2 β mit CK2 α interagiert (vgl. dazu Abschnitt 1.4.4). Zwei der vier Iod-Atome (vgl. Abb. 4.16 (b)) bilden Halogenbindungen zu Carbonylgruppen der Peptidbindung von Tyr39 und Thr108. Des Weiteren wird die Position des ATP-kompetitiven Teils des Inhibitors wiederum durch ein Geflecht an hydrophoben Wechselwirkungen sowohl zwischen den Iod-Atomen als auch zwischen dem Benzimidazolrest und hydrophoben Seitenketten von CK2 α (Phe54, Leu40, Val67, Ile69 und Val101) stabilisiert. Zu beachten ist in

4. Ergebnisse

diesem Fall, dass die Position des ATP-kompetitiven Teils des Inhibitors ebenfalls durch eine π - π -Stapelung zwischen dem His236 des benachbarten CK2 α -Moleküls und dem Benzimidazolrest fixiert wird.

ARC3140: Die Kristallkontakt vermittelnde Bindestelle Diese Bindestelle liegt an der Schnittstelle zweier benachbarter CK2 α -Moleküle im Kristall. Es ist nicht festzustellen ob der ATP-kompetitive Teil des Inhibitors primär an die N-terminale Domäne oder an die C-terminale Domäne von CK2 α bindet.

Zwei der Iod-Atome (vgl. Abb.4.16 (c)) binden über Halogenbindungen an die Carboxygruppen zweier Aspartate an der C-terminalen Domäne von CK2 α . Des Weiteren wird die Position des ATP-kompetitiven Teils und auch (zumindest teilweise) des Linkers von ARC3140 durch hydrophobe Seitenketten sowohl der C-terminalen Domäne (Tyr239, Val243, Arg268, Ile272 und Leu273) als auch der N-terminalen Domäne (Leu40, Val42 und Phe54) stabilisiert.

ARC3140: CK2 β -Kompetition Dass ARC3140 CK2 α ATP-kompetitiv inhibiert wurde bereits von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uri, Tartu gezeigt. Dabei konnte eine starke Bindung mit einer Dissoziationskonstante von 0,2 nM bestimmt werden (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Uri).

Da in der Kristallstruktur jedoch drei verschiedene potenziell physiologische Bindestellen zu erkennen sind, sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden, inwieweit die Bindung von ARC3140 zu der CK2 α /CK2 β -Bindestelle auch biologische Relevanz hat oder lediglich ein Kristallisationsartefakt darstellt. Dabei wurde ein Test verwendet, der sich der Änderung der Fluoreszenzanisotropie bedient (vgl. Hochscherf et al. [2015]). CK2 α wurde, wie in Abschnitt 2.14 beschrieben, mit einem CK2 β -simulierenden fluoreszenzmarkierten Peptid beladen, welches mit dem zu untersuchenden Inhibitor um die Bindungsstelle an CK2 α konkurriert. Durch die schlechtere Besetzung von CK2 α mit dem fluoreszenzmarkierten Peptid nimmt die Fluoreszenzanisotropie ab.

In diesem Versuch wurde ARC3140 in Konzentrationen zwischen 3 nM bis 75 μ M eingesetzt, die Konzentrationen von CK2 α und fluoreszenzmarkiertem Peptid betragen 0,1 μ M und 3 μ M. Die Ansätze wurden direkt nach dem Ansetzen an einem ELISA-Reader ausgelesen. Für den Versuch wurden zwei verschiedene Margen des Inhibitors verwendet. Dabei wurde der Inhibitor zunächst in DMSO gelöst. Die DMSO-Endkonzentration wurde im Versuch konstant bei 1 % (v/v) DMSO gehalten.

Aus der Anisotropieänderung (vgl. Abb. 4.17 (a)) ist zu erkennen, dass ab einer Konzentration von ca. 10 μ M ARC3140 eine Inhibition der CK2 α /Peptid-Interaktion stattfindet, es konnte ein IC₅₀-Wert von $89,7 \pm 9,3 \mu$ M und ein K_i (mit Hilfe des K_i-Calculators^[5]) von

[5]http://sw16.im.med.umich.edu/software/calci_ki/

$12,9 \pm 2,4 \mu\text{M}$ ermittelt werden. Bei der Kalkulation wurde die Bindung von ARC3140 an der ATP-Bindestelle mit einbezogen.

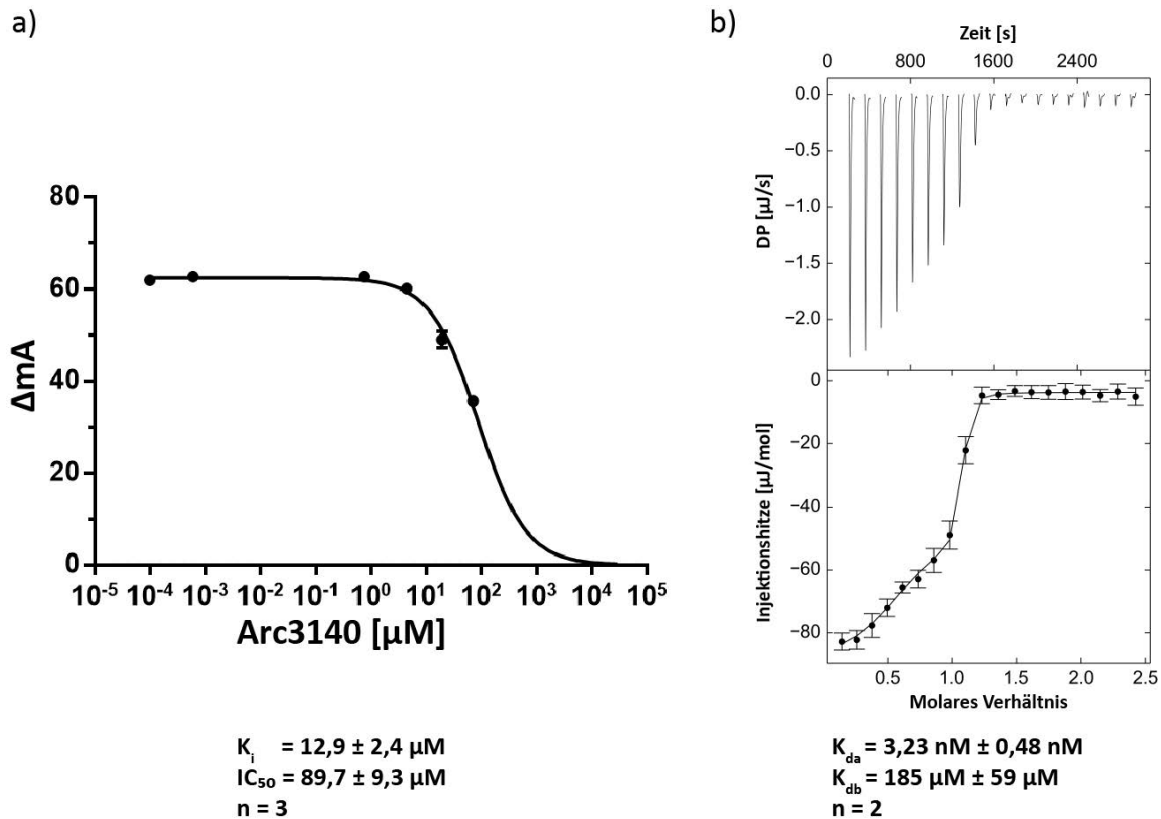


Abbildung 4.17 | Interaktion von ARC3140 mit CK2

(a) Fluoreszenzanisotropie-Assay: Die Interaktion von CK2 α und zyklischem Peptid wird von ARC3140 mit einem K_i von $12,9 \mu\text{M}$ inhibiert. (b) ITC-Messung: Die Rohdaten (oberer Graph) wurden mit einem 2-Bindestellen-Modell ausgewertet (unterer Graph), resultierend in zwei Dissoziationskonstanten.

ARC3140: ITC Um einen Überblick über die Anzahl der tatsächlich an CK2 α bindenden ARC3140-Moleküle zu erhalten, wurden ITC-Experimente durchgeführt. Dabei wurden in 18 Injektionen jeweils $2,5 \mu\text{l}$ CK2 α in einer Konzentration von $175 \mu\text{M}$ zu dem in der Zelle vorgelegten ARC3140 in einer Konzentration von $14,36 \mu\text{M}$ hinzu pipettiert. Dies geschah in einem Puffer aus 10 % (v/v) DMSO, 500 mM NaCl und 25 mM Tris pH 8,5.

Bei der ITC-Messung von CK2 α mit ARC3140 konnten zwei Messungen durchgeführt werden. Dabei wird deutlich, dass mindestens zwei Bindeereignisse stattfinden, eine starke Bindung (K_{da} : $3,23 \text{ nM}$) und eine schwache Bindung (K_{db} : $185 \mu\text{M}$). Weitere sich überlagernde Bindeereignisse können allerdings nicht ausgeschlossen werden. Da das molare Verhältnis deutlich unter zwei lag, ist es naheliegend, dass die Konzentration von ARC3140 nicht exakt genug bestimmt wurde, um eine sichere Aussage über die molaren

4. Ergebnisse

Verhältnisse zu geben. Aus Ermangelung an Inhibitor-Substanz konnten die Messungen nicht wiederholt oder die Konkurrenz von ARC3140 zu CK2 β gemessen werden.

4.5. Struktur von CK2^{Andante}

Die Mutation im CK2 β -Gen, die in *Drosophila melanogaster* zu dem Andante-Phänotyp führt, wurde 1991 durch Konopka et al. produziert, indem durch Strahlung Genschäden in *Drosophila* eingebracht wurden. Diese Mutation führt zu der Implementierung eines Isoleucins anstelle eines Methionins an Position 166 (Konopka et al. [1991], Akten et al. [2003]). Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese Mutation, übertragen auf das humane CK2 β -Gen, keinen Einfluss auf biochemische Eigenschaften des Proteins hat. Ebenso hat die Mutation keinen Einfluss auf die Stabilität des CK2-Holoenzym, die CK2 β -Untereinheiten bilden weiterhin ein Dimer, an das zwei CK2 α -Untereinheiten gebunden sind (Rasmussen et al. [2005]).

4.5.1. Reinigung des Proteins

Das CK2^{Andante}-Holoenzym wurde in Dänemark in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Issinger aufgereinigt. Dabei wurde ausschließlich heterolog in *E. coli* exprimiertes humanes Protein verwendet und die Andante-Mutation auf das humane CK2 β -Gen übertragen. Das erhaltene Protein wurde auf Sauberkeit überprüft, eine weitere Aufreinigung durch Gelfiltration erwies sich als unnötig (vgl. Abb. 4.4).

Das aufgereinigte Protein wurde, da es bereits biochemisch charakterisiert wurde (Rasmussen et al. [2005]), zur Kristallisation eingesetzt, um einen Einblick in die quartäre Struktur zu erhalten.

Da die Mutation im Bereich der CK2 α/β -Interaktionsfläche liegt (Niefind et al. [2001]) war es möglich, dass der Effekt dieser Mutation in *Drosophila melanogaster* auf ein verändertes Interaktionsmuster von CK2 α und CK2 β hindeutet, ohne dabei einen Einfluss auf die CK2 $\alpha_2\beta_2$ -Stöchiometrie zu haben.

4.5.2. Kristallisation

Für die Kristallisation wurde das aufgereinigte Protein mit einer Konzentration von 3 mg/ml eingesetzt, komplementiert mit 0,85 mM AMPPCP oder AMPPNP, 0,17 mM CK2 Substratpeptid (Aminosäuresequenz: RREEETEEE), 1,7 mM MgCl₂ und 250 mM Guanidinhydrochlorid. Von dieser Lösung wurden je 8,2 μ l mit 1,3 μ l Reservoirlösung (18 % (w/v) PEG8000, 0,2 M Calciumacetat und 0,1 M Natriumcacodylat pH 7,0) vermischt und bei 20 °C gegen 750 μ l Reservoirlösung im Sitting-Drop-Verfahren äquilibriert. Die Kristalle erschienen nach wenigen Tagen und wurden in Reservoirlösung, inklusive 20 % (v/v) Glycerol, für die 100 K Synchrotron-Messung vorbereitet, indem die Kristalle mit Hilfe eines Nylonloops aus dem ursprünglichen Tropfen geangelt und für

ein bis zwei Minuten in der Reservoirlösung mit Glycerol inkubiert wurden. Im nächsten Schritt wurde der Kristall mit Hilfe eines Nylonloops geerntet und in flüssigem Stickstoff vitrifiziert.

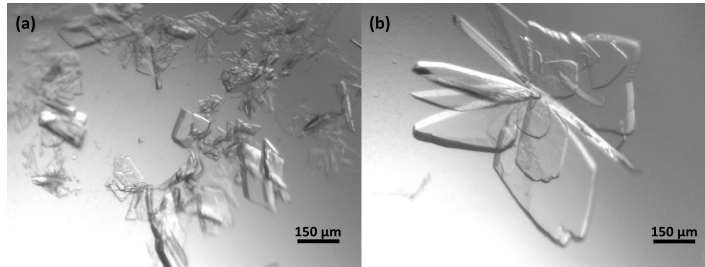


Abbildung 4.18 | Kristalle des CK2^{Andante}-Holoenzym

CK2^{Andante} wurde in zwei Raumgruppen kristallisiert: (a) C2 und (b) P2₁.

Die Kristalle wurden am Synchrotron vermessen und streuten bis zu einer Auflösung von $5 - 3,3 \text{ \AA}$, wobei die Kristalle vornehmlich in zwei Raumgruppen indiziert werden konnten, C2 und P2₁. Es konnte ein Datensatz (kristallisiert mit AMPPCP) in der Raumgruppe C2 bis zu einer Auflösung von $3,3 \text{ \AA}$ gewonnen werden, ein zweiter Datensatz (kristallisiert mit AMPPNP) in der Raumgruppe P2₁ konnte bis zu einer Auflösung von $4,09 \text{ \AA}$ indiziert werden. Dabei ist die Kristallpackung der Kristalle sehr ähnlich. Sie unterscheiden sich im Wesentlichen nur in der Anzahl der Heterotetramere in der asymmetrischen Einheit. In der Raumgruppe C2 befindet sich ein Heterotetramer in der asymmetrischen Einheit, in der Raumgruppe P2₁ sind es derer zwei (vgl. Abb. 4.19 (b)). Statistiken zu den Datensätze können dem Anhang (A.5) entnommen werden.

4.5.3. Auswertung des C2-Datensatzes

Während der P2₁-Datensatz mit einer Auflösung von $4,09 \text{ \AA}$ nicht für die Strukturlösung verwendet wurde, konnte der C2-Datensatz bis zu einem R_{free} von 25,1 % verfeinert werden, viele wichtige Merkmale konnten dabei mit Elektronendichte dargestellt werden.

Bei beiden CK2 α -Untereinheiten im CK2^{Andante}-Holoenzym (vgl. Abb. 4.19 (a)) gibt es, außer bei einigen terminalen Residuen, keine Bereiche, die nicht durch Elektronendichte definiert sind, die AMPPCP-Moleküle eingeschlossen. Dies gilt mit Einschränkungen auch für die CK2 β -Untereinheiten. Sowohl die Dimerisierungsfläche der beiden CK2 β -Untereinheiten als auch die CK2 α/β -Interaktionsflächen können gut mit Elektronendichte dargestellt werden, ebenso sind die beiden im CK2 β -Dimer gebundenen Zink-Ionen eindeutig zu erkennen.

Eine Ausnahme stellen die C-terminalen Residuen (Aminosäuren 206-215) von CK2 β dar: Diese intrinsisch ungeordneten Peptidregionen (intrinsically disordered peptide regions, IDPs) sind in dieser Kristallpackung nicht zu sehen, des Weiteren ist der N-Terminus vor Val7 nicht mit Elektronendichte darstellbar.

4. Ergebnisse

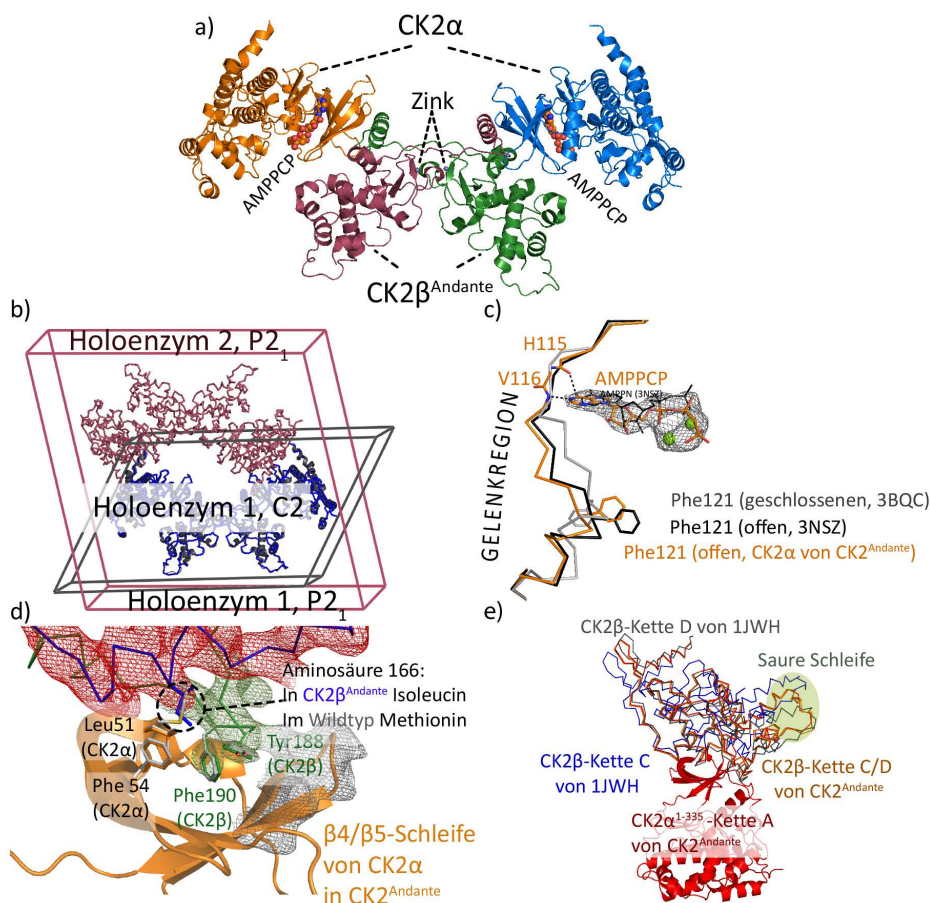


Abbildung 4.19 | Das Holoenzym CK2^{Andante}

(a) Das CK2^{Andante}-Holoenzym besteht aus zwei CK2α-Untereinheiten (mit gebundenem AMPPCP) und zwei CK2β-Untereinheiten. (b) Die beiden Kristallstrukturen unterscheiden sich nur in der Anzahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit. C2 (blau): 1 Molekül, P2₁ (rot): 2 Moleküle. (c) Die Gelenkregion von CK2α liegt im CK2^{Andante}-Holoenzym in der offenen Konformation vor, die AMPPCP-Moleküle sind durch Elektronendichte definiert. (d) Der CK2α/β-Interaktionsraum ist gut mit Elektronendichte definiert und wildtypisch (in grau: Residuen aus 4DGL). (e) Alignment der CK2β-Untereinheiten: Symmetrische Untereinheiten (CK2^{Andante}) in rot und orange, asymmetrische Untereinheiten (PDB-ID: 1JWH) in grau und blau. Level der Elektronendichte in Abbildungen: 1 σ; Abb. a, c, d und e reproduziert und verändert aus Schnitzler et al. [2014], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Makro-Features Das CK2^{Andante}-Holoenzym zeigt den gleichen heterotetrameren Aufbau (vgl. Abb. 4.19 (a)) wie das wildtypische Holoenzym (PDB-ID: 1JWH (Niefind et al. [2001]) bzw. 4DGL (Lolli et al. [2012])). Es besteht aus einem zentralen CK2β-Dimer, an das zwei CK2α-Untereinheiten gebunden sind. Dabei ist in beiden ATP-Bindetaschen Elektronendichte zu erkennen, in die sowohl AMPPCP als auch zwei Magnesium-Ionen modelliert wurden. Das bei der Kristallisation verwendete Substratpeptid ist nicht zu erkennen. Prägnantestes Merkmal der CK2^{Andante}-Holoenzymstruktur, verglichen mit der Kristallstruktur des wildtypischen Holoenzym (vgl. Niefind et al. [2001], Lolli et al. [2012]), ist die deutlich höhere Symmetrie zwischen den jeweiligen Untereinheiten. Zerlegt man das Holoenzym in zwei Einheiten, bestehend aus einer CK2β-Untereinheit und

der daran gebundenen CK2 α -Untereinheit und überlagert sie, so wird dieser Unterschied in der inneren Symmetrie deutlich (vgl. Abb. 4.19 (e)).

ATP-Bindetasche Die ATP-Bindetasche nimmt in der CK2^{Andante}-Holoenzymstruktur eine Form ein, wie sie auch im wildtypischen Holoenzym bzw. CK2 α vorliegt (vgl. Abb. 4.19 (c)). Dabei ist die Adeningruppe des ATP-Analogons AMPPCP über zwei Wasserstoffbrücken mit der Gelenkregion verbunden. Die Gelenkregion nimmt die in 1.4.2 beschriebene offene Konformation ein (vgl. Abb. 4.19 (c)).

Andante-Mutation in CK2 β Die Mutation im CK2 β -Gen führte zu einem Austausch des Methionins 166 gegen ein Isoleucin. Dieser Austausch in der Helix α F von CK2 β ist in der Elektronendichte zu erkennen, allerdings hat dieser recht konservative Austausch augenscheinlich keinerlei Einfluss auf die direkte Umgebung im Heterotetramer. Sowohl CK2 β als auch CK2 α zeigen eine wildtypische Sekundär- und Tertiärstruktur. Dies betrifft ebenfalls die an der CK2 α / β -Interaktion beteiligten Seitenketten wie Phe190 aus CK2 β und Leu51 und Phe54 aus CK2 α (vgl. Abb. 4.19 (d)).

4.6. Die Proteinvarianten der Gelenkregion

Die Gelenkregion von *hsCK2 α* kann sowohl eine offene als auch eine geschlossene Konformation einnehmen (vgl. Abschnitt 1.4.2). Die geschlossene Konformation entspricht dabei der typischen Konformation anderer ePKs, die offene Konformation wurde bisher bei Strukturen von CK2 α auch aus anderen Organismen (z. B. Mais (Niefind et al. [1998]) oder Hefe (Liu et al. [2014])) beobachtet.

Bei dieser Konformationsänderung spielt neben dem Residuum Phe121 (vgl. Abschnitt 1.4.2) ebenfalls die Position Tyr125 eine wichtige Rolle indem die Seitenkette in der geschlossenen Konformation die Position der Seitenkette von Phe121 in der offenen Konformation einnimmt. Diese Residuen sind auch innerhalb der CK2 α -Proteine konserviert (vgl. Abb. A.2, rot umrandet).

Um den Einfluss dieser Residuen auf die Formierung der beiden Konformationen zu untersuchen, wurden vier Proteinvarianten kristallisiert, in denen diese beiden Residuen ausgetauscht wurden. F121A, F121M und Y125A wurden gewählt, da die Seitenketten von Phe121 und Tyr125 die zentrale Rolle in *hsCK2 α* für die Konformation der Gelenkregion spielen. Mit dem Austausch des Phe121 zu Methionin sollte eine ePK-typische geschlossene Formation forciert werden. H115Y war als Proteinvariante geplant, in der *hsCK2 α* sowohl an *zmCK2 α* als auch an *hsCK2 α '* angeglichen wurde, welche beide ein Tyrosin an dieser Position tragen und bisher ausschließlich in der offenen Konformation kristallisiert wurden.

4.6.1. Kristallisation

Die vier Proteinvarianten wurden in zwei verschiedenen Raumgruppen kristallisiert. Dabei wurde Emodin als Inhibitor verwendet, da es keine Wasserstoffbrücken zu der Gelenkregion ausbildet (Battistutta et al. [2000]). Es wurde jeweils gezielt in der Raumgruppe $P4_32_12$ gezüchtet. Eine frühere Analyse hatte gezeigt, dass die Konformation der Gelenkregion in dieser Kristallpackung weitestgehend unbeeinflusst von Kristallkontakten ist (Klopffleisch et al. [2012]). Die zusätzliche Kristallisation in der Raumgruppe $P2_1$ führt zu Strukturen mit höheren Auflösungen, allerdings ist die Gelenkregion stärker an der Ausbildung von Kristallkontakten beteiligt. Trotzdem konnte CK2 α in dieser Kristallpackung unter Niedrigsalz-Kristallisationsbedingungen sowohl mit der Gelenkregion in der offenen Konformation als auch in der geschlossenen Konformation kristallisiert werden (vgl. Klopffleisch et al. [2012]).

Alle Proteinvarianten wurden bereits gereinigt zur Verfügung gestellt (vgl. Abschnitt 4.2.4) und lediglich auf die für die Kristallisation notwendige Proteinkonzentration zwischen 6 und 8 mg/ml konzentriert.

Kristallisation in der Raumgruppe $P4_32_12$ Durch das Austesten und Variieren verschiedener bereits bekannter Kristallisationsbedingungen wurde eine Bedingung (bestehend aus 0,1 M Natriumcitrat pH 6, 0,2 M Ammoniumsulfat und 30 % PEG8000) als effizienteste Kristallisationsbedingung identifiziert. Die Proteinvarianten F121A, F121M und Y125A wurden unter identischen Bedingungen kristallisiert, indem die Proteine zunächst mit Emodin (gelöst in DMSO, 2 mM Endkonzentration) vorinkubiert wurden. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurden die Ansätze für 15 Minuten bei 4 °C und 10000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und daraufhin im Verhältnis 1:1 mit der Reservoirlösung inkubiert. Diese Mischung wurde daraufhin gegen 1 ml Reservoirlösung äquilibriert.

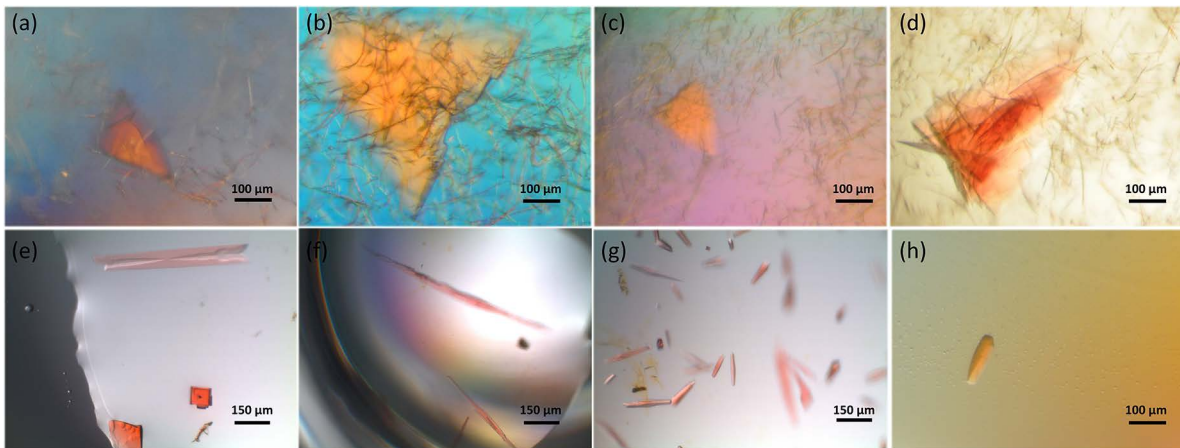


Abbildung 4.20 | Kristalle der CK2 α -Varianten

Alle *hsCK2 α* -Varianten konnten in zwei Raumgruppen ($P2_1$: a-d und $P4_32_12$: e-h) erfolgreich kristallisiert werden, a+e: F121A, b+f: F121M, c+g: Y125A, d+h: H115Y).

Die Kristallisation von H115Y wurde durch den Austausch des Ammoniumsulfats gegen Lithiumsulfat in der Reservoirlösung erreicht. Das Protein wurde in einem Protein-Reservoir-Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Als Vitrifikationslösung wurde immer die Reservoirlösung, versetzt mit 10 % Glycerol, verwendet. Alle Kristalle wurden ein bis zwei Minuten lang in dieser Lösung inkubiert und in flüssigem Stickstoff vitrifiziert.

Kristallisation in der Raumgruppe $P2_1$ Die Proteinvarianten wurden kristallisiert, indem die jeweilige Proteinlösung (in Lagerpuffer) mit 10 mM Emodin (in DMSO) versetzt wurde (Endkonzentration: 2 mM). Diese Lösung wurde 30 Minuten inkubiert und in einem Protein-Reservoir-Verhältnis von 1:2,5 mit der Reservoirlösung (32 % (w/v) PEG4000, 0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6) vermengt. 3,5 μ l dieser Lösung wurden gegen 100 μ l Reservoirlösung in der Sitting-Drop-Methode äquilibriert. Nach ein bis zwei Tagen Äquilibrierung wurden diese Tropfen mit 150 nl einer Impflösung mit Kristallkeimen angeimpft, innerhalb einer Woche waren Kristalle gewachsen. Diese Kristalle wurden für ein bis zwei Minuten in einer Vitrifikationslösung, bestehend aus der Reservoirlösung mit 5-10 % (v/v) Glycerol, inkubiert und in flüssigem Stickstoff vitrifiziert.

4. Ergebnisse

4.6.2. Daten und Strukturen

Von den Kristallen konnten acht Datensätze gewonnen werden. Diese Datensätze wurden mit dem Programm XDS (Kabsch [2010]) prozessiert. Der molekulare Ersatz wurde mit PHASER (McCoy et al. [2007]) unter der Verwendung von 3NGA (Ferguson et al. [2011], für die Datensätze in der Raumgruppe $P4_32_12$) und 2PVR (Niefind et al. [2007], für die Datensätze in der Raumgruppe $P2_1$) durchgeführt.

Die Kristallstrukturen in der Raumgruppe $P4_32_12$ unterscheiden sich dabei durch zentrale Eigenschaften von denen der Raumgruppe $P2_1$: Während die asymmetrische Einheitszelle in der Raumgruppe $P4_32_12$ zwei Moleküle CK2 α enthält, beinhaltet die asymmetrische Einheitszelle der Raumgruppe $P2_1$ ein Molekül CK2 α . Des Weiteren ist der Lösungsmittelgehalt (vgl. Matthews [1968]) unterschiedlich. Die Raumgruppe $P4_32_12$ besitzt einen Lösungsmittelgehalt von ca. 61 %, die Raumgruppe $P2_1$ einen Lösungsmittelgehalt von ca. 37 %, die CK2 α -Moleküle liegen im Kristall deutlich enger aneinander. Statistiken zu den Kristallstrukturen können dem Anhang (A.6, A.7, A.8, A.9) entnommen werden.

Tabelle 4.1 | Kristallisierte Proteinvarianten

Die vier Proteinvarianten F121A, F121M, Y125A und H115Y wurden jeweils in zwei Raumgruppen kristallisiert.

Variante	Raumgruppe	Gelenkregion	Auflösung [Å]
F121A	$P4_32_12$	offen	2,199
F121M	$P4_32_12$	geschlossen	2,698
Y125A	$P4_32_12$	geschlossen	3,147
H115Y	$P4_32_12$	geschlossen	2,446
F121A	$P2_1$	geschlossen	1,745
F121M	$P2_1$	geschlossen	1,701
Y125A	$P2_1$	geschlossen	1,622
H115Y	$P2_1$	geschlossen	1,698

Die erhaltenen Kristallstrukturen unterscheiden sich nicht ausschließlich in der Formation der Gelenkregion (vgl. Abb. 4.21 (b)), auch die $\beta 4/\beta 5$ -Schleife (vgl. Abb. 1.10 (a), 4.21 (a)) liegt in allen $P2_1$ und in der $P4_32_12$ -H115Y-Struktur in der geschlossenen Konformation vor, in den anderen Strukturen in der Raumgruppe $P4_32_12$ in der offenen Konformation. In allen Kristallstrukturen ist in jeder ATP-Bindetasche ein gebundenes Emodin-Molekül zu sehen (vgl. Abb. 4.21 (b)), welches auch durch Elektronendichte definiert ist.

Die Gelenkregion unterscheidet sich stark zwischen den Varianten: Sowohl die beiden Proteinketten der $P4_32_12$ -Kristallstruktur als auch die Proteinkette der $P2_1$ -Struktur von H115Y liegen in einer geschlossenen Konformation vor, die Seitenkette von Tyr125 ist allerdings in beiden Ketten der $P4_32_12$ -Struktur nicht definiert. Phe121 ist ebenfalls

nicht komplett durch Elektronendichte definiert (vgl. Abb. 4.21 (c)).

Im Gegensatz dazu sind die beiden Seitenketten Phe121 und Tyr125 von H115Y in der $P2_1$ -Struktur sehr gut durch Elektronendichte dargestellt. In allen drei Proteinketten (sowohl $P2_1$ als auch $P4_32_12$) ist der H115Y-Austausch dieser Variante gut erkennbar. Besonders in der $P2_1$ ist gut zu sehen, dass sich an Position 115 anstelle eines Histidins ein Tyrosin befindet. Da diese Variante keinen Austausch in der Helix αD aufweist, wurde sie für die strukturelle Untersuchung der Gelenkregion als wildtypisch angesehen.

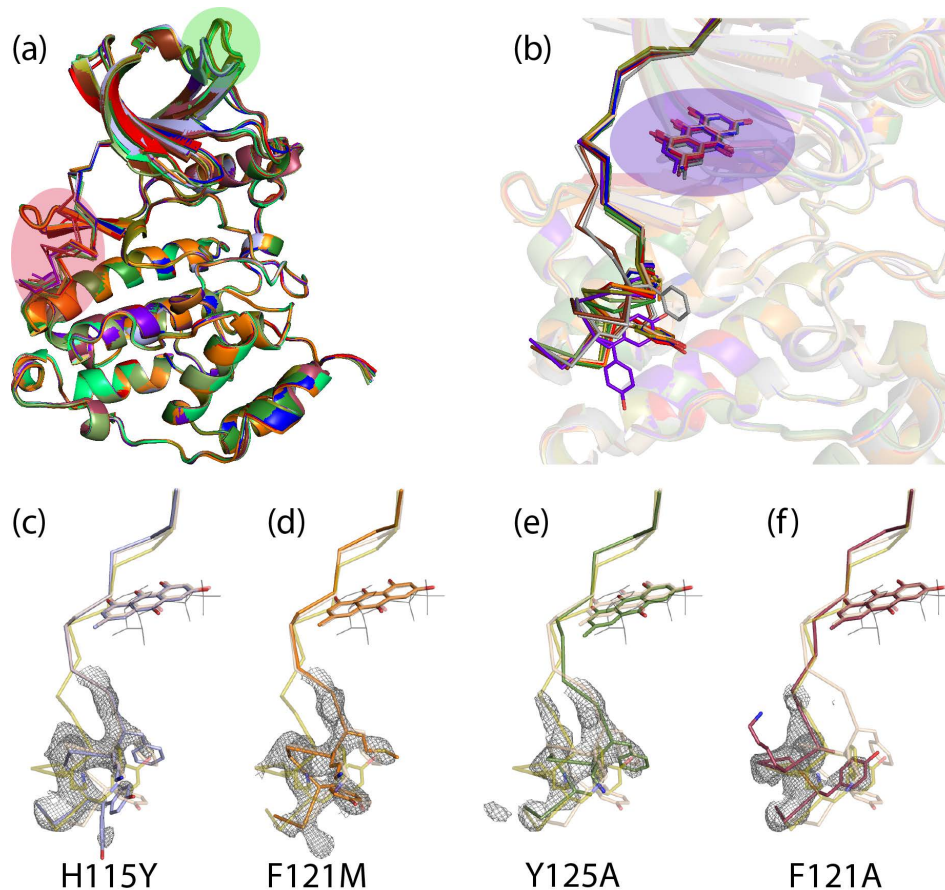


Abbildung 4.21 | Kristallstrukturen der Gelenkregion-Varianten

(a) Alle Strukturen der Proteinvarianten zeigen die typische Faltung von CK2 α und unterscheiden sich lediglich in der Konformation der Gelenkregion (roter Kreis) und der $\beta 4/\beta 5$ -Schleife (grüner Kreis). (b) In allen Strukturen ist ein Emodin-Molekül in der ATP-Bindetasche gebunden (blauer Kreis). (c-f) die *hsCK2 α* -Varianten in der Raumgruppe $P4_32_12$ liegen in der geschlossenen Konformation (c-e) und F121A in der offenen Konformation (f) der Gelenkregion vor. Die Strukturen der Proteinvarianten sind bei (c-f) jeweils überlagert mit 2PVR (offene Gelenkregion, AMPPN, rosa) und 3BQC (geschlossene Gelenkregion, gelb) der Kristallstruktur. Dargestellte Elektronendichte: 1 σ .

