

Molekulare Interaktionen der Proteinkinase CK2 und ihrer Untereinheiten

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Jennifer Raaf

aus Frechen

Köln

2009

Berichtersteller:

PD Dr. Karsten Niefind

Prof. Dr. Günter Schwarz

Tag der letzten mündlichen Prüfung:

25. Juni 2009

Danksagung

Ich möchte allen danken, die mich während meiner Arbeit unterstützt haben und in direkter oder indirekter Weise dazu beigetragen haben:

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Karsten Niefind für die Bereitstellung des interessanten Themas, die exzellente Betreuung und all die Dinge die ich während meiner Arbeit lernen durfte.

Bei Herrn Prof. Dr. Günter Schwarz bedanke ich mich für Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Issinger möchte ich mich für die gute Kooperation und das angenehme Arbeitsklima in seiner Arbeitsgruppe bedanken und außerdem dafür, dass er und seine Frau, Dr. Brigitte Boldyreff, bei Kurzaufenthalten immer ein Gästezimmer frei hatten.

Frau Elena Brunstein danke ich für ihre große Hilfe im Labor und ihre Geduld, v.a. mit den widerspenstigen FPLCs.

Frau Dr. Birgitte Brinkmann Olsen möchte ich für die gute Betreuung in Dänemark und die Hilfe bei den molekularbiologischen Arbeiten bedanken.

Frau Sabine Lohmer möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft danken und dafür, dass sie immer da war, um Fragen zu beantworten.

Herrn Michael Zimmermann danke ich für seine Hilfe und seinen Beistand bei Computerproblemen.

Den Mitarbeitern am DESY in Hamburg und am BESSY in Berlin möchte ich für die Unterstützung bei den Röntgendiffraktionsmessungen danken.

Nils Bischoff, Katrin Fischer, Astrid Höppner, Karsten Klopffleisch, Svena Lüdke, Ines Ochrombel, Sonia Pal, Nicole Splett, Jana Spura, Christine Tölzer und Stephan Wagner möchte ich für die nette Arbeitsatmosphäre danken.

Ganz besonderer Dank gilt auch meinen Eltern und Toby, die mich während der ganzen Zeit unterstützt und ermutigt haben. Auch meiner Oma möchte ich dafür danken, dass sie für mich da war.

Ich möchte mich auch bei all meinen Freunden bedanken, besonders bei Nicole Wördemann, die neben Nils Bischoff und Stephan Wagner, große Teile dieser Arbeit korrigiert hat.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung und Abstract.....	1
1.1 Zusammenfassung – Molekulare Interaktionen der Proteinkinase CK2 und ihrer Untereinheiten.....	1
1.2 Abstract – Molecular interactions of protein kinase CK2 and its subunits.....	4
1.3 Veröffentlichungen.....	6
2. Einleitung.....	7
2.1 Protein-Protein-Wechselwirkungen.....	7
2.2 Proteinkinasen und ihre Interaktionen mit anderen Molekülen.....	11
2.2.1 Bedeutung von Proteinkinasen	11
2.2.2 Strukturelle Grundlagen der Regulation von EPKs.....	12
2.2.3 Protein-Protein-Wechselwirkungen bei eukaryontischen Proteinkinasen.....	14
2.2.4 Proteinkinaseinhibitoren.....	15
2.2.5 Proteinkinase CK2 und ihre Besonderheiten.....	18
2.3 Zielsetzungen.....	22
3. Theoretische Grundlagen	24
3.1 Röntgenkristallographie – ein Blick auf die Struktur von Proteinen.....	24
3.1.1 Proteinkristallisation.....	24
3.1.2 <i>Cryo</i> -Bedingungen.....	25
3.1.3 Röntgendiffraktometrie.....	26
3.1.3.1 Erzeugung von Röntgenstrahlung.....	26
3.1.3.2 Kristallographische Grundbegriffe.....	26
3.1.3.3 Reziprokes Gitter und Ewaldkonstruktion.....	28
3.1.3.4 Fouriertransformation und Phasenproblem.....	30
3.1.3.5 Das Röntgendiffraktionsexperiment.....	31
3.1.4 Auswertung der Diffraktionsdaten.....	32
3.1.4.1 Prozessierung, Skalierung und Reduktion kristallographischer Daten.....	32
3.1.4.2 Packungsdichte und Anzahl der Protomere pro asymmetrischer Einheit.....	32
3.1.4.3 Patterson-Funktion.....	33
3.1.4.4 Phasenbestimmung durch molekularen Ersatz.....	33
3.1.4.5 Substruktur- und Phasenbestimmung mit Hilfe der anomalen Dispersion.....	33
3.1.4.6 Verfeinerung.....	37
3.1.4.7 Qualitätskriterien.....	37

3.2 Kalorimetrie – Zugang zu Stabilitäts- und Bindungseigenschaften von Proteinen	39
3.2.1 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC).....	39
3.2.2 Differentialrasterkalorimetrie (DSC).....	42
4. Material und Methoden.....	44
4.1 Verwendete Materialien, Geräte und EDV-Systeme.....	44
4.1.1 Chemikalien.....	44
4.1.2 Materialien, Geräte und EDV-Systeme.....	44
4.2 Puffer und Lösungen.....	47
4.2.1 LB-Medium (Luria-Bertani-Medium).....	47
4.2.2 SOC-Medium.....	47
4.2.3 TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer).....	47
4.2.4 50-fach TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer).....	47
4.3 Molekularbiologische Methoden.....	48
4.3.1 Verwendete Bakterienstämme.....	48
4.3.2 Expressionsvektor.....	48
4.3.3 Verwendete Oligonucleotide	49
4.3.4 Polymerasekettenreaktion zur Amplifizierung von Teilen des <i>hsCK2α</i> -Gens.....	49
4.3.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	50
4.3.6 Reinigung der PCR-Produkte.....	51
4.3.7 Schneiden der PCR-Produkte und des leeren Expressionsvektors pT7-7.....	51
4.3.8 Extraktion der DNA aus einem präparativen Agarose-Gel.....	51
4.3.9 Dephosphorylierung des geschnittenen Expressionsvektors pT7-7.....	52
4.3.10 Ligation der PCR-Produkte mit dem Expressionsvektor pT7-7.....	52
4.3.11 Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	52
4.3.12 Kolonie-PCR.....	52
4.3.13 <i>Annealing</i> von Oligonucleotiden zur Klonierung des C-Terminus von <i>hsCK2α'</i>	53
4.3.14 Schneiden des Vektors pT7-7 mit <i>hsCK2α¹⁻³²⁶</i> zur Ligation mit dem C-Terminus von <i>hsCK2α'</i>	54
4.3.15 Ligation des Vektors pT7-7 mit <i>hsCK2α¹⁻³²⁶</i> mit dem C-Terminus von <i>hsCK2α'</i>	54
4.3.16 Ortsgerichtete Mutagenese des <i>hsCK2α</i> -Gens.....	55
4.3.17 Plasmidpräparation im 1,5 ml Maßstab.....	56
4.3.18 Restriktionsanalyse.....	56
4.3.19 Sequenzierung.....	56
4.3.19.1 PCR der zu sequenzierenden DNA.....	56
4.3.19.2 DNA-Konzentrierung für die Sequenzierung.....	57

4.4 Proteinbiochemische Methoden.....	57
4.4.1 Rekombinante Expression von <i>hsCK2α</i> -Varianten im 5 ml Maßstab.....	57
4.4.2 Rekombinante Expression <i>hsCK2α</i> - und <i>hsCK2β</i> -Varianten im 9 l Maßstab.....	58
4.4.3 Zellaufschluss.....	58
4.5 Chromatographische Methoden.....	59
4.5.1 Kationenaustausch/Affinitäts-Chromatographie mit P11-Cellulose.....	59
4.5.2 Affinitäts-Chromatographie mit Heparin	59
4.5.3 Kationenaustausch-Chromatographie mit Sepharose Q.....	59
4.5.4 Gel-Permeations-Chromatographie.....	60
4.5.5 Konzentrierung der Proteine durch Ultrazentrifugation.....	60
4.6 Proteinanalytische Methoden.....	60
4.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	60
4.6.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	60
4.6.3 MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	61
4.6.4 Gekoppelter Aktivitätstest.....	61
4.7 Kristallographische Studien.....	62
4.7.1 Allgemeine Vorgehensweise.....	62
4.7.2 Co-Kristallisation.....	62
4.7.2.1 <i>hsCK2α</i> ¹⁻³³⁵ mit Emodin.....	63
4.7.2.2 <i>hsCK2α</i> ¹⁻³³⁵ mit DRB.....	63
4.7.2.3 <i>hsCK2α</i> ¹⁻³³⁵ mit Glycerin.....	63
4.8 Röntgendiffraktometrie.....	63
4.8.1 Kristallmontage.....	63
4.8.2 Diffraktionsexperimente.....	64
4.8.3 Datenreduktion.....	64
4.8.4 Strukturlösung	64
4.8.4.1 Molekularer Ersatz.....	64
4.8.5 <i>Ab initio</i> Strukturlösung und Substrukturlösung mit SAD.....	64
4.9 Kalorimetrische Studien.....	65
4.9.1 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC).....	65
4.9.2 Differentialrasterkalorimetrie (DSC).....	65
5. Ergebnisse.....	67
5.1 Expression und Reinigung.....	67
5.1.1 Expression und Reinigung der <i>hsCK2α</i> -Varianten.....	67
5.1.2 Reinigung der <i>hsCK2β</i> -Varianten.....	69

5.1.3	Reinigung der CK2-Holoenzym-Varianten.....	70
5.2	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	71
5.3	Kristallisation und Röntgendiffraktometrie.....	73
5.3.1	Komplexstruktur von <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> und Emodin.....	73
5.3.2	Komplexstruktur von <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> und DRB.....	76
5.3.2.1	Substrukturlösung mit anomaler Fouriersynthese.....	78
5.3.2.2	Ab initio-Strukturlösung mit SAS.....	79
5.3.3	Komplexstruktur von <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> und Glycerin.....	80
5.4	Kalorimetrie.....	84
5.4.1	Isothermale Titrationskalorimetrie.....	84
5.4.1.1	Thermodynamisches Profil der <i>hsCK2α/hsCK2β</i> -Interaktion.....	84
5.4.1.2	Thermodynamisches Profil der Interaktion von <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> -Punktmutanten und <i>hsCK2β¹⁻¹⁹³</i>	86
5.4.2	Differentialrasterkalorimetrie.....	88
5.4.2.1	Stabilitätseigenschaften von verschiedenen <i>hsCK2</i> -Holoenzymvarianten und deren Untereinheiten.....	88
5.4.2.2	Stabilitätseigenschaften der <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> -Punktmutanten.....	90
5.4.2.3	DSC zum Nachweis des Einflusses von DRB auf die <i>CK2α/CK2β</i> -Interaktion....	91
5.5	Enzymkinetische Messungen.....	92
5.5.1	Kinetische Parameter der <i>CK2α</i> - und <i>CK2</i> -Holoenzym-Varianten.....	92
5.5.2	Inhibitionskinetik mit DRB.....	94
6.	Diskussion.....	97
6.1	Der <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> /Emodin-Komplex.....	97
6.2	Der <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> /DRB-Komplex.....	101
6.2.1	DRB hat einen dualen Bindungsmodus.....	101
6.2.2	Aufklärung der Chlor- und Schwefelsubstruktur des <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> /DRB-Komplexes....	105
6.2.2.1	Die Schwefelsubstruktur des <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> /DRB-Komplexes.....	107
6.2.2.2	Die Chlorsubstruktur des <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> /DRB-Komplexes.....	107
6.3	Der <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> /Glycerin-Komplex.....	112
6.3.1	Bildet <i>hsCK2α</i> Dimere?.....	112
6.3.2	Humane <i>CK2α</i> kann eine inaktive Konformation annehmen.....	113
6.3.3	Hypothese zur Regulation von <i>CK2α</i>	116
6.4	Hinweise für eine größere Plastizität der humanen <i>CK2α</i> gegenüber dem Maishomolog....	118
6.5	Die <i>CK2α/CK2β</i> -Interaktion.....	121

6.5.1 Thermodynamische und strukturelle Charakteristika der <i>hsCK2α/hsCK2β</i> -Interaktion.....	121
6.5.2 Thermodynamische Beiträge von Schlüsselresten der <i>hsCK2α/hsCK2β</i> -Interaktion...123	
6.6 Charakterisierung der verschiedenen <i>hsCK2α</i> - und <i>hsCK2</i> -Holoenzym-Varianten.....	126
7. Ausblick	128
8. Literaturverzeichnis.....	132
9. Anhang.....	142
9.1 Thermodynamische Größen aus den ITC-Messungen.....	142
9.2 Entfaltungstemperaturen aus den DSC-Messungen.....	143
Erklärung.....	144
Lebenslauf.....	145

Abbildungsverzeichnis

Zum Zeichnen der Strukturabbildungen wurden folgende Graphikprogramme verwendet:

* BOBSRIPT [1]/Raster3D [2]

** PyMol [3]

*** BRAGI [4]

Abbildung 2.1: Molekulare Erkennungsmechanismen von Proteinen.....	10
Abbildung 2.2: Humanes Kinom.....	12
Abbildung 2.3: Konformationsänderungen bei Proteinkinasen.....	13
Abbildung 2.4: Oligomere Zustände von Kinasen.....	14
Abbildung 2.5: Pharmakophormodell.....	17
Abbildung 2.6: Quartärstruktur des menschlichen CK2-Holoenzym.....	18
Abbildung 2.7: Übersicht der <i>hsCK2α</i> -Struktur.....	22
Abbildung 3.1: Phasendiagramm und Dampfdiffusionsmethode	24
Abbildung 3.2: Bragg'sches Gesetz.....	27
Abbildung 3.3: Ewaldsche Lagekugel.....	29
Abbildung 3.4: Aufbau eines Röntgendiffraktionsexperimentes.....	31
Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des atomaren Streufaktors.....	35
Abbildung 3.6: Strukturfaktor bei anomaler Streuung.....	36
Abbildung 3.7: ITC-Aufbau.....	40
Abbildung 3.8: DSC-Aufbau.....	43
Abbildung 4.1: Aufbau des Expressionsvektors pT7-7.....	48
Abbildung 4.2: Vergleich der C-Termini von <i>hsCK2α</i> und <i>hsCK2α'</i>	54
Abbildung 4.3: Schema des gekoppelten Aktivitätstests.....	61
Abbildung 5.1: Reinigung von <i>hsCK2α^{1-335, Ile69Ala}</i>	67
Abbildung 5.2: Gel-Permeations-Chromatographie von CK2-Holoenzymvarianten.....	68
Abbildung 5.3: Reinigung von <i>hsCK2β¹⁻²⁰⁸</i>	69
Abbildung 5.4: Gel-Permeations-Chromatographie von CK2-Holoenzymvarianten.....	70
Abbildung 5.5: SDS-Gel von verschiedenen Fraktionen einer Gelfiltration mit dem <i>hsCK2α'</i> -Chimäre/ <i>hsCK2β¹⁻²⁰⁸</i> -Holoenzym.....	71
Abbildung 5.6: MALDI-TOF-Spektren.....	72
Abbildung 5.7: Übersicht des <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> /Emodin-Komplexes (basische Bedingung).....	73
Abbildung 5.8: Übersicht des <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> /Emodin-Komplexes (saure Bedingung).....	74
Abbildung 5.9: Übersicht des <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> /DRB-Komplexes.....	77