Bei der Proteinvariante F121M ist in allen Proteinketten das eingebrachte Methionin klar von Elektronendichte umgeben, Tyr125 ist für die geschlossene Konformation typisch positioniert (vgl. Abb. 4.21 (e)). Das Ersetzen des Tyr125 durch Alanin in der

4. Ergebnisse

Proteinvariante Y125A führt dazu, dass Phe121 in der für die geschlossene Konformation typischen Position tiefer in das Protein hineinragt, was bei den beiden Proteinketten der $P4_32_12$ -Struktur auffällig ist (vgl. Abb. 4.21 (d)). Bei der $P2_1$ -Struktur ist dieses Merkmal nicht so ausgeprägt.

Der Austausch des Phe121 durch Alanin führt in der $P4_32_12$ -Struktur zu einer offenen Konformation der Gelenkregion, die Seitenkette des Tyr125 ragt tief dort ein, wo in der geschlossenen Konformation die Seitenkette des Phe121 im wildtypischen Protein positioniert ist. Die Proteinvariante F121A ist die einzige Proteinvariante, die in den Gelenkregionen der beiden Proteinmoleküle der Raumgruppe $P4_32_12$ klar in einem geöffneten Zustand (vgl. Abb. 4.21 (f)) vorliegt, während sie in dem einzelnen CK2 α -Molekül in der Raumgruppe $P2_1$ in einer geschlossenen Konformation vorliegt. Es gibt allerdings ebenfalls Anzeichen für einen gewissen Anteil an offen vorliegenden Gelenkregionen im Kristall, in dieser $P2_1$ -F121A-Struktur ist insgesamt wenig Elektronendichte im Bereich der Helix αD zu sehen.

4.7. Kokristallisation von CK2 α mit Heparin

Heparin ist ein seit langem bekannter Inhibitor von CK2, der zu Beginn der Forschung an Caseinkinasen (neben der ATP/GTP-Toleranz (vgl. Abschnitt 1.4.2) von CK2 α) ein klassisches biochemisches Unterscheidungsmerkmal zwischen CK2 und anderen Kinasen war. Ziel war, die Bindungsstelle von Heparin an CK2 α zu charakterisieren. Dazu wurde der binäre Komplex aus CK2 α und Heparin kristallisiert. Bei dem verwendeten Heparin handelte es sich um ein kommerziell erhältliches Decasaccharid (vgl. Tab. 2.1).

4.7.1. Kristallisation

Es konnten drei Kristallstrukturen gewonnen werden, bei denen sich entweder die Kristallisationslösungen oder die Raumgruppe unterscheiden. Zwei Strukturen (Hepa-1, Hepa-2) wurden von Kristallen in der Raumgruppe $P4_32_12$ gewonnen, eine experimentell mit SAD-Phasierung gelöste Struktur in der Raumgruppe $P2_1$ konnte aus drei Datensätzen (SAD-1, SAD-2, Hepa-3) gewonnen werden.

Kristallisation in der Raumgruppe $P4_32_12$ Für die Kristalle in der Raumgruppe $P4_32_12$ wurde CK2 α zunächst in einer Konzentration von 5 mg/ml mit dem Heparin Decasaccharid (Endkonzentration 1,5 mM) gemischt und für 30 Minuten vorinkubiert. Manche Ansätze wurden ebenfalls mit 1 mM Emodin inkubiert. Dabei enthielten die Kristallisationsansätze mit Emodin ca. 240 mM NaCl und 10 % DMSO (aus der Emodin-Lösung), die Kristallisationslösung ohne Emodin ca. 340 mM NaCl. Die Salzkonzentration wurde mit Hilfe eines Puffers (400 mM NaCl, 25 mM Tris pH 8,5) eingestellt. Um

Kristalle zu erhalten, wurden diese Lösungen in Verhältnissen von 2:1 bis 5:1 (Proteinlösung zu Reservoir) vermengt und gegen 700 μl Reservoirlösung äquilibriert.

Der erste Datensatz (Hepa-1) wurde von einem Kristall gewonnen, bei dem die Salzkonzentration 240 mM in der Proteinlösung betrug. Des Weiteren enthielt die Proteinlösung 1 mM Emodin. Das Protein-Reservoir-Verhältnis betrug 4:1. Nach dem Kristallwachstum wurden diese Kristalle für drei Tage in einer Vitrifikationslösung ohne Emodin (bestehend aus 32 % (w/v) PEG4000, 5 % (v/v) Glycerol, 0,1 M Tris, 0,2 M LiSO_4 und 0,5 mM Heparin) inkubiert.

Ein zweiter Datensatz (Hepa-2) wurde bei einer Salzkonzentration von 340 mM NaCl in der Proteinlösung und einem Protein-Reservoir-Verhältnis von 4:1 kristallisiert. Die Vitrifikation der erhaltenen Kristalle fand nach der Inkubation in einer Vitrifikationslösung (32 % (w/v) PEG4000, 10 % (v/v) Glycerol, 0,1 M Tris pH 7,5, 0,2 M LiSO_4 , 0,5 mM Heparin) für eine Minute in flüssigem Stickstoff statt.

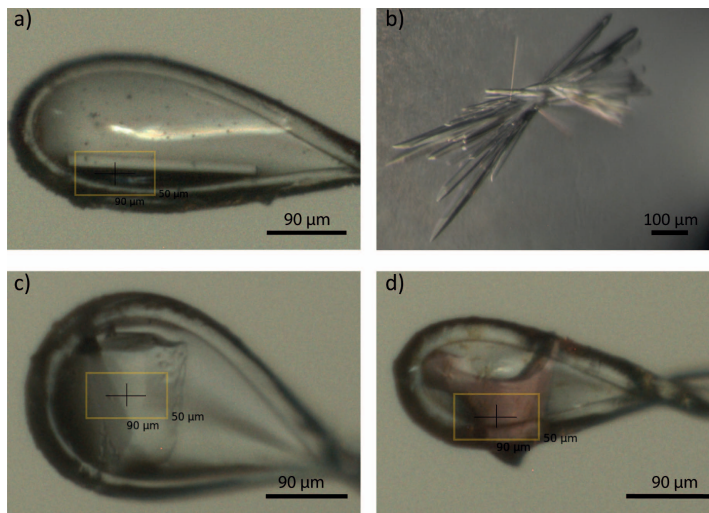


Abbildung 4.22 | Kristalle von CK2 α im Komplex mit Heparin

Sowohl die Hepa-1- (a) als auch die Hepa-2- (b) Kristalle sind stäbchenförmig. Die Kristalle, die für den Hepa-3-Datensatz (c) und für die SAD-1- und SAD-2-Datensätze verwendet wurden (d), sind dreidimensionaler. Teilabbildungen a, c und d wurden von der Beamline-Kamera erstellt, die Kristalle sind bereits in der Nylonschleife befestigt.

Kristallisation in der Raumgruppe $P2_1$ Für die Produktion der Kristalle für den SAD-1- und SAD-2-Datensatz wurde eine Proteinlösung, bestehend aus 8 mg/ml CK2 α , 2 mM Emodin, 2 mM Heparin, 285,7 mM NaCl und ca. 15 mM Tris pH 8,5, in einem Protein-Reservoir-Verhältnis von 1:2,5 gegen 800 μl Reservoir (32 % (w/v) PEG4000, 0,1 M Imidazol, 0,1 M Tris pH 7,5) äquilibriert.

Des Weiteren wurde ein weiterer hochauflösender Datensatz (Hepa-3) von einem Kristall gesammelt, welcher aus der Inkubation einer Proteinlösung (8 mg/ml CK2 α , 2 mM Heparin, 285,7 mM NaCl und ca. 15 mM Tris pH 8,5) gemeinsam mit einer Reservoirlösung (32 % (w/v) PEG4000, 0,2 M Malonat und 0,1 M Tris pH 7,5) in einem Protein-Reservoir-Verhältnis von 1:2,5 inkubiert und gegen 800 μl Reservoir äquilibriert wurde.

Für die Kristalle in der Raumgruppe $P2_1$ gilt, dass nach der Äquilibrierung der Kristallisationsansätze die eigentliche Kristallisation durch die Zugabe von 150 nl Animpflösung

4. Ergebnisse

induziert wurde. Für diese Kristalle wurde eine Vitrifikationslösung ohne Salz (außer Natriumchlorid) verwendet (32 % (w/v) PEG4000, 0,2 M NaCl, 0,5 mM Heparin). Bei dem für die SAD-Datensätze verwendeten Kristall wurde der Vitrifikationslösung 1,2 mM Emodin (Endkonzentration) hinzugefügt.

4.7.2. Strukturen

P₄₃₂₁₂ Die erhaltenen Daten konnten bis zu einer Auflösung von 2,55 Å (Hepa-1) bzw. 2,9 Å (Hepa-2) aufgelöst werden, die Strukturlösung der beiden Datensätze Hepa-1 und Hepa-2 wurde nach der Prozessierung mit XDS (Kabsch [2010]) durch molekularen Ersatz (Phaser, McCoy et al. [2007]) mit Hilfe der PDB 3NGA (Ferguson et al. [2011]) als Startmodell durchgeführt. Als Ausgangspunkt für die Topologie des Heparins wurden die Koordinaten von Heparin aus der PDB 1AZX (vgl. Jin et al. [1997], 3-Buchstabencode: NTP) verwendet und mit elbow (Moriarty et al. [2009]) angepasst. Die Strukturen wurden bis zu einem akzeptablen R-Wert verfeinert. Statistiken können dem Anhang (A.10) entnommen werden.

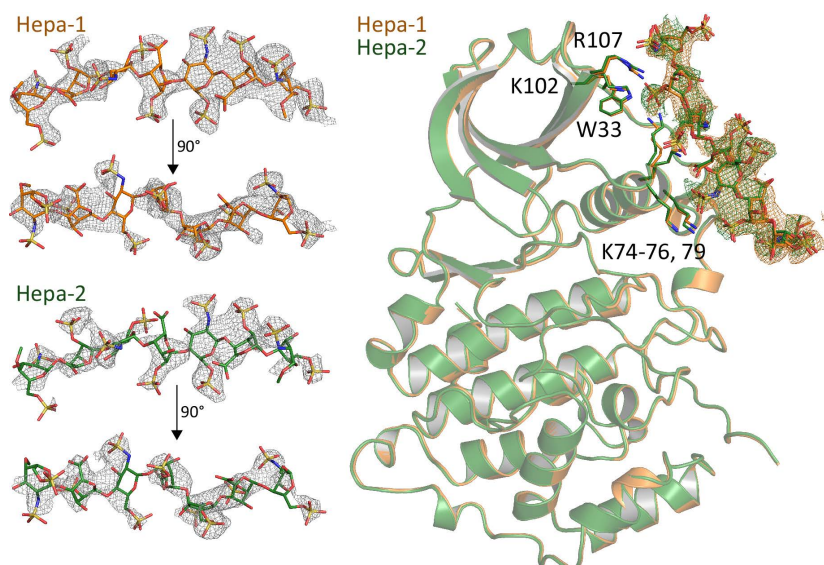


Abbildung 4.23 | Modell der P₄₃₂₁₂-Strukturen

Sowohl bei der Kristallstruktur Hepa-1 (gelb) als auch Hepa-2 (grün) ist das Heparinmolekül klar durch Elektronendichte erkennbar (links), das Heparinmolekül bindet in zwei Bereichen: An dem lysinreichen Cluster der Helix α C (K74-76, K79) und im Bereich um W33, K102 und R107. Elektronendichte: 1 σ .

In den Strukturen von CK2 α mit Heparin in der Raumgruppe P₄₃₂₁₂ befinden sich zwei CK2 α -Moleküle, an einem dieser beiden Moleküle ist Elektronendichte zu erkennen. Von dem Heparin-Decasaccharid sind sieben Zuckerreste darstellbar. Allerdings stellt sich die Elektronendichte nicht klar dar: Zwar ist Elektronendichte vorhanden, allerdings sind gerade die Sulfogruppen schlecht durch Elektronendichte definiert. Das Heparin-Molekül

ist zum einen an der bereits charakterisierten Bindestelle im Bereich der Helix αF um den lysinreichen Bereich Lys74-77 (Vaglio et al. [1996]) lokalisiert, zum anderen ist eine räumliche Nähe zu einem zweiten Bereich (Trp33, Lys102 und Arg107) gegeben.

Die Bindung von Heparin ist dabei nicht spezifisch. Es kann zwar klar eine Bindung zwischen Heparin und CK2 α dargestellt werden, ohne dass jedoch eine exakte Zuordnung von Atompositionen erfolgen kann. Dies hat zur Folge, dass die Heparinbindung nicht an konkreten Wechselwirkungen mit Seitenketten von CK2 α festgemacht werden kann.

P2₁ Für die Lösung der Struktur von Hepa-3 wurden die Datensätze SAD-1 und SAD-2 verwendet. Dabei stellte SAD-1 einen hochredundanten Datensatz dar, welcher bei einer langen Wellenlänge (1,97 Å) gemessen wurde, um das anomale Signal der Schwefelatome zu maximieren (vgl. 3.4). Der Kristall wurde insgesamt um 2520° gedreht und Daten gesammelt, nach 360° wurde jeweils durch Veränderung der chi- und psi-Winkel am Goniometerkopf der Eintrittswinkel der Röntgenstrahlung moduliert. Der Datensatz SAD-2 wurde bei einer Wellenlänge von 1 Å von dem gleichen Kristall gesammelt und während der Strukturlösung als hochauflösender Datensatz verwendet. Für die Strukturlösung durch Schwefel-SAD wurden, nach der Prozessierung mit XDS (Kabsch [2010]), alle Daten des SAD-1-Datensatzes mit Hilfe von XSCALE zusammengeführt. Das anomale Signal des SAD-1-Datensatzes reichte bis zu einer Auflösung von 3,1 Å. Durch phenix.autosol (Terwilliger et al. [2009]) konnten 18 verschiedene anomale Streuer lokalisiert werden. Ausgehend von diesen Atompositionen konnten erste Sekundärstrukturelemente automatisiert lokalisiert werden. Dabei wurden vor allem Teile der α -Helices der C-terminalen Domäne positioniert (vgl. Abb. 4.24 (a)).

Mit Hilfe von phenix.autobuild (Terwilliger et al. [2008]) und intensiver manueller Bearbeitung mit Coot (Emsley und Cowtan [2004]) konnte ein vollständiges Modell erhalten werden. Es zeigte sich, dass zwölf der durch phenix.autosol gefundenen anomalen Streuer zu den Schwefelatomen der Methionine und der Cysteine von CK2 α gehören (vgl. Abb. 4.24 (b)). Vier weitere anomale Streuer sind den Schwefelatomen der Sulfogruppen des gebundenen Heparins zuzuordnen, welches an der Substratbindestelle von CK2 α bindet (vgl. Abb. 4.24 (c)). Die zwei überzähligen Positionen haben keine Entsprechungen in der Struktur, allerdings befindet sich einer dieser beiden anomalen Streuer dort, wo in dem Strukturmodell 2PVR (Niefind et al. [2007]) ein Sulfat-Ion gebunden ist.

Das erhaltene Modell wurde als Ausgangspunkt für den höchstaflösenden Datensatz Hepa-3 verwendet, um eine Kristallstruktur bis zu einer Auflösung von 1.34 Å zu erhalten. Kristallographische Statistiken der drei Datensätze und der Struktur sind im Anhang zu finden (A.11).

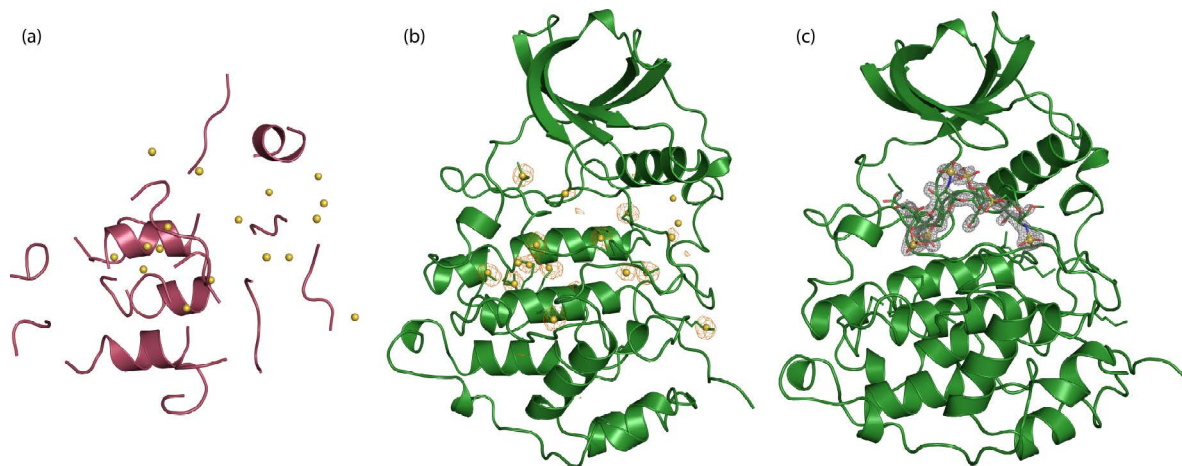


Abbildung 4.24 | Strukturlösung der P₂₁-Heparinstruktur

(a) Ergebnis der automatisierten Strukturlösung mit phenix.autosol. Teile der Helices der C-terminalen Domäne sind ebenso erkennbar wie Teile der Helix α C, 18 anomale Streuer wurden identifiziert (gelbe Sphären). (b) Zwölf dieser anomalen Streuer konnten eindeutig den Cystein- und Methioninresiduen von CK2 α zugeordnet werden. (c) Vier dieser anomalen Streuer gehören zu Sulfogruppen des gebundenen Heparin-Moleküls. Elektronendichte: 1 σ (grau), anomale Elektronendichte: 3.5 σ (gelb).

Obschon die hochauflösende Struktur Hepa-3 ohne Emodin oder einen anderen ATP-kompetitiven Inhibitor kristallisiert wurde, ist in der ATP-Bindetasche ein gebundenes Molekül zu erkennen, bei dem es sich wahrscheinlich um ein Niacin-Molekül handelt und ein Aufreinigungsartefakt darstellt (Kinoshita et al. [2013]).

In der Kristallstruktur ist klar zu erkennen, dass ein Heparin-Molekül an CK2 α gebunden ist. Zwar wurde für die Kristallisation ein Decasaccharid verwendet, in der Kristallstruktur sind jedoch nur vier Zuckerreste erkennbar. Diese setzen sich aus zwei polysulfatierten Glucuronsäureamid- und zwei Iduronsäureresten zusammen, entsprechend den Produktspezifikationen des verwendeten Heparins.

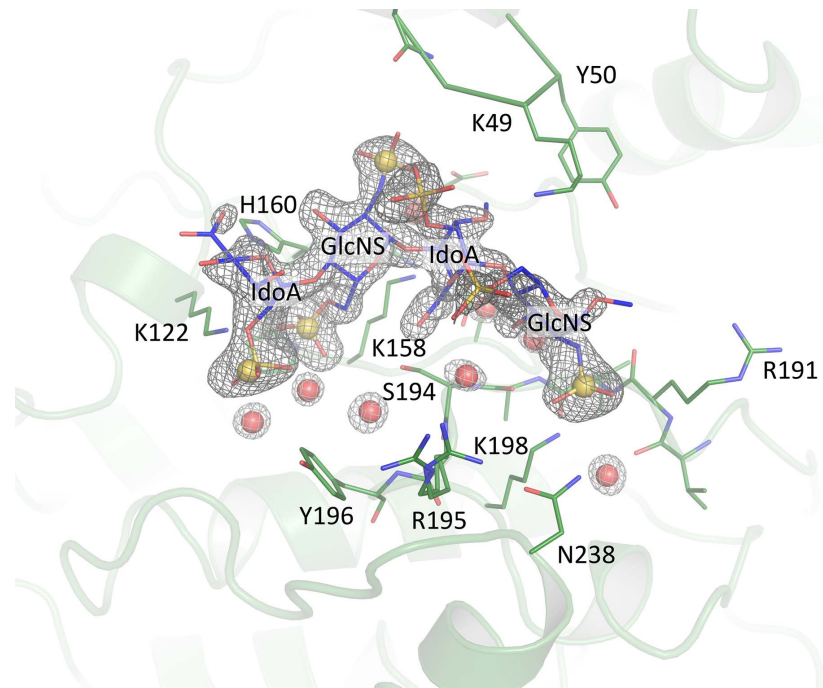


Abbildung 4.25 | Bindung von Heparin an CK2 α in der P2₁-Raumgruppe

Die vier in der Kristallstruktur definierten Zuckerreste binden direkt vor der ATP-Bindestelle, beteiligt sind Residuen der P+1-Bindestelle (R191, S194, R195, Y196, K198), der katalytischen Schleife (K158, H160), der Helix α D (K122) und der glycinreichen Schleife (K49). Goldene Sphären: von phenix.autosol verwendete anomale Streuer, rote Sphären: Wassermoleküle. Elektronendichte 1 σ .

Heparin wird dabei hauptsächlich durch Interaktionen der Sulfogruppen mit CK2 α stabilisiert. Typischerweise besetzt dabei eine Sulfogruppe die als P+1 postulierte (Niefind et al. [2007]) Position an der Aktivierungsschleife (Arg191 und 195, Lys198, aber auch Asn238). Des Weiteren sind Seitenketten der Helix α D (Lys122) und der katalytischen Schleife (Lys158, His160) an der Bindung beteiligt.

Viele weitere Bindungen werden durch (von Wassermolekülen zur Verfügung gestellte) Wasserstoffbrückennetzwerke von Aminogruppen des Proteinrückgrats und dem Heparinmolekül hergestellt. Anders als in den Strukturen Hepa-1 und Hepa-2 sind dabei konkrete Bindungen erkennbar, sodass bei der Positionierung des Heparins bei Hepa-3 von einer stärkeren Bindung ausgegangen werden kann.

5. Diskussion

5.1. PIM3

Teil dieser Arbeit war die Expression und Aufreinigung der humanen ePK PIM3, da PIM-Kinasen häufig ebenfalls von CK2 α -Inhibitoren inhibiert werden (vgl. López-Ramos et al. [2010], Guerra et al. [2015b] und Guerra et al. [2015c]). Im Rahmen dieser Arbeit war diese duale Spezifität insbesondere bei der Entwicklung des CK2-Inhibitors E9 (Guerra et al. [2015c]) aufgefallen.

Die Verwendung der C-terminalen Deletionsvariante PIM3¹⁻³¹⁷ (inspiriert von Harrington et al. [2013]) erwies sich als sinnvoll, da dadurch PIM3 erfolgreich aufgereinigt und biochemisch charakterisiert werden konnte. Die Expression in *E. coli* auch in größeren Mengen war nach Optimierung problemlos möglich. Frisch aufgereinigtes Protein wies ebenfalls eine niedrige Polydispersität auf, ein Indiz auf eine homogene Proteinlösung. Die mittlere Schmelztemperatur T_m von PIM3-CN lag bei 43 °C und damit in einem geeigneten Bereich für eine erfolgreiche Kristallisation. Bei der Gelfiltration eluierte PIM3 als monomeres Protein, ein Teil des Proteins eluierte ebenfalls im Totvolumen der Säule (vgl. 4.3).

Nachdem sowohl das Protein als auch das Substratprotein P21WAF aufgereinigt werden konnten, konnte ich qualitativ zeigen, dass die aufgereinigten PIM3-Varianten aktiv sind (vgl. Abb. 4.6 (a, c)). Die Phosphorylierung von P21WAF ist dabei so stark, dass sie erheblichen Einfluss auf das Laufverhalten von P21WAF auf dem SDS-Gel hat (vgl. Abb. 4.6 (a)). Dies lässt den Schluss zu, dass (auch falls die PKA-Phosphorylierungsstelle zwischen His-Tag und P21WAF (vgl. 4.2) von PIM3 phosphoryliert werden sollte) P21WAF ebenfalls von PIM3 phosphoryliert werden muss. Diese Phosphorylierung durch PIM3 wurde bereits vermutet (Zhang et al. [2013]), da die homologe Kinase PIM1 dazu in der Lage ist (Wang et al. [2002]). Dies ist der erste direkte Nachweis dafür, dass PIM3 P21WAF tatsächlich phosphoryliert.

Die Phosphorylierung von P21WAF kann von E9 konzentrationsabhängig inhibiert werden. Wie bereits angedeutet war die Eigenschaft von E9, neben CK2 ebenfalls PIM3 zu inhibieren (Guerra et al. [2015c]), der Anlass um die Kinase PIM3 zu untersuchen. Da dieser Inhibitor im Rahmen der Arbeit bereits mit CK2 α kristallisiert worden war, war es ebenfalls Ziel eine Kristallstruktur von PIM3 mit E9 zu erhalten. Dies war trotz intensiver Versuche mit den drei erzeugten Proteinvarianten nicht möglich, es konnten keine Kristalle gezüchtet werden. Das Scheitern dieser ersten Kristallisationsversuche ist sowohl auf die Stabilität der erzeugten PIM3-Varianten als auch auf sequenzielle Eigenschaften von PIM3 zurückzuführen: PIM3-CN zeigte im Thermofluor-Assay eine hohe Fluoreszenz bei niedrigen Temperaturen, ein Hinweis auf große ungefaltete Bereiche, welche bereits

mit dem Fluoreszenzfarbstoff interagieren, bevor der hydrophobe Kern des Proteins bei der Temperaturerhöhung entfaltet wird (vgl. Abb. 5.1 (a)). Zwar wurde dieses Experiment ohne Pufferkontrolle durchgeführt, es gibt allerdings weitere Hinweise auf große ungefaltete Bereiche im Bereich des N-Terminus: Mit Hilfe des Online-Tools Xtalpred (Slabinski et al. [2007]) wurden die ersten 39 Aminosäuren von PIM3 als ungeordnet identifiziert. Über die Auswertung der Primärstruktur mit Xtalpred, auch in Relation zu CK2 α , wurde ebenfalls die Kristallisierbarkeit von PIM3 ausgewertet und in zwei verschiedenen Bewertungsskalen als besonders niedrig eingestuft (vgl. Abb. 5.1 (b, c)). Sowohl CK2 α als auch das bereits kristallisierte homologe Enzym PIM1 (z. B. PDB-ID 1XWS, Bullock et al. [2005], nicht gezeigt) erhalten eine deutlich bessere Bewertung.

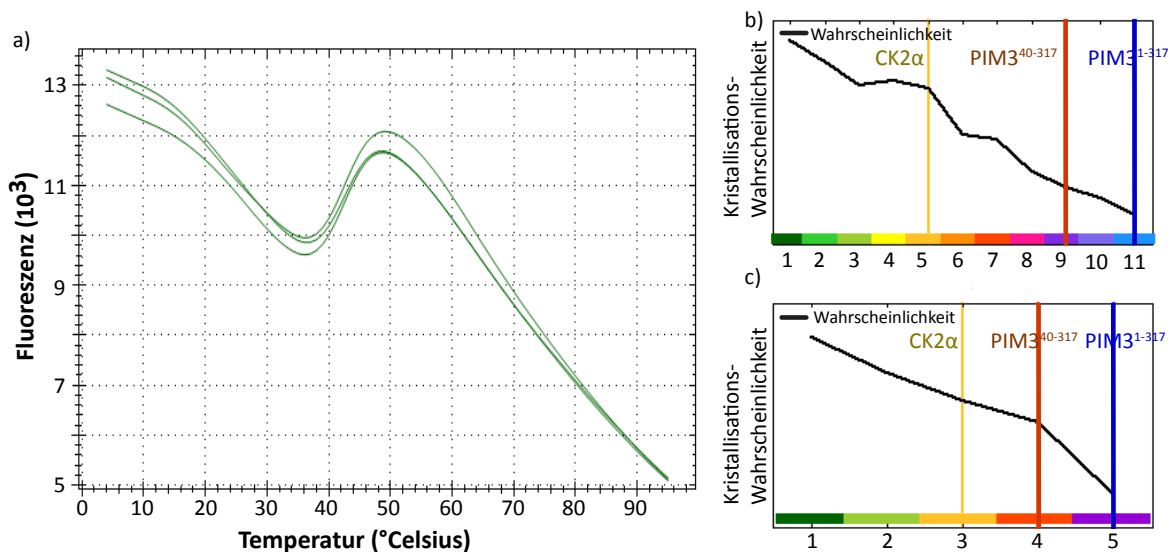


Abbildung 5.1 | Kristallisierbarkeit von PIM3

(a) Thermofluor-Assay: PIM3 zeigt eine hohe Anfangs-Fluoreszenz, ein Indiz auf große ungeordnete Bereiche. (b, c) Vorhersagen der Kristallisierbarkeit sowohl von PIM3¹⁻³¹⁷, PIM3⁴⁰⁻³¹⁷ und CK2 α . Daten erstellt mit Xtalpred (Slabinski et al. [2007]).

Eine PIM3⁴⁰⁻³¹⁷-Variante könnte der Schlüssel zu der Expression eines kristallisierbaren PIM3 sein. Diese Variante würde ebenfalls eine deutlich bessere Bewertung als PIM3¹⁻³¹⁷ bei Xtalpred erhalten (vgl. Abb. 5.1 (b)).

Allerdings wird aus der Struktur von PIM1 ersichtlich, warum E9 ebenfalls PIM1 und PIM3 inhibieren kann. Die Modellierung von PIM3 mit Hilfe der Kristallstruktur von PIM1 (PDB-ID: 1XWS, vgl. Abb. A.4) macht deutlich, dass die Gelenkregion sowohl von PIM1 als auch von PIM3 durch die Pro126 und Pro128 sehr weit nach außen zieht und dadurch die ATP-Bindestelle verbreitert. Proline können keine Wasserstoffbrücken ausbilden, so dass sie einen großen Einfluss auf das Wasserstoffbrücken-Bindungspotenzial und damit auf die Spezifität der ATP-Bindetasche haben.

5. Diskussion

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass E9 PIM3 ähnlich stark inhibieren kann wie CK2 (Guerra et al. [2015c]), ist E9 somit als Grundgerüst für die Entwicklung neuartiger ATP-kompetitiver Inhibitoren, die sowohl CK2 als auch PIM3 adressieren, geeignet. Da PIM3 wie auch CK2 antiapoptotisch wirkt, außerdem ein Proto-Onkogen darstellt und bei Krebs eine Rolle spielt (Brault et al. [2010], Mukaida et al. [2011]), kann eine gleichzeitige Inhibition von CK2 und PIM-Kinasen im medizinischen Sinne extrem sinnvoll sein. Sowohl die Entwicklung von dualen Inhibitoren (z. B. Sarno et al. [2012], López-Ramos et al. [2010], Cozza et al. [2014]) als auch von PIM-Inhibitoren (z. B. Ekambaram et al. [2013], Ishchenko et al. [2015]) sind dabei Objekt aktueller Forschung, zu der E9 einen Beitrag für die weitere Entwicklung leistet.

5.2. CK2

CK2 ist eine ePK, die durch ihre Bedeutung in unzähligen zellulären Prozessen aus der Masse der Proteinkinasen herausragt. Nachdem erste Inhibitoren für andere Kinasen (vgl. 1.1.2) entwickelt und zugelassen wurden, ist CK2 immer weiter in den Vordergrund gerückt (vgl. Pagano et al. [2006]). Erste Inhibitoren befinden sich bereits in klinischen Studien (CIGB-300, CX4945, vgl. 1.5.3). Trotzdem ist und bleibt die Entwicklung weiterer Inhibitoren ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der Inhibition von CK2 α , eine Entwicklung von neuen Inhibitoren ist für die klinische Forschung relevant.

In dieser Arbeit wurden zwei Gruppen ATP-kompetitiver Inhibitoren mit neuen Inhibitor-Grundstrukturen vorgestellt: die Töberichfuran-Inhibitorfamilie und der Inhibitor E9. Eine dritte Inhibitorgruppe stellen Bisubstratinhibitoren dar. Entwickelt wurden diese Inhibitoren aus bekannten ATP-kompetitiven Inhibitoren (TIBI (Gianoncelli et al. [2009]): ARC3140, TBI (Andrzejewska et al. [2003]): ARC1502), welche über einen aliphatischen Linker an einen peptidischen substratkompetitiven Teil, hauptsächlich bestehend aus Aspartaten, gebunden sind. Die Kristallstruktur von CK2 α im Komplex mit ARC3140 überraschte dabei mit einer unerwarteten Bindung des ATP-kompetitiven Teils des Inhibitors an die CK2 α / β -Interaktionsstelle von CK2 α .

Die CK2^{Andante}-Holoenzymstruktur kann nicht abschließend klären, warum der Austausch des Met166 gegen Isoleucin einen Phänotypen in *Drosophila melanogaster* zur Folge hat. Allerdings konnte das Holoenzym in einer Konformation kristallisiert werden, in der die Positionen der beiden CK2 α -Protomere symmetrisch (relativ zur CK2 β -Position) zueinander sind. Diese Struktur gibt Ansätze für eine lineare Oligomerisation als Regulationsmechanismus.

Die Kristallisation des substratkompetitiven Inhibitors Heparin zeigt die komplexe Interaktion dieses Inhibitors mit CK2 α . Die Bindungsstelle an CK2 α ist dabei von der Kristallisation abhängig: In der Raumgruppe P4₃2₁2 ist eine Bindung an der Helix α C

im lysinreichen Bereich der Helix α C Lys74-79 zu erkennen, in der Raumgruppe $P2_1$ bindet es substratkompetitiv in der direkten Umgebung der Phosphorylierungsstelle und hat dabei auch Einfluss auf die Konformation der Gelenkregion.

Die Konformation dieser Gelenkregion in der Kristallstruktur ist abhängig von vielen Faktoren wie pH-Wert der Kristallisation, Raumgruppe oder verwendetem Inhibitor. Da die Gelenkregion der humanen CK2 α sowohl eine offene als auch eine geschlossene Konformation einnehmen kann, kann ich durch die Kristallisation von Proteinvarianten dieser Region einen Einblick in diese Flexibilität geben und dafür wichtige Aminosäuren identifizieren.

5.3. ATP-kompetitive Inhibitoren von CK2

In dieser Arbeit konnte der Bindungsmodus von zwei Gruppen neuartiger ATP-kompetitiver Inhibitoren an CK2 α durch Kokristallisation geklärt werden, der der Töberichfurane (TF, TF85 und TF107) und der von E9. Sowohl E9 (Guerra et al. [2015c]) als auch TF (vgl. Götz et al. [2012]) und TF107 (vgl. Guerra et al. [2015c]) haben in ersten *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen bereits bewiesen, dass sie in der Lage sind, CK2 α selektiv zu inhibieren. Sie erfüllen die Lipinski-Regeln (Lipinski et al. [1997]) und können somit relevant für die Entwicklung marktfähiger Inhibitoren werden.

5.3.1. Töberichfurane

Töberichfurane sind spannende Inhibitoren von CK2, da sie in der Lage sind CK2 α effizient zu inhibieren (TF: K_i : 14,65 nM (Götz et al. [2012]), TF107: K_i : 5 nM (Guerra et al. [2015b], in der Veröffentlichung D11 genannt). Diese Inhibitoren sind ebenfalls selektiv und hemmen neben CK2 nur wenige andere Kinasen, wobei TF107 (Guerra et al. [2015b]) etwas selektiver als TF (Götz et al. [2012]) ist. Für TF107 konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von CDC37, einem CK2-spezifischen Biomarker, *in vivo* bei der Behandlung mit TF107 stark abgesenkt wird (Guerra et al. [2015b]).

Bei den meisten halogenierten CK2-Inhibitoren (Ausnahme: FLC26, Guerra et al. [2015a]) weisen die Halogene tief in die ATP-Bindetasche hinein und bilden Halogenbindungen zu der Hauptkette der Gelenkregion aus (vgl. z. B. die ARC-Inhibitoren, Abschnitt 5.3.3) Trotz des gleichen Dibenzofuran-Grundgerüsts unterscheiden sich die Bindungsmodi von TF und TF85/107: Die gut durch Elektronendichte definierten Chlor-Atome weisen bei TF aus der ATP-Bindetasche heraus. Die beiden Chlor-Atome können somit keine allzu große Bedeutung in der Bindung zu CK2 α haben. Allerdings können sie sterisch wichtig sein, da sie Einfluss auf die Gelenkregion von CK2 α haben könnten.