Abbildung 5.10: Übersicht des <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> /Glycerin-Komplexes.....	81
Abbildung 5.11: Vergleich der Güte der 2F ₀ F _c -Elektronendichten**.....	82
Abbildung 5.12: Vergleich der beiden Ketten des <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> -Dimers ***/**.....	82
Abbildung 5.13: ITC-Messungen mit <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> und <i>hsCK2β¹⁻¹⁹³</i> bzw. <i>hsCK2β¹⁻²⁰⁸</i> bei 30 °C.....	84
Abbildung 5.14: Abhängigkeit der <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> und <i>hsCK2β¹⁻¹⁹³</i> -Wechselwirkung von Temperatur, pH-Wert und Ionisierungsenthalpie des Puffers.....	86
Abbildung 5.15: ITC-Messungen mit <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> und <i>hsCK2α^{1-335, Ile69Ala}</i>	87
Abbildung 5.16: ITC-Messungen mit <i>hsCK2α^{1-335, Leu41Ala}</i> und <i>hsCK2α^{1-335, Leu41Ala, Val42Ala}</i>	88
Abbildung 5.17: DSC-Messungen von Holoenzymvarianten und den entsprechenden einzelnen Untereinheiten.....	89
Abbildung 5.18: DSC-Messungen von verschiedenen <i>hsCK2α</i> -Konstrukten und Holoenzym-Kombinationen.....	90
Abbildung 5.19: DSC-Messungen der <i>hsCK2α</i> -Punktmutanten.....	90
Abbildung 5.20: DSC-Messungen zum Nachweis des Einflusses von DRB.....	91
Abbildung 5.21: Kinetik von verschiedenen <i>hsCK2α</i> und <i>hsCK2</i> -Holoenzym-Varianten.....	92
Abbildung 5.22: Kinetik von <i>zmCK2α</i> und <i>hsCK2α</i> -Punktmutanten.....	93
Abbildung 5.23: Inhibitionskinetik mit DRB.....	96
Abbildung 6.1: Strukturelle Anpassungen von <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> bei der Bindung von Emodin **.....	98
Abbildung 6.2: Wechselwirkungen von Emodin und CK2 α *.....	99
Abbildung 6.3: Strukturelle Plastizität von CK2 α in der ATP-Bindungstasche ***/*.....	100
Abbildung 6.4: Dualer Bindungsmodus von DRB *.....	101
Abbildung 6.5: Bindung von DRB1 in der ATP-Bindungsstelle.*.....	102
Abbildung 6.6: Allosterische Bindungsstelle mit gebundenem DRB2 */***.....	103
Abbildung 6.7: Substruktur der anomalen Streuer *.....	105
Abbildung 6.8: Strukturelles Chlorid-Ion *.....	108
Abbildung 6.9: Chlorid-Ion Cl ⁻³ in der ATP-Bindungstasche *.....	109
Abbildung 6.10: Chlorid-Ionen im Bereich der Substratbindungsstelle ***.....	111
Abbildung 6.11: <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> -Dimer in der asymmetrischen Einheit **.....	112
Abbildung 6.12: Glycerin in der allosterischen Bindungsstelle **.....	113
Abbildung 6.13: <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> /Glycerin-Komplexstruktur **.....	114
Abbildung 6.14: ATP-Bindungsstellen des <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> /Glycerin-Komplex **.....	115
Abbildung 6.15: Hypothese zum Regulationsmechanismus von CK2 α	117
Abbildung 6.16: Pharmakophormodell für verschiedene <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> -Strukturen **.....	119
Abbildung 6.17: Strukturelle Plastizität von CK2 α ***.....	120
Abbildung 6.18: Die CK2 α /CK2 β -Kontaktfläche.....	122

Abbildung 6.19: ITC-Messungen der <i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i> -Punktmutanten/ <i>hsCK2β¹⁻¹⁹³</i> -Wechselwirkung.....	124
Abbildung 6.20: Oberflächendarstellung des <i>hsCK2α/hsCK2β</i> -Kontaktes **.....	125

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Verwendete Geräte.....	44
Tabelle 4.2: Verwendete Materialien.....	45
Tabelle 4.3: Verwendete EDV-Systeme.....	46
Tabelle 4.4: Verwendete Bakterienstämme.....	48
Tabelle 4.5: Verwendete Oligonucleotide.....	49
Tabelle 4.6: PCR-Programm zur Amplifizierung des <i>hsCK2α</i> -Gens.....	50
Tabelle 4.7: Programm für die Kolonie-PCR.....	53
Tabelle 4.8: PCR-Programm für die ortsgerichtete Mutagenese des <i>hsCK2α</i> -Gens.....	55
Tabelle 4.9: PCR-Programm zur Vorbereitung der Sequenzierung.....	57
Tabelle 4.10: Details der Röntgendiffraktionsmessungen.....	64
Tabelle 5.1: Röntgen- und Verfeinerungsstatistik der <i>hsCK2α¹⁻³³⁵/Emodin</i> -Datensätze.....	75
Tabelle 5.2: Röntgen- und Verfeinerungsstatistik des <i>hsCK2α¹⁻³³⁵/DRB</i> -Datensatzes.....	79
Tabelle 5.3: Röntgen- und Verfeinerungsstatistik des <i>hsCK2α¹⁻³³⁵/Glycerin</i> -Datensatzes.....	83
Tabelle 5.4: Kinetische Kenngrößen der einzelnen Enzymvarianten.....	93
Tabelle 5.5: Ergebnisse der Inhibitionskinetik mit DRB.....	94
Tabelle 6.1: Peak-Liste der anomalen Fourierdichte.....	106
Tabelle 9.1: Ergebnisse der ITC-Messungen.....	143
Tabelle 9.2: Ergebnisse der DSC-Messungen.....	144

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren

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

Sonstige Abkürzungen

Å	Ångström
AMPPNP	Adenylimidodiphosphat
ASKA	<i>analog sensitive kinase allele</i>
ASA	<i>solvent accessible surface area</i>
ASU	asymmetrische Einheit der Elementarzelle
ATP	Adenosintriphosphat
BESSY	Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CK2	Casein Kinase 2
CK2 α	katalytische Untereinheit der CK2
CK2 β	nicht-katalytische Untereinheit der CK2
C _p	Wärmekapazität bei konstantem Druck
Da	Dalton (1 Da = 1g/mol)
DAA	1,4-Diamino-5,8-dihydroxy-Anthrachinon
DESY	Deutsches Elektronen-Synchrotron
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonucleinsäure
DRB	5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und Weitere
F _c , F _{calc}	berechnete Strukturfaktoramplituden
F _o , F _{obs}	gemessene Strukturfaktoramplituden
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O _{bidest.}	zweifach destilliertes Wasser
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
<i>hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
I	Intensität
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K	Kelvin
K _B	Bindungskonstante
K _D	Dissoziationskonstante

K_I	Inhibitionskonstante
K_{Ic}	kompetitive Inhibitionskonstante
K_{Iu}	nichtkompetitive Inhibitionskonstante
k_{kat}	Wechselzahl
K_M	Michaelis-Konstante
l	Liter
λ	Wellenlänge (in nm oder Å)
m	Meter
M	molar
MAD	<i>multi-wavelength anomalous dispersion</i>
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionization-time of flight</i>
min	Minute
MNA	1,8-Dihydroxy-4-nitro-Anthrachinon
MNX	1,8-Dihydroxy-4-nitroxanthen-9-on
mol	Teilchenzahl (1 mol = $6,023 \cdot 10^{23}$ Teilchen)
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
<i>p.a</i>	<i>pro analysii</i>
PAGE	<i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglycol
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R_{free}	freier R-Wert
RMSD	<i>root mean square deviation</i> , Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung
R_{work}	R-Wert des Arbeitsdatensatzes
R_{sym}	linearer R-Wert
s	Sekunde
SAD	<i>single wavelength anomalous dispersion</i>
SAS	<i>single wavelength anomalous dispersion on the basis of sulphur</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> , Natrium Dodecylsulfat
TBB	4,5,6,7-Tetrabromo- <i>N,N</i> -dimethyl-benzimidazol
T_m	<i>transition midpoint</i> , Entfaltungstemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V_m	Matthews-Koeffizient
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit
<i>zm</i>	<i>Zea mays</i>
ZMMK	Zentrum für molekulare Medizin der Universität zu Köln
ΔASA	<i>difference in solvent accessible surface area</i>
ΔC_p	Änderung der Wärmekapazität
ΔG°	Änderung der Freien Standardenthalpie
ΔH°	Änderung der Standardenthalpie
ΔS°	Änderung der Standardentropie
σI	Standardabweichung der Intensität

1. Zusammenfassung und *Abstract*

1.1 Zusammenfassung – Molekulare Interaktionen der Proteinkinase CK2 und ihrer Untereinheiten

Die Proteinkinase CK2 (früher auch Caseinkinase 2 genannt) ist ein heterotetrameres Enzym, bestehend aus zwei räumlich getrennten katalytischen Ketten (CK2 α), die mit einem Dimer nicht-katalytischer Untereinheiten (CK2 β) verbunden sind. Zusammen mit den cyclinabhängigen Kinasen und den mitogen-aktivierten Proteinkinasen gehört CK2 α zur CMGC-Familie der eukaryontischen Proteinkinasen (EPKs). CK2 ist hochkonserviert und in viele wichtige zelluläre Prozesse, wie Zellzyklus, Apoptose, Stressantwort und Tagesrhythmus involviert. In vielen Tumoren wird erhöhte CK2-Aktivität beobachtet, was die Proteinkinase CK2 zu einem attraktiven Ziel von Inhibitoren macht.

Neben diesem pharmazeutischen Hintergrund ist die Entwicklung kleiner organischer Moleküle, die inhibierend auf CK2 wirken, auch von wissenschaftlichem Interesse. Denn obwohl CK2 schon seit über 50 Jahren bekannt ist, sind die Details der Funktion nicht verstanden und die Einordnung in die Signaltransduktionswege und regulatorische Netzwerke der Zelle unklar. Die Gründe dafür sind die extrem hohe Anzahl von Substraten (über 300) und der Mangel an (bekannten) Regulationsmechanismen. Im Gegensatz zu ihren streng regulierten nächsten Verwandten, ist CK2 α auch abseits des CK2-Holoenzym katalytisch aktiv. Anders als Cycline bei den cyclinabhängigen Kinasen ist CK2 β kein An- und Ausschalter von CK2 α , sondern hat einen subtileren Einfluss: CK2 β moduliert die Substratspezifität, erhöht die Thermostabilität und die Aktivität und dient als Andockstelle für andere Proteine. Inzwischen gibt es viele Hinweise dafür, dass das CK2-Holoenzym kein permanenter Komplex ist, sondern in einem dynamischen Gleichgewicht mit seinen Untereinheiten CK2 α und CK2 β steht.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Interaktionen der Untereinheiten miteinander und mit kleinen organischen Molekülen unter der Verwendung strukturbiochemischer, kalorimetrischer und enzymkinetischer Methoden untersucht. Dabei wurde das Augenmerk auf drei wichtige Bereiche der menschlichen, katalytischen Untereinheit (*hsCK2 α*) gerichtet: die ATP-Bindungsstelle, die CK2 α /CK2 β -Interaktionsfläche und den C-Terminus.

Im Rahmen der strukturbiochemischen Studien konnte die Struktur von *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵ mit dem ATP-kompetitiven Inhibitor Emodin aufgeklärt und mit einem zuvor veröffentlichten Komplex von Emodin und CK2 α aus Mais verglichen werden. Trotz einer Sequenzidentität von über 77 %

unterscheiden sich die beiden Strukturen in der Orientierung des Inhibitors und den lokalen Konformationen in der Nucleotidbindungsstelle: Die Mais-CK2 α -Untereinheit zeigt die meisten strukturellen Anpassungen in der glycinreichen Schleife, während die humane CK2 α -Untereinheit eine geschlossene Konformation der Gelenkregion einnimmt. Diese Plastizität der Gelenkregion wurde bis jetzt in keiner Struktur der CK2 α -Untereinheit aus Mais beobachtet.

Des Weiteren konnte bei einer *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*-Komplexstruktur mit dem Inhibitor 5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) ein dualer Bindungsmodus festgestellt werden, der sich auch durch eine gemischte Inhibitionskinetik äußerte. Ein DRB-Molekül bindet an die kanonische ATP-Bindungsstelle, das Zweite an die CK2 α /CK2 β -Kontaktfläche und zeigte bei DSC-Messungen einen destabilisierenden Einfluss auf das CK2-Holoenzym. Auch hier schränkte die Gelenkregion den Platz in der Nucleotidbindungsstelle durch eine geschlossene Konformation ein. Mit einer zusätzlich durchgeführte Röntgendiffraktionsmessung bei einer Wellenlänge von 2 Å, konnten anomale Streuer lokalisiert werden. Auf diese Weise wurden die DRB-Positionen verifiziert und die Chlor- und Schwefelsubstruktur des Komplexes aufgeklärt.

In einer bereits veröffentlichten Struktur einer *hsCK2 α* -Punktmutante, bei der eine ähnliche Kristallpackung wie bei dem Komplex mit DRB vorlag, zeigte sich, dass an der allosterischen Bindungsstelle auch Glycerin binden kann. Die Bindung von Glycerin konnte durch eine Co-Kristallisation reproduziert werden und die daraus resultierende Struktur zeigte eine inaktive Konformation. Bis jetzt wurde CK2 α ausnahmslos in der aktiven Form gefunden, die bei CK2 α durch verschiedene intramolekulare Kontakte stabilisiert wird.

Bei der inaktiven Form bleiben die regulatorischen Schlüsselemente in der für EPKs typischen aktiven Konformation, während die glycinreiche Schleife in die ATP-Bindungsstelle kollabiert und so die Bindung von ATP verhindert. Auch hier wurde, wie bei den Komplexstrukturen mit Emodin und DRB, der geschlossene Zustand der Gelenkregion beobachtet, der ebenfalls ein Mechanismus der Inaktivierung sein könnte. Anhand dieser Struktur konnte zum ersten mal die strukturelle Basis für den stimulierenden Einfluss von CK2 β auf CK2 α erklärt werden.

Mit isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) konnte festgestellt werden, dass die Assoziation von CK2 α und CK2 β stark exotherm ist und der enthalpische Beitrag die treibende Kraft der Bindung ist, deren Stärke in den Bereich transienter Heterokomplexe fällt. Auf Grund der hydrophoben Interaktionsfläche wurde eher ein signifikant positiver entropischer Beitrag zu ΔG° erwartet, der aus der Freisetzung hochgeordneter Wassermoleküle resultiert.

Der Vergleich von gebundener und ungebundener menschlicher CK2 α könnte eine mögliche Erklärung liefern: Im ungebundenen Zustand ist die hydrophobe Kontaktfläche von der β 4/ β 5-Schleife bedeckt und so dem Lösungsmittel unzugänglich. Bei der Assoziation von CK2 β öffnet sich die Schleife und es wird Wärme freigesetzt.

Um die C-Termini der beiden paralogen Enzyme *hsCK2 α* und *hsCK2 α '* zu vergleichen, wurde ein längeres *hsCK2 α* -Konstrukt (*hsCK2 α ¹⁻³⁵⁵*) und eine Chimäre, bestehend aus dem Kinasegrundkörper der *hsCK2 α* und der C-terminalen Region der *hsCK2 α '*, erstellt. Beide Proteine wurden in Hinblick auf ihre Stabilität und ihre enzymkinetischen Parameter charakterisiert.

Insgesamt stellt sich die katalytische Untereinheit der Proteinkinase CK2 in der vorliegenden Arbeit als Protein dar, bei dem durch die Bindung verschiedener Liganden und den Vergleich der Komplexe lokale Flexibilität sichtbar wird, die sich zusammen mit der Annahme eines transienten CK2-Holoenzym, durchaus im Sinne einer regulierten Kinase interpretieren lässt.

1.2 Abstract – Molecular interactions of protein kinase CK2 and its subunits

The protein kinase CK2 (former name casein kinase 2) is a heterotetrameric enzyme composed of two separate catalytic chains (CK2 α) attached to a dimer of noncatalytic subunits (CK2 β). Together with the cyclin-dependent kinases and the mitogen-activated protein kinases, CK2 α belongs to the CMGC family of the eukaryotic protein kinases (EPKs). CK2 is highly conserved and is involved in important cellular processes like the cell cycle, apoptosis, stress response and circadian rhythm. Its activity is elevated in a wide variety of tumors and thus a valuable target for inhibitors.

Beside the pharmacological background, the development of small organic molecules inhibiting CK2 activity is of scientific interest. Although CK2 is known for more than 50 years, the details of its function are not understood and its integration in cellular signalling pathways and regulatory networks remains obscure. The main reasons for this uncertainty are the extremely large number of substrates (more than 300) and the lack of regulatory mechanisms. In contrast to its highly regulated relatives, CK2 α is already catalytically active as a monomer. Unlike cyclins in the case of cyclin-dependent kinases, CK2 β is no on-off switch of CK2 α ; rather it has a more subtle influence: CK2 β modulates the substrate specificity, increases the thermostability and activity and serves as a docking site for other proteins. Several observations indicate that the CK2 holoenzyme is not a permanent complex but in a dynamic equilibrium with its subunits.

In the present work the interactions between the subunits and to small organic molecules were characterized with crystallographic, calorimetric and enzymological approaches. These studies were focussed on three important parts of the human catalytic subunit (*hsCK2 α*): the ATP-binding site, the CK2 α /CK2 β interaction region and the C-terminal segment.

In the context of structural studies, the complex of *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵ and the ATP competitive inhibitor emodin was solved and compared to a previously published complex structure of emodin and maize CK2 α . Despite a sequence identity of more than 77% between human and maize CK2 α , the two structures deviate significantly in the orientation of the inhibitor and the local conformations around the nucleotide binding site: maize CK2 α shows the largest adaptations in the glycine-rich loop, whereas human CK2 α adopts a closed conformation of the hinge region. This plasticity of the interdomain hinge was never observed in maize CK2 α .

In a *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵ complex structure with the inhibitor 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB), a dual binding mode was observed which was also detectable as a mixed inhibition in enzyme kinetical studies. One of the DRB molecules occupies the canonical ATP site, the second one binds to the CK2 α /CK2 β interaction interface and leads to a destabilization of the CK2 holoenzyme in DSC experiments. Like in the complex structure with emodin a closed conformation of the hinge region was observed. An additional X-ray diffraction measurement with soft X-rays

(wavelength of 2 Å) was performed to localize the anomalous scatterers. With this method the positions of the DRB molecule were verified and the chlorine and sulphur sub-structures were elucidated.

In a published structure of a human CK2 α point mutant which had a similar crystal packing like the complex with DRB, a glycerol molecule was found at the allosteric site. The binding of glycerol was reproduced by cocrystallization and the resulting structure showed an inactive conformation of the catalytic subunit. So far CK2 α was found exclusively in an active kinase conformation which is stabilized by intramolecular contacts.

In the inactive form the regulatory key regions still are in the EPK typical active positions, while the glycine-rich loop has collapsed into the ATP-binding site so that ATP is excluded from binding. The hinge region was in a closed state, like in the complexes with emodin and DRB, and could also be a mechanism of inactivation. The *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/glycerol* complex structure for the first time provides a structural basis for the stimulatory impact of CK2 β on CK2 α .

Isothermal titration calorimetry (ITC) showed that the association of CK2 α and CK2 β is strongly exothermic and enthalpically driven. The affinity falls in a range typically reported for transient heterocomplexes. Because of the cluster of hydrophobic side chains in the interaction interface, one would expect a significant positive entropic term resulting from the release of ordered water molecules.

A structural comparison of bound and unbound human CK2 α could suggest a possible explanation. In the unbound state the hydrophobic surface patch is shielded by the β 4/ β 5-loop and hence not accessible for the solvent. When CK2 β binds the β 4/ β 5-loop adopts an open conformation and heat is released.

To compare the C-termini of the two isoenzymes *hsCK2 α* and *hsCK2 α '*, a longer variant of *hsCK2 α* (*hsCK2 α ¹⁻³⁵⁵*) and a chimera, consisting of the kinase core of *hsCK2 α* and the C-terminal segment of *hsCK2 α '*, were created. Both proteins were characterized in regard of their thermostability and their kinetics.

To summarize, the different complex structures resulting from the present work and the comparison of them with published structures reveals that the catalytic subunit of protein kinase CK2 has a local plasticity. Together with the assumption of a transient CK2 holoenzyme the adaptability can be interpreted in terms of a regulated kinase.

1.3 Veröffentlichungen

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Niefind, K., Raaf, J. & Issinger, O.-G. Protein kinase CK2 – from structures to insights. *Cell. Mol. Life Sci.* voraussichtlich: **66**, 1800–1816; DOI 10.1007/s00018-009-9149-8, 2009

Raaf, J., Issinger, O.-G. & Niefind, K. First inactive conformation of CK2 α , the catalytic subunit of protein kinase CK2. *J Mol Biol.* **386**, 1212–1221, 2009

Raaf, J., Brunstein, E., Issinger, O.-G. & Niefind, K. The interaction of CK2 α and CK2 β , the subunits of protein kinase CK2, requires CK2 β in a pre-formed conformation and is enthalpically driven. *Protein Sci.* **17**, 2180–2186, 2008

Raaf, J., Issinger, O.-G. & Niefind, K. Insights from soft X-rays: the chlorine and sulfur substructures of a CK2 α /DRB complex. *Mol. Cell. Biochem.* **316**, 15–23, 2008

Raaf, J., Klopffleisch, K., Issinger, O.-G. & Niefind, K. 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**, 1–8, 2008

Raaf, J., Brunstein, E., Issinger, O.-G. & Niefind, K. The CK2 α /CK2 β interface of human protein kinase CK2 harbors a binding pocket for small molecules. *Chem. Biol.* **15**, 111-117, 2008

Die Koordinaten und die experimentellen Strukturfaktoramplituden sind in der Proteindatenbank (Protein Data Bank, RCSB, Rutgers University, New Jersey, <http://www.rcsb.org/pdb/>) [5] unter folgenden Einträgen verfügbar:

2RKP (aktualisiert durch 3H30), 3BQC, 3C13, 3FWQ

2. Einleitung

2.1 Protein-Protein-Wechselwirkungen

In der lebenden Zelle wird der Ablauf von biochemischen Reaktionen von Proteinen auf molekularer Ebene katalysiert¹ und reguliert. Dabei agieren Proteine selten isoliert, sondern gehen Wechselwirkungen mit anderen Proteinmolekülen ein [6], [7]. Dabei kann ein einzelnes Protein ein Bestandteil eines Komplexes sein (z.B. bei der *Splicing*-Maschinerie oder bei Transkriptionsfaktoren), als dynamische funktionelle Einheit in Signalkaskaden (z.B. im Zellzyklus) wirken oder beides. Jeder Komplex kann wiederum mit weiteren Proteinkomplexen interagieren und einzelne Proteine können Bauteile verschiedener Komplexe sein. Dabei hängt die Funktion eines Proteins oft von der Zusammensetzung seines Proteinkomplexes ab. In ihrer Gesamtheit bilden die spezifischen und ineinander greifenden Wechselwirkungen ein kompliziertes Netzwerk, das die zellulären Vorgänge antreibt und koordiniert. Die Eigenschaften der Protein-Protein-Interaktionen spiegeln die Dynamik in der Zelle wider. Aufgrund der zentralen Rolle von Protein-Assoziationen führen fehlerhafte Protein-Protein-Wechselwirkungen oft zu pathologischen Erscheinungen.

Das Verständnis der Protein-Protein-Interaktionen ist daher von großem Interesse für die biomedizinische Forschung. Zur Aufklärung werden zwei verschiedene Ansätze verfolgt: Zum Einen versucht man die Gesamtheit der Proteine und ihre Wechselwirkungspartner zu erfassen, um das komplexe Interaktionsnetzwerk in der Zelle zu verstehen. Mit diesen Zusammenhängen befasst sich die Proteomik. Zum Anderen sind auch die strukturellen und biophysikalischen Details der Wechselwirkung von Interesse. Beide Herangehensweisen werden durch bioinformatische Methoden ergänzt. In dieser Arbeit soll vor allem auf die Einzelheiten von nicht-kovalenten Protein-Protein Assoziationen eingegangen werden.

Bei der Quartärstruktur von Proteinen unterscheidet man Homo- und Heterokomplexe, die permanent oder transient (nicht-permanent) sein können. Nach funktionellen Kriterien unterscheidet man auch obligatorische und nicht-obligatorische Komplexe, wobei obligatorische Komplexe nur in assoziierter Form stabil und funktionsfähig sind [8]. Obligatorische Komplexe sind stets permanent, während nicht-obligatorische Komplexe sowohl permanent, als auch transient sein können [8]. Homooligomere sind oft permanente Komplexe, die im Laufe der Evolution auf die Stabilität ihrer Quartärstruktur hin optimiert wurden, die Komponenten der Heterooligomere hingegen können auch unabhängig vom Proteinkomplex vorkommen.

¹ Eine wichtige Ausnahme sind hierbei katalytisch wirksame RNAs, wie sie z.B. in Ribosomen – Komplexen aus RNA und Proteinen – vorkommen. Für die Entdeckung, dass nicht nur Proteine katalytische Aktivität besitzen, wurden Sidney Altman und Thomas R. Cech 1989 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

Nooren & Thornton [8], [9] unterscheiden schwache transiente Wechselwirkungen mit einem dynamischen Gleichgewicht von assoziierten und dissoziierten Zuständen und starke transiente Interaktionen, bei denen sich das oligomere Gleichgewicht durch die Bindung eines Ligandmoleküls verschiebt. Zwischen den verschiedenen Arten von Protein-Protein-Wechselwirkungen gibt es fließende Übergänge.

Die oligomeren Zustände können durch die Steigerung der lokalen Konzentration der einzelnen Proteine oder durch Einfluss auf die Bindungsaffinität kontrolliert werden. Die Assoziation hängt davon ab, ob die Interaktionsoberflächen der Proteine überhaupt in Kontakt treten können. Dies erfordert, dass die Proteine gleichzeitig am gleichen Ort vorkommen. Die Assoziation von Proteinen, die in verschiedenen Zellkompartimenten vorkommen, kann durch gerichtete Diffusion oder vaskulären Transport kontrolliert werden. Die Untereinheiten von obligatorischen Homooligomeren werden ohnehin simultan exprimiert und sind so schon während der Synthese colokalisiert. Die effektive lokale Konzentration kann aber auch beispielsweise durch Expressionslevel, Sekretion, Proteindegradation, Diffusion oder die Verankerung in einer Membran beeinflusst werden. Die Affinität der Untereinheiten zueinander kann durch die Gegenwart eines Effektormoleküls (z.B. ATP, Ca^{2+}), Änderung der physiologischen Bedingungen (z.B. pH) oder kovalente Modifikationen (z.B. Phosphorylierung) verändert werden [8].

Die geometrischen und physikochemischen Eigenschaften der Kontaktfläche der Protomere entscheiden über die Stabilität des Komplexes. Aus evolutionärer Sicht wurde die Interaktionsfläche auf die für die Funktion erforderliche Stärke der Bindung und auf den Bindungspartner abgestimmt² [10]. Die Berührungsfläche der interagierenden Proteine weist im Allgemeinen ähnliche Merkmale wie das Proteininnere auf, es gibt oft mehr hydrophobe Aminosäurereste als auf dem Rest der Oberfläche und die Reste sind ähnlich dicht gepackt [11]. Die Kontaktfläche in transienten Proteinkomplexen weist im Vergleich zu permanenten Proteinkomplexen einen niedrigeren Anteil an hydrophoben Aminosäuren auf, da die Interaktionsfläche der Protomere im dissoziierten Zustand dem Lösungsmittel exponiert ist [10]. Auch die Größe der Berührungsfläche der Untereinheiten lässt oft Rückschlüsse auf den Charakter der Wechselwirkung zu. Die Proteinkontaktfläche (A_{Kontakt}) errechnet sich, indem man die für das Lösungsmittel zugängliche Fläche des Komplexes (*solvent accessible surface area*; ASA) des Komplexes von der ASA der einzelnen dissoziierten Untereinheiten subtrahiert. Man erhält dabei die dem Lösungsmittel unzugängliche Fläche (*difference in accessible surface area*; ΔASA).