Bei TF107 und TF85 zeigen die Chlor-Atome in Richtung der Seitenkette des Phe113,

5. Diskussion

also tief in die ATP-Bindetasche hinein. Dadurch haben sie eine Funktion in der Bindung des Inhibitors zu CK2 α : Das tiefer liegende Chlor-Atom 1 (vgl. Abb. 5.2) von TF107 interagiert über eine Cl- π -Bindung mit dem Phe113 in einem Winkel von 124 $^{\circ}$ und einer Distanz von 3,3 \AA , wodurch es an der Stabilität der Inhibitorposition direkt beteiligt ist. Das Chlor-Atom 2 scheint wiederum keinen großen Anteil an der Bindung zu haben, es binden lediglich einige Wassermoleküle.

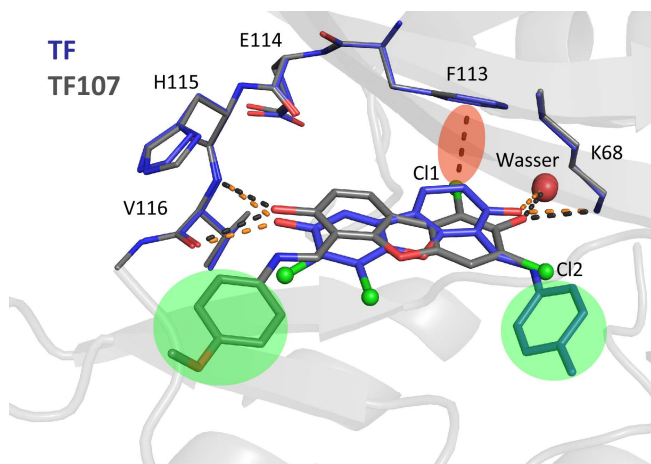


Abbildung 5.2 | Bindungsmodi von TF und TF107

Sowohl TF (blau) als auch TF107 (grau) bilden Wasserstoffbrücken zu der Hauptkette von V116, der Seitenkette von K68 und einem konservierten Wasser aus (TF: orange, TF107: schwarz). Das Cl1-Atom von TF107 geht eine Cl- π -Bindung mit F113 ein.

Das Verbindende aller drei Töberichfuran-Inhibitoren ist, dass sie sowohl zwei Wasserstoffbrückenbindungen auf der distalen Seite zu der Gelenkregion eingehen (Val116) als auch auf der proximalen Seite zu Lys68 und einem konservierten Wassermolekül (vgl. Abb. 5.2). Da alle Inhibitoren sowohl Wasserstoffbrückenbindungen zu der Aminogruppe als auch zu der Carbonylgruppe von Val116 ausbilden, müssen sie eine Hydroxygruppe an der Position 3 (TF85 und TF107) bzw. 8 (TF) tragen. Bei TF befindet sich an Position 8 eine Hydroxylgruppe, bei TF85 an Position 3 allerdings eine Oxogruppe. Es liegt daher nahe, dass von TF85 (und auch von TF) Tautomere vorliegen, wodurch an Position 3 eine Hydroxygruppe entsteht (vgl. Abb. 5.3).

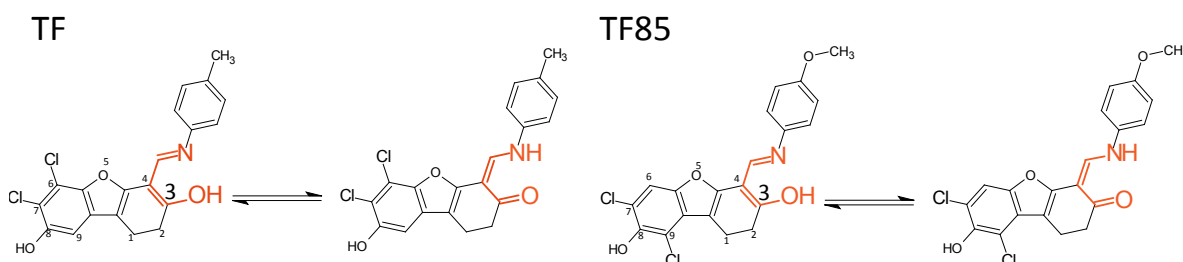


Abbildung 5.3 | Tautomerie von TF und TF85

TF und TF85 tautomerisieren an Position 3 des Dibenzofurangerüsts.

Bei den TF85- und TF107-Strukturen sind die 4-Methoxyphenylgruppen (vgl. Abb. 5.2, grüner Kreis) daran beteiligt, dass die Gelenkregion von *hsCK2 α* nicht die geschlossene Konformation einnehmen kann.

Sowohl die 4-Methylphenyl- (TF) als auch die 4-Methoxyphenylgruppe von TF85 und TF107 sind in den Kristallstrukturen allerdings nicht gut durch Elektronendichte definiert (vgl. 4.9 (c,d)). Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht durch eine Abspaltung dieser Gruppen zu erklären, sondern durch deren Flexibilität. Diese Gruppen spielen für die Bindung an CK2 α keine Rolle, für die Selektivität können sie allerdings trotzdem sehr wichtig sein. Die Flexibilität dieser Gruppen bedingt einige Konformere dieser Moleküle^[6], wodurch es nicht überraschend ist, dass nur wenig Elektronendichte zu erkennen ist.

Den zentralen Unterschied zwischen der Bindung von TF und TF85/107 stellt somit die Cl- π -Interaktion zwischen dem Cl1-Atom und der Seitenkette von Phe113 dar (vgl. 5.2). Mit einem Abstand von 3,3 Å zwischen Cl1 und dem Zentroid des Phenylrings bzw. 5,6 Å zwischen diesem Zentroid und dem Schwerpunkt des Rings des Dibenzofuran-Grundgerüsts von TF107 handelt es sich bei dieser Bindung um eine Interaktion, verglichen zu ähnlichen Bindungsmotiven, mit recht kurzen Bindungslängen und somit starker Bindung (vgl. Matter et al. [2009]). Die entscheidende Eigenschaft der Inhibitoren für die Bindung an CK2 α ist die Chlor-Substitution an Position 9 des Dibenzofuran-Grundgerüsts bei TF85/107: Mit großer Wahrscheinlichkeit ist die Bindung dieses Chlor-Atoms mit Phe113 dafür verantwortlich, dass TF107 stärker an CK2 α bindet als TF. Interessant ist, dass trotz der ähnlichen Struktur der drei Inhibitoren die Position dieses Chlor-Atoms dafür sorgt, dass die Inhibitoren spiegelsymmetrisch zueinander binden, gleichzeitig aber die ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen identisch sind.

5.3.2. E9

E9 ist der erste CK2 α -spezifische ATP-kompetitive Inhibitor, der besonders die hydrophobe Region II adressiert (nach Traxler und Furet [1999], vgl. Abb. 1.3). Durch die Carboxygruppe bildet E9 eine Interaktion sowohl zu Lys68 als auch zu einem Cluster von Wassermolekülen aus, welche ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken bis hin zu Ser51 der glycinreichen Schleife formen.

Die Ionenbindung der Carboxygruppe von E9 mit Lys68 scheint dabei ein wichtiger Bestandteil der Bindung von E9 an CK2 α zu sein und ist ein sich wiederholendes Motiv bei der Bindung vieler Inhibitoren an CK2 α : Sowohl CX4945 (Ferguson et al. [2011]) als auch andere ATP-kompetitive Inhibitoren (FLC26 (Guerra et al. [2015a]), Niacin (Kinoshita et al. [2013]), Thiadiazol 3b (Hou et al. [2012])) binden an dieser Stelle. Die

^[6]vgl. dazu z. B. für TF107: National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5385060, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5385060> (aufgerufen am 19. August 2015).

5. Diskussion

hydrophobe Interaktion zwischen dem Phenylring von E9 mit Phe113 ist ebenfalls ein Bindungsmodus, der bei vielen Inhibitoren zu finden ist.

Zudem bildet die Aminogruppe des Val116 von CK2 α über ein Wassermolekül eine Wasserstoffbrücke zu E9 aus. Beachtenswert ist des Weiteren, dass die Fluorenylgruppe des Inhibitors eine ungewöhnliche Adressierung der hydrophoben Region II (vgl. Abb. 5.4) darstellt: Durch die Größe dieser Gruppe liegt sie auf der Gelenkregion auf, wodurch diese in die offene Konformation gezwungen wird. Die Gelenkregion der E9-*hsCK2 α* -Struktur liegt somit in der offenen Konformation vor, ebenso diejenige der *zmCK2 α* -Struktur. Eine besondere Rolle scheint dabei Asn118 einzunehmen: Die Fluorenylgruppe liegt auf der Seitenkette von Asn118 auf.

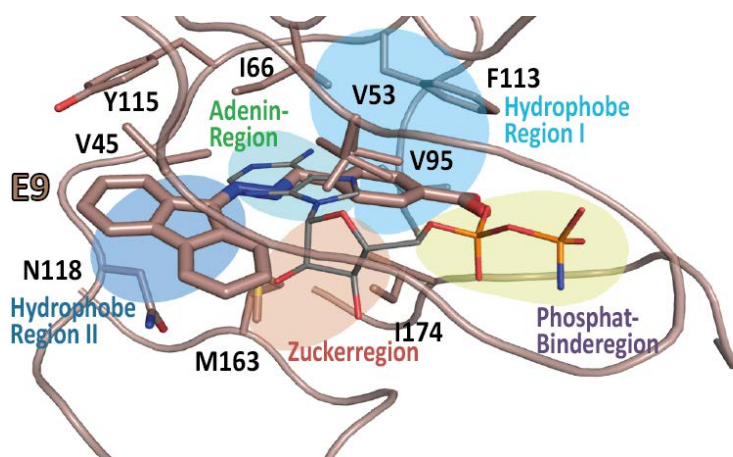


Abbildung 5.4 | E9-Bindung im Pharmakophor-Modell

Die Fluorenylgruppe von E9 besetzt die hydrophobe Region II des Pharmakophor-Modells (Traxler und Furet [1999]), E9 ist dargestellt in braun, überlagert mit AMPPN aus 3NSZ in grau, die verschiedenen Binderegionen des Pharmakophor-Modells sind schematisch dargestellt. Abb. reproduziert und verändert aus Guerra et al. [2015c], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Da CK2 α lediglich mit einem IC₅₀ von 9,5 μ M von E9 *in vitro* gehemmt wird, ist man recht weit von einem klinischen Einsatz oder von vorklinischen Studien entfernt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass hohe Dosen E9 in der Lage sind, sowohl in der humanen Zellkultur antiapoptotisch zu wirken als auch im Xenograft-Mausmodell die Größe von Tumoren deutlich zu verringern (Guerra et al. [2015c]).

Des Weiteren konnte durch Experimente mit E9 gezeigt werden, dass durch die Inhibition von CK2 α die Degradation von HIF1- α , einem Protein, welches für die Steuerung der Sauerstoffversorgung von Zellen zuständig ist, induziert werden kann (Guerra et al. [2015c]). Diese Degradation ist wahrscheinlich auf eine bereits früher vermutete (Miyata und Nishida [2004]) relevante Phosphorylierung von CDC37 zurückzuführen, welche die Interaktion von CDC37 mit dem Chaperon HSP90 stört. Diese Induktion der Degradation von HIF1- α wurde bereits in einer vorangegangenen Arbeit mit dem CK2-Inhibitor Apigenin in Verbindung gebracht, allerdings nicht mit CK2 als zentralem Protein (Mirzoeva et al. [2008]). Auch andere Inhibitoren beeinflussen diese Phosphorylierung von CDC37 (z. B. TF107, vgl. Abschnitt 5.3.1, Guerra et al. [2015b]).

5.3.3. Bisubstratinhibitoren

Sowohl ARC3140 als auch ARC1502 wurden als Bisubstratinhibitoren entwickelt, um zum einen das Potenzial von Bisubstratinhibitoren bei CK2 aufzuzeigen, zum anderen um sie als Werkzeug für die weitere Erforschung von CK2 und insbesondere der Substratbindung verwenden zu können (Enkvist et al. [2012]).

Dabei konnte bereits gezeigt werden, dass ein fluoreszenzmarkierter Bisubstratinhibitor (ARC1504, ein ARC1502-Derivat) zur Charakterisierung von anderen ATP-kompetitiven Inhibitoren in Fluoreszenzanisotropie-Experimenten verwendbar ist (Enkvist et al. [2012]). Außerdem bestand die Hoffnung, durch die Kokristallisation des peptidischen Teils dieser Inhibitoren mit CK2 α einen tieferen Einblick in die Peptidsubstratbindung zu erhalten. Für andere Kinasen sind die Bindungsmodi durch Kristallstrukturen der Kinasen mit peptidischen Substraten oder Inhibitoren (vgl. Zheng et al. [1993]: PKA, Brown et al. [1999]: CDK, Bullock et al. [2005]: PIM1) bereits bekannt, bei CK2 sind die Kenntnisse größtenteils auf Mutagenese- und Kinetik-Studien aufgebaut. Erste strukturelle Indizien beziehen sich auf die Positionierung negativ geladener Moleküle wie Sulfat- (2PVR, Niefind et al. [2007]) oder Chlorid-Ionen (3H30, Raaf et al. [2008a]) aus dem Lösungsmittel (vgl. auch Abschnitt 1.4.3).

ARC3140 und ARC1502 Die beiden Inhibitoren ARC3140 und ARC1502 unterscheiden sich strukturell nur in der Halogenierung: Der ATP-kompetitive Teil von ARC3140 ist tetraiodiert, bei ARC1502 tetrabromiert.

Aus den Erfahrungen der Kristallisation eines ähnlichen Bisubstratinhibitors (ARC1154, Enkvist et al. [2012]) wurden bereits erste Rückschlüsse gezogen und eine Kristallisationsbedingung optimiert, in der keine hohen Salzkonzentrationen vorliegen. Eine hohe Ionenstärke im Lösungsmittel kann zum einen die Bindung des substratkompetitiven Teils behindern, zum anderen kann eine hohe Salzkonzentration Einfluss auf die Bindung des ATP-kompetitiven Teils haben (vgl. Guerra et al. [2015a]). Bei allen mit CK2 α kristallisierten Bisubstratinhibitoren konnte keine Bindung des substratkompetitiven Teils gezeigt werden, sodass keine Aussage über die Substratbindung bei CK2 α getroffen werden kann.

Die beiden Inhibitoren ARC3140 und ARC1502 binden in einem ähnlichen Bindungsmodus an die ATP-Bindestelle von CK2 α (vgl. Abschnitt 4.4.3). Allerdings sind weder die Linkerregion noch der substratkompetitive Teil durch Elektronendichte definiert. Die Linkerregion zum substratkompetitiven Teil scheint jedoch eine Rolle bei der Orientierung zu spielen, ähnlich zu anderen tetrahalogenierten Inhibitoren.

Sowohl TBI, TBB (Battistutta et al. [2001]) als auch TIBI (Sarno et al. [2011]) bzw. Derivate derselben (Sarno et al. [2011], Battistutta et al. [2005], Battistutta et al. [2007], Bischoff et al. [2011a], Cozza et al. [2014], Swider et al. [2015]) wurden bereits

5. Diskussion

mit *zmCK2 α* oder *hsCK2 α* kokristallisiert, wobei die Orientierung des tetrahalogenierten Benzimidazol/Benzotriazol-Grundgerüsts nicht immer identisch ist, im Gegenteil unterscheiden sich die Bindungsmodi erheblich: Während bei TBB (als einzigem Inhibitor) die Triazol-Gruppe in Richtung Lys68 zeigt (vgl. Abb. 5.5), sind viele derivatisierte TBB-, TBI-, TIB- und auch TIBI-Inhibitoren in ähnlicher Orientierung an *zm/hsCK2 α* gebunden wie ARC3140 und ARC1502. Die Derivatisierung an der Imidazol- bzw. Triazolgruppe hat somit einen direkten Einfluss auf den Bindungsmodus an CK2 α (vgl. Abb. 5.5). Dies bestätigt die Arbeit von Sarno et al., die 2011 zeigen konnten, dass sich ein tetrahalogenierter Inhibitor, der randständig an der Imidazol- bzw. Triazolgruppe substituiert ist, wie ARC3140 und ARC1502 positioniert.

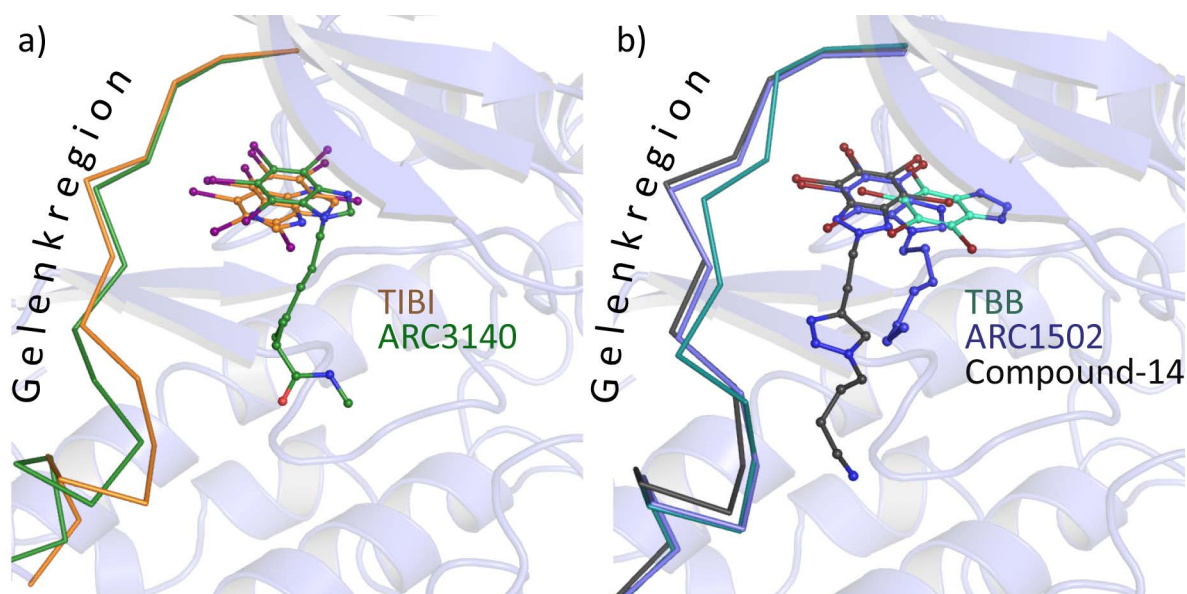


Abbildung 5.5 | Position von TBB- und TIBI-Derivaten

(a) Orientierung von ARC3140 in Relation zu TIBI (PDB-ID: 3KXN). TIBI bindet in zwei verschiedenen Positionen an CK2 α . (b) ARC1502 in Relation zu TBB (PDB-ID: 1J91) und einem TBB-Derivat (PDB-ID: 5CQW).

Ähnlich der Positionsbestimmung der Töberichfurane konnte bei ARC3140 durch das anomale Signal der Iod-Atome die Position des Inhibitors unzweifelhaft bestimmt werden (vgl. Abb. 4.15).

ARC3140 Das Außergewöhnliche des Inhibitors ARC3140 ist unzweifelhaft seine Fähigkeit, nicht nur ATP-kompetitiv an CK2 α zu binden. In der Kristallstruktur wurden zwei weitere ARC3140-Moleküle sichtbar, die zum einen mit der N-terminalen Domäne von CK2 α interagieren, zum anderen eine Rolle bei der Kristallisation gespielt haben können (vgl. Abb. 4.16). ARC3140 wurde unter den gleichen Konditionen wie ARC1502 kristalli-

siert, allerdings wurde ausschließlich bei ARC3140 eine Kristallisation in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ mit einzigartigen Zellkonstanten beobachtet.

Der Kristallkontakt Das ARC3140-Molekül, welches hauptsächlich für einen Kristallkontakt verantwortlich ist, bindet an der N-terminalen Domäne von CK2 α und an der C-terminalen Domäne des Symmetrieäquivalents. Dies wird ebenfalls deutlich an der Beteiligung dieses Moleküls an der Fläche des Kristallkontakts: Während ARC3140 in der ATP-Bindetasche nicht an der Interaktion mit Symmetrieäquivalenten beteiligt ist und ARC3140 in der CK2 α / β -Interaktionsstelle lediglich mit dem Histidin 236 des symmetrieäquivalenten CK2 α -Moleküls interagiert (vgl. Abb. 4.16 (b), Interaktionsfläche: $66,9 \text{ \AA}^2$, berechnet mit Arealmol, CCP4-Suite), interagiert das Kristallkontakt-ARC3140-Molekül (vgl. Abb. 4.16 (c)) über eine Fläche von $315,3 \text{ \AA}^2$ (berechnet mit Arealmol) mit dem symmetrieäquivalenten CK2 α -Molekül. Auffällig ist dabei, dass dieser Kristallkontakt Auswirkungen auf die Konformation der C-terminalen Domäne hat: Der Kristallkontakt führt zu einer Verformung der Helix $\alpha 1$, wodurch diese Helix um bis zu 3 \AA verschoben wird (vgl. Abb. 5.6).

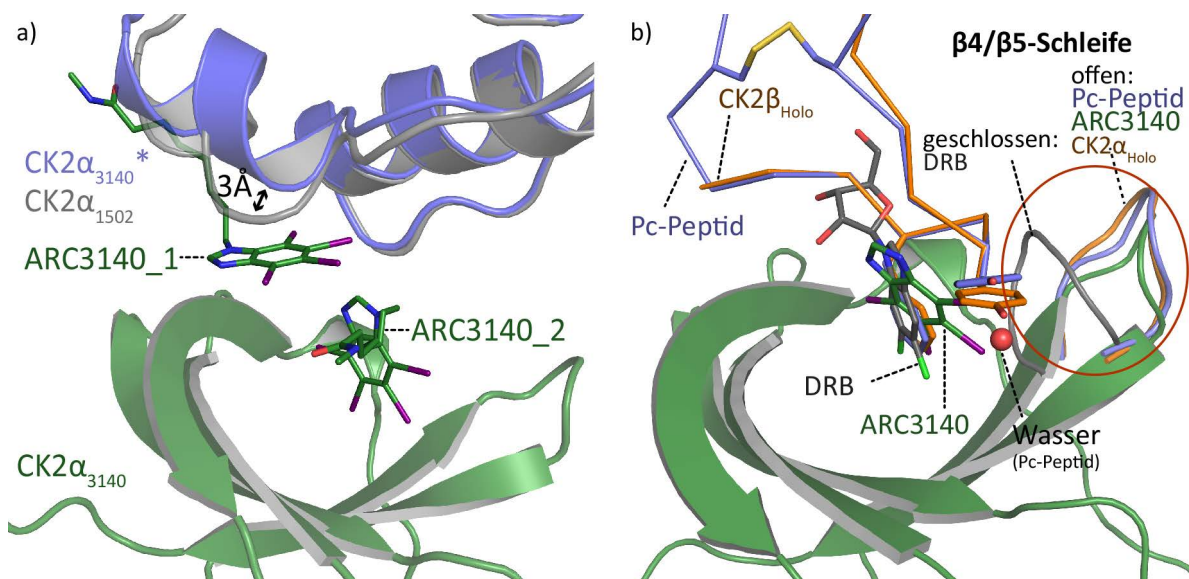


Abbildung 5.6 | Einfluss von ARC3140 auf die Konformation von CK2 α

(a) ARC3140-1 bindet sowohl an CK2 α (grün) als auch an das symmetrieäquivalente CK2 α^* (blau). Dadurch wird die Helix $\alpha 1$ des Symmetrieäquivalents um bis zu 3 \AA verschoben. In grau: CK2 α (ARC1502). (b) Die $\beta 4/\beta 5$ -Schleife von CK2 α befindet sich bei Bindung von CK2 β (orange, PDB-ID: 4DGL) in der offenen Konformation, ebenso bei der Bindung des Pc-Peptids (blau, PDB-ID: 4IB5) und ARC3140 (grün). Bei der Bindung von DRB (grau, PDB-ID: 3H30) liegt die $\beta 4/\beta 5$ -Schleife in der geschlossenen Konformation vor.

ARC3140: Die CK2 α / β -Interaktionsstelle Die Bindung von ARC3140 an der α / β -Interaktionsstelle von CK2 α wird zusätzlich durch die Interaktion mit dem symmetrieäquivalenten CK2 α -Molekül stabilisiert, die Bindung in der CK2 α / β -Bindestelle trägt den

5. Diskussion

deutlich größeren Anteil. Die Bindung an dieser Stelle entspricht der Bindungsstelle der CK2 β -Untereinheit (Niefind et al. [2001]), des CK2 β -kompetitiven zyklischen Pc-Peptids (Raaf et al. [2013]) und des ATP-kompetitiven Inhibitors DRB (Raaf et al. [2008a], vgl. Abb. 5.6 (b)). Im Unterschied zu der Bindung von DRB ist ARC3140 allerdings in der Lage, die β 4/ β 5-Schleife in der offenen Konformation zu stabilisieren, die diese Schleife ebenfalls bei der Bindung von CK2 β und Pc-Peptid einnimmt. Diese Eigenschaft ist ein zentraler Unterscheidungspunkt von DRB und ARC3140: Während DRB anscheinend in einer Nische bindet, in der auch Glycerol binden kann (Raaf et al. [2008a]), besitzt ARC3140 die Eigenschaft, die β 4/ β 5-Schleife in der offenen Konformation zu stabilisieren, ebenso wie CK2 β und das Pc-Peptid.

Charakterisierung der Bindung von ARC3140 an der CK2 α / β -Bindestelle Die Besetzung der CK2 α / β -Bindestelle durch ARC3140 in der Komplexstruktur von CK2 α resultierte zwangsläufig in der Hypothese, dass ARC3140 ein CK2 β -kompetitiver Inhibitor der CK2 α /CK2 β -Interaktionsstelle sein könnte. Um dem nachzugehen, wurde untersucht, ob ARC3140 ein Pc-Peptid aus der CK2 α /CK2 β -Interaktionsstelle verdrängen kann (vgl. Hochscherf et al. [2015]). Dieses Experiment hat den Vorteil, dass die ATP-kompetitive Bindung ausgeblendet wird, da ausschließlich die Konkurrenz mit dem CK2 β -kompetitiven Pc-Peptid betrachtet werden kann (Hochscherf et al. [2015]). Dieser Test ist eine noch recht junge Methode, um die Stärke solcher Interaktionen zu beobachten und konnte eine CK2 β -kompetitive Bindung bestätigen. Mit einem gemessenen K_i -Wert von 118 μ M ist diese Inhibition definitiv vorhanden.

Um die Bindung weiter zu charakterisieren, wurden erste ITC-Messungen durchgeführt. Bei ITC-Messungen werden alle Interaktionen von ARC3140 und CK2 α erfasst, sowohl mit der ATP-Bindestelle als auch mit der CK2 α / β -Bindestelle und einer eventuellen dritten Bindungsstelle. Dabei konnte klar festgestellt werden, dass mindestens zwei Bindungsereignisse von ARC3140 an CK2 α stattfinden, die erhaltenen Daten sind mit einem einzelnen Bindeereignis nicht auswertbar. Allerdings bergen diese Messungen einige Krähenfüße: Bei zwei Bindungsereignissen würde man, da CK2 α zu ARC3140 hinzu titriert wurde, ein molares Verhältnis von 0,5 erwarten, da zwei ARC3140-Moleküle an ein CK2 α -Molekül binden. Gemessen wurde ein Verhältnis von 1, was einer einzigen Bindungsstelle entspricht. Des Weiteren scheint das zweite Bindungsereignis mit einer niedrigeren Dissoziationskonstante stattzufinden, was auf eine Kooperativität zwischen der ATP-Bindestelle und der CK2 β -kompetitiven Bindestelle hindeuten kann.

Unter der Prämisse, dass die Bestimmung der Inhibitorkonzentration nicht präzise durchgeführt werden kann (es wurde eine Absorptionskoeffizienz $\epsilon_{300\text{nm}}$: 10000 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ auch in wässriger Lösung (pH 8,5) angenommen, vgl. Gianoncelli et al. [2009]), ist zwar keine absolute Aussage über die Anzahl von Bindungsereignissen zu treffen, es findet allerdings

definitiv mehr als ein Bindungsereignis statt. Die ermittelten Dissoziationskonstanten $K_{da} = 3,23 \text{ nM}$ und $K_{db} = 185 \text{ }\mu\text{M}$ liegen in einer ähnlichen Größenordnung wie der für die ATP-Bindetasche bestimmte K_d -Wert (ca. $0,2 \text{ nM}$, unveröffentlichte Daten unseres Kooperationspartners Prof. Uri) und dem bestimmten K_i -Wert der Inhibition der CK2 α /Pc-Peptid-Interaktion ($118 \text{ }\mu\text{M}$, vgl. Abb. 4.17 (a, b)).

Aus dem Konvolut der Ergebnisse ist zu schließen, dass die Bindung von ARC3140 an CK2 α eine komplexe Interaktion darstellt. Sowohl Strukturdaten als auch ITC-Daten weisen auf mehrere Bindungsereignisse, auch in wässriger Lösung, hin. Die Ergebnisse der Pc-Peptid-Kompetition zeigen, dass ARC3140 an der CK2 α / β -Bindestelle bindet. Offen bleibt zu diesem Zeitpunkt, ob das dritte in der Kristallstruktur an CK2 α bindende ARC3140-Molekül ebenfalls *in vitro* bindet oder lediglich einen Kristallkontakt darstellt. Die ITC-Daten (vgl. Abb. 4.17) würden ebenfalls eine dritte Bindestelle zulassen.

5.4. CK2^{Andante}

Durch die Kristallisation und Strukturlösung konnte eine Kristallstruktur des CK2 Holoenzym gewonnen werden, in dem die beiden CK2 α -Untereinheiten in gleicher Weise an das CK2 β -Dimer binden (vgl. Abb. 4.19 (a)). Das CK2^{Andante}-Holoenzym ist dadurch charakterisiert, dass die CK2 β -Untereinheiten einen Aminosäureaustausch an der Position 166 tragen; das im Wildtyp vorhandene Methionin wurde durch ein Isoleucin ersetzt (Akten et al. [2003]). Dieser Austausch führt bei *Drosophila melanogaster* zu einer Verlängerung des Tagesrhythmus auf 25,5 Stunden (Konopka et al. [1991]). Auf intrazellulärer Ebene wird die Lokalisation von Proteinen, die an der Zeitwahrnehmung beteiligt sind, in den Zellkern beeinflusst (Akten et al. [2003], vgl. Abschnitt 1.3.2).

Allerdings konnte ich nicht ermitteln, dass der Austausch des Met166 gegen Isoleucin (übertragen auf *hsCK2 β* , vgl. dazu A.1) einen strukturellen Einfluss auf den Bindungsmodus zwischen CK2 β und CK2 α hat (vgl. Abb. 4.19 (d)) hat. Rasmussen et al. [2005] konnten ebenfalls keinen Einfluss auf die Aktivität und den heterotetrameren Aufbau des Holoenzym zeigen. Auf Proteinlevel kann somit kein Argument für die Auswirkung der Mutation im CK2 β -Gen auf *Drosophila melanogaster* gefunden werden.

Allerdings kann die Codon-Nutzung von *Drosophila melanogaster* einen Hinweis liefern: Während das Basentriplett ATG als einziges Triplett für Methionin kodiert und die entsprechende tRNA in ausreichender Menge vorhanden ist, ist das Basentriplett ATA, welches die Mutation in CK2^{Andante} ausmacht (Akten et al. [2003]), kein in *Drosophila melanogaster* vorrangig verwendetes Triplett für Isoleucin. Im Gegenteil werden weniger als 20 % aller Isoleucine durch das Basentriplett ATA kodiert^[7]. Zwar konnten Akten et al. [2003] zeigen, dass sowohl die Expression von wildtypischem CK2 β als auch von CK2^{Andante} im Tagesablauf „relatively constant“ war, allerdings ist ein Unterschied des Expressionslevel zu erkennen: CK2^{Andante} wird schlechter exprimiert als wildtypisches CK2 β , ein Einfluss der Mutation auf das Expressionsniveau scheint möglich (vgl. Abb. 5.7).

^[7]www.genscript.com/cgi-bin/tools/codon_freq_table; abgerufen am 24. August 2015

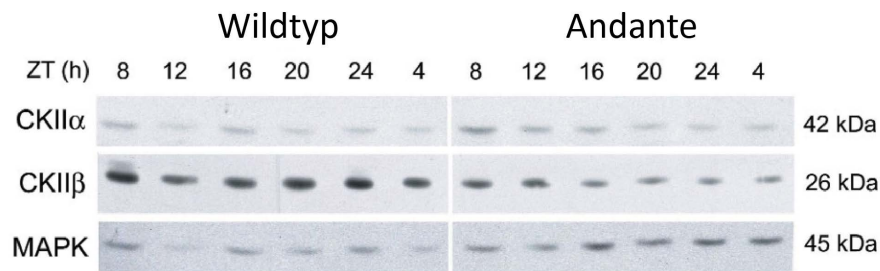


Abbildung 5.7 | Expression von wildtypischem und Andante-CK2

Die Expression von CK2 β^{Andante} ist im gesamten Tagesablauf geringer als bei wildtypischem CK2 β . Abbildung des Western Blots reproduziert und verändert aus Akten et al. [2003] mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.

Eine allosterische Auswirkung des M166I-Austauschs auf die Aktivität des CK2 β^{Andante} -Holoenzym kann nicht ausgeschlossen werden. Die vergleichsweise einfache Kristallisation des CK2 β^{Andante} -Holoenzym als symmetrisches Heterotetramer (verglichen mit dem wildtypischen Protein) ist allerdings der einzige experimentelle Hinweis auf eine Verhaltensänderung des Produktes selbst. Da CK2 β ebenfalls mit anderen Proteinen interagiert, ist auch eine Bedeutung dieses Austausches über CK2 hinaus durchaus möglich (vgl. z. B. Boldyreff und Issinger [1997]; Korn et al. [1999]).

5.4.1. Die Oligomerisation als regulatorischer Mechanismus

Nachdem Glover 1986 und Valero et al. 1995 aufzeigen konnten, dass CK2-Oligomere *in vitro* existieren, entwickelten sich in den Folgejahren verschiedenste Theorien der Regulation von CK2 durch Oligomerisation und Trans-Phosphorylierung:

In einem ersten Modell postulierten Rekha und Srinivasan [2003], dass die beobachtete Trans-Autophosphorylierung des CK2 β -N-Terminus durch eine CK2 α -Untereinheit eines anderen Holoenzym-Moleküls zu einer Inaktivierung führt. Pagano et al. konnten 2005 zeigen, dass nicht nur die Trans-Autophosphorylierung eine Rolle spielt, sondern auch eine mögliche elektrostatische Interaktion der negativ geladenen sauren Schleife einer CK2 β -Untereinheit des Holoenzym mit der überwiegend positiv geladenen Substrat-Binderegion einer CK2 α -Untereinheit (vgl. Abschnitt 1.4.4) eines benachbarten CK2 Holoenzym-Moleküls interagieren kann. Diese saure Schleife stellt eine flexible Region von CK2 β dar, welche in der ersten CK2 β -Struktur (Chantalat et al. [1999]) ungeordnet vorlag. Pagano et al. banden 2005 zum ersten Mal auch Daten von CK2 β -Varianten (Boldyreff et al. [1993]) mit ein. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass ein Entfernen der negativen Ladungen in der sauren Schleife von CK2 β zu einer Hyperaktivierung von CK2 führt. Eine weiterführende Studie von Poole et al. [2005] griff wiederum die Ergebnisse von Glover auf, um eine erste Möglichkeit für eine Bildung von linearen Filamenten aufzuzeigen (Abb. 5.8 (a)), indem zwei Holoenzyme über die sauren Schleifen eines dritten Holoenzym miteinander verbunden werden und dadurch ein lineares Fila-

5. Diskussion

ment entstehen kann, ähnlich der von Valero et al. charakterisierten dünnen Filamente (vgl. 1.4.5). Dabei wurde auch erstmals eine Verknüpfung einer möglichen Filamentbildung zu der Regulation von PKA dargestellt (Abb. 5.8 (b)), in der die De-Oligomerisation der Holoenzymfilamente das eigentliche regulatorische Moment darstellt. Anzumerken ist dabei, dass bei diesem Modell jede Substratbindestelle von CK2 α durch eine saure Schleife einer CK2 β -Untereinheit eines anderen Holoenzym inhibiert wird, die Filamentbildung somit zu einer Inaktivierung führt.