² Auch hier gibt es eine Ausnahme: Bei Antikörpern (Immunglobulinen) muss die Selektion auf die Bindung an das Antigen viel schneller sein als es evolutionär möglich wäre. Dies geschieht, indem eine große Vielfalt von verschiedenen Antikörpern durch die Umordnung von Genen und Mutationen erzeugt wird. Anschließend werden die Antikörper, die an ein Antigen binden, selektioniert und in einem Prozess der „Affinitätsreifung“ optimiert.

Es gelten die folgenden Beziehungen [12]:

$$2 * A_{\text{Kontakt}} = \Delta \text{ASA} = (A_1 + A_2) - A_{12} \quad [\text{Gleichung 1}]$$

- A_{Kontakt} : Proteinkontaktfläche eines Protomers
 ΔASA : dem Lösungsmittel unzugängliche Fläche im Komplex³
 $A_1; A_2$: dem Lösungsmittel zugängliche Fläche von Protomer 1 bzw. 2
 A_{12} : dem Lösungsmittel zugängliche Fläche des Komplexes

Oft gibt es eine Korrelation zwischen der Größe der Interaktionsfläche und der Stärke der Bindung [9]. Die Interaktionsfläche von obligatorischen Komplexen ist im Allgemeinen größer als bei nicht obligatorischen Komplexen. Nooren und Thornton fanden für transiente Homodimere Interaktionsflächen von etwa 478–926 Å² und 570–2213 Å² für transiente Heterodimere [9]. Nicht-obligatorische Komplexe mit einer Kontaktfläche über 1000 Å² (A_{Kontakt}) zeigen oft große Konformationsänderungen bei der Bindung [11].

Neben der Größe der Interaktionsfläche spielt auch die geometrische und die elektrostatische Komplementarität der Kontaktflächen eine Rolle. Zur Charakterisierung der geometrischen Komplementarität wurde der sogenannte *Gap*-Index eingeführt, der sich aus dem Quotient des Volumens der Zwischenräume innerhalb einer Kontaktfläche und deren Größe ergibt [10]. Die Form der Kontaktfläche kann beschrieben werden, indem rechnerisch eine Ebene bestmöglich in die Fläche gelegt wird. Die Standardabweichung von dieser Ebene gilt als Maß für die Krümmung der Fläche. Permanente Komplexe haben eine höhere Komplementarität und haben meist eine weniger planare Kontaktfläche als nicht-permanente Komplexe [10]. Es gibt kein bevorzugtes Sekundärstrukturmotiv, das in den Interaktionsflächen überwiegt [12].

Die meisten der bis jetzt erwähnten Tendenzen wurden anhand von Kristallstrukturen, die in der „*protein data bank*“ (PDB) [5] hinterlegt wurden, ermittelt. Bei Proteinstrukturen, die durch röntgenkristallographische Methoden gelöst wurden, besteht allerdings die Gefahr Kristallkontakte mit biologisch relevanten Protein-Protein-Interaktionen zu verwechseln. Denn es sind die gleichen nicht-kovalenten Interaktionen, nämlich Wasserstoffbrückenbindungen und Van der Waals-Wechselwirkungen, die ausschlaggebend für die Packung der Proteine im Kristall sind. Kristallkontakte sind aber in der Regel kleiner als bei biologischen Kontakten [13]. Verschiedene bioinformatische Programme (z.B. PISA Datenbank [14]) erleichtern die Unterscheidung von relevanten Interaktionen und kristallographischen Artefakten.

³ In der Literatur wird ΔASA oft auch verwendet, wenn eigentlich die Proteinkontaktfläche eines Protomers gemeint ist, also $\Delta \text{ASA}/2$.

Die einzelnen Aminosäuren der Kontaktfläche leisten einen individuellen Beitrag zur Bindungsenergie bei der Bildung des Komplexes. Diese Energien müssen nicht notwendigerweise additiv sein, außerdem gibt es positive oder negative kooperative Effekte [15]. Die thermodynamischen Parameter der Bindung werden in dem Kapitel Kalorimetrie (Kapitel 3.2) erläutert.

Wie bereits erwähnt spielen auch Konformationsänderungen bei der Assoziation eine wichtige Rolle. Um diese Konformationsänderungen zu erklären, wurden zwei verschiedene Konzepte entwickelt: Die „*induced fit*“-Hypothese („induzierte Passform“) besagt, dass der erste Kontakt zwischen einem Protein und dem Bindungspartner eine Änderung der Konformation auslöst, die die Ausbildung der geeigneten Passform hervorruft [16]. Bei der „*conformational selection*“-Hypothese („Auswahl der Konformation“) wird angenommen, dass eine Vielzahl von Konformationen des Proteins zu unterschiedlichen Anteilen in einem dynamischen Gleichgewicht vorliegen. Der Bindungspartner hat eine Präferenz für eine bestimmte Konformation. Bei der Assoziation verschiebt sich das Gleichgewicht zu Gunsten der ausgewählten Konformation bzw. des Komplexes [17], [18] (siehe Abbildung 2.1, [19]).

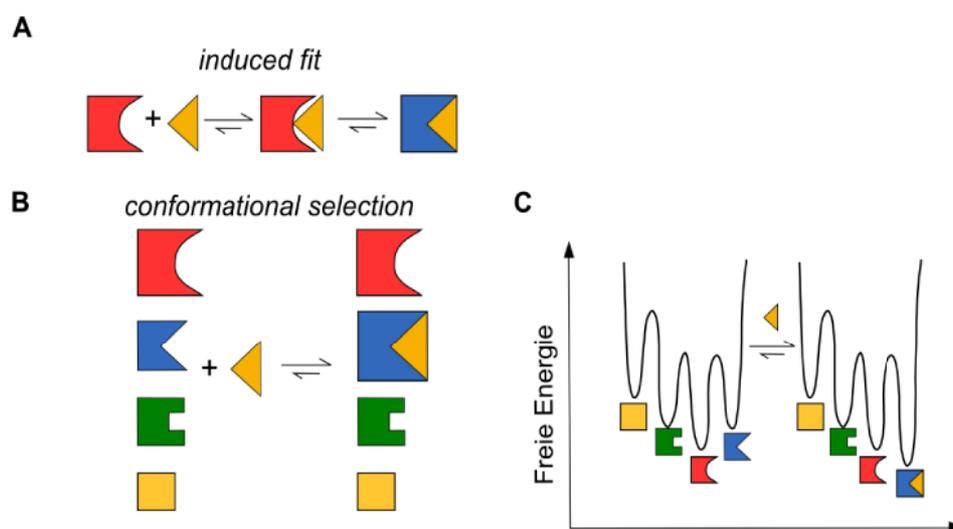


Abbildung 2.1: Molekulare Erkennungsmechanismen von Proteinen (Abbildung modifiziert nach Boehr *et al.* [19]). **(A)** Die „*induced fit*“-Hypothese besagt, dass sich die geometrisch komplementäre Form der Bindungsstelle erst nach dem ersten Kontakt mit dem Bindungspartner bildet. **(B)** Bei der „*conformational selection*“-Hypothese nimmt man an, dass viele verschiedene Konformationen in einem dynamischen Gleichgewicht vorliegen. **(C)** Der Bindungspartner bindet nur an eine bestimmte Konformation relativ hoher Energie, die selten vorkommt und stabilisiert den Komplex. Das Gleichgewicht verschiebt sich dann zu Gunsten der ausgewählten Konformation bzw. des Komplexes.

Die Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen ist ein biomedizinischer Ansatzpunkt für die Behandlung zahlreicher Humankrankheiten. Ziel ist es, zellpermeable organische Verbindungen zu entwickeln, die Proteinkomplexe stabilisieren, verhindern oder aufbrechen. Die Gründe für Schwierigkeiten bei der Identifizierung von Leitstrukturen (*leading structures*) für solche Moleküle sind v.a. die charakteristischen Eigenschaften von Protein-Protein-Grenzflächen: Die Kontaktflächen sind in der Regel größer als 1100 \AA^2 [11] und oft relativ planar. Es wurde jedoch gezeigt,

dass meist nur wenige Aminosäurereste einen großen Beitrag zur Bindung leisten [11]. Diese „*hot spots*“ können von niedermolekularen Verbindungen adressiert werden. In der Wirkstoffforschung werden drei verschiedene Ansätze verfolgt: Man leitet Peptide als Leitstrukturen von der Protein-Protein-Grenzfläche ab, durchsucht chemische Bibliotheken nach Modulatoren oder führt ein virtuelles (*in silico*) *Screening* chemischer Datenbanken durch [20].

2.2 Proteinkinasen und ihre Interaktionen mit anderen Molekülen

2.2.1 Bedeutung von Proteinkinasen

Proteinkinasen katalysieren den Transfer der γ -Phosphogruppe von einem Donormolekül – meist ATP – entweder auf die Hydroxygruppe (O-Phosphorylierung; bei Serin, Threonin und Tyrosin) oder auf die Amidgruppe einer Aminosäureseitenkette (N-Phosphorylierung; bei Histidin). Sie gehören daher zur Gruppe der Transferasen. Proteinkinasen wirken als molekulare Schalter in der Zelle: Phosphorylierungen ändern die lokalen Ladungseigenschaften des Substratproteins, was wiederum Konformationsänderungen (Aktivierung oder Inaktivierung), eine Veränderung der intrazellulären Lokalisation oder der Bindungseigenschaften bewirken kann. Die Dephosphorylierung wird von den Phosphatasen katalysiert.

Als Komponenten von Signaltransduktionswegen modulieren Proteinkinasen nahezu alle fundamentalen physiologischen Prozesse, wie z.B. Transkription, Zellzyklus, Differenzierung, Proliferation, Wahrnehmung und Reaktion auf Reize, Immunantwort und Apoptose. Um das Zusammenspiel dieser molekularen Prozesse zu gewährleisten, sind Proteinkinasen in der Regel streng reguliert (dazu mehr in Kapitel 2.2.2). Mutationen oder falsch regulierte Kinasen sind daher oft der Grund für Erkrankungen (wie z.B. Krebs).

Kinasen lassen sich in zwei Superfamilien einordnen: die eukaryontischen Protein Kinasen (EPKs) und die prokaryontischen Histidin-Kinasen. Diese Nomenklatur ist historisch gewachsen und aus heutiger Sicht irreführend, denn sowohl EPKs, als auch Histidin-Kinasen kommen in allen drei Organismenreichen (Eukaryonten, Bakterien und Archaeobakterien) vor [21]. Hinzu kommen auch noch die sogenannten „atypischen Proteinkinasen“, die eigene Sequenzfamilien bilden [22].

Bei der Analyse des menschlichen Genoms von Manning *et al.* wurden 518 verschiedene Gene für Proteinkinasen gefunden, davon 478 EPKs und 40 atypische Proteinkinasen [22]. Demnach umfassen EPK-Gene etwa 2 % des humanen Genoms [22], [23]. Vergleichbare Tendenzen fand man auch bei anderen Eukaryonten, wie beispielsweise *Saccharomyces cerevisiae* [24], *Drosophila melanogaster* [25] und *Caenorhabditis elegans* [26], [27]. Die Anzahl der Kinasegene steigt mit der

Komplexität der Organismen [22]. Die Gesamtheit der Proteinkinasen, die im Genom eines Organismus kodiert sind, nennt man in Anlehnung an das Genom auch „Kinom“. Eine Übersicht des menschlichen Kinoms und der phylogenetischen Beziehungen der verschiedenen eukaryontischen Proteinkinasen findet sich in dem Dendrogramm in Abbildung 2.2 [22]. Die meisten EPKs fallen dabei in eine der großen Gruppen: AGC, CAMK, CK1, CMGC (genauere Betrachtung siehe Kapitel 2.2.5), STE, TK, und TKL [22], [28].

Im Folgenden wird nur die Familie der EPKs betrachtet, die Begriffe „Proteinkinase“ oder „Kinase“ werden daher im Sinne von eukaryontischen Proteinkinasen verwendet.

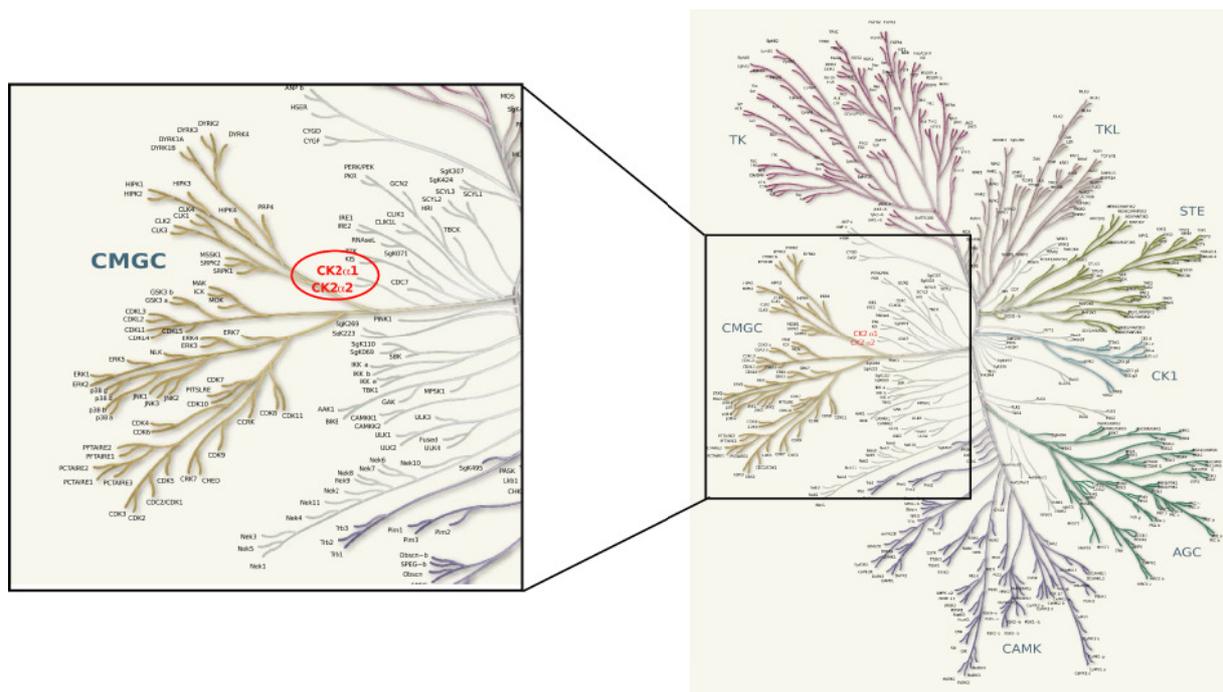


Abbildung 2.2: Humanes Kinom. Modifiziert nach Manning *et al.* 2002 (Poster zum Artikel, [22]). Die meisten EPKs fallen in eine der großen Gruppen: **AGC** (mit den PKA-, PKG- und PKC-Familien), **CAMK** (Calcium/Calmodulin abhängige Kinasen), **CK1** (mit der Casein Kinase 1 Familie), **CMGC** (mit den Cyclin abhängigen Kinasen [CDKs], den Mitogen-aktivierten Kinasen [MAPK], den Glycogen-Synthasekinasen, [GSK] und den CDK-ähnlichen Kinasen [CLK]), **STE** (Homologe von Hefe „Sterile“-Kinasen), **TK** (Tyrosin-Kinasen) und **TKL** (Tyrosin-Kinase-Ähnliche). Hervorgehoben ist die CMGC-Gruppe eukaryontischer Proteinkinasen (EPKs) mit der katalytischen Untereinheit der CK2.

2.2.2 Strukturelle Grundlagen der Regulation von EPKs

Eukaryontische Proteinkinasen sind eng verwandte Proteine mit einer gemeinsamen Grundarchitektur, bestehend aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne, die über die sogenannte Gelenk- oder *Hinge*-Region miteinander verbunden sind. Der N-terminale Teil besteht bis auf eine Helix (Helix α C) aus β -Faltblättern, während das C-terminale Segment größtenteils aus α -Helices besteht. Das aktive Zentrum befindet sich in einem Spalt zwischen den beiden Kinase-

domänen. EPKs können zwei extreme Konformationen einnehmen: den Grundzustand mit minimaler Aktivität und einen Zustand maximaler Aktivität als Antwort auf ein regulatives Signal [29]. Ein solches Signal kann die Bindung eines Liganden (Signalmoleküle wie Hormone oder sekundäre Botenstoffe) sein. Die Regulationsmechanismen sind innerhalb der Gruppe der EPKs sehr unterschiedlich und können aus Bindung (CDKs) oder Dissoziation von Untereinheiten (CAPK), Phosphorylierungen (MAPKs), Dephosphorylierungen (GSK3), Freisetzen von Pseudosubstraten (Twitchin) oder Dimerisierung (EGF-Rezeptor) bestehen (zusammenfassend besprochen in [29], [30], [31]).

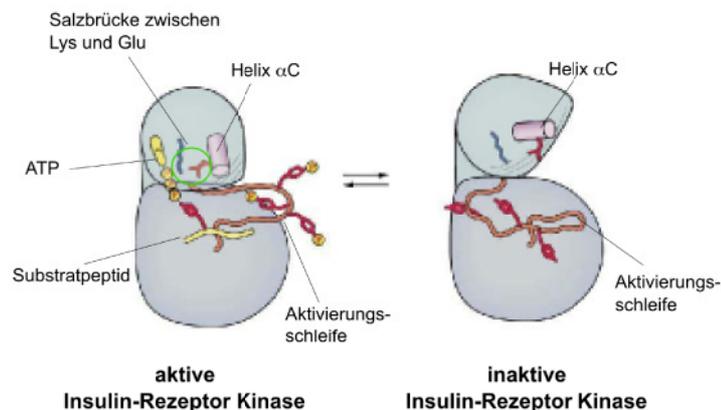


Abbildung 2.3: Konformationsänderungen des Übergangs vom aktiven in den inaktiven Zustand bei Proteinkinasen. Modifiziert nach Huse & Kuriyan [29]. Im aktiven Zustand ist die Aktivierungsschleife in einer geöffneten Konformation, durch die Salzbrücke zwischen einem Lys und einem Glu der Helix αC kann Mg^{2+} koordiniert werden. In der inaktiven Konformation blockiert die Aktivierungsschleife die Substratbindung, die Helix αC dreht sich und zerstört die Salzbrücke.

Im aktiven Zustand nehmen alle EPKs auf Grund der chemischen Zwänge des einheitlichen Katalysemechanismus eine ähnliche Konformation an. Die inaktiven Konformationen hingegen sind sehr variabel. Während des Aktivierungsprozesses ereignen sich große strukturell gekoppelte Veränderungen in der sogenannten Aktivierungsschleife und der Helix αC , wodurch die katalytischen Reste in ihre funktionelle Position gebracht werden. Im aktiven Zustand ist die Aktivierungsschleife in einer geöffneten Konformation, die eine Substrat- und ATP-Bindung zulässt. Zudem wird das konservierte DFG-Motiv am Anfang der Schleife in das aktive Zentrum gedreht, wo es eines der beiden Mg^{2+} -Ionen zur Abschirmung der Phosphogruppen des ATPs koordiniert. In der inaktiven Konformation kollabiert meist die Aktivierungsschleife in das aktive Zentrum, dreht das DFG-Motiv und blockiert so die Nucleotid- und Substratbindung.

Das zweite strukturelle Schlüsselement bei der Aktivierung ist die Helix αC aus der N-terminalen Domäne. In der aktiven Konformation bildet sich eine ionische Wechselwirkung zwischen einem Lysin aus dem Bereich zwischen den beiden Kinasedomänen und einem Glutamat der Helix αC .

Fixiert in dieser Position kann die Seitenkette des Lysins die α - und die β -Phosphogruppe des ATPs ausrichten. Bei der Inaktivierung wird die Helix α C von dem aktiven Zentrum weggedreht, wodurch die Lys-Glu-Salzbrücke zerstört wird [29] (siehe Abbildung 2.3). Diese Rotation ist mit der Bewegung des DFG-Motivs gekoppelt [28].

2.2.3 Protein-Protein-Wechselwirkungen bei eukaryontischen Proteinkinasen

Als Komponenten von Signaltransduktionswegen müssen Kinasen mit nachgeschalteten Komponenten interagieren, diese gegebenenfalls phosphorylieren und in ihrer Aktivität kontrolliert werden. Die folgenden Beispiele sollen einen kurzen Überblick über verschiedene Protein-Protein-Interaktionen im Zusammenhang mit der allosterischen Regulation von Kinasen verschaffen (zusammenfassend besprochen in [30]).

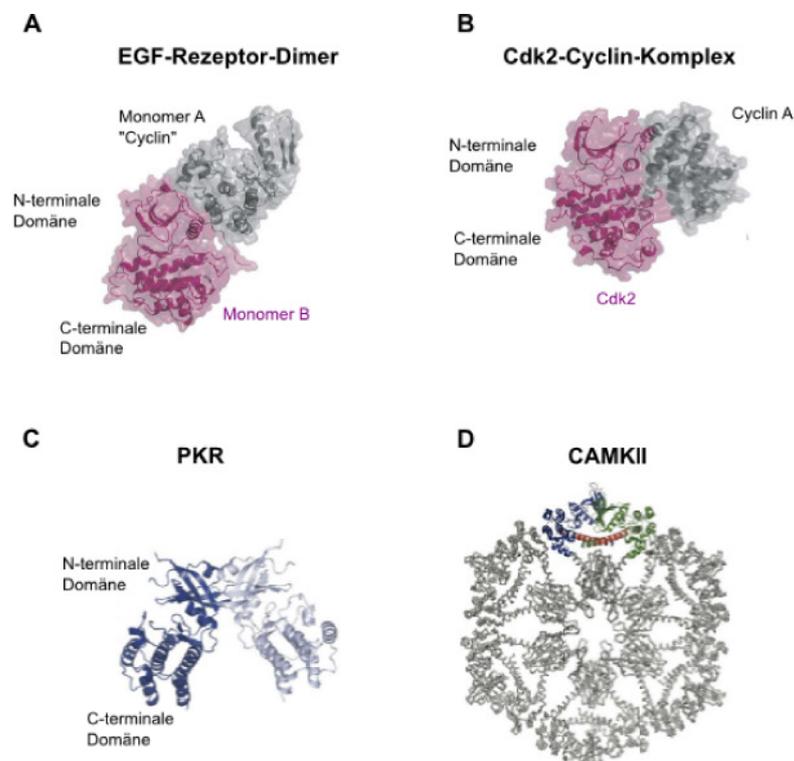


Abbildung 2.4: Verschiedene oligomere Zustände von Kinasen. Modifiziert nach Pellicena & Kuriyan [30]. (A)+(B) Vergleich des asymmetrischen EGF-Rezeptor-Dimers mit dem Cdk2-Cyclin A-Komplex. (C) symmetrisches Rücken-zu-Rücken-Dimer der PKR. (D) Hypothetische Rekonstruktion des CAMKII-Holoenzym, die eine mögliche Einordnung eines Dimers im Dodecamer zeigt.

Die RNA-abhängige Kinase (PKR) beendet die Translation, indem sie den Translations-Initiationfaktor eIF2 phosphoryliert [32]. Das entscheidende Signal dafür ist die Bindung doppelsträngiger RNA. Die Kinase bildet daraufhin Dimere, wodurch sich beide Kinasen gegenseitig in der Aktivierungsschleife phosphorylieren (Autophosphorylierung in *trans*) und damit aktivieren [33]. Dieses Prinzip ist in einer Vielzahl von Kinasen verwirklicht. Die beiden PKR-Untereinheiten

sind „Rücken zu Rücken“ angeordnet und formen so ein symmetrisches Homodimer (Abbildung 2.4 C). Dabei interagieren sie mit ihren N-terminalen Domänen miteinander und es wird Einfluss auf die Position der regulatorisch wichtigen Helix α C genommen [34].

Kinasen bilden auch zusammen mit anderen, v.a. regulatorischen Proteinen, Heterodimere. Das wohl bekannteste Beispiel für eine solche Wechselwirkung ist die allosterische Regulation der cyclinabhängigen Kinasen (CDKs). Durch die Bindung von Cyclin an die cyclinabhängige Kinase dreht sich die Helix α C zur Formierung der Lys-Glu-Salzbrücke und die Aktivierungsschleife öffnet das aktive Zentrum (Abbildung 2.4 B). Zur vollständigen Aktivierung ist allerdings noch eine Phosphorylierung der Aktivierungsschleife nötig [35].

Rezeptor-Tyrosinkinasen wie z.B. der EGF-Rezeptor sind Transmembranproteine, an die extrazelluläre Domäne bindet der Ligand (EGF: *epidermal growth factor*, Epidermiswachstumsfaktor), die intrazelluläre Domäne ist eine Tyrosinkinase. Der Rezeptor liegt ohne den Wachstumsfaktor als Monomer vor und ist inaktiv. Die Bindung von EGF an die extrazelluläre Domäne veranlasst den Rezeptor zur Dimerisierung⁴. Die beiden Kinasedomänen phosphorylieren sich gegenseitig und werden aktiviert. Die Phosphorylierung erfolgt dabei allerdings nicht wie bei der PKR in der Aktivierungsschleife. Die phosphorylierten Tyrosine dienen als Anheftungsstellen für SH2-Domänen (*src-homology 2*) anderer Proteine (z.B. das Adapterprotein Grb-2), die das Signal weiterleiten [36]. Da die Aktivierungsschleife nicht phosphoryliert werden muss, war die Rolle der Dimerisierung in diesem Zusammenhang unklar, bis man darauf aufmerksam wurde, dass die Kinaseuntereinheiten in der Kristallpackung asymmetrische Dimere bilden, wobei dieses Arrangement der Wechselwirkung von CDKs mit Cyclinen ähnelt [37] (Abbildung 2.4 A).

Kinasen bilden neben den bis jetzt erwähnten Dimeren auch höhere Oligomere, die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase CaMKII beispielsweise bildet sogar stabile Dodecamere mit Hilfe einer C-terminalen Assoziations-Domäne [38] (Abbildung 2.4 D).

2.2.4 Proteinkinaseninhibitoren

Schlägt die Regulation von Kinasen fehl, so hat das oft pathologische Vorgänge wie die Entstehung von Krebs zur Folge. Kinasen stehen aber auch in Zusammenhang mit anderen Krankheiten wie z.B. Diabetes, Neurodegeneration, Infektionen und chronischen Entzündungen. Aus diesem Grund sind Proteinkinasen sehr interessant für die Entwicklung von Medikamenten. Dabei hat man die Option, solche Kinaseinhibitoren therapeutisch einzusetzen, lange unterschätzt, da man auf Grund der strukturellen Ähnlichkeiten des aktiven Zentrums innerhalb der EPK-Familie keine Möglichkeit

⁴ Ein naher Verwandter des EGF-Rezeptors, der Insulinrezeptor, liegt immer als durch Disulfidbrücken verbundenes Dimer vor. Die durch die Phosphorylierung veranlasste Aktivierung findet aber erst nach Bindung von Insulin statt.

sah, spezifische Inhibitoren zu entwickeln. Heute weiß man, dass es zwischen den verschiedenen Kinasen eine Reihe subtiler struktureller Unterschiede gibt, was die Suche nach Proteinkinaseinhibitoren für viele Pharmaunternehmen zu einem Forschungsschwerpunkt gemacht hat. Kinaseinhibitoren werden mittlerweile neben anderen Therapieformen, wie z.B. operative Entfernung von Tumoren, Bestrahlung, Chemo- und Immuntherapie, bei der Behandlung von verschiedenen Krebsarten eingesetzt.

Die meisten Kinaseinhibitoren adressieren die kanonische ATP-Bindungsstelle. Dabei unterscheidet man Typ I und Typ II Inhibitoren (auch DFG-*in*- und DFG-*out*-Inhibitoren genannt). Typ I-Inhibitoren binden an die aktive Kinase, bei der das katalytisch wichtige DFG-Motiv in das aktive Zentrum gedreht ist. Sie gehen ähnlich wie ATP, Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Peptidrückgrat der *Hinge*-Region ein, die die beiden Kinasedomänen verbindet und können zwei hydrophobe Taschen belegen, die sich neben der Region befinden, die bei Bindung von ATP mit der Adeningruppe besetzt ist (siehe Pharmakophormodell in Abbildung 2.5). Die Form und die Größe der hydrophoben Bereiche unterscheidet sich von Kinase zu Kinase, was zur Gestaltung spezifischer Inhibitoren ausgenutzt werden kann [39].

Eine andere Strategie zur Erhöhung der Spezifität des Inhibitors wird bei den Typ II-Inhibitoren verfolgt: Diese binden an die ATP-Bindungsstelle inaktiver Kinasen, bei denen das DFG-Motiv aus dem aktiven Zentrum gedreht ist. Bei den DFG-*out*-Inhibitoren macht man sich zu Nutze, dass sich inaktive Kinasen strukturell aus Mangel an von der Reaktion diktierten chemischen Zwängen viel mehr als aktive Kinasen unterscheiden. Durch die DFG-*out*-Konformation wird eine zusätzliche hydrophobe Tasche gebildet, deren umgebende Aminosäurereste relativ variabel sind und so zur Selektivität des Inhibitors beitragen [40]. DFG-*out*-Inhibitoren erfahren außerdem weniger Konkurrenz durch zelluläres ATP und verschieben das Gleichgewicht hin zur inaktiven Konformation, was ihre Wirksamkeit *in vivo* steigern kann [41]. Die meisten ATP-kompetitiven Kinaseinhibitoren sind Heterozyklen mit wenigen drehbaren Bindungen [41].