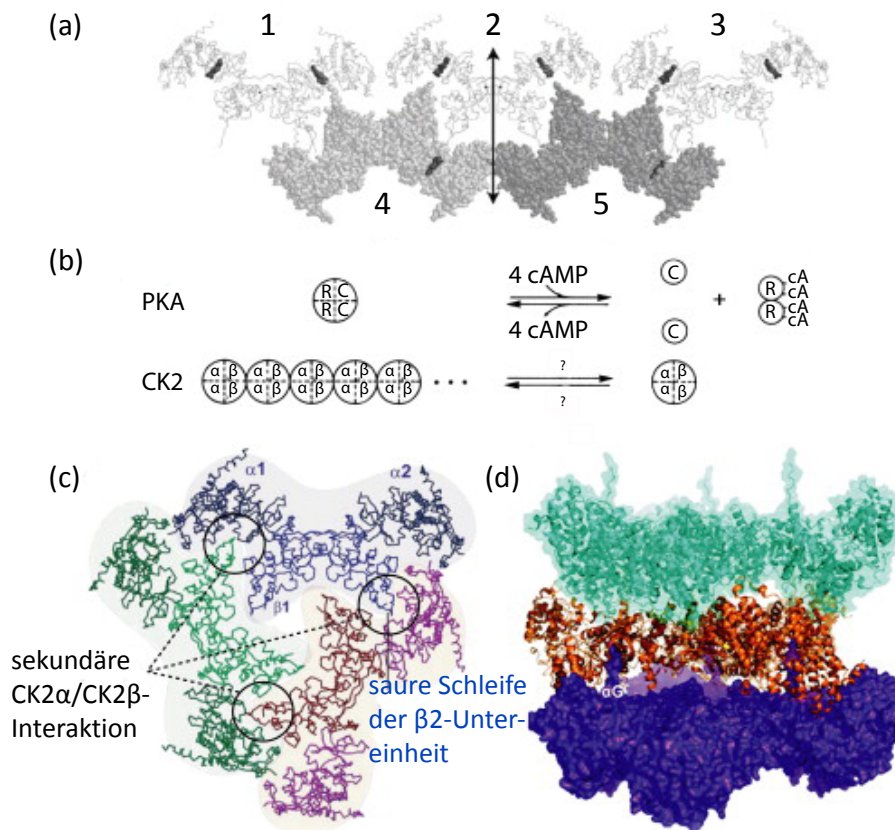


Abbildung 5.8 | Oligomerisierungs- und Aktivierungsmechanismen des Holoenzym

(a) Potenzielle Oligomerisierung durch die Formierung eines linearen Filaments aus CK2-Holoenzym nach Poole et al. [2005], reproduziert aus Poole et al. [2005], mit freundlicher Genehmigung von Springer. (b) Ein möglicher Mechanismus der Aktivierung durch De-Oligomerisation in Analogie zu der Aktivierung von PKA, angelehnt an Poole et al. [2005] und ebenfalls reproduziert und verändert aus Poole et al. [2005], mit freundlicher Genehmigung von Springer. (c) Drei CK2-Holoenzyme bilden ein Trimer aus Tetrameren, einen trimeren Ring in der hexagonalen Kristallpackung der Kristallstruktur (PDB-ID: 1JWH). Die saure Schleife einer CK2 β -Untereinheit interagiert mit der Substratbinderegion einer CK2 α -Untereinheit eines anderen Tetramers, reproduziert aus Niefind und Issinger [2005] mit freundlicher Genehmigung von Springer. (d) Gestapelte trimere Ringe bilden ein dickes Filament, mit freundlicher Genehmigung reproduziert aus Lolli et al. [2012], © 2012 American Chemical Society. Diese Stapel bilden sich in der hexagonalen Kristallstruktur (PDB-ID: 4DGL) aus. Der C-Terminus von CK2 β (vgl. 1.4.4) interagiert mit der nächsten Trimer-Schicht und bildet ein dickes Filament aus.

Nachdem Niefind und Issinger [2005] eine erste mögliche Trimerisierung und somit Ringstrukturbildung (ähnlich der Ringstruktur von Valero et al. [1995], vgl. Abb. 5.8 (c)) anhand von Kristallkontakten postulierten, publizierten Lolli et al. 2012 erstmals ein Modell für eine mögliche dreidimensionale Oligomerisation: Dabei wird eine mögliche Inhibition von CK2 α im Holoenzym (nach der bereits beschriebenen ringförmigen Trimerisierung) durch die C-terminale Helix einer CK2 β -Untereinheit (vgl. 1.4.4) des benachbarten Holoenzym-Moleküls und somit eine Möglichkeit für die Bildung dreidimensionaler Filamente beschrieben. Durch die Stapelung der Trimere aufeinander ist eine Bildung von inaktiven Filamenten möglich (vgl. Abb. 5.8 (d)). Diese Form von Filamenten ist ein erster Ansatz, um die von Valero et al. [1995] beschriebenen dicken Filamente zu erklären.

Lolli et al. führten 2014 diese Theorien weiter aus, nachdem sie symmetrische CK2-Holoenzym-Kristallstrukturen ähnlich der CK2^{Andante}-Holoenzymstruktur gewinnen konnten. Nach Lolli et al. [2014] liegen die inaktiven dicken Filamente in einem Gleichgewicht mit inaktiven Trimeren, welche sich unter Niedrigsalz-Bedingungen aus symmetrischen, aktiven Heterotetrameren bilden. Diese Trimere aus asymmetrischen CK2-Holoenzym-Molekülen wiederum können durch Hochsalzbedingungen und Polyaminen in Heterotetramere zerfallen (vgl. Abb. 5.9).

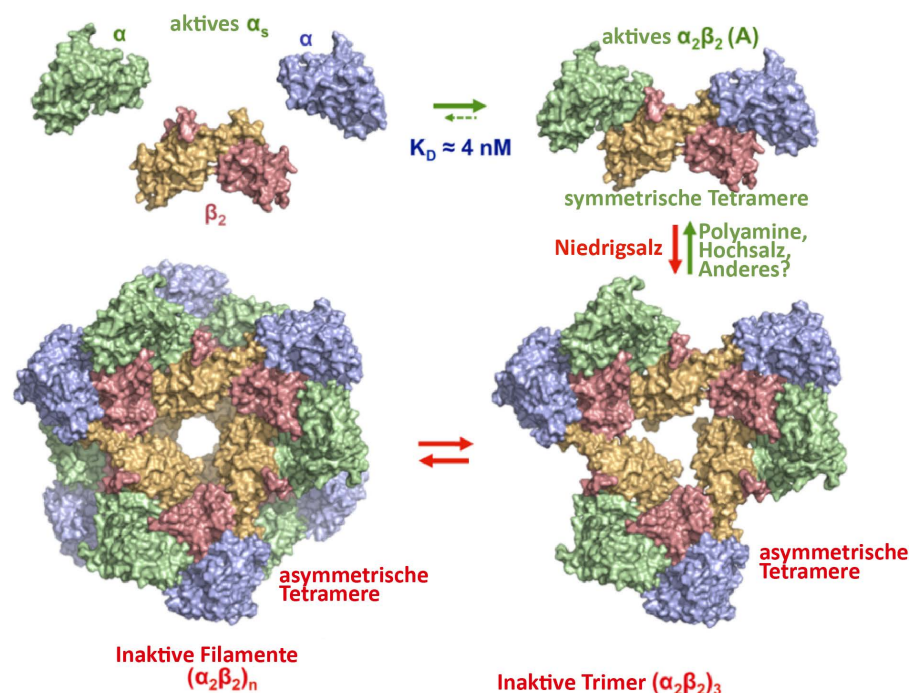


Abbildung 5.9 | Symmetrie des Holoenzym als zentrales Element der Oligomerisierung

Das symmetrische und das asymmetrische Heterotetramer: Nach Lolli et al. [2014] liegt das Holoenzym als symmetrisches Tetramer vor. Durch äußere Einflüsse bildet sich ein Trimer aus Tetrameren aus asymmetrischen Holoenzymen, die sich zu inaktiven Filamenten zusammenlagern. Abbildung reproduziert und verändert mit freundlicher Genehmigung von Lolli et al. [2014], © 2014 American Chemical Society.

5. Diskussion

Problematisch an dieser Hypothese ist allerdings, dass sie einigen gut dokumentierten Eigenschaften von CK2 widerspricht. Zum einen wurden ringförmige Filamente bisher nicht als inaktiv charakterisiert (Valero et al. [1995]), zum anderen führt Niedrigsalz nicht zu einer Inaktivierung von CK2 (vgl. z. B. Valero et al. [1995] und Rasmussen et al. [2005]).

Lolli et al. [2014] betonen allerdings in ihrer Arbeit einen weiteren Punkt, der auch in dieser Arbeit an der CK2^{Andante}-Kristallstruktur festgestellt werden konnte: Die primäre Interaktionsstelle zwischen CK2 α und CK2 β besitzt eine gewisse Rotationsfreiheit. In der CK2^{Andante}-Struktur ist die CK2 α 2 β -Bindung an beiden Bindestellen identisch, in asymmetrischen Kristallstrukturen (vgl. Abb. 4.19 (e), Niefind et al. [2001] und Lolli et al. [2014]) allerdings nicht. Diese Flexibilität des Holoenzym, trotz der starken Bindung (K_d : 4 nM, Raaf et al. [2011]), wäre für die Ausbildung zweier unterschiedlicher Filamente (ringförmige Strukturen und längliche Filamente (vgl. Abb. 1.11)) *in vivo* notwendig.

5.4.2. Trans-Interaktionen des CK2^{Andante}-Holoenzym

Das CK2^{Andante}-Holoenzym zeichnet sich, wie beschrieben, nicht dadurch aus, dass der Austausch des Met166 zu Isoleucin zu einer Modulation der Aktivität oder der Konformation des Holoenzym führt. Allerdings bietet die in dieser Arbeit diskutierte Struktur neben den vorangegangenen vorgestellten Modellen einen tieferen Einblick in eine mögliche Oligomerisation des Heterotetramers, ähnlich der Beschreibung von Glover [1986] und Poole et al. [2005]: In der Kristallstruktur von CK2^{Andante} in der Raumgruppe C2 ist eine deutliche Affinität der sauren Schleife (vgl. Abb. 5.10) der CK2 β -Untereinheiten zu der basischen ATP-Bindestelle der CK2 α -Untereinheiten eines symmetrieäquivalenten CK2-Holoenzym zu erkennen. Diese Interaktion wurde bereits früher beschrieben (vgl. Abb. 1.10), allerdings kann mit der CK2^{Andante}-Struktur diese Interaktion zum ersten Mal bei intermolekularen Kontakten von Symmetrieäquivalenten des symmetrischen CK2-Holoenzym gezeigt werden.

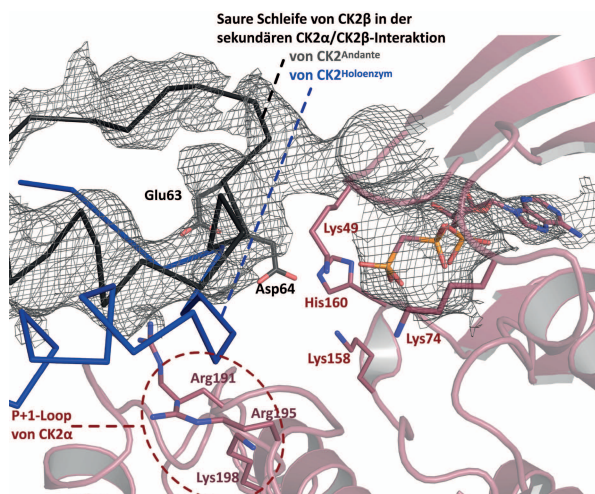


Abbildung 5.10 | Sekundäre CK2 α / β -Interaktion im symmetrischen Holoenzym

Die saure Schleife von CK2 α im CK2^{Andante}-Holoenzym zeigt eine starke Affinität zu positiv geladenen Resten der Substratbindestelle von CK2 α des benachbarten Holoenzym, die dargestellte Elektronendichte stellt eine NCS-gemittelte Elektronendichte dar, hergestellt mit Coot (Emsley und Cowtan [2004]), Abbildung reproduziert und verändert aus Schnitzler et al. [2014] mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Diese Interaktion betrifft nicht wie im asymmetrischen Holoenzym (Lolli et al. [2012], Lolli et al. [2014]) jeweils ein CK2 α -Protomer, sondern beide CK2 α -Untereinheiten zeigen eine Affinität zu den sauren Schleifen der CK2 β -Untereinheiten unterschiedlicher CK2-Holoenzyme im Kristall.

Somit konnte in zwei unabhängigen Kristallpackungen eine inhibitorische Nähe der sauren Schleife von CK2 β mit der basischen Substratbindestelle von CK2 α gezeigt werden (vgl. Abb. 5.10). Dies sind weitere experimentelle Indizien für eine Interaktion, welche *in vivo* regulatorische Bedeutung haben könnte: Ein Austausch der Reste der sauren Schleife zu Alanin (CK2 β^{55-57A}) führt zu einer Hyperaktivierung von CK2 (Boldyreff et al. [1993]). Außerdem können polybasische Moleküle CK2 aber nicht CK2 α aktivieren (vgl. Abschnitt 1.6). Erklärbar ist dies durch die Bindung dieser polybasischen Moleküle an die saure Schleife von CK2 β : Calmodulin, ein Substrat von monomerem CK2 α , wird nur von dem Holoenzym phosphoryliert, wenn polybasische Moleküle CK2 aktivieren oder die saure Schleife mutiert wurde (Holoenzym mit CK2 β^{55-57A} , vgl. Meggio et al. [1994]). Diese Wechselwirkungen zwischen der Substratbindestelle von CK2 α und der sauren Schleife von CK2 β sind in der CK2^{Andante}-Kristallstruktur nicht (wie bei Poole et al. [2005] postuliert) komplett linear. Sie sind gegeneinander versetzt, sodass neben der Möglichkeit einer linearen Filamentbildung ebenfalls ein zweidimensionales, flächiges Filament möglich scheint (vgl. Abb. 5.11). Außerdem würde diese Art der Interaktion erklären, warum die von Valero et al. [1995] identifizierten Filamente aktiv sind, da die äußeren Substrat-Bindestellen von *hsCK2 α* unbesetzt bleiben würden.

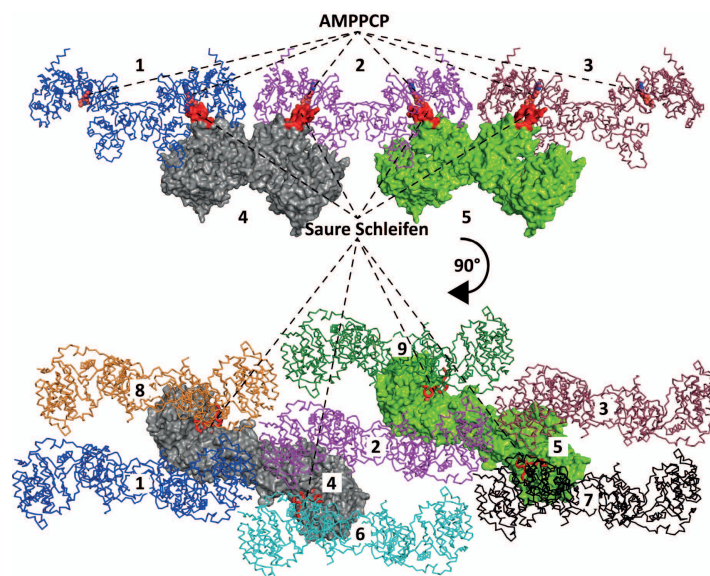


Abbildung 5.11 | Mögliche Filamentbildung des symmetrischen Holoenzym

Durch die Interaktion der Substratbindestelle von CK2 α und der sauren Schleife von CK2 β in der CK2^{Andante}-Kristallstruktur kann sowohl ein lineares als auch ein flächiges Filament abgeleitet werden. An der ATP-Bindetasche von CK2 α ist immer ein AMPPCP-Molekül gebunden.

5.5. Die Gelenkregion von CK2 α

Die Gelenkregion von CK2 α ist das verbindende Element von N-terminaler und C-terminaler Domäne an der ATP-Bindetasche. In *hsCK2 α* hat die Konformation der Gelenkregion in Kristallstrukturen einen nicht unerheblichen Einfluss auf Bindungen in der ATP-Bindetasche (vgl. Abschnitt 1.4.2). Die vier *hsCK2 α* ¹⁻³¹⁷-Varianten F121A, F121M, Y125A und H115Y konnten sowohl in der Raumgruppe P2₁ als auch in der Raumgruppe P4₃2₁2 unter unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen kristallisiert werden. Dabei unterscheiden sich die Kristallisationsbedingungen nicht wesentlich, ausschlaggebend für die unterschiedliche Kristallisation ist das Verhältnis von Proteinlösung zu Reservoirlösung.

Durch die Kristallstrukturen dieser Proteinvarianten konnte ich bestätigen, dass unterschiedliche Kristallpackungen eine zentrale Rolle für die Untersuchung der Gelenkregion spielen können (vgl. Klopffleisch et al. [2012]): Während in den Kristallstrukturen in der P4₃2₁2-Raumgruppe die Gelenkregion kaum durch intermolekulare Interaktionen beeinflusst wird (Interaktionsfläche ca. 22,1 Å² in der geschlossenen Konformation, 37,9 Å² in der offenen Konformation), ist in der Raumgruppe P2₁ eine Beeinflussung der Konformation der Gelenkregion durch Kristallkontakte stärker gegeben (Interaktionsfläche ca. 157,2 Å² in der geschlossenen Konformation, 254 Å² in der offenen Konformation) (vgl. Klopffleisch et al. [2012]). Das benachbarte Symmetrieäquivalent kann dabei durchaus Einfluss auf die Konformation der Gelenkregion nehmen, wobei die Bindung von Inhibitoren erheblichen Einfluss haben kann, auch in der Raumgruppe P2₁ (vgl. z. B. die Struktur von ARC1502 im Komplex mit CK2 α , Abb. 4.13).

H115Y Der Austausch dieser Proteinvariante liegt nicht in der Helix α D wie bei den anderen Varianten, sondern direkt an der ATP-Bindetasche. Andere CK2 α -Proteine (z. B. von Mais oder *hsCK2 α '*) tragen an dieser Position einen Tyrosinrest und wurden bisher ausschließlich in der offenen Konformation kristallisiert (Niefind et al. [1998]; Nakaniwa et al. [2009]).

F121A Die einzige Kristallstruktur der Proteinvarianten in der offenen Konformation ist P4₃2₁2-F121A. Bei P2₁-F121A ist ebenfalls eine Tendenz zur offenen Konformation erkennbar, die Gelenkregion liegt im Kristall anscheinend sowohl in der geschlossenen als auch in der offenen Konformation vor. Die Kristallstruktur gibt dabei immer das Mittel aller Moleküle im Kristall wieder. Die Konformation der Gelenkregionen aller anderen Proteinvarianten war in den Kristallstrukturen geschlossen. Da die Proteinvariante F121A nicht in der Lage ist, die offene Konformation in der Raumgruppe P2₁ auszubilden, kann davon ausgegangen werden, dass bereits der Einfluss der Kristallkontakte auf die Gelenkregion ausreicht, um die geschlossene Konformation zu favorisieren.

F121M und Y125A Diese beiden Proteinvarianten wurden ausschließlich in der geschlossenen Konformation kristallisiert. Dies entspricht den Erwartungen, da durch den Austausch von Phe121 gegen Methionin die geschlossene Konformation (angelehnt an PKA) stabilisiert werden sollte. In der Proteinvariante Y125A fehlt mit dem Tyrosinrest 125 genau die Seitenkette, die mit Phe121 um den gleichen hydrophoben Raum konkurriert und in der offenen Konformation diesen Raum besetzt (vgl. Abschnitt 1.4.2). Auch dort entspricht die Struktur den Erwartungen: Die Seitenkette von Phe121 besetzt den hydrophoben Raum.

5.5.1. Kinetische Daten

Die Austausche der Proteinvarianten haben Auswirkungen auf die Verwendung von ATP und GTP als Kosubstrat. Wie bereits erörtert (vgl. Abschnitt 1.4.2), ist die Eigenschaft beide Kosubstrate verwenden zu können innerhalb der Serin/Threonin-ePKs sehr charakteristisch für CK2 α und unterscheidet sie von anderen ePKs wie PKA. Da GTP in der geschlossenen Konformation nicht an die ATP/GTP-Bindestelle binden kann, wurden im Rahmen eines Praktikums von Dirk Lindenblatt kinetische Messungen mit den in dieser Arbeit vorgestellten Proteinvarianten sowohl mit ATP als auch mit GTP durchgeführt (Lindenblatt [2013]).

Dabei wurde deutlich, dass bei den beiden Proteinvarianten, bei denen die geschlossene Konformation stabilisiert wurde (F121M und Y125A), die Präferenz deutlich in Richtung von ATP verschoben ist (vgl. Lindenblatt [2013]). Dies gilt ebenfalls für F121A, welche in der Kristallstruktur P4₃2₁2-F121A allerdings eindeutig geöffnet ist.

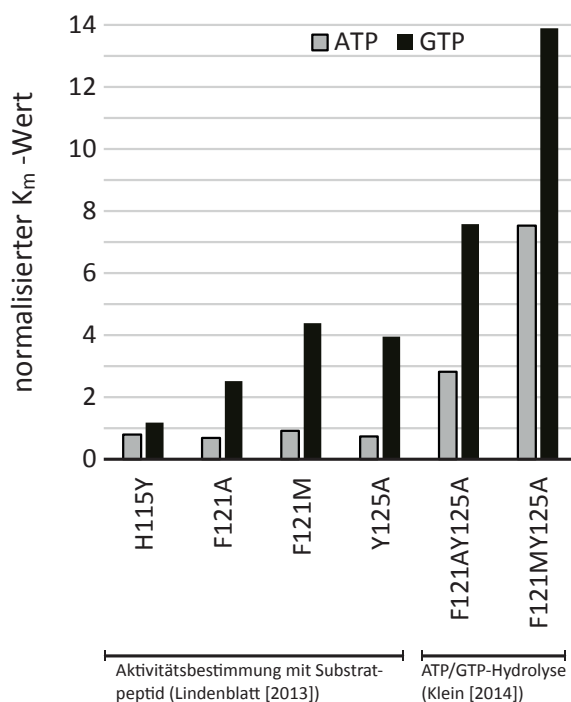


Abbildung 5.12 | Bindung von ATP und GTP an Proteinvarianten

Außer H115Y weisen alle weiteren Einzelaustausch-Varianten eine deutliche Präferenz zu ATP auf. Die Messungen von Lindenblatt [2013] wurden mit einem Substratpeptid durchgeführt. Die beiden Doppelaustausch-Varianten zeigen ebenfalls eine Präferenz für ATP, beide Varianten binden auch ATP deutlich schlechter als der Wildtyp. Die Messungen wurden von Klein [2014] durchgeführt, es wurde die ATP/GTP-Hydrolyse gemessen. K_m -Werte wurden mit wildtypischen Werten normalisiert.

5. Diskussion

Diese Daten konnten mit der Strukturlösung und kinetischen Untersuchung zweier Doppelmutanten, F121AY125A und F121MY125A, weiter bestätigt werden. Beide Proteinvarianten wurden in der Raumgruppe $P2_1$ in der geschlossenen Konformation der Gelenkregion kristallisiert (Klein [2014]). Beide Doppelvarianten zeigten eine klare Präferenz für ATP, wobei sowohl ATP als auch GTP deutlich schlechtere Substrate für diese Varianten als für den Wildtyp waren.

Auffällig war bei allen getesteten Varianten, dass erste Messungen mit Holoenzym-Protein bei allen Varianten darauf hinweisen, dass die Formierung des Holoenzym die Präferenz für ATP oder GTP annähernd auf Wildtyp-Niveau stabilisieren kann (Klein [2014], Lindenblatt [2013]). Andere Varianten der Gelenkregion oder der ATP/GTP-Bindetasche von CK2 α wurden ebenfalls auf ihre Rolle bei der Diskriminierung von ATP oder GTP untersucht, woraus eine Verschlechterung der GTP-Nutzbarkeit (Jacob et al. [2000]: N118E, D120N; Yde et al. [2005]: V66A/M163L) oder keine substanzielle Veränderung der Aktivität (Diese Arbeit, Lindenblatt [2013]: H115Y) resultierte.

Die Flexibilität der Gelenkregion im Kristall Die tatsächliche Rolle der Helix α D der Gelenkregion für die Kosubstratspezifität von CK2 α und die Diskriminierung zwischen ATP und GTP bleibt in Teilen unklar. Zwar wird aus den Strukturdaten deutlich, dass Phe121 und Tyr125 um denselben hydrophoben Raum konkurrieren und ein Wegfall jeweils einer dieser Seitenketten dazu führt, dass die andere Seitenkette diese Position einnimmt. In den Varianten Y125A, F121M und F121MY125A kann womöglich die deutlich geringere Flexibilität der Gelenkregion die geschlossene Konformation stabilisieren, da in dieser Konformation GTP nicht binden kann (vgl. Niefind et al. [1999]).

Bei den Varianten F121A und F121AY125A ist vorstellbar, dass durch den Wegfall der großen hydrophoben Seitenkette Phe121 die Gelenkregion so stark destabilisiert wird, dass die hohe Flexibilität eine Bindung von GTP (welches nicht so tief wie ATP in der Bindetasche bindet) deutlich erschwert. Die veränderte Flexibilität der Helix α D spiegelt sich ebenfalls in der Verteilung der Temperaturfaktoren (als Maß der Positionstreuung der Atome in Kristallstrukturen) der einzelnen Varianten wider: Während die für die Helix α D wildtypische Variante H115Y in der geschlossenen Konformation relativ hohe Temperaturfaktoren im Bereich der Helix α D aufweist, zeigen die beiden Varianten F121M und Y125A eine geringere Flexibilität. Die Variante F121A in der offenen Konformation der Gelenkregion zeigt hohe Temperaturfaktoren in der Helix α D. Dies ist konsistent mit der Hypothese, dass diese hohe Flexibilität eine Rolle bei der Diskriminierung von GTP spielen kann (vgl. Abb. 5.13).

Vergleicht man allerdings die Temperaturfaktoren der Helix α D der Varianten mit denen anderer Kinasen wie PKA oder PIM-1, so fällt auf, dass bei diesen Kinasen die Helix α D sehr unflexibel ist. Auch wenn einige der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*-Varianten eine stabilisierte

Helix α D haben, ist der Unterschied zu den Gelenkregionen anderer Kinasen immer noch eklatant (vgl. Abb. 5.13).

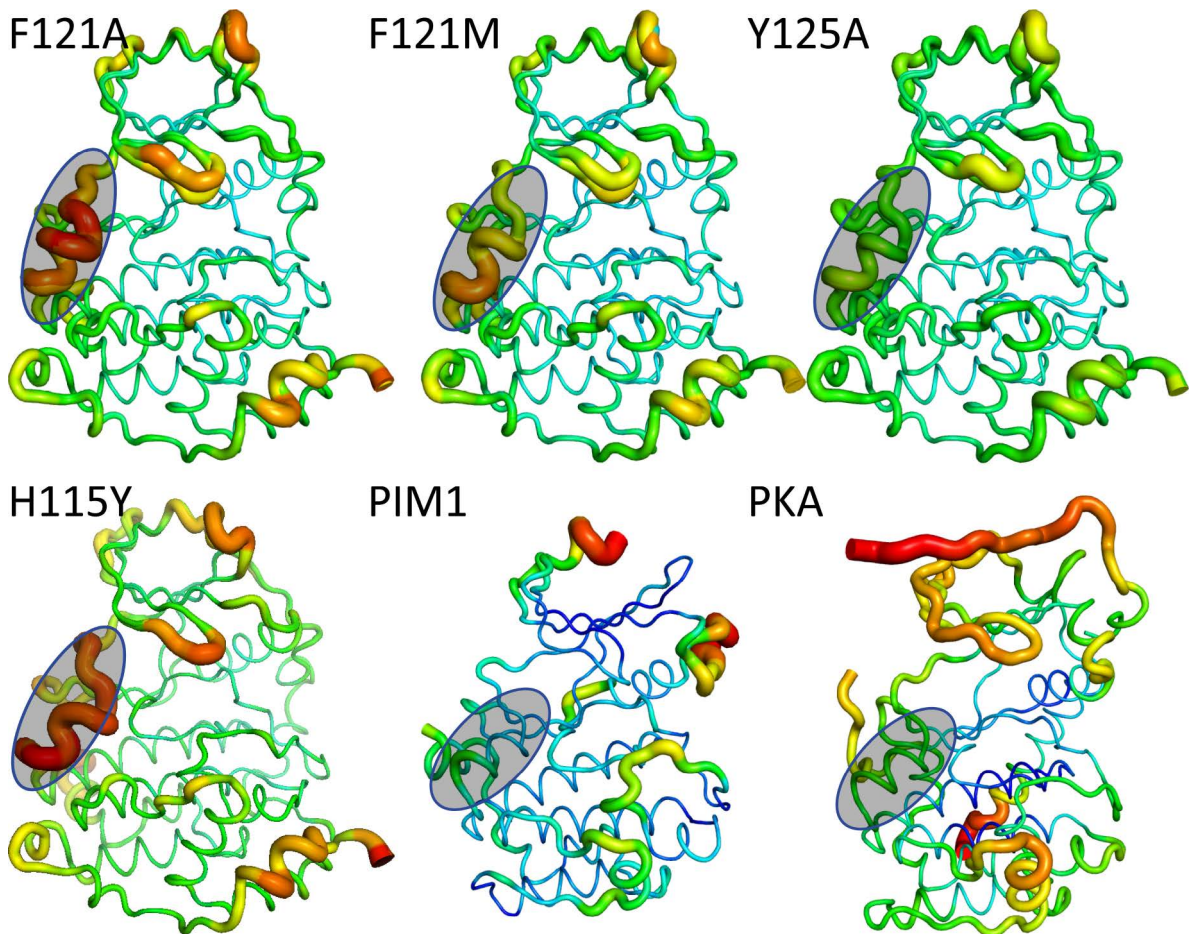


Abbildung 5.13 | Die B-Faktoren der Gelenkregionen

Darstellung der Temperaturfaktoren in den CK2 α -Varianten und zwei Vergleichsproteinen, PIM1 (PDB-ID: 1XWS) und PKA (PDB-ID: 1J3H). Die Helices α D sind grau hervorgehoben.

5.5.2. Die Spine-Theorie als Erklärungsansatz

Da GTP bei *hsCK2 α* nicht so tief in der Bindetasche wie ATP bindet, wird die Bindung womöglich durch die geringere Hydrophobizität beeinflusst. Ein Einfluss dieser geringeren Hydrophobizität kann ebenfalls mit der Spine-Theorie nach Kornev et al. [2008] in Einklang gebracht werden, die einen Stapel aus hydrophoben Aminosäuren als notwendig für Aktivität ansieht.

In der offenen bzw. der geschlossenen Konformation besetzen zwei verschiedene hydrophobe Seitenketten der Helix α D den gleichen Raum (in der geöffneten Konformation Tyr125, in der geschlossenen Konformation Phe121), der bei PKA und vielen anderen Kinasen von einem Methionin besetzt wird und Teil des sogenannten katalytischen Spines (Kornev et al. [2008]) ist. Dieser c-Spine (vgl. Abb. 5.14) besteht sowohl aus hydrophoben Aminosäuren der ATP-Bindetasche als auch der Helix α D und wird von der Base des ATP/GTP komplettiert. Diese Spines sind von zentraler Bedeutung für die Aktivität von

5. Diskussion

Proteinkinasen und setzen sich aus Aminosäuren sowohl der C-terminalen als auch der N-terminalen Domäne zusammen. Ausgehend von der Helix αF der deutlich rigideren C-terminalen Domäne (Taylor und Kornev [2011]) verlaufen beide Spines gen N-terminaler Domäne. Der regulatorische Spine spielt bei der Stabilisierung der Aktivierungsschleife eine wichtige Rolle: In inaktiven Zuständen von ePKs sind diese Aminosäuren nicht zu einem Stapel assembliert (Taylor et al. [2012b]).

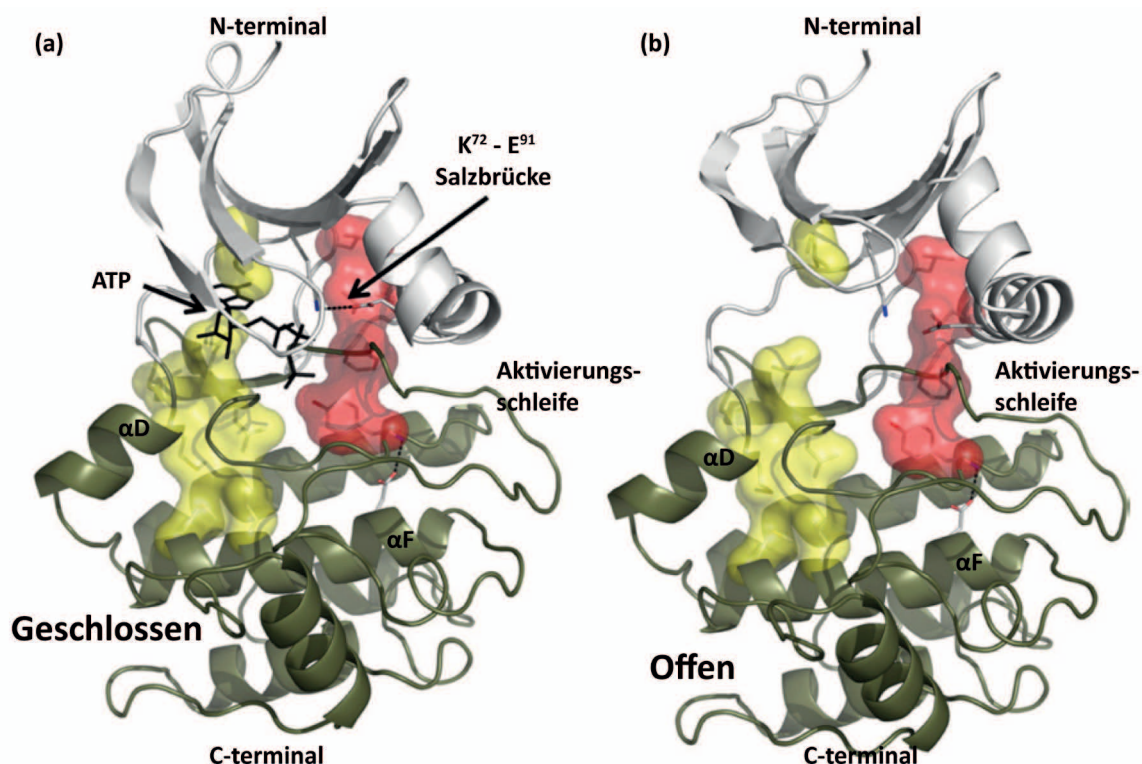


Abbildung 5.14 | Das Spine-Konzept nach Taylor und Kornev

Der regulatorische r-Spine (dargestellt in rot) stellt einen Stapel aus hydrophoben Aminosäuren dar, an dem sowohl Aminosäuren der C- als auch der N-terminalen Domäne beteiligt sind und damit die ganze Kinase stabilisiert. Der katalytische c-Spine wird erst durch die Bindung des NTPs vervollständigt. Bei PKA vervollständigt der Purin-Teil des NTPs den hydrophoben Stapel, wodurch eine Salzbrücke zwischen K72 und E91 ausgebildet wird und eine geschlossene Konformation einnimmt. Geschlossene und offene Konformation bezieht sich in diesem Kontext nicht auf die Helix αD , sondern auf die Ausbildung der Salzbrücke und die Bindung von ATP. Abb. reproduziert und verändert aus Kornev und Taylor [2010], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Bei PKA ist die Aminosäure Met128 der Helix αD am c-Spine beteiligt. In der geschlossenen Konformation der Gelenkregion von CK2 α besetzt Phe121 diese Position. Bei der offenen Konformation ist diese Position allerdings nicht adäquat besetzt, da sich statt des Phe121 die Seitenkette von Tyr125 an dieser Position befindet (vgl. Abb. 1.7). Somit ist zwar ebenfalls eine hydrophobe Seitenkette an dieser Position (vgl. Abb. 1.7), allerdings zeigt die Hydroxygruppe des Tyr125 an die Stelle, an der sich in der geschlossenen Konformation der Phenylring des Phe121 befindet. Daher wurde von Bischoff et al.

[2011b] postuliert, dass CK2 (in der offenen Konformation der Gelenkregion) trotz eines unvollständigen c-Spines aktiv ist. Die Struktur- und Kinetikdaten der Proteinvariante F121A weisen allerdings darauf hin, dass der c-Spine für die Bindung von GTP bei CK2 α weiter gefasst werden sollte: Auch in der geöffneten Konformation dieser Variante bindet GTP schlechter. Der einzige Unterschied zum Wildtyp ist eine erhöhte Flexibilität der Helix α D und eine verringerte Hydrophobizität. Es erscheint daher vorstellbar, dass bei CK2 α sowohl Phe121 als auch Tyr125 entscheidende Seitenketten sind, um in der offenen Konformation GTP zu binden. Für die Bindung von ATP sind sie von geringerer Bedeutung.

5.5.3. Die Gelenkregion – offen oder geschlossen?

Da (trotz der offenen Konformation der Gelenkregion in der Kristallstruktur von F121A) GTP in den drei Varianten F121A, F121M und Y125A schlechter bindet als ATP kann davon ausgegangen werden, dass nicht allein eine geschlossene Konformation die Bindung von GTP erschwert, sondern ebenfalls andere Faktoren wie z. B. die Hydrophobizität der Helix α D. Außerdem gilt zu beachten, dass die Bindung eines ATP-Analogons an der ATP-Bindestelle bisher nicht in einer Kristallstruktur von wildtypischem CK2 α gefunden wurde, sondern lediglich bei einer Variante (V66A, M163L, vgl. Niefind et al. [2009]), welche zusätzlich in einer Hochsalz-Kristallisationsbedingung kristallisiert wurde von der bekannt ist, dass sie einen Einfluss sowohl auf Interaktionen im Protein (Guerra et al. [2015a]) als auch auf die Konformation der Gelenkregion haben kann (Bischoff [2013]). Dagegen stehen zwei *hs*CK2 α -Strukturen in Komplex mit einem ATP-Analogon in der offenen Konformation der Gelenkregion (vgl. Niefind et al. [2007], Ferguson et al. [2011]), die in Niedrigsalz-Kristallisationsbedingungen kristallisiert wurden. Somit mehrten sich die Hinweise darauf, dass die Gelenkregion *in vivo* bei gebundenem NTP in der offenen Konformation vorliegt. Ein weiteres Indiz dafür ist, dass in der geschlossenen Konformation die Seitenkette von Phe121 in eine untypische Konformation gezwungen wird.

Allerdings ist es vorstellbar, dass die geschlossene Konformation durch die Bindung von Substraten oder Inhibitoren induziert werden kann, wodurch Substrate kosubstratabhängig phosphoryliert werden könnten.

5.5.4. Einfluss der Bindung der CK2 β -Untereinheit auf die Gelenkregion von CK2 α

Die Affinität für ATP oder GTP ist in den Gelenkregion-Varianten stark durch die Formierung des Holoenzym beeinflussbar. Erste Experimente weisen darauf hin, dass die Bindung von CK2 β an CK2 α in allen Varianten eine Verschiebung hin zu wildtypischen Verhältnissen induziert (Klein [2014], Lindenblatt [2013]). Da die Gelenkregion im

5. Diskussion

Holoenzym (mit Ausnahme von Proteinvarianten der Gelenkregion) bei Bindung eines ATP-Analogons immer in der offenen Konformation vorliegt (vgl. Niefind et al. [2001], Schnitzler et al. [2014]), ist es durchaus möglich, dass die Bindung von CK2 β einen allosterischen Effekt auf die ATP/GTP-Bindung hat und sowohl ATP als auch GTP gleichermaßen stabilisiert. Bei Tyrosinkinasen konnte bereits gezeigt werden, dass durch einen Aminosäureaustausch am r-Spine (Thr zu Ile) die Aktivität einer Kinase massiv gesteigert werden kann (Azam et al. [2008]), Ähnliches scheint durch die Interaktion von CK2 β oder ARC3140 mit CK2 α am c-Spine ebenfalls induzierbar.

Einen weiteren Hinweis auf einen allosterischen Effekt der Besetzung der CK2 α / β -Bindestelle auf die Gelenkregion wies die Konformation der Gelenkregion in der ARC3140-Struktur und der CK2^{Andante}-Holoenzymstruktur auf: Die Gelenkregion dieser Strukturen liegt in der offenen Konformation vor, allerdings sind Unterschiede zu offenen Konformationen anderer Kristallstrukturen erkennbar: Der Abstand der Helix α D zu der katalytischen Schleife ist deutlich größer als bei vergleichbaren Strukturen (vgl. Abb. 5.15). Dies gilt auch für einige, jedoch nicht alle, Gelenkregionen in Holoenzym-Kristallstrukturen. Im symmetrischen CK2^{Andante}-Holoenzym ist dies allerdings der Fall.

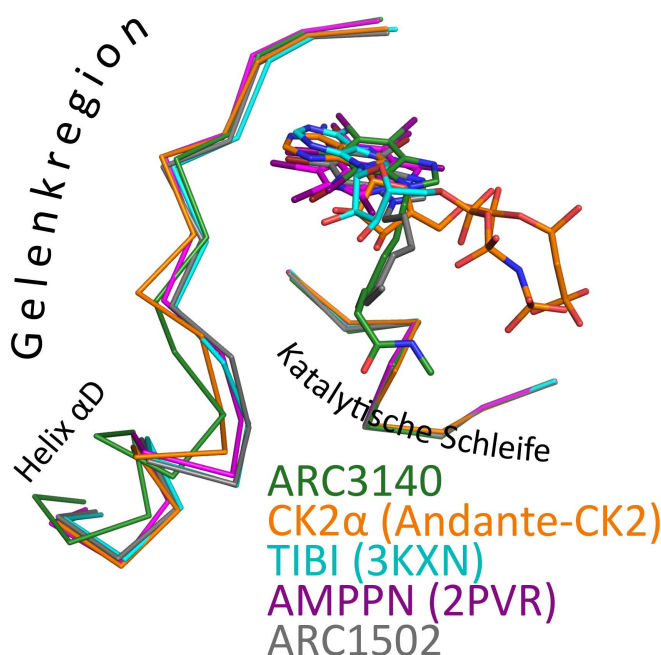


Abbildung 5.15 | Variabilität der Gelenkregion in der offenen Konformation

Der Abstand der offenen Gelenkregion von der katalytischen Schleife ist abhängig von dem Bindungspartner: Bei ARC3140 und dem CK2^{Andante}-Holoenzym ist die CK2 α /CK2 β -Interaktionsstelle durch starke hydrophobe Interaktion besetzt, in den anderen Fällen nicht. TIBI ist in Komplex mit *zm*CK2 α (Sarno et al. [2011]).

Bei anderen Interaktoren der CK2 α / β -Bindestelle ist dies hingegen nicht der Fall (vgl. Raaf et al. [2008a], Raaf et al. [2013]), möglicherweise bedingt durch eine zu geringe Hydrophobizität von DRB und Pc-Peptid, verglichen mit ARC3140 und CK2 β .

5.5.5. Einschränkungen der Röntgenstrukturanalyse

Die Kristallstrukturen der Proteinvarianten machen ein typisches Problem der Röntgenkristallographie deutlich: Bei der Kristallisation können zum einen viele Faktoren (z. B.

pH-Wert oder Salzkonzentration) einen Einfluss auf die Kristallstruktur nehmen, zum anderen können Kristallkontakte erhebliche Auswirkungen haben. Um diese Auswirkungen auszuschließen, wurden die Proteinvarianten (unter anderem) in der Raumgruppe $P4_32_12$ kristallisiert (vgl. Klopffleisch et al. [2012]).

Gerade der pH-Wert scheint bei der Kristallisation von *hsCK2 α* im Komplex mit Emodin eine Rolle zu spielen: Je niedriger der pH-Wert, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit einer geschlossenen Gelenkregion (vgl. Papinutto et al. [2012]). Des Weiteren ist eine Kristallstruktur immer eine Mittelung aus vielen einzelnen Molekülen, sodass flexible Regionen zwar durch einen hohen Temperaturfaktor identifiziert werden können, es aber nicht ohne weiteres möglich ist die Mobilität einer Region, die mehrere Konformationen adaptiert, wiederzugeben. Daraus ergibt sich, dass die Konformationen der Gelenkregion der vier Proteinvarianten eher als Tendenz zu verstehen sind. Eine geschlossene Gelenkregion im Kristall kann in Lösung durchaus zum großen Teil in der offenen Konformation vorliegen. Dies spiegeln auch die Aktivitätsmessungen wider.

5.6. CK2-Inhibition durch Heparin

5.6.1. Interaktion mit polyanionischen Molekülen

Wie bereits beschrieben ist CK2 eine ePK mit einer acidophilen Substratspezifität (vgl. Abschnitt 1.4.3). Heparin (ähnlich wie viele andere polyanionische Zuckermoleküle) ist ein Inhibitor von CK2 α . Auch DNA als negativ geladenes Polymer ist in der Lage mit CK2 zu interagieren und das Enzym zu inhibieren. Nachdem man zunächst von einer spezifischen Interaktion mit der 3'UTR des CK2 β -Gens ausgegangen war (Robitzki et al. [1993]), konnte später gezeigt werden, dass es sich um eine unspezifische Interaktion handelt, wobei die Inhibition durch DNA in dem Maße reduziert wird wie sich das CK2-Holoenzym formiert (Gatica et al. [1995]). Allerdings wird davon ausgegangen, dass CK2 trotz dieser Interaktion *in vivo* keine Transkriptionsfaktor-Funktion einnimmt (Ackermann und Pyerin [1999]).

5.6.2. Heparin und Heparansulfat

Heparin ist ein Polysaccharid, das hauptsächlich aus sich wiederholenden 1-4-glykosidisch verbundenen α -L-Iduronsäure (IdoA)- und α -D-Glucosamin(GluNS)-Disacchariden besteht (vgl. Abb. 5.16 (b)), zu geringem Umfang auch aus β -D-Glucuronsäure und α -D-Glucosamin (vgl. Abb. 5.16 (c)). Heparin ist ein stark sulfoniertes Molekül, typischerweise ist die Iduronsäure 2-O-sulfoniert und das Glucosamin sowohl 6-O- als auch 2-N-sulfoniert (Rabenstein [2002]). Sowohl durch die starke Sulfonierung, dem Aufbau aus hauptsächlich Iduronsäure und Glucosamin als auch das typische Molekulargewichtsfenster (zwischen 5000 und 25000 g/mol, Rabenstein [2002]) unterscheidet sich He-

5. Diskussion

parin von Heparansulfat. Dieses ist zum einen deutlich größer (60000-100000 g/mol, Rabenstein [2002]) und besitzt Abschnitte geringer Sulfonierung, zum anderen besteht die Grundeinheit in erster Linie aus einem 1-4-glykosidisch verbundenen Disaccharid aus β -D-Glucuronsäure und α -D-Glucosamin (Rabenstein [2002], vgl. Abb. 5.16 (a)). Dadurch ist Heparansulfat länger und deutlich flexibler. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass es keine starre Abgrenzung geben kann, da auch viele Heparansulfate mit Heparin-ähnlichen Eigenschaften bekannt sind und häufig Abschnitte hoher Sulfonierung enthalten können (vgl. Abb. 5.16 (a), NS-Domäne von Heparansulfat). Man kann Heparin somit auch als gewebespezifisches Heparansulfat betrachten (Meneghetti et al. [2015]).

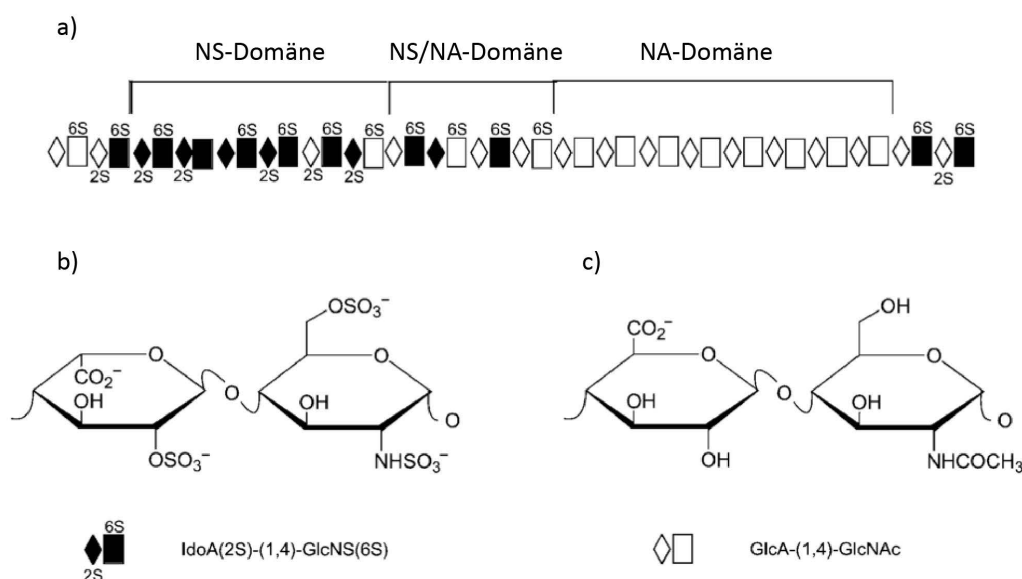


Abbildung 5.16 | Aufbau von Heparansulfat und Heparin

Aufbau von Heparansulfat und Heparin. (a) Heparansulfat besteht sowohl aus unsulfatierten Bereichen (NA-Domäne) und stark sulfatierten Bereichen (NS-Domäne). (b) Grundbausteine von Heparin bzw. der NS-Domäne. (c) Grundbausteine der NA-Domäne. Abb. reproduziert und verändert aus Rabenstein [2002] mit freundlicher Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

5.6.3. CK2 α im Komplex mit Heparin

In dieser Arbeit kann ich zeigen, dass Heparin sowohl hochspezifisch an die Substratbindestelle von CK2 α bindet als auch eine deutliche Affinität zu dem basischen Bereich, der die Aminosäuren Lys74-79 einschließt, zeigt.

In dieser Arbeit wurde CK2 α mit einem Heparin-Decasaccharid kristallisiert. Es soll angemerkt sein, dass die Sulfonierung von Heparin im Ausgangsprodukt lediglich ca. 75 % beträgt, die Produzenten gehen bei ihren Berechnungen der Molekülmasse von 2,5 Sulfogruppen pro Disaccharid aus (persönliche Mitteilung von DextraUK).

P2₁ In der P2₁-Struktur von CK2 α und Heparin ist ein Teil des Heparinmoleküls klar definiert, die vier Zucker-Einheiten konnten als eine heparintypische Abfolge aus IdoA(2S)-GlcNS(6S)-IdoA(2S)-GlcNS(6S) modelliert werden. Auf diese vier Zucker-Einheiten verteilen sich sechs Sulfogruppen. Durch die Lösung dieser Struktur mittels der SAD-Technik war es möglich, neben allen Schwefelatomen der Methionine und Cysteine von CK2 α (ausgenommen Met1, bekannt aus Raaf [2009]) insgesamt vier Schwefelatome des Heparinmoleküls durch anomale Daten exakt zu positionieren.

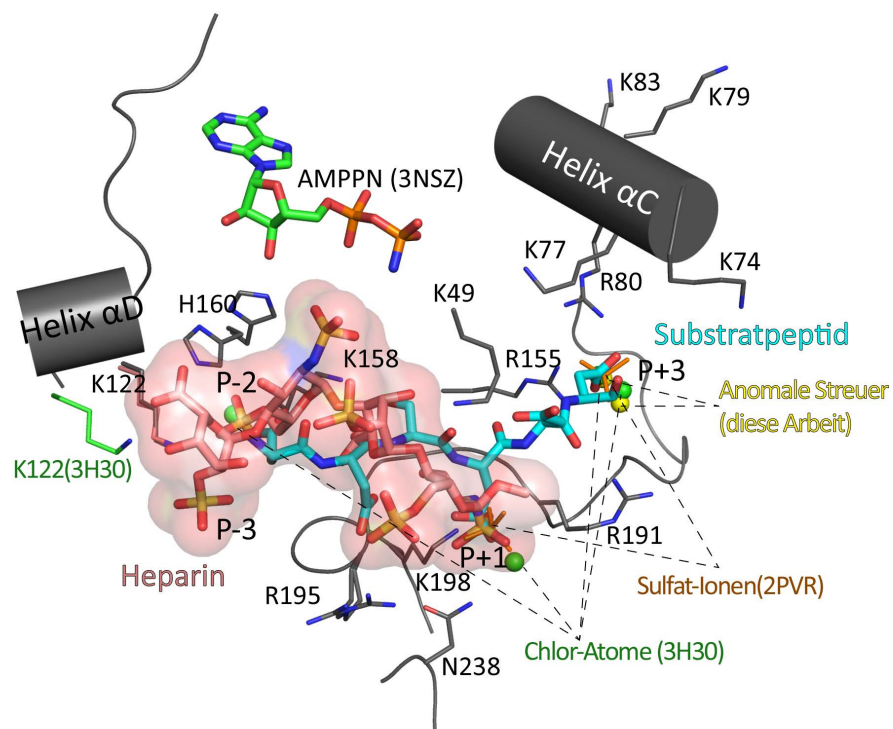


Abbildung 5.17 | Bindung von Heparin an der Substratbindestelle

Heparin bindet im Bereich von P-3 und P+1 der Substratbindestelle. Dabei werden P-2 und P+1 an den gleichen Positionen besetzt wie durch die Chlor-Atome (PDB-ID: 3H30) und (an P+1) auch durch ein Sulfat-Ion (PDB-ID: 2PVR). An der Position P+3 des modellierten Substratpeptids (vgl. Niefind et al. [2007]) binden auch in der P2₁-Heparinstruktur zwei anomale Streuer.

In dieser Kristallstruktur liegt die Gelenkregion in der geschlossenen Konformation vor, sodass Lys122 an der Bindung sowohl der Sulfogruppe an der P-3-Position als auch an der P-2-Position beteiligt ist. Diese Sulfogruppe in der P-2-Position wird des Weiteren ebenfalls von His160 stabilisiert. Lys158 spielt keine Rolle in der Bindung an einer Sulfogruppe, allerdings bildet sie eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Sauerstoffatom des Zucker-Rings der linken GluNS-Gruppe und zu der Carboxygruppe der rechten IdoA-Gruppe aus.

An der Bindung der Sulfogruppe an der P+1-Position sind die typischen Residuen be-

5. Diskussion

teilt, sowohl Lys198 als auch Arg195. Des Weiteren wird diese Sulfogruppe von einer Wasserstoffbrücke von Asn238 gebunden. Zwar reicht das in der Struktur sichtbare Heparinmolekül nicht hin bis zu der P+3-Bindestelle, allerdings sind auch dort, ähnlich wie bereits in anderen Strukturen (Raaf et al. [2008a], Niefind et al. [2007]), anomale Streuer identifizierbar. Es gilt zu beachten, dass eine weitere Bindung von Heparin an der P+3-Position durch die Kristallpackung nicht möglich ist, es würde mit dem symmetrieäquivalenten Heparinmolekül kollidieren.

P4₃2₁2 Die Bindung des Heparins in der Raumgruppe P4₃2₁2 ist nicht so spezifisch durch Elektronendichte definiert wie bei dem Heparin-Molekül in der P2₁-Raumgruppe. Es wurden allerdings insgesamt sieben Zuckergruppen in die Elektronendichte modelliert (vgl. Abb. 4.23). Die Lage des Heparinmoleküls wird maßgeblich von den beiden in der asymmetrischen Einheit vorliegenden CK2 α -Molekülen beeinflusst, beide Proteinketten binden mit der gleichen positiv geladenen Region an Heparin (vgl. Abb. 5.18 (a)). Da keine distinkten Bindungen zwischen Protein und Heparin definierbar sind, ist eine Bewertung der beteiligten Residuen von CK2 α komplex: Sowohl Proteinkette A als auch Proteinkette B binden von beiden Seiten an dem Heparinmolekül. Dabei liegt das Lysincluster 74-79 der Kette A gegenüber der Region um Arg107, Lys102 und Trp33 der Kette B (und vice versa, vgl. Abb. 5.18 (b)), der Abstand zu der Heparin-Elektronendichte ist in beiden Fällen relativ konstant. Dies hat zur Folge, dass die Verifizierung der tatsächlichen Binderegion schwierig ist.

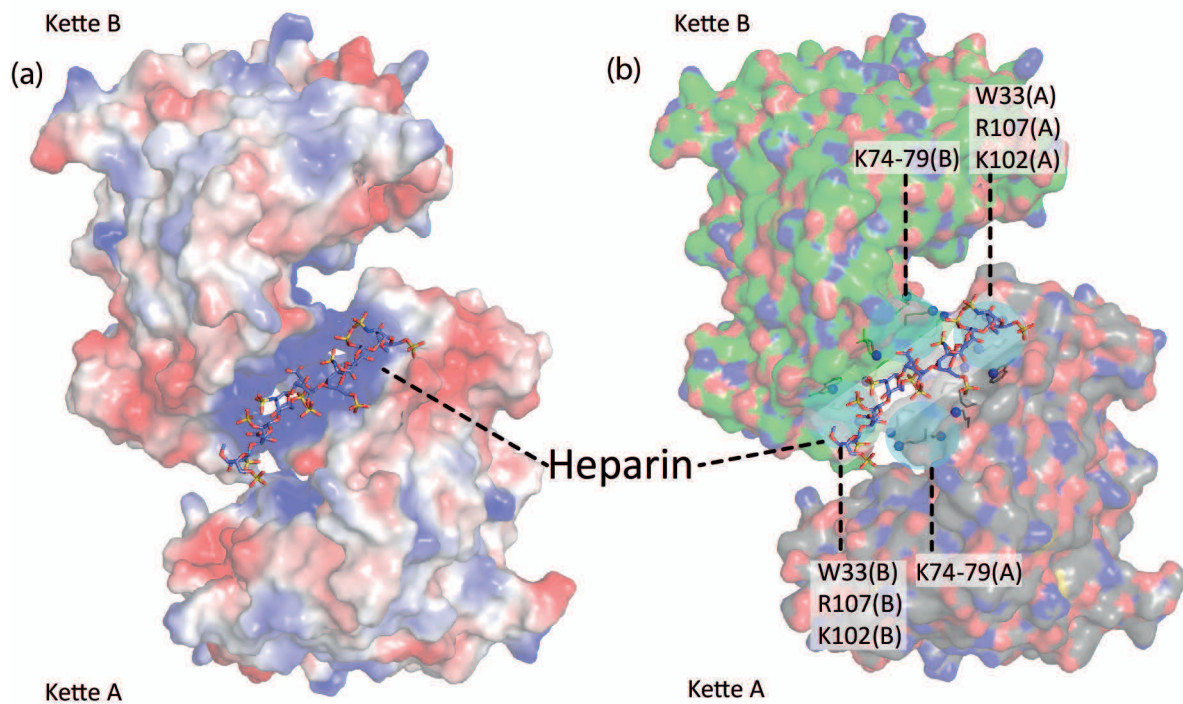


Abbildung 5.18 | Bindung von Heparin an CK2

(a) Heparin bindet sowohl an Kette A als auch Kette B in der Kristallstruktur von Hepa-1 und Hepa-2 an den gleichen positiv geladenen Regionen. Abbildung erstellt mit Pymol, Einfärbung nach qualitativem elektrostatischem Potenzial. (b) Die an der Bindung beteiligten Regionen der beiden Proteinketten liegen sich gegenüber.

Allerdings ist dieser Bindungsmodus nicht unbekannt für Heparin: Eine unspezifische elektrostatische Interaktion zwischen negativ geladenem Heparin und positiv geladenem Protein konnte anhand von kinetischen Daten bereits für Thrombin gezeigt werden (Olson et al. [1991]). Eine Kristallstruktur von Thrombin komplexiert mit Heparin (Carter et al. [2005], PDB-ID: 1XMN) bestätigte auch dort in ähnlicher Weise wie in den $P4_32_12$ -Strukturen diese unspezifische Bindung: Es ist deutlich Elektronendichte entlang der putativen Bindestelle von Heparin bei Thrombin zu erkennen, eine exakte Modellierung eines Heparinmoleküls mit den Positionen der Sulfogruppen ist allerdings nicht ohne Weiteres möglich.

Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die Zusammensetzung der Kristallisationslösung ausschlaggebend für den Kokristallisationserfolg war: Bei einer zu hohen Salzkonzentration war es schwierig, an CK2 α gebundenes Heparin zu erkennen. Auch die Dauer von Kristallisation und Soaking in der Vitrifikationslösung hatten direkten Einfluss auf die Bindung von Heparin an der C-terminalen Domäne. Offenbar konkurrierte das durch elektrostatische Interaktionen stabilisierte Heparin mit Ionen aus der Kristallisationslösung.

5. Diskussion

Inhibition von CK2 durch Heparin Dass in den beiden verschiedenen Raumgruppen jeweils nur eine der beiden Bindestellen mit Heparin besetzt ist, ist der Kristallisation geschuldet: Durch Kristallkontakte ist in der P₂₁-Kristallstruktur eine Bindung von Heparin an die Helix α C nicht möglich, ebenso ist eine Bindung an der Substratbindeschleife und an der P+1-Schleife in der P₄₃₂₁₂-Struktur nicht möglich. Diese Separierung der beiden Bindungsstellen ermöglicht einen neuen Blick auf CK2 α :

Heparin bindet an der ATP-Bindetasche spezifisch, die Interaktion sowohl der Sulfo-
gruppen als auch der Carboxygruppe der Iduronsäure sind ausgeprägt. Die Interaktion an der Helix α C hingegen ist, ähnlich der Bindung von Heparin an Thrombin (Olson et al. [1991], Carter et al. [2005]), wahrscheinlich in erster Linie durch unspezifische elektrostatische Interaktionen charakterisiert.

Bereits 1980 konnten Hathaway et al. zeigen, dass die Inhibition durch langkettiges Heparin kompetitiv zum Substrat β -Casein ist. Durch die Verwendung verschieden langer Heparin-Fragmente und Peptid- und Proteinsubstrate konnten O'Farrell et al. [1999] zeigen, dass die Phosphorylierung eines peptidischen Substrats (RRRADDSDDDDD) nicht ausschließlich kompetitiv durch Heparin inhibiert wird, sondern dass ein produktiver CK2-Substrat-Heparin-Komplex existieren kann. Vor dem Hintergrund, dass das verwendete Substratpeptid lediglich fünf negative Ladungen hinter dem zu phosphorylierenden Serin trägt, ist es durchaus vorstellbar, dass die Bindung von Heparin an der C-terminalen Domäne von CK2 α auch dann möglich ist, wenn dieses Substratpeptid gebunden hat. Vaglio et al. zeigten 1996 durch Mutagenese-Studien, dass die Inhibition von CK2 α durch Heparin und andere polyanionische Moleküle sowohl durch das Entfernen der positiven Ladung von Lys74-77 (K74-77A-Variante) als auch dem Austausch von Arg191, Arg195 und Lys198 (R191R195K198A-Variante) zu einer Abschwächung (R191R195K198A: 100 \times insensitiver) bzw. Aufhebung (K74-77: Aktivierung) der Inhibition führt. Allerdings weisen die Autoren auch auf die Schwäche ihrer Experimente hin: Die Inhibition ist stark abhängig von der Sequenz des Substratpeptids. Außerdem wurde ein sehr langes Heparin-Molekül (MW: 14000, ca. 40-Saccharid) verwendet, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit eine große Interaktionsfläche zur Stabilisierung der Position und damit zur Inhibition benötigt. Des Weiteren muss beachtet werden, dass all diese genannten Experimente mit CK2-Holoenzym und nicht, wie in den vorgestellten Kristallstrukturen, mit CK2 α durchgeführt wurden. Es ist allerdings bekannt, dass das Holoenzym deutlich weniger anfällig für Heparin-Inhibition ist als CK2 α (Sarno et al. [1997b]).

Modell: Heparin inaktiviert CK2 α Die beiden unabhängig voneinander beobachteten Bindeereignisse von Heparin ergänzen sich mit bereits durchgeführten kinetischen Messungen an CK2 mit Heparin: 1999 konnten O'Farrell et al. zeigen, dass die Stärke der

Inhibition von CK2 durch Heparin längenabhängig ist. Allerdings ist diese Längenabhängigkeit nicht linear, kürzere Heparin-Fragmente inhibieren deutlich schlechter als lange Fragmente (starke Inhibition ca. ab Dodecasaccharid, vgl. O'Farrell et al. [1999]). Daraus wurde bereits früh vermutet, dass die Bindung von Heparin an CK2 komplexer ist als eine einfache unspezifische elektrostatische Interaktion. Das von mir postulierte Modell der Inhibition von CK2 α durch Heparin sieht vor, dass es zwei unabhängige Bindestellen für Heparin gibt (vgl. Abb. 5.19):

Die Substratbindestelle von P-3 bis P+1 (oder eventuell P+3, da Kristallkontakte eine Bindung von Heparin an dieser Position verhindern), bei der Heparin durch Wasserstoffbrücken in einer definierten Position stabilisiert wird und eine zweite N-terminale Bindestelle, an der Heparin hauptsächlich über eine nichtspezifische elektrostatische Interaktion stabilisiert wird. Ab einer Länge von zwölf Zuckerresiduen (vgl. O'Farrell et al. [1999]) kann das Heparin-Molekül lang genug sein, um an beide Bindestellen zu binden.

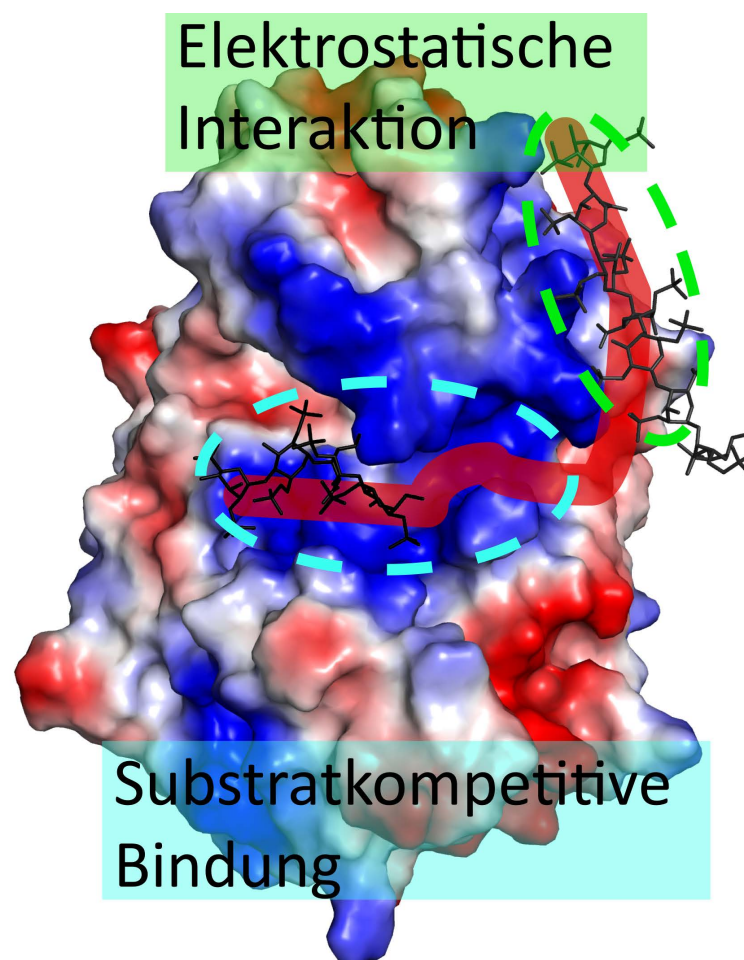


Abbildung 5.19 | Modell der Heparinbindung

Ein Heparin-Molekül kann zwei unabhängige Bindungen mit CK2 α eingehen, eine substratkompetitive Bindung im Bereich P-3 bis P+3 (ca. 7 Zuckerreste, cyanfarbener Bereich) und eine elektrostatische Interaktion entlang der N-terminalen Domäne (grüner Bereich).

Bedeutung von Heparin für CK2 in der Zelle Heparin wird in erster Linie in Mastzellen gelagert und ist dort essentiell für die Einlagerung von spezifischen Mastzell-Proteasen (Rabenstein [2002]). Des Weiteren spielt es als Gegenion zu Histamin in den sekretorischen Granula von Mastzellen eine wichtige Rolle: Ohne Heparin sind hohe Histaminkonzentrationen von 0,4 M in Mastzellen nicht möglich (Rabenstein [2002]). Die Rolle von Heparin in der Medizin als Antikoagulant ist indes ein nicht-natürlicher Verwendungszweck, normalerweise übernehmen Heparansulfate diese Rolle.

Für die Inhibition von CK2 durch polyanionische Zuckeroligomere bedeutet dies, dass CK2 lediglich in den Mastzellen selbst oder bei der Ausschüttung der sekretorischen Granula von Heparin inaktiviert werden kann. Da Heparansulfat jedoch ebenfalls in der Lage ist CK2 zu inhibieren (Hathaway et al. [1980]), ist es durchaus möglich, dass Heparansulfate eine zentrale Rolle bei der CK2-Inhibition *in vivo* spielen. Da Heparansulfat allerdings im Golgi-Apparat produziert und durch Exozytose an der Zellmembran positioniert wird (Kreuger und Kjellén [2012]) ist es unwahrscheinlich, dass die Inhibition von CK2 intrazellulär (außer im Golgi-Apparat) eine große Rolle spielt.

Des Weiteren ist zu beachten, dass Heparansulfate eine sehr heterogene Molekülfamilie in Bezug auf Länge, Sulfonierung und Zuckerbausteine darstellen, sodass man von einem Heparanom sprechen kann (Turnbull et al. [2001]). Dies spiegelt ebenfalls das Interaktom von Heparansulfaten wider: Bei der Untersuchung 22 bekannter interagierender Proteine (HSBPs, Heparansulfate Binding Proteins), exklusive CK2, konnten große Unterschiede in Bindungsmodus, Interaktionsfläche, Heparansulfat-Länge und Affinität dargestellt werden (Xu und Esko [2014]).

Inhibition von CK2 - klinische Relevanz? Es scheint möglich, dass die Gabe von Heparin bei Krankenhausaufenthalt zur Vermeidung von Thrombosen ebenfalls durch die Inhibition von CK2 Folgen haben kann: Bei Cisplatin-resistenten Tumoren konnte eine positive Wirkung durch Heparin-gabe beobachtet werden, sie wurde allerdings nicht in Verbindung zu CK2 gesetzt (Pfankuchen et al. [2015]). Es bleibt zu klären, ob die Inhibition von CK2 ursächlich ist, da auch viele andere Proteine mit Heparin interagieren.

5.7. Fazit und Ausblick

5.7.1. Die ATP-Bindetasche

Die Aufklärung des Bindungsmodus der ATP-kompetitiven Inhibitoren E9 und der Töberichfurane zeigt neue Möglichkeiten der selektiven CK2 α -Inhibition auf. Gerade die Kristallisation der unterschiedlichen Töberichfurane macht deutlich, dass bereits kleine strukturelle Unterschiede im Inhibitor zu unterschiedlichen Bindungsmodi führen können und wie wichtig die Kokristallisation von Inhibitoren für das Verständnis und die Optimierung solcher Moleküle ist.

E9 stellt den ersten Inhibitor von CK2 α dar, der massiv eine hydrophobe Region der ATP-Bindetasche adressiert und könnte eine Leitstruktur für hochselektive duale CK2-PIM-Inhibitoren darstellen.

Die Besetzung der ATP-Bindetasche von CK2 α durch ARC3140 zeigt ebenfalls die Bedeutung dieser Methode auf: Die Orientierung von ARC3140 konnte zweifelsfrei geklärt werden.

Sowohl die Strukturen im Komplex mit den Töberichfuranen als auch mit den Bisubstratinhibitoren machen eindrucksvoll deutlich, dass gerade die gezielte Halogenierung von Inhibitoren zu effizienten und selektiven ATP-kompetitiven Inhibitoren führen kann.