Typ III-Inhibitoren binden nicht im aktiven Zentrum, sondern an einer allosterischen Bindungsstelle. Die Aminosäurereste außerhalb der ATP-Bindungsstelle sind generell weniger konserviert, was die Möglichkeit eine höhere Selektivität zu erreichen, steigert [41].

Eine andere Strategie zur Steigerung der Selektivität sind Moleküle, die die Protein-Protein-Interaktionsflächen von Kinasen adressieren. Dieses Konzept bietet sich gerade für Proteinkinasen an, da diese wie in Kapitel 2.2.3 erläutert, vielfältige Wechselwirkungen mit Regulator- oder Ankerproteinen eingehen.

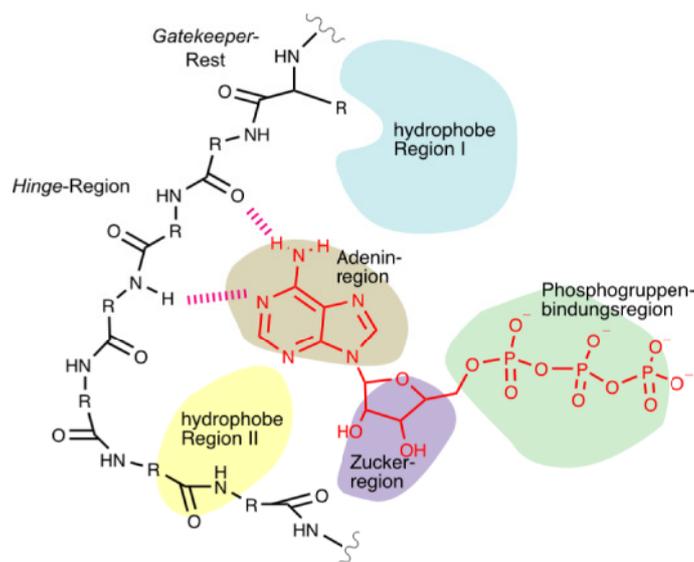


Abbildung 2.5: Pharmakophormodell. Schematische Darstellung der ATP-Bindungsstelle im aktiven Zentrum von Kinasen. Modifiziert nach [39], [40].

Um geeignete Leitstrukturen für Kinaseinhibitoren zu finden, testet man viele verschiedene Verbindungen *in vitro* und *in silico*. Eine solche Leitstruktur wird dann rational oder durch kombinatorische Chemie verändert, um ihre Bindungseigenschaften, Selektivität und Eignung als Arznei zu verbessern. Einige chemische Eigenschaften entscheiden im Allgemeinen über die orale Bioverfügbarkeit chemischer Verbindungen. „Lipinski's rule of five“ [42] beschreibt die chemischen Hauptmerkmale von Arzneimitteln, die für die Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Exkretion (Pharmakokinetik) von Bedeutung sind: Die Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungs-Donatoren sollte kleiner als fünf, die Anzahl der Akzeptoren kleiner als zehn sein, die Molekülmasse sollte nicht mehr als 500 g/mol betragen und die Verbindung sollte relativ lipophil sein ($\log P$ =Verteilungskoeffizient nicht mehr als fünf). Genügt eine so optimierte Verbindung diesen Regeln, wird ihre Verträglichkeit und Wirksamkeit *in vivo* getestet. Erst nach ausführlichen klinischen Studien kann ein Wirkstoff zugelassen werden.

2.2.5 Proteinkinase CK2 und ihre Besonderheiten

Nachdem nun die Haupteigenschaften der Gruppe der eukaryontischen Proteinkinasen, ihre Interaktion mit anderen Proteinen und die Charakteristika von Protein-Protein-Wechselwirkungen im Allgemeinen erläutert worden sind, soll nun das Studienobjekt dieser Arbeit – die Proteinkinase CK2 – beschrieben werden.

Das Holoenzym der CK2 (alter Name: Casein Kinase 2) ist ein Heterotetramer, bestehend aus zwei katalytischen Untereinheiten (CK2 α), die an ein stabiles Dimer der nicht-katalytischen Untereinheiten (CK2 β) binden. Die beiden CK2 α -Untereinheiten haben dabei untereinander keinen Kontakt. Der C-terminale Teil einer CK2 β -Kette greift zur anderen CK2 β -Kette hinüber, so dass der CK2 α /CK2 β -Kontakt immer von zwei CK2 β -Ketten, die mit einer CK2 α -Untereinheit interagieren, vermittelt wird (siehe Abbildung 2.6) [43].

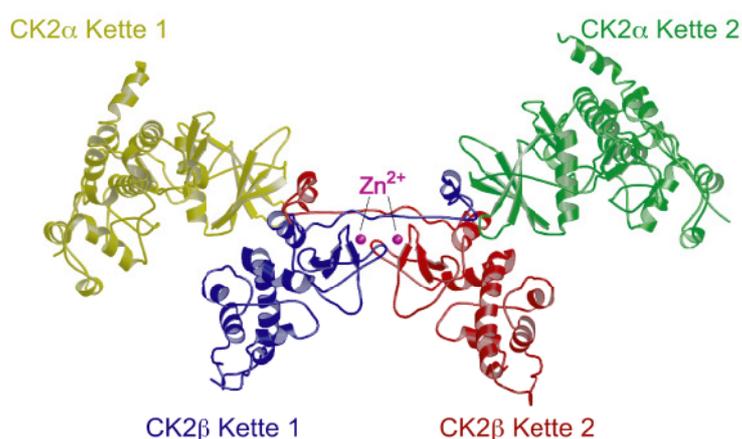


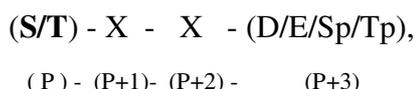
Abbildung 2.6: Quartärstruktur des menschlichen CK2-Holoenzym (PDB-Datei 1JWH [43]). Das CK2-Holoenzym besteht aus zwei getrennten katalytischen Untereinheiten (CK2 α), die an ein stabiles Dimer der nicht-katalytischen Untereinheiten (CK2 β) binden. Der C-terminale Teil einer CK2 β -Kette greift dabei zur anderen CK2 β -Kette hinüber. Der CK2 α /CK2 β -Kontakt von zwei CK2 β -Ketten die mit einer CK2 α -Untereinheit interagieren vermittelt.

CK2 α gehört zur CMGC-Gruppe eukaryontischer Proteinkinasen und steht daher in naher Verwandtschaftsbeziehung zu den cyclinabhängigen Kinasen, den MAP-Kinasen, und zur Glycogensynthasekinase 3 (siehe Abbildung 2.2) [22]. CK2 α hat die charakteristische EPK-Architektur und ist in allen eukaryontischen Spezies vorhanden [27], wobei die Aminosäuresequenz in vielen Bereichen hochkonserviert ist. *Knockout*-Studien mit Hefe und Mäusen zeigten, dass das Fehlen von CK2 α letal ist [44], [45].

Von CK2 β sind hingegen mit Ausnahme des Stelat-Proteins aus *Drosophila melanogaster* keine Homologen bekannt. Charakteristisch für CK2 β ist ein absolut konservierter Zinkfinger, der als Dimerisierungsmotiv dient und lokale Ähnlichkeiten mit dem Transkriptionselongationsfaktor

TFIIS aufweist [46]. Durch das Zinkfingermotiv, hydrophobe Reste und die Überkreuzung der C-terminalen Bereiche ist die Dimerisierungsfläche hocheffektiv und bewirkt, dass CK2 β permanente Dimere bildet. Wie auch CK2 α , kommt CK2 β in allen eukaryontischen Spezies außer einigen einzelligen Protozoen vor. Dabei variieren allerdings v.a. bei Pflanzen die Anzahl der CK2 β -Gene und es kommen C- und N-terminale Verlängerungen vor. CK2 β -*Knockout*-Mäuse sind nicht lebensfähig [47], während Hefe auch ohne CK2 β überleben kann [48].

Die Proteinkinase CK2 ist spezifisch für saure, negativ geladene Bereiche bei Substratproteinen (Acidophilie). Die minimale Konsensussequenz lautet [49]:



d.h. mindestens in der Position (P+3) muss sich ein negativ geladener Aminosäurerest befinden. Negative Ladungen in der (P+1)-Position sind auch förderlich für die Bindung und können eine fehlende negative Ladung in der (P+3)-Position ersetzen [50].

CK2 ist pleiotrop, ihr Substratspektrum umfasst zumindest *in vitro* über 300 Proteine. Darunter befinden sich viele Transkriptionsfaktoren, Effektoren der DNA/RNA-Struktur, Komponenten der Translation oder Signalproteine [50]. CK2 ist bei vielen fundamentalen zellulären Prozessen, wie Proliferation, Apoptose (dabei hat sie eine anti-apoptotische Wirkung) [51], [52], Zellzyklus [53] und Stressantwort [54] beteiligt. In einer Vielzahl von Tumoren beobachtet man eine Steigerung der Aktivität von CK2 [51].

Eine genaue Einordnung in die komplizierten Signaltransduktionsnetzwerke war trotz intensiver Forschung seit 1954 nicht möglich. Der Grund dafür liegt zum Einen in der bereits erwähnten Pleiotropie, die eine zweifelsfreie Zuordnung von Aufgaben in der Zelle erschwert. Zum Anderen scheinen keine der typischen Kinaseregulationsmechanismen auf die CK2 zuzutreffen. Die katalytische CK2 α -Untereinheit ist auch abseits des Holoenzym aktiv und weder Phosphorylierungen noch Autophosphorylierungen haben Einfluss auf die Aktivität. CK2 α scheint also eine unregulierte Kinase zu sein und das trotz ihrer Zugehörigkeit zu der ansonsten streng kontrollierten CMGC-Gruppe.

In struktureller Hinsicht wird CK2 α trotz gleicher EPK-Grundarchitektur durch verschiedene Elemente in die aktive Konformation gezwungen. Das N-terminale Segment hält die Helix α C in der aktiven Konformation und stabilisiert die offene Form der Aktivierungsschleife. Außerdem besitzt CK2 α kein DFG-Motiv zur Koordination von Mg²⁺, sondern ein DWG-Motiv, wobei das Tryptophan eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung ausbilden kann und damit die „DFG-*in*“-Konformation stabilisiert [55]. Des Weiteren sind positiv geladene Positionen in der Aktivierungsschleife, die in anderen Kinasen zur Regulation phosphoryliert werden, bei CK2 α zur Substrat-

erkennung umfunktioniert worden [56]. All diese Hinweise legen also den Verdacht nahe, dass es sich bei der CK2 bzw. CK2 α um eine konstitutiv aktive Kinase handelt.

Es wurden jedoch auch alternative Regulationsmechanismen in Betracht gezogen: Die Bildung inaktiver filamentöser Aggregate des Holoenzym [57], Regulation durch kleine Moleküle wie z.B. Inositolphosphate [58], Änderung der Spezifität durch Protein-Protein-Wechselwirkungen [59], [60], intrazelluläre Translokation [61] oder Regulation der Expression und Degradation [62].

Welche Bedeutung kommt bei dem Fehlen von Regulationsmechanismen der CK2 β -Untereinheit bzw. dem Holoenzym zu? Fest steht zumindest, dass CK2 β kein An- und Aus-Schalter im Sinne von Cyclinen bei den CDKs ist. Die Anwesenheit von CK2 β hat aber dennoch Einfluss auf CK2 α , denn CK2 β bewirkt eine Stimulation der Kinaseaktivität im Holoenzym, steigert die Thermostabilität und beeinflusst das Substratprofil. CK2 β wirkt als „Andockstelle“ für verschiedene CK2-Substratproteine [63], andere Substrate wie z.B. Calmodulin werden nur in Abwesenheit von CK2 β phosphoryliert [64].

In Frage zu stellen ist in diesem Zusammenhang, ob das CK2-Holoenzym, wie lange Zeit angenommen, ein permanenter Heterokomplex ist. Es häufen sich die Anzeichen, dass einzelne Subpopulationen von CK2 α und CK2 β *in vivo* unabhängig voneinander existieren [65], [66], [67], [68] zumindest wenn sie zeitlich und räumlich getrennt vorkommen. Auch die relativ kleine CK2 α /CK2 β -Interaktionsfläche (832 Å²) [43] spricht eher für ein nicht-permanentes CK2-Holoenzym, dass in einem dynamischen Gleichgewicht mit den dissoziierten Untereinheiten steht. CK2 β wäre unter Annahme dieses Szenarios in ihren Aufgaben vielseitiger. Interaktionen mit anderen Kinasen, wie CHK1 [69], A-Raf [70], [71] und Mos [72] weisen auf eine solche unabhängige Rolle hin.

Die ungeklärte Regulation ist im Zusammenhang mit der Proteinkinase CK2 aber nicht die einzige Besonderheit: CK2 und CK2 α weisen eine duale Cosubstratspezifität auf, sie akzeptieren sowohl ATP als auch GTP als Phosphodonor [73]. Möglicherweise besitzt CK2 auch eine duale Substratspezifität, d.h., sie kann neben Serin- und Threoninresten auch in Abhängigkeit von der Sequenzumgebung Tyrosinreste phosphorylieren [74]. Das CK2-Holoenzym bildet bei niedrigen Salzkonzentrationen ringförmige und filamentöse Aggregate von denen angenommen wird, dass ihnen eine regulatorische Funktion zukommt [75], [76], [57].

Zu erwähnen ist auch das CK2 α -Paralog CK2 α' , das in Vertebraten vorkommt. Die Gene von *hsCK2 α* und *hsCK2 α'* befinden sich auf zwei unterschiedlichen Chromosomen [77], [78]. Die beiden Isoenzyme unterscheiden sich vor allem in der Sequenz des C-terminalen Bereiches. Beim Menschen ist der C-Terminus der CK2 α 41 Aminosäuren länger als bei CK2 α' . Letztere kommt hauptsächlich im Gehirn und in den Hoden vor, während CK2 α in allen Geweben zu finden ist [67]. CK2 α' defiziente Mäuse sind lebensfähig, jedoch führt der *Knockout* bei den Männchen zur

Infertilität [79]. Auch CK2 α' bildet mit CK2 β das Holoenzym aus, allerdings beobachtet man nicht das bereits beschriebene Aggregationsverhalten bei niedrigen Salzkonzentrationen [80].