5.7.2. CK2 α/β -Interaktionen

ARC3140 In der Kristallstruktur von CK2 α im Komplex mit ARC3140 konnte eine zweite, in Lösung relevante, Bindungsstelle von ARC3140 an CK2 α identifiziert werden. ARC3140 bindet neben der ATP-Bindetasche ebenfalls an die CK2 α/β -Bindestelle. Diese Interaktion konnte weiter charakterisiert werden. Um einen bimodalen Inhibitor zu entwickeln, ist jedoch eine weitere Charakterisierung dieser Bindung notwendig: Kann dieser Inhibitor ebenfalls die Interaktion zwischen CK2 α und CK2 β *in vitro* stören? Wie kann man diesen Inhibitor verändern, um die Interaktion zu stabilisieren und zu verstärken ohne die ATP-kompetitive Inhibition einzubüßen?

CK2^{Andante} In der Kristallstruktur des CK2^{Andante}-Holoenzym hatte der Austausch von Met166 zu Isoleucin keinerlei Einfluss auf den Bindungsmodus der CK2 β -Untereinheit an CK2 α , ermöglichte allerdings einen Einblick in die regulatorischen Mechanismen durch sekundäre CK2 α/β -Interaktionen. Das symmetrische Holoenzym von CK2^{Andante} gibt dabei erste strukturelle Hinweise auf die Formierung eines linearen Holoenzym-Oligomers, wie es bereits zuvor *in vitro* gefunden (Valero et al. [1995]) und als Modell postuliert (Poole et al. [2005]) wurde.

Die Oligomerisation erweitert die komplexe Regulation von CK2 (vgl. Abschnitt 1.4.5) um eine weitere Ebene. Da es bereits ausreichende Indizien für eine Oligomerisation *in vitro* gibt, ist es an der Zeit dieser Oligomerisation durch den Nachweis *in vivo* auch

eine physiologische Relevanz zu geben, der Nachweis einer CK2-Oligomerisation in der Zelle steht bisher noch aus. Erste spezifische Methoden befinden sich derweil in der Anwendung (Hübner et al. [2014]).

5.7.3. Die Gelenkregion – Einfluss auf die ATP/GTP-Bindung

Die Gelenkregion konnte anhand von Proteinvarianten charakterisiert werden, wobei die Gelenkregion der Proteinvariante F121A als einzige Kristallstruktur in der offenen Konformation vorlag. Die kinetischen Messungen (vgl. Lindenblatt [2013], Klein [2014]) zeigten auf, dass alle Varianten der Helix α D ATP gegenüber GTP bevorzugen, auch F121A.

Wie wichtig ist die Konformation der Gelenkregion? Alle bisherigen Daten weisen darauf hin, dass Moleküle, die Wasserstoffbrücken zu der Gelenkregion ausbilden, eine offene Konformation der Gelenkregion induzieren, ohne dass geklärt ist, wie diese Vorgänge zusammenhängen (vgl. Klopffleisch et al. [2012]). Die abschließende Bewertung der Bedeutung der Gelenkregion für die Bindung von ATP, GTP und natürlich auch Inhibitoren bleibt schwierig. Die Eigenschaft eine offene oder geschlossene Konformation einzunehmen wurde bisher ausschließlich in Kristallstrukturen von *hsCK2 α* beobachtet. Durch die Proteinvarianten konnte bestätigt werden, dass die Residuen Phe121 und Tyr125 definitiv einen Einfluss sowohl auf die Konformation der Gelenkregion als auch auf die ATP/GTP-Präferenz haben. Die ATP-Präferenz der Proteinvarianten kann allerdings nicht mit der geschlossenen Gelenkregion in Verbindung gebracht werden, da F121A bei offener Gelenkregion ebenfalls ATP stärker bindet. Da Heparin eine geschlossene Konformation induziert, weil Lys122 an der Bindung beteiligt ist (vgl. Abschnitt 4.25) liegt es nahe, dass die Konformation der Gelenkregion durch Bindungspartner (Substrate oder Inhibitoren) beeinflusst wird. Eine Kristallisation von *zmCK2 α* mit Heparin könnte Aufschluss darüber geben, ob auch dort die geschlossene Konformation induziert werden kann. Außerdem könnten Kinetiken mit verschiedenen Substratpeptiden und ATP oder GTP als Kosubstrat einen Einblick darüber geben, ob es eine Interdependenz zwischen Substratsequenz und Kosubstratnutzung gibt.

5.7.4. Substratkompetitive Bindung

Durch die Kokristallisation von CK2 α mit dem substratkompetitiven Inhibitor Heparin wurde ein erster struktureller Einblick in die Substratbindung gewonnen. Heparin bindet dabei sowohl an die direkte Substratbindestelle im P-3 bis P+1-Bereich als auch in einem zweiten Bereich, der Helix α C. Diese Bindung wird dabei durch elektrostatische Interaktion stabilisiert, ohne dass in der Kristallstruktur konkrete Wasserstoffbrücken identifiziert werden konnten. Die Kristallstruktur von CK2 α im Komplex mit Heparin in der Raumgruppe P2₁ ist die erste Struktur, bei der ein Molekül an die CK2 α -Substratbindestelle

gebunden hat. Zielführend für die erfolgreiche Kokristallisation war zum einen, dass die Salzkonzentration in der Kristallisationslösung so weit wie möglich gesenkt wurde und zum anderen, dass besonders Ionen, von denen eine Interaktion mit CK2 α bekannt ist (vgl. Niefind et al. [2007]), nach Möglichkeit vermieden wurden.

Diese Vorgehensweise kann wegweisend für die Kristallisation von CK2 mit einem Substratpeptid sein, um zu dem lange erwarteten ternären Komplex aus CK2 α , Kosubstrat und Substratpeptid zu gelangen.

<i>hsPIM3</i> (Q86V86)	-----	0
<i>hsPIM1</i> (P11309)	MPHEPHEPLTPPFSA L PDPAGAPSR R QSRQRPQLSSDSPSAFRASRSHSRNATRSHSHSH	60
<i>hsPIM3</i> (Q86V86)	-----MLLSKFGSLAHL CGPGVDHLPVKILQPA	29
<i>hsPIM1</i> (P11309)	SPRHSLRHSPGSGSCGSSSGHRPCADILEVGM LLSKINS LAHLRAAPCN DLH-ATKLAP- *****: ***** . * .. * *	118
<i>hsPIM3</i> (Q86V86)	KADKESFEKAYQVGAVL GSGGFGTVYAGSRIADGLPVAVKHVVKERVTEWGS LG-GATVP	88
<i>hsPIM1</i> (P11309)	GKEKEPLESQYQVG PLLGSGGFGSVYSGIRVSDNLPVAIKHVEKDRI SDWGELPN GTRVP :** :*. **** :*****:**:* **:* *****:*** *:***:*. * * : **	178
<i>hsPIM3</i> (Q86V86)	LEVVL LRK VGAAGGARGVIRLLDWFERP DGFLLVLERPEPAQDLDFD FITERGALDEPLAR	148
<i>hsPIM1</i> (P11309)	MEVVL LK KVS--SGFSGVIRLLDWFERPDSFVLILERPEPVQDLDFD FITERGALQEELAR :*****:**. . * *****:*****.*:*:*****.*****:*****.* **	236
<i>hsPIM3</i> (Q86V86)	RFFAQVLA AVRHC HSCGVVHRDIK DENLLVDLRSGELKLIDFGSGALLKDTVYTFDFGTR	208
<i>hsPIM1</i> (P11309)	SFFWQVLEAVRHCHNCGLHRDIK DENILIDLNRGELKLIDFGSGALLKDTVYTFDFGTR ** *** *****.**:*****:**:* . *****:*****:*****	296
<i>hsPIM3</i> (Q86V86)	VYSPPEWIRYHRYHGRSATVWVSLGVLLYDMVCGDIPFEQDEEILRGRLFRRRVSEPCQQ	268
<i>hsPIM1</i> (P11309)	VYSPPEWIRYHRYHGRSAAVWVSLGILLYDMVCGDIPFEHDEEIRGQVFRQRVSSECQH *****:*****.**:*****:*****.**:***:**:***:*** **	356
<i>hsPIM3</i> (Q86V86)	LIRWCLSLRPSERPSLDQIAAHPWMLGADGGVPESCDLRLCTLD PDDVASTTSSSESL	326
<i>hsPIM1</i> (P11309)	LIRWCLALRPSDRPTFEEIQNH P W M Q D V L L P - Q E T A E I H L H S L S P G P S K ----- *****:*****:**:***.* * * . * :***:*** :*. *	404

Abbildung A.3 | Alignment von PIM-Kinasen

PIM1 und PIM3 zeigen eine hohe Sequenzähnlichkeit. Rot umrandet sind die für die Konformation der Gelenkregion herausragenden Reste. In Klammern hinter der Bezeichnung ist die Uniprot-ID aufgeführt.

A.2. PIM3-Modell

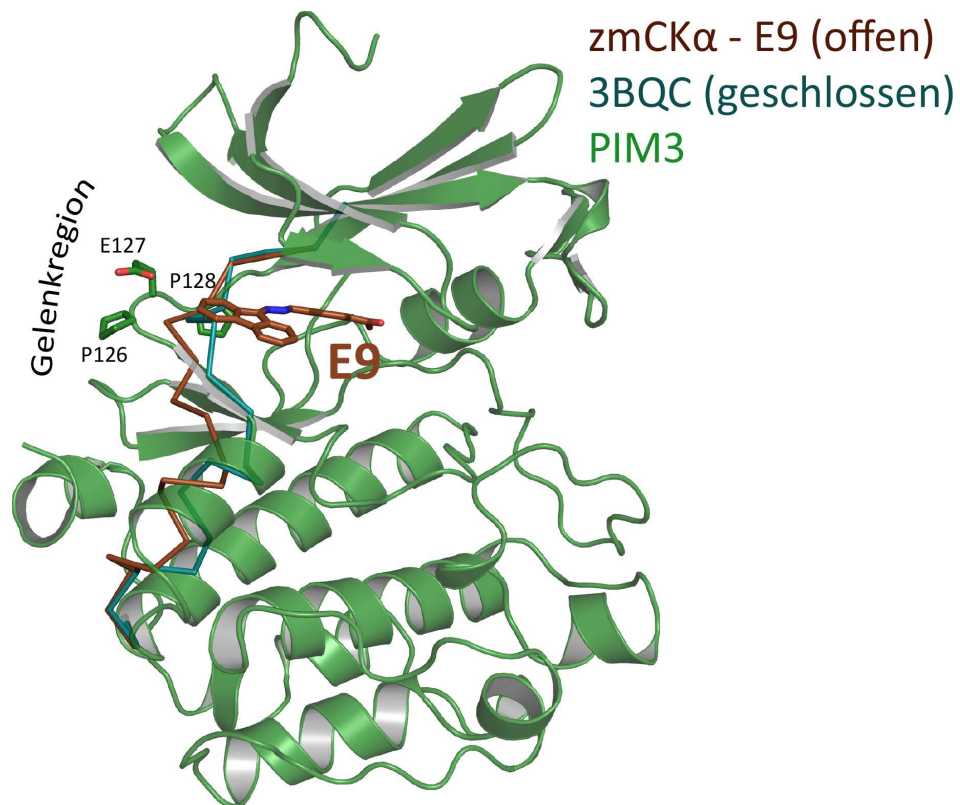


Abbildung A.4 | Modell von PIM3

Das Strukturmodell von PIM3 wurde mit Hilfe von SWISS-MODEL (Guex et al. [2009]) und PIM1 als Matrize (PDB-ID: 1XWS, Bullock et al. [2005]) erstellt. E9 kann durch die Proline in der Gelenkregion P126 und P128 ähnlich binden wie bei *zmCK2 α* (braun) während die Bindung von E9 an CK2 α mit der geschlossenen Gelenkregion (3BQC, cyan) sterisch nicht möglich ist. Die Position von E9 ist aus der E9-*zmCK2 α* -Struktur aus dieser Arbeit entnommen.

A.3. Tabellen

Tabelle A.1 | Statistiken der TF-Kristalldaten

Datensammlungsstatistiken für *hsCK2 α* -TF bei Wellenlängen von 1 Å und 2 Å. Eingeklammerte Werte entsprechen der höchsten Auflösungsschale. Ramachandran-Statistiken wurden mit Procheck ermittelt (Laskowski et al. [1993]).

Diffractionsdaten		
	CK2α-TF 1 Å	CK2α-TF 2 Å
Röntgenquelle	PX-III, SLS	PX-III, SLS
Wellenlänge (Å)	1.0	2.0
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁
a,b,c (Å)	57.435, 45.707, 63.19	57.43, 45.38, 63.33
α, β, γ (°)	90, 110.94, 90	90, 110.863, 90
Auflösung (Å)	36.14 - 1.79 (1.853 - 1.79)	36.01 - 2.9 (3 - 2.9)
R_{merge}	0.054 (0.512)	0.033 (0.061)
R_{meas}	0.0632 (0.615)	0.036 (0.0665)
CC_{1/2}	0.998 (0.821)	0.999 (0.998)
I/σ(I)	12.86 (1.74)	43.5 (26.8)
Einzigartige Reflexe	27738 (2266)	6609 (610)
Vollständigkeit (%)	95.21 (78.35)	95.3 (88.2)
Multiplizität	3.5 (3.1)	6.5 (6.8)
B-Faktor (Wilson-Plot, Å²)	26.69	29.55
Verfeinerung		
Anzahl Reflexe in Work / Test-Set	26341 / 1389	
R_{work} / R_{free}	16.33 / 21.25	
Anzahl Atome / B-Faktoren (Å²)		
Protein	2801 / 34.40	
Liganden	30 / 41.20	
Wasser	177 / 38.90	
RMS-Abweichungen		
Bindungslängen (Å)	0.005	
Bindungswinkel (°)	0.91	
Ramachandran-Plot (%) / Anzahl Residuen		
favorisierte Regionen	90.6 / 270	
zusätzlich erlaubte Regionen	8.7 / 26	
generell erlaubte Regionen	0.3 / 1	
verbotene Regionen	0.3 / 1	
Residuen/Proteinmoleküle	328 / 1	

A. Appendix

Tabelle A.2 | Statistiken der TF85- und TF107-Kristalldaten

Datensammlungsstatistiken für *hsCK2α*-TF85 und *hsCK2α*-TF107. Von *hsCK2α*-TF85 wurden ebenfalls Daten bei einer Wellenlänge von 2 Å gesammelt. Eingeklammerte Werte entsprechen der höchsten Auflösungsschale. Ramachandranstatistiken wurden mit Procheck ermittelt (Laskowski et al. [1993]).

Diffraktionsdaten			
	CK2α- TF85 1A	CK2α- TF85 2A	CK2α-TF107
Röntgenquelle	PX-III, SLS	PX-III, SLS	PX-III, SLS
Wellenlänge (Å)	1.0	2.0	1.0
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
a,b,c (Å)	57.477, 45.505, 63.489	57.67, 45.50, 63.32	57.876, 45.67, 63.753
α, β, γ (°)	90, 110.97, 90	90, 110.806, 90	90, 111.14, 90
Auflösung (Å)	34.17 - 1.84 (1.906 - 1.84)	36.1 - 2.993 (3.1 - 2.993)	36.22 - 1.643 (1.702 - 1.643)
R_{merge}	0.055 (0.709)	0.092 (0.286)	0.035 (0.615)
R_{meas}	0.034 (0.85)	0.1 (0.312)	0.041 (0.745)
CC_{1/2}	0.999 (0.704)	0.996 (0.958)	0.999 (0.738)
I/σ(I)	14.02 (1.53)	16 (5.2)	18.7 (1.7)
Einzigartige Reflexe	25781 (2367)	6058 (525)	37643 (3505)
Vollständigkeit (%)	95.93 (88.29)	94.4 (84.2)	98.9 (93.4)
Multiplizität	3.5 (3.2)	6.5 (6.1)	3.3 (3.0)
B-Faktor (Wilson-Plot, Å²)	29.47	48.50	24.82
Verfeinerung			
Anzahl Reflexe in Work / Test-Set	24458 / 1317		35807 / 1825
R_{work} / R_{free}	18.92 / 21.86		16.66 / 19.55
Anzahl Atome / B-Faktoren (Å²)			
Protein	2830 / 25.60		2782 / 32.50
Liganden	31 / 62.60		31 / 44.80
Wasser	171 / 55.20		198 / 38.30
RMS-Abweichungen			
Bindungslängen (Å)	0.005		0.005
Bindungswinkel (°)	0.89		0.85
Ramachandran-Plot (%) / Anzahl Residuen			
favorisierte Regionen	89.3 / 266		91.3 / 273
zusätzlich erlaubte Regionen	10.1 / 26		8 / 24
generell erlaubte Regionen	0.3 / 1		0.3 / 1
verbotene Regionen	0.3 / 1		0.3 / 1
Residuen/Proteinmoleküle	328 / 1		329 / 1

Tabelle A.3 | Statistiken der E9-Kristalldaten

Datensammlungsstatistiken für *hsCK2 α -E9* und *zmCK2 α -E9*. Eingeklammerte Werte entsprechen der höchsten Auflösungsschale. Ramachandranstatistiken wurden mit Procheck ermittelt (Laskowski et al. [1993]).

Diffraktionsdaten		
	hsCK2α-E9	zmCK2α-E9
Röntgenquelle	PX-III, SLS	PX-III, SLS
Wellenlänge (Å)	1.0	1.0
Raumgruppe	P2 ₁	C2
a,b,c (Å)	58.49, 45.45, 64.01	142.748, 59.683, 44.884
α, β, γ (°)	90, 111.39, 90	90, 102.96, 90
Auflösung (Å)	36.14 - 1.85 (1.916 - 1.85)	43.74 - 1.24 (1.284 - 1.24)
R_{merge}	0.0707 (0.7793)	0.01738 (0.5602)
R_{meas}	0.079 (0.806)	0.02 (0.614)
CC_{1/2}	0.999 (0.722)	1 (0.863)
I/σ(I)	15.94 (2.07)	27.03 (2.01)
Einzigartige Reflexe	26410 (2584)	103023 (9872)
Vollständigkeit (%)	97.84 (96.82)	99.09 (95.18)
Multiplizität	5.1 (5.4)	3.2 (2.8)
B-Faktor (Wilson-Plot, Å²)	25.03	16.08
Verfeinerung		
Reflexe in Work / Test-Set	25064 / 1345	97806 / 5140
R_{work} / R_{free}	16.97 / 21.33	14.33 / 17.53
Anzahl Atome / B-Faktoren (Å²)		
Protein	2833 / 31.50	2853 / 26.80
Liganden	31 / 43.2	55 / 34.9
Wasser	216 / 34.5	328 / 37.3
RMS-Abweichungen		
Bindungslängen (Å)	0.004	0.014
Bindungswinkel (°)	0.79	1.47
Ramachandran-Plot (%) / Anzahl Residuen		
favorisierte Regionen	90.3 / 270	90.9 / 269
zusätzlich erlaubte Regionen	9.4 / 28	8.8 / 26
generell erlaubte Regionen	0	0
verbotene Regionen	0.3 / 1	0.3 / 1
Residuen/Proteinmoleküle	329 / 1	327 / 1

A. Appendix

Tabelle A.4 | Statistiken der ARC3140- und ARC1502-Kristalldaten

Datensammlungsstatistiken für CK2 α -ARC3140 und CK2 α -ARC1502. Eingeklammerte Werte entsprechen der höchsten Auflösungsschale. Ramachandranstatistiken wurden mit Procheck ermittelt (Laskowski et al. [1993]).

Diffraktionsdaten		
	CK2α-ARC3140	CK2α-ARC1502
Röntgenquelle	ID29, ESRF	PX-III, SLS
Wellenlänge (Å)	1.12713	1.0
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁
a,b,c (Å)	47.504, 85.174, 90.435	58.02, 46.01, 64.15
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 110.7, 90
Auflösung (Å)	342.59 - 1.59 (1.646 - 1.59)	36.51 - 2.35 (2.434 - 2.35)
R_{merge}	0.102 (0.835)	0.095 (0.346)
R_{meas}	0.111 (0.912)	0.107 (0.403)
CC_{1/2}	0.998 (0.643)	0.995 (0.896)
I/σ(I)	11.5 (1.4)	10.3 (3.6)
Einzige Reflexe	50071 (4869)	13067 (1177)
Vollständigkeit (%)	99.7 (98.2)	97.4 (88.4)
Multiplizität	6.1 (6.1)	4.5 (3.5)
B-Faktor (Wilson-Plot, Å²)	16.69	36.76
Verfeinerung		
Reflexe in Work / Test-Set	47291 / 1965	12406 / 652
R_{work} / R_{free}	18.71 / 20.72	17.75 / 22.25
Anzahl Atome / B-Faktoren (Å²)		
Protein	2803 / 21.30	2785 / 42.50
Liganden	79 / 38.80	20 / 56.30
Wasser	263 / 32.30	72 / 37.9
RMS-Abweichungen		
Bindungslängen (Å)	0.004	0.014
Bindungswinkel (°)	0.79	1.47
Ramachandran-Plot (%) / Anzahl Residuen		
favorisierte Regionen	91.3 / 272	91.3 / 272
zusätzlich erlaubte Regionen	8.4 / 25	8.4 / 25
generell erlaubte Regionen	0	0.3 / 1
verbotene Regionen	0.3 / 1	0
Residuen/Proteinmoleküle	327 / 1	328 / 1

Tabelle A.5 | Statistiken der CK2^{Andante}-Kristalldaten

Datensammlungsstatistiken für *hsCK2^{Andante}* in den Raumgruppen C2 und P2₁. Eingeklammerte Werte entsprechen der höchsten Auflösungsschale. Ramachandranstatistiken wurden mit Procheck ermittelt (Laskowski et al. [1993]).

Diffraktionsdaten		
	CK2^{Andante}-C2	CK2^{Andante}-P2₁
Röntgenquelle	PX-III, SLS	BL14.1, BESSY
Wellenlänge (Å)	1.0	0.918410
Raumgruppe	C2	P2 ₁
a,b,c (Å)	210.537, 57.441, 139.394	140.869, 57.417, 188.228
α, β, γ (°)	90.0, 118.54, 90.0	90, 102.74, 90
Auflösung (Å)	46.24 - 3.3 (3.418 - 3.3)	46.94 - 4.092 (4.238 - 4.092)
R_{merge}	0.0502 (0.4373)	0.1228 (0.5545)
R_{meas}	0.0631 (0.559)	0.145 (0.593)
CC_{1/2}	0.999 (0.797)	0.996 (0.713)
I/σ(I)	13.85 (1.82)	8.03 (2.19)
Einzigartige Reflexe	21878 (2169)	22027 (4497)
Vollständigkeit (%)	97.24 (97.26)	97.76 (95.90)
Multiplizität	2.4 (2.3)	3.4 (3.4)
B-Faktor (Wilson-Plot, Å²)	106.73	128.81
Verfeinerung		
Reflexe in Work / Test-Set	20456/1117	
R_{work} / R_{free}	21.3 / 25.1	
Anzahl Atome / B-Faktoren (Å²)		
Protein	8876 / 130.90	
Liganden	74 / 133.00	
Wasser	20 / 79.30	
RMS-Abweichungen		
Bindungslängen (Å)	0.003	
Bindungswinkel (°)	0.632	
Ramachandran-Plot (%) / Anzahl Residuen		
favorisierte Regionen	85.2 / 805	
zusätzlich erlaubte Regionen	14.4 / 136	
generell erlaubte Regionen	1 / 0.1	
verbotene Regionen	0.3 / 1	
Residuen/Proteinmoleküle	1064 / 4	

A. Appendix

Tabelle A.6 | Statistiken der F121A- und F121M-Kristalldaten in der Raumgruppe P2₁
 Datensammlungsstatistiken für die Proteinvarianten F121A und F121M in der Raumgruppe P2₁.
 Eingeklammerte Werte entsprechen der höchsten Auflösungsschale. Ramachandranstatistiken
 wurden mit Procheck ermittelt (Laskowski et al. [1993]).

Diffractionsdaten		
	CK2α-F121A P2₁	CK2α-F121M P2₁
Röntgenquelle	PX-III, SLS	PX-III, SLS
Wellenlänge (Å)	0.977940	0.977940
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁
a,b,c (Å)	58.106, 45.427, 63.323	58.177, 45.376, 63.061
α, β, γ (°)	90, 111.11, 90	90, 111.46, 90
Auflösung (Å)	36.01 - 1.746 (1.808 - 1.746)	35.9 - 1.701 (1.762 - 1.701)
R_{merge}	0.054 (0.688)	0.052 (0.599)
R_{meas}	0.063 (0.804)	0.064 (0.726)
CC_{1/2}	0.999 (0.698)	0.999 (0.726)
I/σ(I)	14.8 (1.7)	15.1 (1.9)
Einzigartige Reflexe	31293 (2999)	32247 (3191)
Vollständigkeit (%)	99.1 (95)	95.2 (94.7)
Multiplizität	3.7 (3.6)	2.9 (2.9)
B-Faktor (Wilson-Plot, Å²)	24.38	20.88
Verfeinerung		
Anzahl Reflexe in Work / Test-Set	29694 / 1595	30579 / 1638
R_{work} / R_{free}	17.43 / 22.40	/ 20.84 / 24.19
Anzahl Atome / B-Faktoren (Å²)		
Protein	2803 / 33.20	2803 / 30.7
Liganden	26 / 43.90	26 / 33.4
Wasser	242 / 38.10	196 / 31.5
RMS-Abweichungen		
Bindungslängen (Å)	0.007	0.006
Bindungswinkel (°)	1.00	0.93
Ramachandran-Plot (%) / Anzahl Residuen		
favorisierte Regionen	89.6 / 267	89.3 / 266
zusätzlich erlaubte Regionen	10.1 / 30	10.4 / 31
generell erlaubte Regionen	0	0
verbotene Regionen	0.3 / 1	0.3 / 1
Residuen/Proteinmoleküle	328 / 1	328 / 1

Tabelle A.7 | Statistiken der Y125A- und H115Y-Kristalldaten in der Raumgruppe P2₁
 Datensammlungsstatistiken für Die Proteinvarianten Y125A und H115Y in der Raumgruppe P2₁.
 Eingeklammerte Werte entsprechen der höchsten Auflösungsschale. Ramachandranstatistiken
 wurden mit Procheck ermittelt (Laskowski et al. [1993]).

Diffractionsdaten		
	CK2α-Y125A P2₁	CK2α-H115Y P2₁
Röntgenquelle	PX-III, SLS	PX-III, SLS
Wellenlänge (Å)	0.977940	0.977940
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁
a,b,c (Å)	58.106, 45.932, 63.476	58.103, 45.474, 63.362
α, β, γ (°)	90, 111.38, 90	90, 111.19, 90
Auflösung (Å)	34.18 - 1.622 (1.68 - 1.622)	34.24 - 1.698 (1.758 - 1.698)
R_{merge}	0.04 (0.556)	0.043 (0.641)
R_{meas}	0.037 (0.652)	0.051 (0.748)
CC_{1/2}	0.999 (0.776)	0.999 (0.693)
I/σ(I)	17.3 (2.0)	16.4 (1.8)
Einzigartige Reflexe	39082 (3593)	34115 (3275)
Vollständigkeit (%)	98.4 (91.4)	99.28 (94.93)
Multiplizität	3.7 (3.5)	3.7 (3.7)
B-Faktor (Wilson-Plot, Å²)	22.77	25.26
Verfeinerung		
Anzahl Reflexe in Work / Test-Set	37134 / 1944	32387 / 1722
R_{work} / R_{free}	16.75 / 19.71	17.26 / 20.11
Anzahl Atome / B-Faktoren (Å²)		
Protein	2776 / 27.80	2811 / 34.70
Liganden	26 / 31.30	20 / 36.10
Wasser	221 / 33.70	151 / 35.00
RMS-Abweichungen		
Bindungslängen (Å)	0.008	0.007
Bindungswinkel (°)	1.15	1.02
Ramachandran-Plot (%) / Anzahl Residuen		
favorisierte Regionen	88.9 / 265	89.3 / 266
zusätzlich erlaubte Regionen	10.7 / 32	10.4 / 31
generell erlaubte Regionen	0	0
verbotene Regionen	0.3 / 1	0.3 / 1
Residuen/Proteinmoleküle	328 / 1	328 / 1

A. Appendix

Tabelle A.8 | Statistiken der F121A- und F121M-Kristalldaten in der Raumgruppe P₄₃₂₁₂
 Datensammlungsstatistiken für die Proteinvarianten F121A und F121M in der Raumgruppe P₄₃₂₁₂. Eingeklammerte Werte entsprechen der höchsten Auflösungsschale. Ramachandran-statistiken wurden mit Procheck ermittelt (Laskowski et al. [1993]).

Diffraktionsdaten		
	CK2α-F121A P₄₃₂₁₂	CK2α-F121M P₄₃₂₁₂
Röntgenquelle	BL14-1, BESSY	BL14-1, BESSY
Wellenlänge (Å)	0.918410	0.918410
Raumgruppe	P ₄ ₃ ₂ ₁ ₂	P ₄ ₃ ₂ ₁ ₂
a,b,c (Å)	126.601, 126.601, 126.934	126.94, 126.94, 126.966
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	40.13 - 2.199 (2.278 - 2.199)	44.88 - 2.698 (2.795 - 2.698)
R_{merge}	0.066 (0.783)	0.129 (0.787)
R_{meas}	0.072 (0.852)	0.137 (0.839)
CC_{1/2}	0.999 (0.820)	0.998 (0.827)
I/σ(I)	19 (2.6)	17.2 (3.2)
Einzigartige Reflexe	52839 (5168)	28822 (2797)
Vollständigkeit (%)	99.8 (99.6)	98.8 (97.7)
Multiplizität	6.3 (6.4)	8.2 (8.3)
B-Faktor (Wilson-Plot, Å²)	40.47	42.64
Verfeinerung		
Anzahl Reflexe in Work / Test-Set	50168 / 2638	27352 / 1444
R_{work} / R_{free}	19.77 / 22.30	20.12 / 23.57
Anzahl Atome / B-Faktoren (Å²)		
Protein	5601 / 51.00	5576 / 46.90
Liganden	92 / 79.20	75 / 69.20
Wasser	240 / 42.5	165 / 37.60
RMS-Abweichungen		
Bindungslängen (Å)	0.003	0.003
Bindungswinkel (°)	0.69	0.81
Ramachandran-Plot (%) / Anzahl Residuen		
favorisierte Regionen	90.7 / 547	90.9 / 547
zusätzlich erlaubte Regionen	9.0 / 54	8.6 / 52
generell erlaubte Regionen	0	0
verbotene Regionen	0.3 / 1	0.3 / 1
Residuen/Proteinmoleküle	663 / 2	662 / 2

Tabelle A.9 | Statistiken der Y125A- und H115Y-Kristalldaten in der Raumgruppe P₄₃₂₁₂
 Datensammlungsstatistiken für die Proteinvarianten *hsCK2αY125A* und *H115Y* in der Raumgruppe P₄₃₂₁₂. Eingeklammerte Werte entsprechen der höchsten Auflösungsschale. Ramachandranstatistiken wurden mit Procheck ermittelt (Laskowski et al. [1993]).

Diffractionsdaten		
	CK2α-Y125A P₄₃₂₁₂	CK2α-H115Y P₄₃₂₁₂
Röntgenquelle	BL14-1, BESSY	PX-III, SLS
Wellenlänge (Å)	0.918410	1
Raumgruppe	P ₄ ₃ ₂ ₁ ₂	P ₄ ₃ ₂ ₁ ₂
a,b,c (Å)	127.046, 127.046, 127.313	127.741, 127.741, 126.935
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	44.96 - 3.146 (3.259 - 3.147)	45.16 - 2.446 (2.533 - 2.446)
R_{merge}	0.179 (0.766)	0.079 (0.834)
R_{meas}	0.197 (0.842)	0.085 (0.893)
CC_{1/2}	0.994 (0.765)	0.999 (0.885)
I/σ(I)	10.2 (2.5)	18.1 (2.5)
Einzigartige Reflexe	18616 (1813)	39267 (3769)
Vollständigkeit (%)	99.8 (99.1)	99.7 (97.5)
Multiplizität	5.7 (5.8)	7.5 (7.7)
B-Faktor (Wilson-Plot, Å²)	52.88	51.23
Verfeinerung		
Anzahl Reflexe in Work / Test-Set	17644 / 951	39218 / 1943
R_{work} / R_{free}	23.52 / 27.32	20.45 / 24.12
Anzahl Atome / B-Faktoren (Å²)		
Protein	5588 / 43.70	5673 / 57.50
Liganden	65 / 51.70	85 / 76.30
Wasser	8 / 31.70	42 / 45.40
RMS-Abweichungen		
Bindungslängen (Å)	0.005	0.004
Bindungswinkel (°)	0.61	0.79
Ramachandran-Plot (%) / Anzahl Residuen		
favorisierte Regionen	88.4 / 532	91.2 / 550
zusätzlich erlaubte Regionen	11.1 / 67	8.0 / 48
generell erlaubte Regionen	0	0
verbotene Regionen	0.3 / 1	0.3 / 1
Residuen/Proteinmoleküle	663 / 2	662 / 2

A. Appendix

Tabelle A.10 | Statistiken der Heparin-Kristalldaten in der Raumgruppe P4₃2₁2

Datensammlungsstatistiken für *hsCK2* in Komplex mit Heparin in der Raumgruppe P4₃2₁2. Eingeklammerte Werte entsprechen der höchsten Auflösungsschale. Ramachandranstatistiken wurden mit Procheck ermittelt (Laskowski et al. [1993]).

Diffraktionsdaten		
	CK2 α -Hepa-2	CK2 α -Hepa-1
Röntgenquelle	ID29, ESRF	PX-III, SLS
Wellenlänge (Å)	0.976250	0.977950
Raumgruppe	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
a,b,c (Å)	128.655, 128.655, 124.338	128.401, 128.401, 124.154
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	45.49 - 2.9 (3.004 - 2.9)	45.4 - 2.55 (2.642 - 2.55)
R_{merge}	0.098 (0.629)	0.085 (0.723)
R_{meas}	0.104 (0.668)	0.093 (0.788)
CC_{1/2}	0.999 (0.89)	0.999 (0.802)
I/σ(I)	16.6 (3.4)	16.2 (2.6)
Einzigartige Reflexe	23707 (2312)	33917 (3259)
Vollständigkeit (%)	99.9 (100)	98.5 (96.2)
Multiplizität	9.2 (8.8)	6.7 (6.4)
B-Faktor (Wilson-Plot, Å²)	61.40	48.47
Verfeinerung		
Reflexe in Work / Test-Set	22500 / 1185	32194 / 1695
R_{work}/R_{free}	21.28 / 26	19.46 / 24.87
Anzahl Atome / B-Faktoren (Å²)		
Protein	5607 / 52.20	5607 / 54.20
Liganden	137 / 131.90	137 / 135.80
Wasser	10 / 83.60	57 / 43.70
RMS-Abweichungen		
Bindungslängen (Å)	0.004	0.004
Bindungswinkel (°)	0.792	0.97
Ramachandran-Plot (%) / Anzahl Residuen		
favorisierte Regionen	90.2 / 545	90.9 / 549
zusätzlich erlaubte Regionen	9.4 / 57	8.6 / 52
generell erlaubte Regionen	0.2 / 1	0.2 / 1
verbotene Regionen	0.2 / 1	0.3 / 2
Residuen/Proteinmoleküle	664 / 2	664 / 2

Tabelle A.11 | Statistiken der Heparin-Kristalldaten in der Raumgruppe P2₁

Datensammlungsstatistiken für *hsCK2* in Komplex mit Heparin in der Raumgruppe P2₁. Eingeklammerte Werte entsprechen der höchsten Auflösungsschale. Ramachandranstatistiken wurden mit Procheck ermittelt (Laskowski et al. [1993]).