Insgesamt ist über die Rolle von CK2 α' wegen Problemen bei der rekombinanten Expression und Reinigung weitaus weniger bekannt als für CK2 α . Das Vorhandensein von zwei Isoenzymen legt eine funktionelle Spezialisierung nahe, ansonsten wäre eines der Paraloge während der Evolution verloren gegangen. Eine Unterscheidung der Funktionen von CK2 α und CK2 α' konnte aber bis jetzt nicht getroffen werden. Es ist allerdings davon auszugehen, dass der Schlüssel für die Unterscheidung im C-Terminus liegt. Jüngste Studien zeigten, dass CK2 α bei dem Durchschreiten des Zellzyklus an mehreren Resten (Thr344, Thr360, Ser362 und Ser370) der C-terminalen Region zeitweise phosphoryliert und wieder dephosphoryliert wird [81]. Werden diese Reste verändert, kommt es zu Defekten der Mitose. Es ist außerdem bekannt, dass die Phosphorylierungen, die wahrscheinlich durch die cyclinabhängige Kinase Cdk1 katalysiert werden [82], die Bindung anderer Proteine wie beispielsweise die Peptidylprolylisomerase Pin1 vermitteln. CK2 α' fehlen diese Phosphorylierungsstellen und ist damit kein Bindungspartner für Pin1.

Auf Grund der Rolle der CK2 bei pathologischen Erscheinungen und der offenen Fragen hinsichtlich der Regulation und Einordnung im Zellgeschehen, sind CK2-Inhibitoren von pharmazeutischem und wissenschaftlichem Interesse. In den letzten Jahren sind eine Fülle ATP-kompetitiver Inhibitoren entwickelt worden und die meisten Neueinträge in der PDB waren CK2 α -Inhibitor-Komplexe. Zu den publizierten kompetitiven CK2-Inhibitoren gehören halogenierte Benzimidazol- oder Triazol-derivate [83], [84], Quinazoline [85], Curcumine [86] und Anthrachinone [87].

Neuerdings wurde auch die CK2 α /CK2 β -Interaktion Angriffspunkt verschiedener kleiner Moleküle, die die Wechselwirkung verhindern sollen. Beim strukturbasierten Design dieser CK2 β -Antagonisten entwarf man zunächst kurze zyklische Peptide, die dem C-terminalen *hairpin loop* von CK2 β ähnelten und an die CK2 β -Bindungsstelle im N-terminalen Bereich der CK2 α binden [88]. Um eine Zellpermeabilität und damit die Wirksamkeit der Antagonisten *in vivo* zu erreichen, müssen weitere Modifikationen vorgenommen werden. Am Ende einer solchen Entwicklung steht ein sogenanntes Peptidomimetikum. Bei der empirischen Suche nach CK2 β -Antagonisten mit geringem Molekulargewicht fand man Podophylloxin-Indol-Analoga, welche die CK2 α /CK2 β -Interaktion inhibieren [89]. Man erhofft sich bei dieser Art von Inhibitoren spezifische CK2-Holoenzymfunktionen in der Zelle zu verhindern, während die Funktionen der einzelnen Untereinheiten unberührt bleiben. Die strukturellen Voraussetzungen, kleine organische Moleküle zu finden, die in die Assoziation der CK2 Untereinheiten eingreifen, sind gut, denn die Interaktionsfläche der CK2 α ist nicht flach, sondern eine hydrophobe Tasche.

2.3 Zielsetzungen

Die Strukturen der humanen katalytischen CK2 α - und nicht-katalytischen CK2 β -Untereinheit, sowie des CK2-Holoenzym waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit bereits aufgeklärt. Kalorimetrische, strukturbiochemische, molekulargenetische und enzymkinetische Methoden sollten dazu beitragen, Details der CK2 α -Struktur zu verstehen. Dabei sollten die Interaktionen der Untereinheiten miteinander und mit kleinen organischen Molekülen untersucht werden, wobei der Fokus auf drei essentielle Bereiche (Abbildung 2.7) der katalytischen Untereinheit gerichtet werden sollte:

- a) die ATP-Bindungsstelle
- b) die CK2 α /CK2 β -Interaktionsfläche
- c) den C-Terminus.

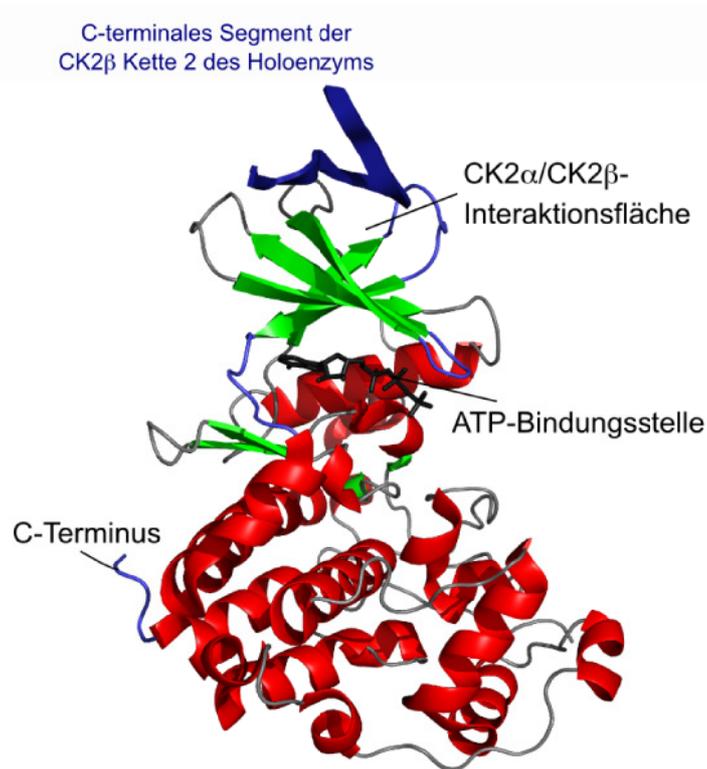


Abbildung 2.7: Übersicht der *hsCK2 α* -Struktur [56]. Verschiedene Bereiche der humanen katalytischen Untereinheit sollten in der vorliegenden Arbeit durch kalorimetrische, strukturbiochemische, molekulargenetische und enzymkinetische Ansätze untersucht werden: die ATP-Bindungsstelle, die CK2 α /CK2 β -Interaktionsfläche und der C-Terminus.

zu a) In den vergangenen Jahren sind viele verschiedene ATP-kompetitive Inhibitoren, die CK2 adressieren, entwickelt worden. Zur Strukturaufklärung von Komplexen mit kleinen organischen Molekülen (abgesehen von dem ATP-Analogon AMPPNP) wurde nicht die

menschliche, sondern die katalytische Untereinheit aus Mais verwendet. Diese weist zwar eine hohe Sequenzidentität zu der humanen CK2 α auf, ist aber eben nicht identisch mit ihr. In dieser Arbeit sollte die menschliche CK2 α -Untereinheit in Anwesenheit von Inhibitoren kristallisiert und die Strukturen der resultierenden Komplexe gelöst werden, um Konformationsänderungen der Nucleotidbindungsstelle, die auf die Bindung der Liganden zurückzuführen sind, aufzuklären.

- zu b) Durch die Kristallstruktur des humanen CK2-Holoenzym [43], waren dessen Grundarchitektur und die Eigenschaften der Interaktionsfläche bekannt. Dieses Wissen sollte durch eine thermodynamische Charakterisierung der CK2 α /CK2 β -Wechselwirkung ergänzt werden. Mit isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) sollten die Stärke und treibenden Kräfte der Bindung aufgeklärt werden. Des Weiteren sollten hydrophobe Aminosäurereste der Interaktionsoberfläche von CK2 α gegen Alanin ausgetauscht werden und die Konsequenzen für das thermodynamische Profil der Bindung untersucht werden. Die Stabilitätseigenschaften der einzelnen Untereinheiten CK2 α und CK2 β und des Holoenzym sollten mit der Differentialrasterkalorimetrie (DSC) ermittelt werden.
- zu c) Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der C-terminalen Bereiche der beiden Isoenzyme *hsCK2 α* und *hsCK2 α '*. Obwohl das bloße Vorhandensein zweier Isoenzyme auf eine funktionelle Spezialisierung hindeutet, konnte die Funktion bis jetzt nicht klar unterschieden werden. Die beiden paraloge Enzyme unterscheiden sich in Länge und Sequenz (und wahrscheinlich auch der Struktur) ihrer C-Termini. In beiden Fällen ist dieser Bereich strukturell vollkommen uncharakterisiert, aber wahrscheinlich der Schlüssel zur funktionellen Unterscheidung: Wildtyp-*hsCK2 α* hat die Tendenz zu degradieren und es kommt zum spontanen Verlust des C-terminalen Segmentes.

Aus diesem Grund wurde in den meisten strukturellen Studien die katalytische Untereinheit aus Mais, die keine vergleichbare C-terminale Region hat und weitaus stabiler als der *hsCK2 α* -Wildtyp ist oder die stabile C-terminale Deletionsmutante *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* [90] verwendet. Bei der Wildtyp-*hsCK2 α '* hingegen gibt es sowohl Stabilitäts- als auch Löslichkeitsprobleme [80]. Um diese Probleme zu überwinden, sollte zum Einen eine *hsCK2 α / α '*-Chimäre, bestehend aus der Kinasedomäne von *hsCK2 α* und dem C-terminalen Segment von *hsCK2 α '*, hergestellt werden. Zum Anderen sollte ausgehend von der etablierten *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*-Variante der C-Terminus sukzessive verlängert werden.

3. Theoretische Grundlagen

3.1 Röntgenkristallographie – ein Blick auf die Struktur von Proteinen

3.1.1 Proteinkristallisation

Zur Röntgenstrukturanalyse eines Proteins muss man viele dieser Proteinmoleküle in die hoch geordnete dreidimensionale Struktur eines Kristalls bringen. Damit diese hohe Ordnung entsteht, müssen spezifische Kristallkontakte gegenüber unspezifischen Aggregationen überwiegen. Dazu muss das Protein langsam in eine Sättigungskonzentration gebracht werden. Um die Löslichkeit des Proteins zu verringern, bedient man sich sogenannter Fällungsmittel, wie z.B. verschiedener Salze, PEG, MPD, *iso*-Propanol oder anderer organischer Lösungsmittel. Die Kristallisation hängt u.a. von der Art und Konzentration des Fällungsmittels, dem pH-Wert, der Temperatur und der Reinheit und Konzentration des Proteins ab. Das Phasendiagramm (Abbildung 3.1 A) zeigt die Abhängigkeit der Kristallisation von Fällungsmittel- und Proteinkonzentration. Wird die Sättigungskonzentration überschritten, stellt sich zunächst ein metastabiler Zustand ein, in dem Kristallwachstum möglich ist, in der sich aber keine Kristallkeime bilden. Erst wenn die Fällungsmittel- oder Proteinkonzentration weiter erhöht wird, kommt es zur Nukleation. Die Proteinkonzentration in der die Keime umgebenden Lösung sinkt durch den Einbau der Proteine in den Kristall und bewegt sich wieder in die metastabile Zone im Phasendiagramm, die nun das Wachstum der Kristalle begünstigt.

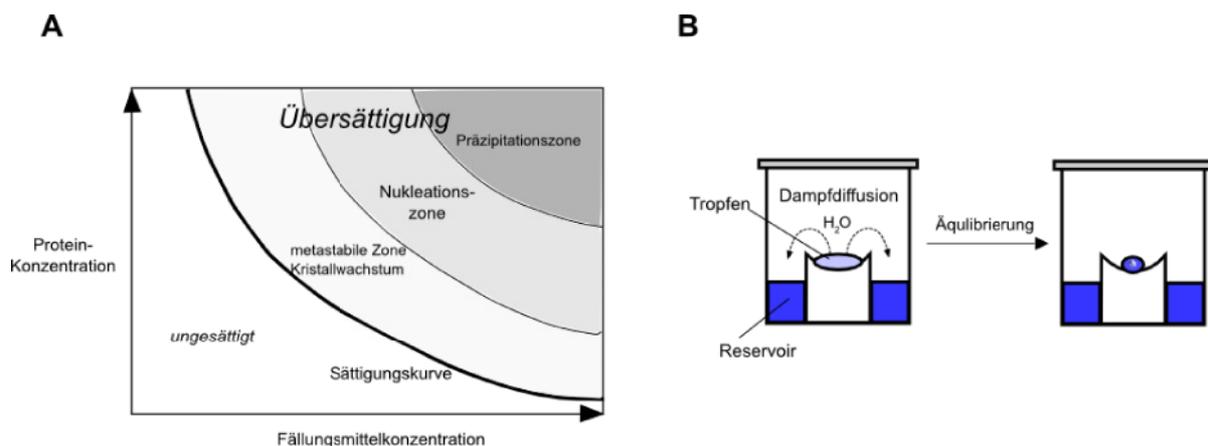


Abbildung 3.1: (A) Phasendiagramm der Kristallisation (B) Dampfdiffusionsmethode mit dem sitzenden Tropfen. Im Tropfen befindet sich eine Mischung aus Proteinlösung und Fällungsmittel, im Reservoir nur das Fällungsmittel. Der Ansatz wird mit Klebefolie abgedichtet. Da die Konzentration des Fällungsmittels im Tropfen geringer ist als im Reservoir, wird dem Tropfen durch Dampfdiffusion Wasser entzogen und die Fällungsmittel- und Proteinkonzentration im Tropfen wird langsam erhöht.

Während der Äquilibrierung bewegt sich ein Kristallisationssystem also durch ein Phasendiagramm. Um diese Bewegung gezielt zu steuern, gibt es verschiedene Methoden, wie die Dialyse,

das *Batch*-Verfahren, die freie Grenzflächendiffusion (*free interphase diffusion*) und die Gasphasendiffusion.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Gasphasendiffusionsmethode mittels „sitzendem Tropfen“ (*sitting drop*) angewendet (Abbildung 3.1 B). Dabei platziert man einen Tropfen der Proteinlösung auf einer dafür vorgesehenen Vertiefung und mischt diesen mit der Fällungsmittellösung. Ein größeres Volumen des Fällungsmittels wird in das Reservoir gefüllt. Um einen Gasaustausch mit der Umgebung zu verhindern, wird der Kristallisationsansatz mit Klebefolie abgedichtet. Im Tropfen ist die Konzentration des Fällungsmittels geringer als im Reservoir. Um das Gefälle auszugleichen, wird dem Tropfen durch Dampfdiffusion Wasser entzogen und die Fällungsmittel- und Proteinkonzentration im Tropfen wird langsam erhöht [91].