Diffraktionsdaten			
	CK2α-Hepa-3	CK2α-SAD-lowres	CK2α-SAD-native
Röntgenquelle	PX-III, SLS	PX-III, SLS	PX-III, SLS
Wellenlänge (Å)	0.8	1.968	0.8
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
a,b,c (Å)	58.76, 45.19, 63.46	58.73, 45.39, 63.45	58.73, 45.55, 63.67
α, β, γ (°)	90, 111.94, 90	90, 111.99, 90	90, 112.002, 90
Auflösung (Å)	34.79 - 1.34 (1.388 - 1.34)	35.94 - 2.99 (3.097 - 2.99)	36.07 - 1.53 (1.59 - 1.53)
R_{merge}	0.039 (0.738)	0.045 (0.063) ^y	0.048 (0.702)
R_{meas}	0.042 (0.799)	0.044 (0.061) ^y	0.055 (0.802)
CC_{1/2}	1.0 (0.779)	1.0 (0.999) ^y	0.999 (0.680)
I/σ(I)	21.2 (2.6)	67.5 (44.0) ^y	18.4 (1.8)
Einzigartige Reflexe	68561 (6740)	12215(1165) ^y	46335 (3993)
Vollständigkeit (%)	98.6 (97.4)	99.6 (95.7) ^y	98.4 (85)
Multiplizität	6.8 (6.7)	23.1 (20.1) ^y	4.5 (4.1)
B-Faktor (Wilson-Plot, Å²)	16.83	23.82	18.55
Verfeinerung			
Reflexe in Work / Test-Set	65230 / 3431		
R_{work} / R_{free}	15.96 / 18.55		
Anzahl Atome / B-Faktoren (Å²)			
Protein	2887 / 26.40		
Liganden	93 / 62.90		
Wasser	247 / 31.30		
RMS-Abweichungen			
Bindungslängen (Å)	0.014		
Bindungswinkel (°)	1.58		
Ramachandran-Plot (%) / Anzahl Residuen			
favorisierte Regionen	89.3 / 266		
zusätzlich erlaubte Regionen	10.4 / 31		
generell erlaubte Regionen	0		
verbotene Regionen	0.3 / 1		
Residuen/Proteinmoleküle	328 / 1		

A. Appendix

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}, \text{ Weiss und Hilgenfeld [1997]}$$

$$R_{\text{meas}} = \frac{\sum_h \sqrt{\frac{n_h}{n_h - 1}} \sum_i^{n_h} |\hat{I}_h - I_{h,i}|}{\sum_h \sum_i^{n_h} I_{h,i}}, \text{ mit } \hat{I}_h = \frac{1}{n_h} \sum_i^{n_h} I_{h,i}, \text{ Diederichs und Karplus [1997]}$$

CC_{1/2}: Karplus und Diederichs [2012]

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Humane eukaryotische Proteinkinasen	2
1.2.	Aufbau einer eukaryotischen Proteinkinase – Die Kinasereaktion	3
1.3.	Pharmakophor-Modell nach Taylor und Liu	6
1.4.	Das CK2-Holoenzym	8
1.5.	CK2 α und CK2 α' in der CMGC-Proteinkinase-Familie	11
1.6.	Struktur von CK2 α	14
1.7.	Die beiden Konformationen der Gelenkregion von CK2 α	16
1.8.	Konsensus-Sequenz der CK2-abhängigen Phosphorylierung von Substratproteinen und -peptiden	17
1.9.	Die Substratbindestelle	18
1.10.	Primäre und sekundäre Interaktionen zwischen CK2 α und CK2 β	20
1.11.	Postulierte Oligomere	22
1.12.	ATP-kompetitive Inhibitoren	23
2.1.	Fluoreszenzanisotropie-Assay nach Hochscherf	47
3.1.	Der Weg zu erfolgreicher Kristallisation	51
3.2.	Darstellung der Röntgenbeugung nach Bragg	54
3.3.	Diffractionsaufnahme eines Proteinkristalls	55
3.4.	f' und f'' verschiedener Atome	58
4.1.	PIM3-Varianten	61
4.2.	P21WAF-Variante	62
4.3.	PIM3-CN Western Blot	64
4.4.	Reinheit der verwendeten Proteine	65
4.5.	Gelfiltration der PIM3-Varianten	66
4.6.	Charakterisierung von PIM3-CN	67
4.7.	Töberichfurane als Inhibitoren	68
4.8.	Kristalle von CK2 α mit Töberichfuran-Inhibitoren	69
4.9.	Bindung der Töberichfurane an CK2 α	70
4.10.	Der Inhibitor E9	71
4.11.	Kristalle von CK2 α mit E9	72
4.12.	Bindung von E9 an CK2 α	73
4.13.	Die Inhibitoren ARC1502 und ARC3140	74
4.14.	Kristalle von CK2 α mit ARC3140 oder ARC1502	75
4.15.	CK2 α interagiert mit ARC3140 und ARC1502	76
4.16.	Drei Bindungsstellen von ARC3140	77
4.17.	Interaktion von ARC3140 mit CK2	79
4.18.	Kristalle des CK2 ^{Andante} -Holoenzym	81

4.19. Das Holoenzym CK2 ^{Andante}	82
4.20. Kristalle der CK2 α -Varianten	85
4.21. Kristallstrukturen der Gelenkregion-Varianten	87
4.22. Kristalle von CK2 α im Komplex mit Heparin	89
4.23. Modell der P4 ₃ 2 ₁ 2-Strukturen	90
4.24. Strukturlösung der P2 ₁ -Heparinstruktur	92
4.25. Bindung von Heparin an CK2 α in der P2 ₁ -Raumgruppe	93
5.1. Kristallisierbarkeit von PIM3	95
5.2. Bindungsmodi von TF und TF107	98
5.3. Tautomerie von TF und TF85	98
5.4. E9-Bindung im Pharmakophor-Modell	100
5.5. Position von TBB- und TIBI-Derivaten	102
5.6. Einfluss von ARC3140 auf die Konformation von CK2 α	103
5.7. Expression von wildtypischem und Andante-CK2	107
5.8. Oligomerisierungs- und Aktivierungsmechanismen des Holoenzym	108
5.9. Symmetrie des Holoenzym als zentrales Element der Oligomerisie- rung	109
5.10. Sekundäre CK2 α / β -Interaktion im symmetrischen Holoenzym	110
5.11. Mögliche Filamentbildung des symmetrischen Holoenzym	111
5.12. Bindung von ATP und GTP an Proteinvarianten	113
5.13. Die B-Faktoren der Gelenkregionen	115
5.14. Das Spine-Konzept nach Taylor und Kornev	116
5.15. Variabilität der Gelenkregion in der offenen Konformation	118
5.16. Aufbau von Heparansulfat und Heparin	120
5.17. Bindung von Heparin an der Substratbindestelle	121
5.18. Bindung von Heparin an CK2	123
5.19. Modell der Heparinbindung	125
A.1. Alignment von CK2 β	130
A.2. Alignment von CK2 α	130
A.3. Alignment von PIM-Kinasen	131
A.4. Modell von PIM3	132

Tabellenverzeichnis

2.1. Inhibitoren	28
2.2. Enzyme und Kits	28
2.3. Zur Verfügung gestellte Proteine	29

2.4.	Zur Verfügung gestellte Konstrukte	29
2.5.	Während der Arbeit erstellte Konstrukte	29
2.6.	Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung von PIM3¹⁻³¹⁷	29
2.7.	Verwendete <i>E. coli</i>-Stämme	30
2.8.	Verwendete Antibiotika	30
2.9.	Puffer für die Proteinreinigung	31
2.10.	Puffer für SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	32
2.11.	Weitere Puffer, Medien und Lösungen	33
2.12.	Verwendete Software	34
2.13.	Verwendete Kristallisations-Screens	35
2.14.	Protokoll einer Standard-PCR	36
2.15.	Rezept für SDS-Gele	43
4.1.	Kristallisierte Proteinvarianten	86
A.1.	Statistiken der TF-Kristalldaten	133
A.2.	Statistiken der TF85- und TF107-Kristalldaten	134
A.3.	Statistiken der E9-Kristalldaten	135
A.4.	Statistiken der ARC3140- und ARC1502-Kristalldaten	136
A.5.	Statistiken der CK2^{Andante}-Kristalldaten	137
A.6.	Statistiken der F121A- und F121M-Kristalldaten in der Raumgruppe P2₁	138
A.7.	Statistiken der Y125A- und H115Y-Kristalldaten in der Raumgruppe P2₁	139
A.8.	Statistiken der F121A- und F121M-Kristalldaten in der Raumgruppe P4₃2₁2	140
A.9.	Statistiken der Y125A- und H115Y-Kristalldaten in der Raumgruppe P4₃2₁2	141
A.10.	Statistiken der Heparin-Kristalldaten in der Raumgruppe P4₃2₁2	142
A.11.	Statistiken der Heparin-Kristalldaten in der Raumgruppe P2₁	143

Literatur

- Abergel, C. Molecular replacement: tricks and treats. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 69(11):2167–2173, 2013.
- Ackermann, K. und W. Pyerin. Protein kinase CK2 α may induce gene expression but unlikely acts directly as a DNA-binding transcription-activating factor. *Mol. Cell. Biochem.*, 191(1):129–134, 1999.
- Adams, P. D., P. V. Afonine, G. Bunkóczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L. W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger und P. H. Zwart. PHENIX: A comprehensive python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 66(2):213–221, 2010.
- Akamine, P., Madhusudan, J. Wu, N.-H. Xuong, L. F. Ten Eyck und S. S. Taylor. Dynamic features of cAMP-dependent protein kinase revealed by apoenzyme crystal structure. *J. Mol. Biol.*, 327(1):159–171, 2003.
- Akten, B., E. Jauch, G. K. Genova, E. Y. Kim, I. Ederly, T. Raabe und F. R. Jackson. A role for CK2 in the *Drosophila* circadian oscillator. *Nat. Neurosci.*, 6(3):251–257, 2003.
- Andersen, K. R., N. C. Leksa und T. U. Schwartz. Optimized *E. coli* expression strain LOBSTR eliminates common contaminants from His-tag purification. *Proteins*, 81(11):1857–1861, 2013.
- Andrzejewska, M., M. A. Pagano, F. Meggio, A. M. Brunati und Z. Kazimierczuk. Polyhalogenobenzimidazoles: Synthesis and their inhibitory activity against casein kinases. *Bioorganic Med. Chem.*, 11(18):3997–4002, 2003.
- Azam, M., M. A. Seeliger, N. S. Gray, J. Kuriyan und G. Q. Daley. Activation of tyrosine kinases by mutation of the gatekeeper threonine. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15(10):1109–1118, 2008.
- Badrinarayan, P. und G. N. Sastry. Sequence, structure, and active site analyses of p38 MAP kinase: Exploiting DFG-out conformation as a strategy to design new type II leads. *J. Chem. Inf. Model.*, 51(1):115–129, 2011.
- Barth, Andreas. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, 1767(9):1073–1101, 2007.

- Basnet, H., X. B. Su, Y. Tan, J. Meisenhelder, D. Merkurjev, K. A. Ohgi, T. Hunter, L. Pillus und M. G. Rosenfeld. Tyrosine phosphorylation of histone H2A by CK2 regulates transcriptional elongation. *Nature*, 516(7530):267–271, 2014.
- Battistutta, R., S. Sarno, E. De Moliner, E. Papinutto, G. Zanotti und L. A. Pinna. The replacement of ATP by the competitive inhibitor emodin induces conformational modifications in the catalytic site of protein kinase CK2. *J. Biol. Chem.*, 275(38):29618–29622, 2000.
- Battistutta, R., E. De Moliner, S. Sarno, G. Zanotti und L. A. Pinna. Structural features underlying selective inhibition of protein kinase CK2 by ATP site-directed tetrabromo-2-benzotriazole. *Protein Sci.*, 10(11):2200–2206, 2001.
- Battistutta, R., M. Mazzorana, S. Sarno, Z. Kazimierczuk, G. Zanotti und L. A. Pinna. Inspecting the structure-activity relationship of protein kinase CK2 inhibitors derived from tetrabromo-benzimidazole. *Chem. Biol.*, 12(11):1211–1219, 2005.
- Battistutta, R., M. Mazzorana, L. Cendron, A. Bortolato, S. Sarno, Z. Kazimierczuk, G. Zanotti, S. Moro und L. A. Pinna. The ATP-binding site of protein kinase CK2 holds a positive electrostatic area and conserved water molecules. *ChemBioChem*, 8(15):1804–1809, 2007.
- Ben-Neriah, Y., G. Q. Daley, A.-M. Mes-Masson, O. N. Witte und D. Baltimore. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the produkt of the bcr/abl hybrid gene. *Science*, 233(4760):212–214, 1986.
- Berg, T. Modulation of protein-protein interactions with small organic molecules. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 42(22):2462–2481, 2003.
- Bibby, A. C. und D. W. Litchfield. The multiple personalities of the regulatory subunit of protein kinase CK2: CK2 dependent and CK2 independent roles reveal a secret identity for CK2 β . *Int. J. Biol. Sci.*, 1(2):67–79, 2005.
- Bickerton, G. R., G. V. Paolini, J. Besnard, S. Muresan und A. L. Hopkins. Quantifying the chemical beauty of drugs. *Nat. Chem.*, 4(2):90–98, 2012.
- Bidwai, A. P., J. C. Reed und C. V. C. Glover. Phosphorylation of calmodulin by the catalytic subunit of casein kinase II is inhibited by the regulatory subunit. *Arch. Biochem. Biophys.*, 300(1):265–270, 1993.
- Bischoff, N. *Vergleichende Strukturanalyse zweier paraloger Isoformen der humanen Proteinkinase CK2 α* . PhD thesis, Universität zu Köln, 2013.

- Bischoff, N., B. Olsen, J. Raaf, M. Bretner, O.-G. Issinger und K. Niefind. Structure of the human protein kinase CK2 catalytic subunit CK2 α ' and interaction thermodynamics with the regulatory subunit CK2 β . *J. Mol. Biol.*, 407(1):1–12, 2011a.
- Bischoff, N., J. Raaf, B. Olsen, M. Bretner, O.-G. Issinger und K. Niefind. Enzymatic activity with an incomplete catalytic spine: Insights from a comparative structural analysis of human CK2 α and its paralogous isoform CK2 α '. *Mol. Cell. Biochem.*, 356(1-2):57–65, 2011b.
- Bjørning-Poulsen, M., S. Siehler, L. Wiesmüller, D. Meek, K. Niefind und O.-G. Issinger. The 'regulatory' β -subunit of protein kinase CK2 negatively influences p53-mediated allosteric effects on Chk2 activation. *Oncogene*, 24(40):6194–6200, 2005.
- Blau, J. A new role for an old kinase: CK2 and the circadian clock. *Nat. Neurosci.*, 6(3):208–210, 2003.
- Boldyreff, B., F. Meggio, L. A. Pinna und O.-G. Issinger. Reconstitution of normal and hyperactivated forms of casein kinase-2 by variably mutated β -subunits. *Biochemistry*, 32(47):12672–12677, 1993.
- Boldyreff, Brigitte und Olaf-Georg Issinger. A-Raf kinase is a new interacting partner of protein kinase CK2 β subunit. *FEBS Lett.*, 403(2):197–199, 1997.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1-2): 248–254, 1976.
- Brault, L., C. Gasser, F. Bracher, K. Huber, S. Knapp und J. Schwaller. Pim serine/threonine kinases in the pathogenesis and therapy of hematologic malignancies and solid cancers. *Haematologica*, 95(6):1004–1015, 2010.
- Braun, A. P. und H. Schulman. The multifunctional calcium/calmodulin kinase: from form to function. *Annu. Rev. Physiol.*, 4:417–445, 1995.
- Bricogne, G., E. Blanc, M. Brandl, C. Flensburg, P. Keller, W. Paciorek, P. Roversi, A. Sharff, O. S. Smart, C. Vonrhein und T. O. Womack. BUSTER, 2011.
- Brown, N. R., M. E. M. Noble, J. A. Endicott und L. N. Johnson. The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases. *Nat. Cell Biol.*, 1(7):438–443, 1999.
- Buchdunger, E., J. Zimmermann, H. Mett, T. Meyer, M. Müller, B. J. Druker und N. B. Lydon. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.*, 56:100–104, 1996.

- Bullock, A. N., J. Debreczeni, A. L. Amos, S. Knapp und B. E. Turk. Structure and substrate specificity of the Pim-1 kinase. *J. Biol. Chem.*, 280(50):41675–41682, 2005.
- Carter, W. J., E. Cama und J. A. Huntington. Crystal structure of thrombin bound to heparin. *J. Biol. Chem.*, 280(4):2745–2749, 2005.
- Chaitanya, G. V., J. S. Alexander und P. P. Babu. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun. Signal.*, 8(1):1–11, 2010.
- Chantalat, L., D. Leroy, O. Filhol, A. Nueda, M. J. Benitez, E. M. Chambaz, C. Cochet und O. Dideberg. Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *EMBO J.*, 18(11):2930–2940, 1999.
- Chardot, T., H. Shen und J. C. Meunier. Dual specificity of casein kinase II from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *C. R. Acad. Sci. III.*, 318(9):937–942, 1995.
- Cochet, C. und E. M. Chambaz. Oligomeric structure and catalytic activity of G-type casein kinase - isolation of the 2 subunits and renaturation experiments. *J. Biol. Chem.*, 258:1403–1406, 1983.
- Cochet, C., D. Job, F. Pirollet und E. M. Chambaz. Adenosine 3',5'-monophosphate-independent protein kinase activities in the bovine adrenal cortex cytosol. *Endocrinology*, 106(3):750–757, 1980.
- Cohen, P. Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discov.*, 1(4):309–315, 2002.
- Colicelli, J. ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity. *Sci. Signal.*, 3(139):1–46, 2011.
- Cozza, G., P. Bonvini, E. Zorzi, G. Poletto, M. A. Pagano, S. Sarno, A. Donella-Deana, G. Zagotto, A. Rosolen, L. A. Pinna, F. Meggio und S. Moro. Identification of ellagic acid as potent inhibitor of protein kinase CK2: a successful example of a virtual screening application. *J. Med. Chem.*, 49(8):2363–2366, 2006.
- Cozza, G., C. Girardi, A. Ranchio, G. Lolli, S. Sarno, A. Orzeszko, Z. Kazimierczuk, R. Battistutta, M. Ruzzene und L. A. Pinna. Cell-permeable dual inhibitors of protein kinases CK2 and PIM-1: structural features and pharmacological potential. *Cell. Mol. Life Sci.*, 71(16):3173–3185, 2014.

- De Klein, A., A. G. van Kessel, G. Grosveld, C. R. Bartram, A. Hagemeijer, D. Bootsma, N. K. Spurr, N. Heisterkamp, J. Groffen und J. R. Stephenson. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*, 300(5894):765–767, 1982.
- Deininger, M., E. Buchdunger und B. J. Druker. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood J.*, 105(7):2640–2653, 2005.
- Desagher, S., A. Osen-Sand, S. Montessuit, E. Magnenat, F. Vilbois, A. Hochmann, L. Journot, B. Antonsson und J.-C. Martinou. Phosphorylation of Bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol. Cell*, 8(3):601–611, 2001.
- Diederichs, K und P. A. Karplus. Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Nat. Struct. Biol.*, 4(4):269–275, 1997.
- Donella-Deana, A., L. Cesaro, S. Sarno, A. M. Brunati, M. Ruzzene und L. A. Pinna. Autocatalytic tyrosine-phosphorylation of protein kinase CK2 α and α' subunits: implication of Tyr¹⁸². *Biochem. J.*, 357(2):563–567, 2001.
- Duncan, J. S., J. P. Turowec, G. Vilc, S. S. C. Li, G. B. Gloor und D. W. Litchfield. Regulation of cell proliferation and survival: convergence of protein kinases and caspases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1804(3):505–510, 2010.
- Duncan, J. S., J. P. Turowec, K. E. Duncan, G. Vilc, C. Wu, B. Lüscher, S. S.-C. Li, G. B. Gloor und D. W. Litchfield. A peptide-based target screen implicates the protein kinase CK2 in the global regulation of caspase signaling. *Sci. Signal.*, 4(172):1–14, 2011.
- Ekambaram, R., E. Enkvist, A. Vaasa, M. Kasari, G. Raidaru, S. Knapp und A. Uri. Selective bisubstrate inhibitors with sub-nanomolar affinity for protein kinase Pim-1. *ChemMedChem*, 8(6):909–913, 2013.
- Emsley, P. und K. Cowtan. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 60(Pt 12):2126–2132, 2004.
- Enkvist, E., K. Viht, N. Bischoff, J. Vahter, S. Saaver, G. Raidaru, O.-G. Issinger, K. Niefind und A. Uri. A subnanomolar fluorescent probe for protein kinase CK2 interaction studies. *Org. Biomol. Chem.*, 10(43):8645–8653, 2012.
- Ericsson, U. B., B. M. Hallberg, G. T. DeTitta, N. Dekker und P. Nordlund. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal. Biochem.*, 357(2):289–298, 2006.

- Ermakova, I., B. Boldyreff, O.-G. Issinger und K. Niefind. Crystal structure of a C-terminal deletion mutant of human protein kinase CK2 catalytic subunit. *J. Mol. Biol.*, 330(5):925–934, 2003.
- Fabbro, D., S. W. Cowan-Jacob und H. Moebitz. Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14. *Br. J. Pharmacol.*, 172(11):2675–2700, 2015.
- Faust, M. und M. Montenarh. Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function? *Cell Tissue Res.*, 301(3):329–340, 2000.
- Faust, M., N. Schuster und M. Montenarh. Specific binding of protein kinase CK2 catalytic subunits to tubulin. *FEBS Lett.*, 462(1-2):51–56, 1999.
- Faust, M., M. Jung, J. Günther, R. Zimmermann und M. Montenarh. Localization of individual subunits of protein kinase CK2 to the endoplasmic reticulum and to the Golgi apparatus. *Mol. Cell. Biochem.*, 227(1-2):73–80, 2001.
- Faust, M., J. Günther, E. Morgenstern, M. Montenarh und C. Götz. Specific localization of the catalytic subunits of protein kinase CK2 at the centrosomes. *Cell. Mol. Life Sci.*, 59(12):2155–2164, 2002.
- Feige, J. J., F. Pirollet, C. Cochet und E. M. Chambaz. Selective inhibition of a cyclic nucleotide-independent protein kinase (G-type casein kinase) by naturally occurring glycosaminoglycans. *FEBS Lett.*, 121(1):139–142, 1980.
- Ferguson, A. D., P. R. Sheth, A. D. Basso, S. Paliwal, K. Gray, T. O. Fischmann und H. V. Le. Structural basis of CX-4945 binding to human protein kinase CK2. *FEBS Lett.*, 585(1):104–110, 2011.
- Garman, E. F. und E. P. Mitchell. Glycerol concentrations required for cryoprotection of 50 typical protein crystallization solutions. *J. Appl. Crystallogr.*, 29(5):584–587, 1996.
- Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel und A. Bairoch. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. Walker, John M., editor, *Proteomics Protoc. Handb.*, Seiten 571–607. Humana Press, 2005.
- Gatica, M., M. V. Hinrichs, A. Jedlicki, C. C. Allende und J. E. Allende. Effect of metal ions on the activity of casein kinase II from *Xenopus laevis*. *FEBS Lett.*, 315(2):173–177, 1993.
- Gatica, M., G. Jacob, C. C. Allende und J. E. Allende. DNA inhibits the catalytic activity of the α subunit of protein kinase CK2. *Biochemistry*, 34(1):122–127, 1995.

- Gianoncelli, A., G. Cozza, A. Orzeszko, F. Meggio, Z. Kazimierczuk und L. A. Pinna. Tetraiodobenzimidazoles are potent inhibitors of protein kinase CK2. *Bioorg. Med. Chem.*, 17(20):7281–7289, 2009.
- Glover, C. V. C. A filamentous form of Drosophila casein kinase II. *J. Biol. Chem.*, 261(30):14349–14354, 1986.
- Golub, A. G., V. G. Bdzhola, Y. V. Kyshenia, V. M. Sapelkin, A. O. Prykhod'ko, O. P. Kukharenko, O. V. Ostrynska und S. M. Yarmoluk. Structure-based discovery of novel flavonol inhibitors of human protein kinase CK2. *Mol. Cell. Biochem.*, 356(1-2):107–115, 2011.
- Götz, C., S. Kartarius, P. Scholtes und M. Montenarh. Binding domain for p21^{WAF1} on the polypeptide chain of the protein kinase CK2 β -subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 268(3):882–885, 2000.
- Götz, C., A. Gratz, U. Kucklaender und J. Jose. TF — A novel cell-permeable and selective inhibitor of human protein kinase CK2 induces apoptosis in the prostate cancer cell line LNCaP. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 1820(7):970–977, 2012.
- Grankowski, N., B. Boldyreff und O.-G. Issinger. Isolation and characterization of recombinant human casein kinase II subunits α and β from bacteria. *Eur. J. Biochem.*, 198(1):25–30, 1991.
- Gratz, A. *Autodisplay der humanen Proteinkinase CK2 und Entwicklung eines Verfahrens zur Inhibitionstestung*. PhD thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2010.
- Groffen, J., J. R. Stephenson, N. Heisterkamp, A. de Klein, C. R. Bartram und G. Grosveld. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*, 36(1):93–99, 1984.
- Guerra, B. und O.-G. Issinger. Protein kinase CK2 in human diseases. *Curr. Med. Chem.*, 15(19):1870–1886, 2008.
- Guerra, B., B. Boldyreff, S. Sarno, L. Cesaro, O.-G. Issinger und L. A. Pinna. CK2: A protein kinase in need of control. *Pharmacol. Ther.*, 82(2-3):303–313, 1999a.
- Guerra, B., S. Siemer, B. Boldyreff und O.-G. Issinger. Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2 β subunit fraction, devoid of the catalytic CK2 α subunit, in mouse brain and testicles. *FEBS Lett.*, 462(3):353–357, 1999b.

- Guerra, B., N. Bischoff, V. G. Bdzhola, S. M. Yarmoluk, O.-G. Issinger, A. G. Golub und K. Niefind. A note of caution on the role of halogen bonds for protein kinase/Inhibitor recognition suggested by high- and low-salt CK2 α complex structures. *ACS Chem. Biol.*, 10(7):1654–1660, 2015a.
- Guerra, B., J. Hochscherf, N. B. Jensen und O.-G. Issinger. Identification of a novel potent, selective and cell permeable inhibitor of protein kinase CK2 from the NIH/NCI diversity set library. *Mol. Cell. Biochem.*, 406(1):151–161, 2015b.
- Guerra, B., T. D. L. Rasmussen, A. Schnitzler, H. H. Jensen, B. S. Boldyreff, Y. Miyata, N. Marcussen, K. Niefind und O.-G. Issinger. Protein kinase CK2 inhibition is associated with the destabilization of HIF-1 α in human cancer cells. *Cancer Lett.*, 356(2):751–761, 2015c.
- Guex, N., M. C. Peitsch und T. Schwede. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis*, 30(SUPPL. 1):162–173, 2009.
- Hajduk, P. J. und J. Greer. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 6(3):211–219, 2007.
- Harrington, L., S. Cheley, L. T. Alexander, S. Knapp und H. Bayley. Stochastic detection of Pim protein kinases reveals electrostatically enhanced association of a peptide substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110(47):E4417–E4426, 2013.
- Hathaway, G. M. und J. A. Traugh. Cyclic nucleotide-independent protein kinases from rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.*, 254(3):762–768, 1979.
- Hathaway, G. M. und J. A. Traugh. Casein kinases-multipotential protein kinases. *Curr. Top. Cell. Regul.*, 21:101–127, 1982.
- Hathaway, G. M. und J. A. Traugh. Kinetics of activation of casein kinase II by polyamines and reversal of 2,3-bisphosphoglycerate inhibition. *J. Biol. Chem.*, 259(11):7011–7015, 1984.
- Hathaway, G. M., T. H. Lubben und J. A. Traugh. Inhibition of casein kinase II by heparin. *J. Biol. Chem.*, 255(17):8038–8041, 1980.
- Heinemann, V., L. W. Hertel, G. B. Grindey und W. Plunkett. Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1- β -D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.*, 48(14):4024–4031, 1988.

- Hellwig, C. T., A. H. Ludwig-Galezowska, C. G. Concannon, D. W. Litchfield, J. H. M. Prehn und M. Rehm. Activity of protein kinase CK2 uncouples Bid cleavage from caspase-8 activation. *J. Cell Sci.*, 123(9):1401–1406, 2010.
- Herberg, F. W., M. L. Doyle, S. Cox und S. S. Taylor. Dissection of the nucleotide and metal-phosphate binding sites in cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*, 38(19):6352–6360, 1999.
- Hochscherf, J., D. Lindenblatt, M. Steinkrüger, E. Yoo, Ö. Ulucan, S. Herzig, O.-G. Issinger, V. Helms, C. Götz, I. Neundorf, K. Niefind und M. Pietsch. Development of a high-throughput screening-compatible assay to identify inhibitors of the CK2 α /CK2 β interaction. *Anal. Biochem.*, 468:4–14, 2015.
- Hou, Z., I. Nakanishi, T. Kinoshita, Y. Takei, M. Yasue, R. Misu, Y. Suzuki, S. Nakamura, T. Kure, H. Ohno, K. Murata, K. Kitaura, A. Hirasawa, G. Tsujimoto, S. Oishi und N. Fujii. Structure-based design of novel potent protein kinase CK2 (CK2) inhibitors with phenyl-azole scaffolds. *J. Med. Chem.*, 55(6):2899–2903, 2012.
- Houtman, J. C. D., P. H. Brown, B. Bowden, H. Yamaguchi, E. Appella, L. E. Samelson und P. Schuck. Studying multisite binary and ternary protein interactions by global analysis of isothermal titration calorimetry data in SEDPHAT: Application to adaptor protein complexes in cell signaling. *Protein Sci.*, 16(1):30–42, 2007.
- Hübner, G. M., J. N. Larsen, B. Guerra, K. Niefind, M. Vrecl und O.-G. Issinger. Evidence for aggregation of protein kinase CK2 in the cell: a novel strategy for studying CK2 holoenzyme interaction by BRET². *Mol. Cell. Biochem.*, 397(1-2):285–293, 2014.
- Hung, M.-S., Z. Xu, Y.-C. Lin, J.-H. Mao, C.-T. Yang, P.-J. Chang, D. M. Jablons und L. You. Identification of hematein as a novel inhibitor of protein kinase CK2 from a natural product library. *BMC Cancer*, 9:135, 2009.
- Ishchenko, A., L. Zhang, J.-Y. Le Brazidec, J. Fan, J. H. Chong, A. Hingway, A. Raditsis, L. Singh, B. Elenbaas, V. S. Hong, D. Marcotte, L. Silvian, I. Enyedy und J. Chao. Structure-based design of low-nanomolar PIM kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 25(3):474–480, 2015.
- Issinger, O.-G. Casein kinases: pleiotropic mediators of cellular regulation. *Pharmacol. Ther.*, 59(1):1–30, 1993.
- Jacob, G., G. Neckelman, M. Jimenez, C. C. Allende und J. E. Allende. Involvement of asparagine 118 in the nucleotide specificity of the catalytic subunit of protein kinase CK2. *FEBS Lett.*, 466(2-3):363–366, 2000.

- Janeczko, M., M. Masłyk, R. Szyszka und A. Baier. Interactions between subunits of protein kinase CK2 and their protein substrates influences its sensitivity to specific inhibitors. *Mol. Cell. Biochem.*, 356(1):121–126, 2011.
- Jin, L., J. P. Abrahams, R. Skinner, M. Petitou, R. N. Pike und R. W. Carrell. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94(26):14683–14688, 1997.
- Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 66(2):125–132, 2010.
- Kannan, N. und A. F. Neuwald. Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2 α . *Protein Sci.*, 13(8):2059–2077, 2004.
- Karplus, P. A. und K. Diederichs. Linking crystallographic model and data quality. *Science*, 336:1030–1033, 2012.
- Keller, S., C. Vargas, H. Zhao, G. Piszczek, C. A. Brautigam und P. Schuck. High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak-shape analysis. *Anal. Chem.*, 84(11):5066–5073, 2012.
- Kerr, J. F. R., A. H. Wyllie und A. R. Currie. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26(4):239–257, 1972.
- Kinoshita, T., T. Nakaniwa, Y. Sekiguchi, Y. Sogabe, A. Sakurai, S. Nakamura und I. Nakanishi. Crystal structure of human CK2 α at 1.06 Å resolution. *J. Synchrotron Radiat.*, 20(Pt 6):974–979, 2013.
- Klein, R. Die ungewöhnliche ATP/GTP-Nutzung durch Proteinkinase CK2. 2014.
- Kloppfleisch, K., O.-G. Issinger und K. Niefind. 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. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 68(8):883–892, 2012.
- Konopka, R. J., R. F. Smith und D. Orr. Characterization of Andante, a new *Drosophila* clock mutant, and its interactions with other clock mutants. *J. Neurogenet.*, 7(2-3): 103–114, 1991.
- Korn, I., S. Gutkind, N. Srinivasan, T. L. Blundell, C. C. Allende und J. E. Allende. Interactions of protein kinase CK2 subunits. *Mol. Cell. Biochem.*, 191:75–83, 1999.
- Kornev, A. P. und S. S. Taylor. Defining the conserved internal architecture of a protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, 1804(3):440–444, 2010.

- Kornev, A. P., S. S. Taylor und L. F. Ten Eyck. A helix scaffold for the assembly of active protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105(38):14377–14382, 2008.
- Kreuger, J. und L. Kjellén. Heparan sulfate biosynthesis: regulation and variability. *J. Histochem. Cytochem.*, 60(12):898–907, 2012.
- Kuckländer, U. und H. Töberich. Zur Umsetzung von 2-(Aminomethylen)cyclohexanon-Derivaten mit Dichlorchinonen. *Chem. Ber.*, 116(1):152–158, 1983.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, 1970.
- Laskowski, R. A., M. W. MacArthur, D. S. Moss und J. M. Thornton. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.*, 26(2):283–291, 1993.
- Laudet, B., V. Moucadel, R. Prudent, O. Filhol, Y.-S. Wong, D. Royer und C. Cochet. Identification of chemical inhibitors of protein-kinase CK2 subunit interaction. *Mol. Cell. Biochem.*, 316(1-2):63–69, 2008.
- Lavogina, D., E. Enkvist und A. Uri. Bisubstrate inhibitors of protein kinases: from principle to practical applications. *ChemMedChem*, 5(1):23–34, 2010.
- Lee, W.-K., S. H. Son, B.-S. Jin, J.-H. Na, S.-Y. Kim, K.-H. Kim, E. E. Kim, Y. G. Yu und H. H. Lee. Structural and functional insights into the regulation mechanism of CK2 by IP₆ and the intrinsically disordered protein Nopp140. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110(48):19360–19365, 2013.
- Leeson, P. Drug discovery: chemical beauty contest. *Nature*, 481(7382):455–456, 2012.
- Leonard, C. J., L. Aravind und E. V. Koonin. Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: Evolution of the “eukaryotic” protein kinase superfamily. *Genome Res.*, 8:1038–1047, 1998.
- Leroy, D., J.-K. Heriché, O. Filhol, E. M. Chambaz und C. Cochet. Binding of polyamines to an autonomous domain of the regulatory subunit of protein kinase CK2 induces a conformational change in the holoenzyme. A proposed role for the kinase stimulation. *J. Biol. Chem.*, 272(33):20820–20827, 1997.
- Leslie, A. G. W. und H. R. Powell. Processing diffraction data with mosflm. Read, Randy J. und Joel L. Sussman, editors, *Evol. Methods Macromol. Crystallogr.*, volume 245 of *NATO Science Series II: Mathematics, Physics and Chemistry*, Seiten 41–51. Springer Netherlands, Dordrecht, 2007.

- Li, P.-F., J. Li, E.-C. Müller, A. Otto, R. Dietz und R. von Harsdorf. Phosphorylation by protein kinase CK2: A signaling switch for the caspase-inhibiting protein ARC. *Mol. Cell*, 10(2):247–258, 2002.
- Li, Y.-Y. und N. Mukaida. Pathophysiological roles of Pim-3 kinase in pancreatic cancer development and progression. *World J. Gastroenterol.*, 20(28):9392–9404, 2014.
- Lin, J.-M., V. L. Kilman, K. Keegan, B. Paddock, M. Emery-Le, M. Rosbash und R. Al-lada. A role for casein kinase 2 α in the *Drosophila* circadian clock. *Nature*, 420 (6917):816–820, 2002.
- Lindberg, R. A., A. M. Quinn und T. Hunter. Dual-specificity protein kinases: will any hydroxyl do? *Trends Biochem. Sci.*, 17(3):114–119, 1992.
- Lindenblatt, D. CK2 Aktivitätstests unter physiologischen Bedingungen mit ATP und GTP als Cosubstrate. 2013.
- Lipinski, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today Technol.*, 1(4):337–341, 2004.
- Lipinski, C. A., F. Lombardo, B. W. Dominy und P. J. Feeney. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 46(1-3):3–26, 1997.
- Liu, H., H. Wang, M. Teng und X. Li. The multiple nucleotide-divalent cation binding modes of *Saccharomyces cerevisiae* CK2 alpha indicate a possible co-substrate hydrolysis product (ADP/GDP) release pathway. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 70:501–513, 2014.
- Liu, Q., T. Dahmane, Z. Zhang, Z. Assur, J. Brasch, L. Shapiro, F. Mancina und W. A. Hendrickson. Structures from anomalous diffraction of native biological macromolecules. *Science*, 336(6084):1033–1037, 2012.
- Liu, Y. und N. S. Gray. Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat. Chem. Biol.*, 2(7):358–364, 2006.
- Livak, K. J. Detailed structure of the *Drosophila melanogaster* stellate genes and their transcripts. *Genetics*, 124(2):303–316, 1990.
- Lohmann, S. M., A. B. Vaandrager, A. Smolenski, U. Walter und H. R. De Jonge. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem. Sci.*, 22(97):307–312, 1997.

- Lolli, G., L. A. Pinna und R. Battistutta. Structural determinants of protein kinase CK2 regulation by autoinhibitory polymerization. *Acs Chem.Biol.*, 7(7):1158–1163, 2012.
- Lolli, G., A. Ranchio und R. Battistutta. Active form of the protein kinase CK2 $\alpha_2\beta_2$ holoenzyme is a strong complex with symmetric architecture. *ACS Chem. Biol.*, 9(2):366–371, 2014.
- López-Ramos, M., R. Prudent, V. Moucadel, C. F. Sautel, C. Barette, L. Lafanechère, L. Mouawad, D. Grierson, F. Schmidt, J.-C. Florent, P. Filippakopoulos, A. N. Bullock, S. Knapp, J.-B. Reiser und C. Cochet. New potent dual inhibitors of CK2 and Pim kinases: discovery and structural insights. *FASEB J.*, 24(9):3171–3185, 2010.
- Lou, D. Y., I. Dominguez, P. Toselli, E. Landesman-Bollag, C. O'Brien und D. C. Seldin. The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development. *Mol. Cell. Biol.*, 28(1):131–139, 2008.
- Lowe, E D, Martin E M Noble, V T Skamniki, N G Oikonomakos, D J Owen und Louise N Johnson. The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide substrate complex: kinase substrate recognition. *EMBO J.*, 16(22):6646–58, 1997.
- Lowe, S. W. und A. W. Lin. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3):485–495, 2000.
- Lozeman, F. J., D. W. Litchfield, C. Piening, K. Takio, K. A. Walsh und E. G. Krebs. Isolation and characterization of human cDNA clones encoding the α and the α' subunits of casein kinase II. *Biochemistry*, 29(36):8436–8447, 1990.
- Mäenpää, P. H. Effects of polyamines and polyanions on a cyclic nucleotide-independent and a cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta*, 498(1):294–305, 1977.
- Manning, G. Genomic overview of protein kinases. *WormBook*, Seiten 1–19, 2005.
- Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter und S. Sudarsanam. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298(5600):1912–1934, 2002.
- Marchiori, F., F. Meggio, O. Marin, G. Borin, A. Calderan, P. Ruzza und L. A. Pinna. Synthetic peptide substrates for casein kinase 2. Assessment of minimum structural requirements for phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*, 971:332–338, 1988.
- Marin, O., F. Meggio, S. Sarno, L. Cesaro, M. A. Pagano und L. A. Pinna. Tyrosine versus serine/threonine phosphorylation by protein kinase casein kinase-2. A study with peptide substrates derived from immunophilin Fpr3. *J. Biol. Chem.*, 274(41):29260–29265, 1999.

- Matter, H., M. Nazaré, S. Güssregen, D. W. Will, H. Schreuder, A. Bauer, M. Urmann, K. Ritter, M. Wagner und V. Wehner. Evidence for C-Cl/C-Br- π Interactions as an Important Contribution to Protein-Ligand Binding Affinity. *Angew. Chemie Int. Ed.*, 48(16):2911–2916, 2009.
- Matthews, B. W. Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.*, 33(2):491–497, 1968.
- McCoy, A. J., R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni und R. J. Read. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.*, 40(4):658–674, 2007.
- McIlwain, D. R., T. Berger und T. W. Mak. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5(4):1–28, 2013.
- Meggio, F. und L. A. Pinna. Subunit structure and autophosphorylation mechanism of casein kinase-TS (type-2) from rat liver cytosol. *Eur. J. Biochem.*, 145(3):593–599, 1984.
- Meggio, F. und L. A. Pinna. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.*, 17(3):349–368, 2003.
- Meggio, F., A. M. Brunati und L. A. Pinna. Autophosphorylation of type 2 casein kinase TS at both its α - and β -subunits. Influence of different effectors. *FEBS Lett.*, 160(1-2):203–208, 1983.
- Meggio, F., B. Boldyreff, O. Marin, F. Marchiori, J. W. Perich, O.-G. Issinger und L. A. Pinna. The effect of polylysine on casein-kinase-2 activity is influenced by both the structure of the protein/peptide substrates and the subunit composition of the enzyme. *Eur. J. Biochem.*, 205(3):939–945, 1992a.
- Meggio, F., B. Boldyreff, O. Marin, L. A. Pinna und O.-G. Issinger. Role of the β subunit of casein kinase-2 on the stability and specificity of the recombinant reconstituted holoenzyme. *Eur. J. Biochem.*, 204(1):293–297, 1992b.
- Meggio, F., B. Boldyreff, O. G. Issinger und L. A. Pinna. Casein Kinase 2 Down-Regulation and Activation by Polybasic Peptides Are Mediated by Acidic Residues in the 55-64 Region of the P-Subunit . A Study with Calmodulin As Phosphorylatable Substrate. *Biochemistry*, 33:4336–4342, 1994.
- Meneghetti, M. C. Z., A. J. Hughes, T. R. Rudd, H. B. Nader, A. K. Powell, E. A. Yates und M. A. Lima. Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. *J. R. Soc. Interface*, 12(110):1–13, 2015.

- Mentzel, B., E. Jauch und T. Raabe. CK2 β interacts with and regulates p21-activated kinases in *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 379(2):637–642, 2009.
- Messenger, M. M., R. B. Saulnier, A. D. Gilchrist, P. Diamond, G. J. Gorbisky und D. W. Litchfield. Interactions between protein kinase CK2 and Pin1. Evidence for phosphorylation-dependent interactions. *J. Biol. Chem.*, 277(25):23054–23064, 2002.
- Mirzoeva, S., N. D. Kim, K. Chiu, C. A. Franzen, R. C. Bergan und J. C. Pelling. Inhibition of HIF-1 Alpha and VEGF expression by the chemopreventive bioflavonoid apigenin is accompanied by Akt inhibition in human prostate carcinoma PC3-M cells. *Mol. Carcinog.*, 47(9):686–700, 2008.
- Miyata, Y. und E. Nishida. CK2 controls multiple protein kinases by phosphorylating a kinase-targeting molecular chaperone, Cdc37. *Mol. Cell. Biol.*, 24(9):4065–4074, 2004.
- Moriarty, N. W., R. W. Grosse-Kunstleve und P. D. Adams. Electronic ligand builder and optimization workbench (eLBOW): A tool for ligand coordinate and restraint generation. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 65(10):1074–1080, 2009.
- Mukaida, N., Y.-Y. Wang und Y.-Y. Li. Roles of Pim-3, a novel survival kinase, in tumorigenesis. *Cancer Sci.*, 102(8):1437–1442, 2011.
- Nakaniwa, T., T. Kinoshita, Y. Sekiguchi, T. Tada, I. Nakanishi, K. Kitaura, Y. Suzuki, H. Ohno, A. Hirasawa und G. Tsujimoto. Structure of human protein kinase CK2 α 2 with a potent indazole-derivative inhibitor. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 65(2):75–79, 2009.
- Newton, A. C. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem. Rev.*, 101(8):2353–2364, 2001.
- Niefind, K. und R. Battistutta. Substrate recognition: structural basis of the acidophily and correlation to constitutive activity. Pinna, L. A., editor, *Protein Kinase CK2*, Kapitel Structural bases of protein kinase CK2 function and inhibition, Seiten 3–75. John Wiley & Sons, 2013.
- Niefind, K. und O.-G. Issinger. Primary and secondary interactions between CK2 α and CK2 β lead to ring-like structures in the crystals of the CK2 holoenzyme. *Mol. Cell. Biochem.*, 274(1):3–14, 2005.
- Niefind, K., B. Guerra, L. A. Pinna, O.-G. Issinger und D. Schomburg. Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays* at 2.1 Å resolution. *EMBO J.*, 17(9):2451–2462, 1998.

- Niefind, K., M. Pütter, B. Guerra, O.-G. Issinger und D. Schomburg. GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2. *Nat. Struct. Biol.*, 6(12):1100–1103, 1999.
- Niefind, K., B. Guerra, I. Ermakowa und O.-G. Issinger. Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J.*, 20(19):5320–5331, 2001.
- Niefind, K., C. W. Yde, I. Ermakova und O.-G. Issinger. Evolved to be active: Sulfate ions define substrate recognition sites of CK2 α and emphasise its exceptional role within the CMGC family of eukaryotic protein kinases. *J. Mol. Biol.*, 370(3):427–438, 2007.
- Niefind, K., J. Raaf und O.-G. Issinger. Protein kinase CK2: From structures to insights. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66(11):1800–1816, 2009.
- Nolen, B., S. Taylor und G. Ghosh. Regulation of protein kinases: Controlling activity through activation segment conformation. *Mol. Cell*, 15(5):661–675, 2004.
- Nowell, P. C. Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *J. Clin. Invest.*, 117(8):2033–2035, 2007.
- Nowell, P. C. und D. A. Hungerford. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J. Natl. Cancer Inst.*, 25(1):85–109, 1960.
- O'Farrell, F., M. Loog, I. M. Janson und P. Ek. Kinetic study of the inhibition of CK2 by heparin fragments of different length. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, 1433(1-2):68–75, 1999.
- Olsen, B. B., B. Boldyreff, K. Niefind und O.-G. Issinger. Purification and characterization of the CK2 α' -based holoenzyme, an isozyme of CK2 α : a comparative analysis. *Protein Expr. Purif.*, 47(2):651–661, 2006.
- Olson, S. T., H. R. Halvorson und I. Björk. Quantitative characterization of the thrombin-heparin interaction. Discrimination between specific and nonspecific binding models. *J. Biol. Chem.*, 266(10):6342–6352, 1991.
- Olsten, M. E. K. und D. W. Litchfield. Order or chaos? An evaluation of the regulation of protein kinase CK2. *Biochem. Cell Biol.*, 82(6):681–693, 2004.
- Olsten, M. E. K., J. E. Weber und D. W. Litchfield. CK2 interacting proteins: Emerging paradigms for CK2 regulation? *Mol. Cell. Biochem.*, 274(1-2):115–124, 2005.
- Oprea, T. I., A. M. Davis, S. J. Teague und P. D. Leeson. Is there a difference between leads and drugs? a historical perspective. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 41(5):1308–1315, 2001.

- Pagano, M. A., F. Meggio, M. Ruzzene, M. Andrzejewska, Z. Kazimierczuk und L. A. Pinna. 2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole: a novel powerful and selective inhibitor of protein kinase CK2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 321(4): 1040–1044, 2004.
- Pagano, M. A., S. Sarno, G. Poletto, G. Cozza, L. A. Pinna und F. Meggio. Auto-phosphorylation at the regulatory β subunit reflects the supramolecular organization of protein kinase CK2. *Mol. Cell. Biochem.*, 274(1-2):23–29, 2005.
- Pagano, M. A., L. Cesaro, F. Meggio und L. A. Pinna. Protein kinase CK2: a newcomer in the 'druggable kinome'. *Biochem. Soc. Trans.*, 34(6):1303–1306, 2006.
- Pantoliano, M. W., R. F. Bone, A. W. Rhind und F. R. Salemme. Microplate thermal shift assay apparatus for ligand development and multi-variable protein chemistry optimization, 2000.
- Pantoliano, M. W., E. C. Petrella, J. D. Kwasnoski, V. S. Lobanov, J. Myslik, E. Graf, T. Carver, E. Asel, B. A. Springer, P. Lane und F. R. Salemme. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J. Biomol. Screen. Off. J. Soc. Biomol. Screen.*, 6(6):429–440, 2001.
- Papinutto, E., A. Ranchio, G. Lolli, L. A. Pinna und R. Battistutta. Structural and functional analysis of the flexible regions of the catalytic α -subunit of protein kinase CK2. *J. Struct. Biol.*, 177(2):382–391, 2012.
- Pargellis, C., L. Tong, L. Churchill, P. F. Cirillo, T. Gilmore, A. G. Graham, P. M. Grob, E. R. Hickey, N. Moss, S. Pav und J. Regan. Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nat. Struct. Biol.*, 9(4):268–272, 2002.
- Patterson, A. L. A fourier series method for the determination of the components of interatomic distances in crystals. *Phys. Rev.*, 46(5):372–376, 1934.
- Pavletich, N. P. Mechanisms of Cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their Cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J. Mol. Biol.*, 287(5):821–828, 1999.
- Perea, S. E., O. Reyes, Y. Puchades, O. Mendoza, N. S. Vispo, I. Torrens, A. Santos, R. Silva, B. Acevedo, E. López, V. Falcón und D. F. Alonso. Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide that impairs the phosphorylation by the protein kinase 2 (casein kinase 2). *Cancer Res.*, 64(19):7127–7129, 2004.
- Perea, S. E., O. Reyes, I. Baladron, Y. Perera, H. Farina, J. Gil, A. Rodriguez, D. Bacardi, J. L. Marcelo, K. Cosme, M. Cruz, C. Valenzuela, P. A. López-Saura, Y. Puchades,

- J. M. Serrano, O. Mendoza, L. Castellanos, A. Sanchez, L. Betancourt, V. Besada, R. Silva, E. López, V. Falcón, I. Hernández, M. Solares, A. Santana, A. Díaz, T. Ramos, C. López, J. Ariosa, L. J. González, H. Garay, D. Gómez, R. Gómez, D. F. Alonso, H. Sigman, L. Herrera und B. Acevedo. CIGB-300, a novel proapoptotic peptide that impairs the CK2 phosphorylation and exhibits anticancer properties both in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Biochem.*, 316(1-2):163–167, 2008.
- Perea, S. E., I. Baladron, Y. Garcia, Y. Perera, A. Lopez, J. L. Soriano, N. Batista, A. Palau, I. Hernández, H. Farina, I. Garcia, L. Gonzalez, J. Gil, A. Rodriguez, M. Solares, A. Santana, M. Cruz, M. Lopez, C. Valenzuela, O. Reyes, P. A. López-Saura, C. A. González, A. Diaz, L. Castellanos, A. Sanchez, L. Betancourt, V. Besada, L. J. González, H. Garay, R. Gómez, D. E. Gómez, D. F. Alonso, P. Perrin, J.-Y. Renualt, H. Sigman, L. Herrera und B. Acevedo. CIGB-300, a synthetic peptide-based drug that targets the CK2 phosphoacceptor domain. Translational and clinical research. *Mol. Cell. Biochem.*, 356(1-2):45–50, 2011.
- Perera, Y., H. G. Farina, I. Hernández, O. Mendoza, J. M. Serrano, O. Reyes, D. E. Gómez, R. E. Gómez, B. E. Acevedo, D. F. Alonso und S. E. Perea. Systemic administration of a peptide that impairs the protein kinase (CK2) phosphorylation reduces solid tumor growth in mice. *Int. J. Cancer*, 122(1):57–62, 2008.
- Perera, Y., N. Del Toro, L. Gorovaya, J. Fernandez-De-Cossio, H. G. Farina und S. E. Perea. Synergistic interactions of the anti-casein kinase 2 CIGB-300 peptide and chemotherapeutic agents in lung and cervical preclinical cancer models. *Mol. Clin. Oncol.*, 2(6):935–944, 2014.
- Pérez, J., A. Castañeda-García, H. Jenke-Kodama, R. Müller und J. Muñoz-Dorado. Eukaryotic-like protein kinases in the prokaryotes and the myxobacterial kinome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105(41):15950–15955, 2008.
- Pfankuchen, D. B., D. P. Stölting, M. Schlesinger, H.-D. Royer und G. Bendas. Low molecular weight heparin tinzaparin antagonizes cisplatin resistance of ovarian cancer cells. *Biochem. Pharmacol.*, 97(2):147–157, 2015.
- Pierre, F., P. C. Chua, S. E. O'Brien, A. Siddiqui-Jain, P. Bourbon, M. Haddach, J. Michaux, J. Nagasawa, M. K. Schwaebe, E. Stefan, A. Vialettes, J. P. Whitten, T. K. Chen, L. Darjania, R. Stansfield, K. Anderes, J. Bliesath, D. Drygin, C. Ho, M. Omori, C. Proffitt, N. Streiner, K. Trent, W. G. Rice und D. M. Ryckman. 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. *J. Med. Chem.*, 54(2):635–654, 2011a.

- Pierre, F., P. C. Chua, S. E. O'Brien, A. Siddiqui-Jain, P. Bourbon, M. Haddach, J. Michaux, J. Nagasawa, M. K. Schwaebe, E. Stefan, A. Vialettes, J. P. Whitten, T. K. Chen, L. Darjanian, R. Stansfield, J. Bliesath, D. Drygin, C. Ho, M. Omori, C. Proffitt, N. Streiner, W. G. Rice, D. M. Ryckman und K. Anderes. Pre-clinical characterization of CX-4945, a potent and selective small molecule inhibitor of CK2 for the treatment of cancer. *Mol. Cell. Biochem.*, 356(1-2):37–43, 2011b.
- Pinna, L. A. Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 1054:267–284, 1990.
- Pinna, L. A. The raison d'être of constitutively active protein kinases: the lesson of CK2. *Acc. Chem. Res.*, 36(6):378–384, 2003.
- Pinna, L. A. *Protein kinase CK2*. John Wiley & Sons, 2013.
- Pinna, L. A. und M. Ruzzene. How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 1314(3):191–255, 1996.
- Poletto, G., J. Vilardell, O. Marin, M. A. Pagano, G. Cozza, S. Sarno, A. Falqués, E. Itarte, L. A. Pinna und F. Meggio. The regulatory β subunit of protein kinase CK2 contributes to the recognition of the substrate consensus sequence. A study with an eIF2 β -derived peptide. *Biochemistry*, 47(32):8317–8325, 2008.
- Poole, A., T. Poore, S. Bandhakavi, R. O. McCann, D. E. Hanna und C. V. C. Glover. A global view of CK2 function and regulation. *Mol. Cell. Biochem.*, 274(1-2):163–170, 2005.
- Raaf, J. *Molekulare Interaktionen der Proteinkinase CK2 und ihrer Untereinheiten*. PhD thesis, Universität zu Köln, 2009.
- Raaf, J., E. Brunstein, O.-G. Issinger und K. Niefind. The CK2 α /CK2 β interface of human protein kinase CK2 harbors a binding pocket for small molecules. *Chem. Biol.*, 15(2):111–117, 2008a.
- Raaf, J., E. Brunstein, O.-G. Issinger und K. Niefind. The interaction of CK2 α and CK2 β , the subunits of protein kinase CK2, requires CK2 β in a preformed conformation and is enthalpically driven. *Protein Sci.*, 17(12):2180–2186, 2008b.
- Raaf, J., K. Klopffleisch, O.-G. Issinger und K. Niefind. The catalytic subunit of human protein kinase CK2 structurally deviates from its maize homologue in complex with the nucleotide competitive inhibitor emodin. *J. Mol. Biol.*, 377(1):1–8, 2008c.

- Raaf, J., N. Bischoff, K. Klopffleisch, E. Brunstein, B. B. Olsen, G. Vilks, D. W. Litchfield, O. G. Issinger und K. Niefind. Interaction between CK2 α and CK2 β , the subunits of protein kinase CK2: Thermodynamic contributions of key residues on the CK2 α surface. *Biochemistry*, 50:512–522, 2011.
- Raaf, J., B. Guerra, I. Neundorff, B. Bopp, O.-G. Issinger, J. Jose, M. Pietsch und K. Niefind. First structure of protein kinase CK2 catalytic subunit with an effective CK2 β -competitive ligand. *ACS Chem. Biol.*, 8(5):901–907, 2013.
- Rabenstein, D. L. Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat. Prod. Rep.*, 19(3):312–331, 2002.
- Raingeaud, J., S. Gupta, J. S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R. J. Ulevitch und R. J. Davis. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 Mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.*, 270(13):7420–7426, 1995.
- Rasmussen, T., I. H. E. Skjøth, H. H. Jensen, K. Niefind, B. Boldyreff und O.-G. Issinger. Biochemical characterization of the recombinant human Drosophila homologues Timekeeper and Andante involved in the Drosophila circadian oscillator. *Mol. Cell. Biochem.*, 274(1-2):151–161, 2005.
- Ravelli, R. B. G., H.-K. S. Leiros, B. Pan, M. Caffrey und S. McSweeney. Specific radiation damage can be used to solve macromolecular crystal structures. *Structure*, 11(2):217–224, 2003.
- Rekha, N. und N. Srinivasan. Structural basis of regulation and substrate specificity of protein kinase CK2 deduced from the modeling of protein-protein interactions. *BMC Struct. Biol.*, 3:4–16, 2003.
- Ren, R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat. Rev. Cancer*, 5(3):172–183, 2005.
- Riman, S., R. Rizkallah, A. Kassardjian, K. E. Alexander, B. Lüscher und M. M. Hurt. Phosphorylation of the transcription factor YY1 by CK2 α prevents cleavage by caspase 7 during apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, 32(4):797–807, 2012.
- Robitzki, A., L. Bodenbach, H. Voss und W. Pyerin. Human casein kinase II. The subunit α protein activates transcription of the subunit β gene. *J. Biol. Chem.*, 268(8):5694–5702, 1993.
- Rodnight, R. und B. E. Lavin. Phosphatase kinase from brain: activation by ions and subcellular distribution. *Biochem. J.*, 93(1):84–91, 1964.

- Rose, K. M., L. E. Bell, D. A. Siefken und S. T. Jacob. A heparin-sensitive nuclear protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 256(14):7468–7477, 1981.
- Rosenberg, B. Platinum coordination complexes in cancer chemotherapy. *Naturwissenschaften*, 60(9):399–406, 1973.
- Rupp, B. *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology*. Garland Science, New York, 1st edition, 2009.
- Sarno, S., O. Marin, F. Meggio und L. A. Pinna. Polyamines as negative regulators of casein kinase-2: The phosphorylation of calmodulin triggered by polylysine and by the α [66-86] peptide is prevented by spermine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194(1):83–90, 1993.
- Sarno, S., B. Boldyreff, O. Marin, B. Guerra, F. Meggio, O.-G. Issinger und L. A. Pinna. Mapping the residues of protein kinase CK2 implicated in substrate recognition: mutagenesis of conserved basic residues in the α -subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 206(1):171–179, 1995.
- Sarno, S., P. Vaglio, F. Meggio, O.-G. Issinger und L. A. Pinna. Protein kinase CK2 mutants defective in substrate recognition. Purification and kinetic analysis. *J. Biol. Chem.*, 271(18):10595–10601, 1996.
- Sarno, S., P. Vaglio, O. Marin, O.-G. Issinger, K. Ruffato und L. A. Pinna. Mutational analysis of residues implicated in the interaction between protein kinase CK2 and peptide substrates. *Biochemistry*, 36(39):11717–11724, 1997a.
- Sarno, S., P. Vaglio, O. Marin, F. Meggio, O.-G. Issinger und L. A. Pinna. Basic residues in the 74-83 and 191-198 segments of protein kinase CK2 catalytic subunit are implicated in negative but not in positive regulation by the β -subunit. *Eur. J. Biochem.*, 248(2):290–295, 1997b.
- Sarno, S., H. Reddy, F. Meggio, M. Ruzzene, S. P. Davies, A. Donella-Deana, D. Shugar und L. A. Pinna. Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett.*, 496(1):44–48, 2001.
- Sarno, S., P. Ghisellini und L. A. Pinna. Unique activation mechanism of protein kinase CK2. The N-terminal segment is essential for constitutive activity of the catalytic subunit but not of the holoenzyme. *J. Biol. Chem.*, 277(25):22509–22514, 2002a.
- Sarno, S., S. Moro, F. Meggio, G. Zagotto, D. Dal Ben, P. Ghisellini, R. Battistutta, G. Zanotti und L. A. Pinna. Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors. *Pharmacol. Ther.*, 93(2-3):159–168, 2002b.

- Sarno, S., E. Papinutto, C. Franchin, J. Bain, M. Elliott, F. Meggio, Z. Kazimierczuk, A. Orzeszko, G. Zanotti, R. Battistutta und L. A. Pinna. ATP site-directed inhibitors of protein kinase CK2: an update. *Curr. Top. Med. Chem.*, 11(11):1340–1351, 2011.
- Sarno, S., M. Mazzorana, R. Traynor, M. Ruzzene, G. Cozza, M. A. Pagano, F. Meggio, G. Zagotto, R. Battistutta und L. A. Pinna. Structural features underlying the selectivity of the kinase inhibitors NBC and dNBC: Role of a nitro group that discriminates between CK2 and DYRK1A. *Cell. Mol. Life Sci.*, 69(3):449–460, 2012.
- Schindler, T., W. Bornmann, P. Pellicena, W. T. Miller, B. Clarkson und J. Kuriyan. Structural mechanism for STI-571 inhibition of Abelson tyrosine kinase. *Science*, 289(5486):1938–1942, 2000.
- Schnitzler, A., B. B. Olsen, O.-G. Issinger und K. Niefind. The protein kinase CK2^{Andante} holoenzyme structure supports proposed models of autoregulation and trans-autophosphorylation. *J. Mol. Biol.*, 426(9):1871–1882, 2014.
- Schrodinger LLC, . The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1, 2010.
- Schüttelkopf, A. W. und D. M. F. van Aalten. PRODRG: A tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 60(8):1355–1363, 2004.
- Senhwa Biosciences, . Study of CX-4945 in Combination With Gemcitabine and Cisplatin for Frontline Treatment of Cholangiocarcinoma. Technical report, Senhwa Biosciences Inc., 2015.
- Shin, S., Y. Lee, W. Kim, H. Ko, H. Choi und K. Kim. Caspase-2 primes cancer cells for TRAIL-mediated apoptosis by processing procaspase-8. *EMBO J.*, 24(20):3532–3542, 2005.
- Siddiqui-Jain, A., D. Drygin, N. Streiner, P. Chua, F. Pierre, S. E. O'Brien, J. Bliesath, M. Omori, N. Huser, C. Ho, C. Proffitt, M. K. Schwaebe, D. M. Ryckman, W. G. Rice und K. Anderes. CX-4945, an orally bioavailable selective inhibitor of protein kinase CK2, inhibits prosurvival and angiogenic signaling and exhibits antitumor efficacy. *Cancer Res.*, 70(24):10288–10298, 2010.
- Slabinski, L., L. Jaroszewski, L. Rychlewski, I. A. Wilson, S. A. Lesley und A. Godzik. XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinformatics*, 23(24):3403–3405, 2007.
- Solares, A. M., A. Santana, I. Baladrón, C. Valenzuela, C. A. González, A. Díaz, D. Castillo, T. Ramos, R. Gómez, D. F. Alonso, L. Herrera, H. Sigman, S. E. Perea, B. E.

- Acevedo und P. López-Saura. Safety and preliminary efficacy data of a novel casein kinase 2 (CK2) peptide inhibitor administered intralesionally at four dose levels in patients with cervical malignancies. *BMC Cancer*, 9:146, 2009.
- St-Denis, N., M. Gabriel, J. P. Turowec, G. B. Gloor, S. S.-C. Li, A.-C. Gingras und D. W. Litchfield. Systematic investigation of hierarchical phosphorylation by protein kinase CK2. *J. Proteomics*, 118:49–62, 2014.
- St-Denis, N. A., D. R. Derksen und D. W. Litchfield. Evidence for regulation of mitotic progression through temporal phosphorylation and dephosphorylation of CK2 α . *Mol. Cell. Biol.*, 29(8):2068–2081, 2009.
- St-Denis, N. A., M. L. Bailey, E. L. Parker, G. Vilks und D. W. Litchfield. Localization of phosphorylated CK2 α to the mitotic spindle requires the peptidyl-prolyl isomerase Pin1. *J. Cell Sci.*, 124(14):2341–2348, 2011.
- Swider, R., M. Mastyk, J. M. Zapico, C. Coderch, R. Panchuk, N. Skorokhyd, A. Schnitzler, K. Niefind, B. de Pascual-Teresa und A. Ramos. Synthesis, biological activity and structural study of new benzotriazole-based protein kinase CK2 inhibitors. *RSC Adv.*, 5(89):72482–72494, 2015.
- Taylor, G. L. Introduction to phasing. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 66(4):325–338, 2010.
- Taylor, S. S. und A. P. Kornev. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 36(2):65–77, 2011.
- Taylor, S. S., R. Ilouz, P. Zhang und A. P. Kornev. Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 13(10):646–658, 2012a.
- Taylor, S. S., M. M. Keshwani, J. M. Steichen und A. P. Kornev. Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 367(1602):2517–2528, 2012b.
- Terwilliger, T. C., R. W. Grosse-Kunstleve, P. V. Afonine, N. W. Moriarty, P. H. Zwart, L.-W. Hung, R. J. Read und P. D. Adams. Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 64(1):61–69, 2008.
- Terwilliger, T. C., P. D. Adams, R. J. Read, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. W. Grosse-Kunstleve, P. V. Afonine, P. H. Zwart und L.-W. Hung. Decision-making in structure solution using bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 65(6):582–601, 2009.

- Torres, J., J. Rodriguez, M. P. Myers, M. Valiente, J. D. Graves, N. K. Tonks und R. Pulido. Phosphorylation-regulated cleavage of the tumor suppressor PTEN by caspase-3. Implications for the control of protein stability and PTEN-protein interactions. *J. Biol. Chem.*, 278(33):30652–30660, 2003.
- Traxler, P. und P. Furet. Strategies toward the design of novel and selective protein tyrosine kinase inhibitors. *Pharmacol. Ther.*, 82(2-3):195–206, 1999.
- Treiber, D. K. und N. P. Shah. Ins and outs of kinase DFG motifs. *Chem. Biol.*, 20(6):745–746, 2013.
- Turnbull, J., A. Powell und S. Guimond. Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol.*, 11(2):75–82, 2001.
- Turowec, J. P., J. S. Duncan, G. B. Gloor und D. W. Litchfield. Regulation of caspase pathways by protein kinase CK2: identification of proteins with overlapping CK2 and caspase consensus motifs. *Mol. Cell. Biochem.*, 356(1-2):159–167, 2011.
- Turowec, J. P., G. Vilks, M. Gabriel und D. W. Litchfield. Characterizing the convergence of protein kinase CK2 and caspase-3 reveals isoform-specific phosphorylation of caspase-3 by CK2 α' : implications for pathological roles of CK2 in promoting cancer cell survival. *Oncotarget*, 4(4):560–571, 2013.
- Ubersax, J. A. und J. E. Ferrell Jr. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8(7):530–541, 2007.
- Vaglio, P., S. Sarno, O. Marin, F. Meggio, O.-G. Issinger und L. A. Pinna. Mapping the residues of protein kinase CK2 α subunit responsible for responsiveness to polyanionic inhibitors. *FEBS Lett.*, 380(1):25–28, 1996.
- Valero, E., S. De Bonis, O. Filhol, R. H. Wade, J. Langowski, E. M. Chambaz und C. Cochet. Quaternary structure of casein kinase 2. Characterization of multiple oligomeric states and relation with its catalytic activity. *J. Biol. Chem.*, 270(14):8345–8352, 1995.
- Vilks, G., J. E. Weber, J. P. Turowec, J. S. Duncan, C. Wu, D. R. Derksen, P. Zien, S. Sarno, A. Donella-Deana, G. Lajoie, L. A. Pinna, S. S. C. Li und D. W. Litchfield. Protein kinase CK2 catalyzes tyrosine phosphorylation in mammalian cells. *Cell. Signal.*, 20(11):1942–1951, 2008.
- Vulpetti, A. und R. Bosotti. Sequence and structural analysis of kinase ATP pocket residues. *Farmacol.*, 59(10):759–765, 2004.

- Wang, Zeping, Nandini Bhattacharya, Philip F Mixer, Wenyi Wei, John Sedivy und Nancy S Magnuson. Phosphorylation of the cell cycle inhibitor p21 Cip1 / WAF1 by Pim-1 kinase. *Biochem. Biophys. Acta*, 1593:45–55, 2002.
- Weiss, M. S. und R. Hilgenfeld. On the use of the merging R factor as a quality indicator for X-ray data. *J. Appl. Crystallogr.*, 30(2):203–205, 1997.
- Welker, S., C. Servas, M. Rui, C. Götz und M. Montenarh. Tissue-specific functions and regulation of protein kinase CK2. Ahmed, K., O.-G. Issinger und R. Szyszka, editors, *Protein kinase CK2 Cell. Funct. Norm. Dis. state*, Seiten 109–124. Springer International Publishing AG, 2015.
- Wilson, L. K., N. Dhillon, J. Thorner und G. S. Martin. Casein kinase II catalyzes tyrosine phosphorylation of the yeast nucleolar immunophilin Fpr3. *J. Biol. Chem.*, 272(20):12961–12967, 1997.
- Winn, M. D., C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. W. Leslie, A. McCoy, S. J. McNicholas, G. N. Murshudov, N. S. Pannu, E. A. Potterton, H. R. Powell, R. J. Read, A. Vagin und K. S. Wilson. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 67(4):235–242, 2011.
- Xu, D. und J. D. Esko. Demystifying heparan sulfate-protein interactions. *Annu. Rev. Biochem.*, 83(1):129–157, 2014.
- Xu, X., P. A. Toselli, L. D. Russell und D. C. Seldin. Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II α' catalytic subunit. *Nat. Genet.*, 23(1):118–121, 1999.
- Yde, C. W., I. Ermakova, O.-G. Issinger und K. Niefind. Inclining the purine base binding plane in protein kinase CK2 by exchanging the flanking side-chains generates a preference for ATP as a cosubstrate. *J. Mol. Biol.*, 347(2):399–414, 2005.
- Yim, H., Y. H. Lee, C. H. Lee und S. K. Lee. Emodin, an anthraquinone derivative isolated from the rhizomes of *Rheum palmatum*, selectively inhibits the activity of casein kinase II as a competitive inhibitor. *Planta Med.*, 65(1):9–13, 1999.
- Zandomeni, R., M. C. Zandomeni, D. Shugar und R. Weinmann. Casein kinase type II is involved in the inhibition by 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole of specific RNA polymerase II transcription. *J. Biol. Chem.*, 261(7):3414–3419, 1986.
- Zhang, F., B. Liu, Z. Wang, X.-J. Yu, Q.-X. Ni, W.-T. Yang, N. Mukaida und Y.-Y. Li. A novel regulatory mechanism of Pim-3 kinase stability and its involvement in pancreatic cancer progression. *Mol. Cancer Res.*, 11(12):1508–1520, 2013.

- Zheng, J., E. A. Trafny, D. R. Knighton, N.-H. Xuong, S. S. Taylor, L. F. Ten Eyck und J. M. Sowadski. 2.2 Å refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 49(3):362–365, 1993.
- Zień, P., O. Abramczyk, K. Domańska, M. Bretner und R. Szyszka. TBBz but not TBBt discriminates between two molecular forms of CK2 in vivo and its implications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 312(3):623–628, 2003.
- Zien, P., J. S. Duncan, J. Skierski, M. Bretner, D. W. Litchfield und D. Shugar. Tetrabromobenzotriazole (TBBt) and tetrabromobenzimidazole (TBBz) as selective inhibitors of protein kinase CK2: evaluation of their effects on cells and different molecular forms of human CK2. *Biochim. Biophys. Acta*, 1754(1-2):271–280, 2005.
- Zulauf, M. und A. D'Arcy. Light scattering of proteins as a criterion for crystallization. *J. Cryst. Growth*, 122(1-4):102–106, 1992.

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 Seite II 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 Prof. Dr. Karsten Niefind betreut worden.

Düren, 16.01.2016

.....
Ort, Datum

.....
Alexander Schnitzler