Um initiale Kristallisationsbedingungen zu finden, verwendet man meistens kommerzielle *Screens*, die nach dem Schema der unvollständigen faktoriellen Suche ([92], *sparse matrix*) ein breites Spektrum möglicher Kombinationen und Konzentrationen von Fällungsmitteln abdecken. Wird eine initiale Kristallisationsbedingung gefunden, so muss diese meist noch optimiert werden, um größere oder weniger verwachsene Kristalle zu erhalten. Durch Variation des pH-Wertes, der Fällungsmittel- oder Proteinkonzentration und Zugabe von Additiven oder Detergenzien versucht man die Kristallisationsbedingungen zu verbessern.

Komplexstrukturen von Proteinen mit Substraten, Co-Faktoren oder Inhibitoren kann man erhalten, indem man z.B. zu dem Proteinkristall im Tropfen ein kleines Volumen des zu bindenden Moleküls bringt (*soaking*, Tränken). Durch die Lösungsmittelkanäle im Kristall kann ein solches Molekül an die spezifische Bindungsstelle in den Kristall hineindiffundieren. Möglich ist dies durch den hohen Solvensgehalt im Proteinkristall (30–70 %) [93], der zudem bewirkt, dass die Proteine meist auch im Kristall noch aktiv sind. Bei der Co-Kristallisation, die in dieser Arbeit angewendet wurde, werden Protein und Ligand vor oder bei dem Pipettieren des Tropfens vermischt.

3.1.2 *Cryo*-Bedingungen

Die energiereichen Röntgenstrahlen verursachen Schäden am Proteinkristall, wodurch die Streuqualität beeinträchtigt wird. Um die Kristalle zu schützen, werden sie während der Röntgendiffraktionmessung in einen 100 K kalten Stickstoff-Strom gebracht. Für diese Tieftemperaturmessungen muss der Proteinkristall zuvor in geeignete *Cryo*-Bedingungen gebracht werden, die vom Kristall toleriert werden und die ein glasartiges Erstarren der Lösung um den Kristall ermöglichen. Bilden sich nämlich Eiskristalle, führt dies bei der Röntgendiffraktionsmessung zu Pulverringen (sogenannten „Eisringen“), die bei der Auswertung der Daten stören. Um dies zu vermeiden, ist im Tropfen meist ein gewisser Anteil Glycerin (mindestens 20 %) oder ein höherer

Anteil eines bereits in der Kristallisationsbedingung vorhandenen Polyethylenglycols (PEGs) nötig. Auch eine Erhöhung der Salzkonzentration kann zu *Cryo*-Bedingungen führen [91]. Die *Cryo*-Bedingung kann durch Zugabe der Protektanten in den Tropfen, durch Umbetten des Kristalls oder durch langsame Äquilibration erfolgen.

3.1.3 Röntgendiffraktometrie

3.1.3.1 Erzeugung von Röntgenstrahlung

Zur Aufklärung der Struktur von chemischen Verbindungen braucht man Röntgenstrahlung, deren Wellenlänge (1000-0,1 Å) im Bereich der Atomabstände liegt. Röntgenstrahlung kann durch zwei verschiedene Vorgänge erzeugt werden:

Zum Einen kann sie durch eine Änderung der Beschleunigung (Abbremsung oder Richtungsänderung) geladener Teilchen (meistens Elektronen) entstehen. Diese sogenannte Bremsstrahlung hat ein kontinuierliches Spektrum („weißes“ Röntgenlicht) und entsteht in Teilchenbeschleunigern als „Nebenprodukt“ durch die Ablenkung der geladenen Teilchen im Magnetfeld (sogenannte Synchrotronstrahlung).

Zum Anderen kann Röntgenstrahlung durch hochenergetische Übergänge in der Elektronenhülle von Atomen entstehen. In einer Röntgenröhre werden Elektronen zur Anode beschleunigt. Dabei tritt neben der Bremsstrahlung ein Linienspektrum auf, welches auf den Elektronenübergang in den Atomschalen des Anodenmaterials zurückzuführen ist. Die hochenergetischen Elektronen, welche die Anode erreichen, schießen Elektronen aus der Schale mit niedrigem Energieniveau. Diese wird dann mit Elektronen aus Schalen höherer Energie aufgefüllt. Bei diesem Prozess wird Röntgenstrahlung einer für das Anodenmaterial charakteristischen Wellenlänge emittiert. Als Anodenmaterial wird meist Kupfer oder Molybdän verwendet. Bei Röntgenröhren verwendet man die charakteristische Röntgenstrahlung.

Synchrotronstrahlung hat eine höhere Intensität als Röntgenstrahlen, die mit einer Röntgenröhre erzeugt werden. Zudem lässt sich bei der Synchrotronstrahlung die Wellenlänge variieren, was z.B. bei Methoden zur experimentellen Phasenbestimmung (siehe Kapitel 3.1.4.5) ausgenutzt wird [91].

3.1.3.2 Kristallographische Grundbegriffe

Ein Kristall ist ein dreidimensionaler Körper, der sich aus periodisch wiederholenden Elementarzellen zusammensetzt. Die Elementarzellen werden mit den Vektoren $\vec{a}, \vec{b}, \vec{c}$ und den eingeschlossenen Winkeln α, β und γ beschrieben. Es gibt sieben primitive Kristallsysteme: triklin, monoklin, orthorhombisch, tetragonal, trigonal, hexagonal und kubisch. Die Ecken der

Elementarzellen bilden ein Gitter. Durch diese Gitterpunkte können die sogenannten Netzebenen gelegt werden. Dabei ergeben sich 14 verschiedenen Bravaisgitter-Typen. Die kleinste Einheit innerhalb eines Kristallgitters, die selbst keine innere Symmetrie besitzt, wird als asymmetrische Einheit (*asymmetric unit*; ASU) bezeichnet. Durch die Anwendung einer Symmetrieoperation auf die ASU kann der Inhalt der Elementarzelle beschrieben werden. Die verschiedenen Symmetrieelemente werden in den 32 möglichen Punktgruppen wiedergegeben. Kombiniert man diese Punktgruppen mit den Bravaisgitter-Typen, erhält man 230 mögliche Raumgruppen, von denen aber nur 65 bei Proteinen vorkommen können. Spiegelung und Inversion sind durch den Aufbau der Proteine aus L-Aminosäuren nicht möglich [91], [94].

Da der Abstand der Atome in der Größenordnung der Wellenlänge der Röntgenstrahlen liegt, wirken diese wie ein dreidimensionales Beugungsgitter. Durch die einfallende Röntgenstrahlung werden die Elektronen der Atome zu erzwungenen Schwingungen angeregt und strahlen Röntgenstrahlung gleicher Frequenz ab. Die von den einzelnen Atomen ausgehenden Wellen interferieren miteinander, es kommt abhängig vom Gangunterschied zu konstruktiver oder destruktiver Interferenz. Die Bedingungen für eine konstruktive Interferenz beschreibt das Braggsche Gesetz (Abbildung 3.2), das den Streuvorgang als Reflektion an den Netzebenen behandelt [91], [94], [95].

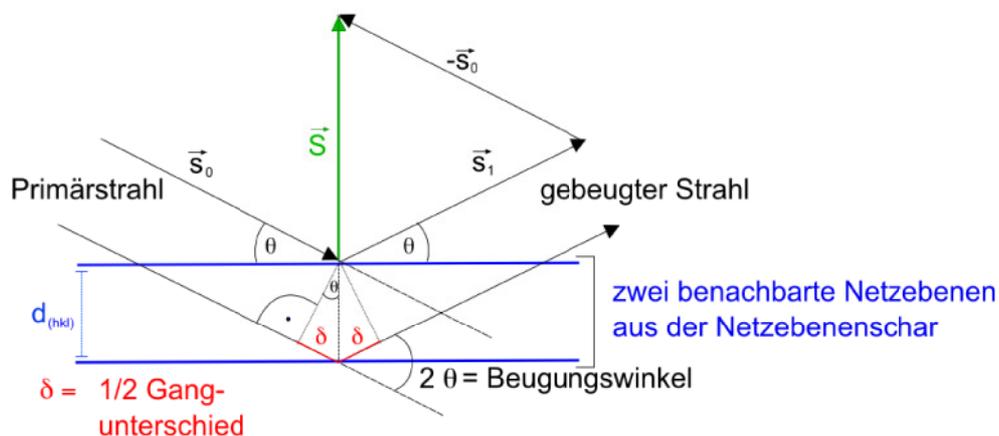


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Röntgenbeugung gemäß dem Braggschen Gesetz. Zusätzlich wird die vektorielle Darstellung zur Konstruktion des Streuvektors \vec{S} gezeigt. \vec{s}_0 steht für den einfallenden Röntgenstrahl, \vec{s}_1 für den gebeugten Strahl.

Trifft ein monochromatischer Röntgenstrahl unter dem Winkel θ auf eine Netzebenenchar mit dem Abstand $d_{(hkl)}$, erfolgt konstruktive Interferenz nur dann, wenn der Gangunterschied zweier an benachbarten Ebenen gestreuter Röntgenstrahlen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge λ beträgt.

$$n\lambda = 2d_{(hkl)} \cdot \sin\theta \quad \text{[Gleichung 2]}$$

- n : ganze Zahl
 λ : Wellenlänge
 $d_{(hkl)}$: Abstand der Netzebenen
 θ : Bragg-Winkel

Es gibt also für jede Netzebenenschar nur bestimmte Winkel unter denen konstruktive Interferenz stattfindet und ein Röntgenreflex auftritt. Umgekehrt enthalten die Reflexe Informationen über den Abstand der Netzebenen und damit über das Gitter. Es lassen sich also das Bravaisgitter und die Gitterkonstanten ermitteln. Der Winkel 2θ beschreibt die Ablenkung eines einzelnen gebeugten Strahls gegenüber der Primärstrahlrichtung. Je größer dieser Streuwinkel ist, desto mehr Detailinformation über die Struktur steckt in dem zugehörigen Reflex.

3.1.3.3 Reziprokes Gitter und Ewaldkonstruktion

Das Braggsche Gesetz (Gleichung 2) schafft also einen Zusammenhang zwischen einem Parameter, der die kristalline Ordnung beschreibt (dem Netzebenenabstand $d_{(hkl)}$), und weiteren Größen, die sich auf Eigenschaften der Röntgenstrahlung (Richtung, Wellenlänge) beziehen. Eine alternative Beschreibung dieses Zusammenhanges ist von Paul Peter Ewald vorgeschlagen worden [96].

Wegen ihrer Anschaulichkeit und Einfachheit hat sie ihren festen Platz in kristallographischen Lehrbüchern gefunden, auch wenn sie Definitionen erfordert, die auf den ersten Blick umständlich wirken:

- Das Kristallgitter mit seinen Netzebenenscharen hkl wird in ein sogenanntes reziprokes Gitter übertragen. Zu jeder Netzebenenschar wird ein reziproker Gittervektor konstruiert. Länge und Richtung eines reziproken Gittervektors hängen eindeutig von der zugehörigen Netzebenenschar ab: Jeder $r_{(hkl)}^{\rightarrow}$ steht senkrecht auf der zugehörigen Netzebenenschar und seine Länge ist gleich $1/d_{(hkl)}$. Das so konstruierte reziproke Gitter lässt sich nach der gleichen Vorschrift – Zeichnen von Netzebenenscharen und Konstruktion zugehöriger senkrechter Vektoren – wieder in das direkte Gitter übersetzen.
- Die Röntgenstrahlparameter werden in einen sogenannten Streuvektor zusammengefasst, für den gilt:

$$\vec{S} = \vec{s}_1 - \vec{s}_0 \quad \text{[Gleichung 3]}$$

- \vec{S} : Streuvektor
 \vec{s}_0 : Vektor der einfallenden Welle
 \vec{s}_1 : Vektor der gebeugten Welle

Da die Wellenvektoren \vec{s}_1 und \vec{s}_0 die Länge $1/\lambda$ haben, gilt für die Länge von \vec{S} :

$$|\vec{S}| = (2 \cdot \sin\theta) / \lambda \quad . \quad \text{[Gleichung 4]}$$

Mit diesen Definitionen vereinfacht sich das Braggsche Gesetz zu:

$$r_{(hkl)}^* = \vec{S} \quad \text{[Gleichung 5]}$$

$r_{(hkl)}^*$: reziproker Gittervektor

Zur konstruktiven Interferenz kommt es also genau dann, wenn der Streuvektor auf einen reziproken Gitterpunkt trifft.

Zur weiteren Veranschaulichung hat Ewald alle Streuvektoren \vec{S} , die bei einem festen Primärstrahl mit Wellenvektor \vec{s}_0 möglich sind, zusammengefasst. All diese \vec{S} -Vektoren beschreiben eine Kugel, die sogenannte Ewaldsche Lagekugel (Abbildung 3.3). Der Durchmesser dieser Kugel ist $2/\lambda$, ihr Radius also $1/\lambda$, was zeigt, dass es sich um eine Kugel im reziproken Raum handelt. Der Kristall liegt im Mittelpunkt der Kugel. Legt man nun den Nullpunkt des reziproken Gitters an den Ursprungsort all dieser \vec{S} -Vektoren, so gilt: Ein Reflex tritt auf, wenn ein reziproker Gitterpunkt die Oberfläche der Ewaldschen Lagekugel berührt. Dreht man den Kristall, so dreht sich gleichermaßen auch das reziproke Gitter, wodurch mehr und mehr reziproke Gitterpunkte die Oberfläche der Ewaldschen Lagekugel schneiden [91], [94].

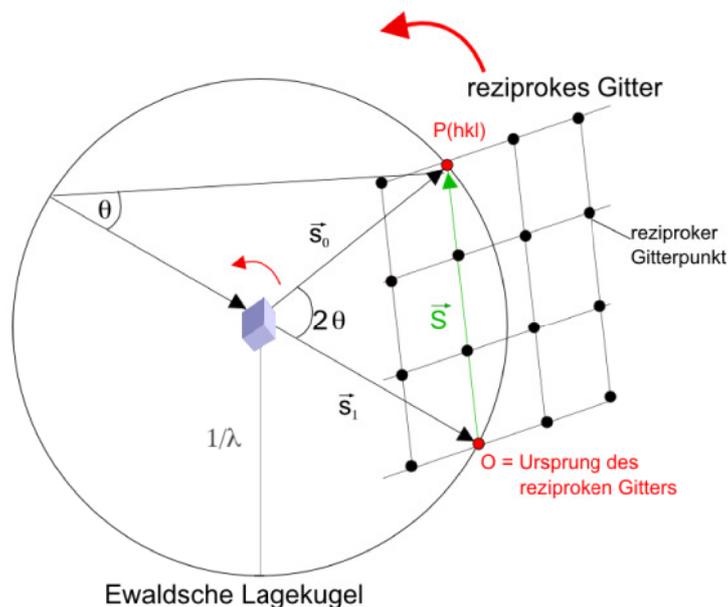


Abbildung 3.3: Ewaldsche Lagekugel zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen realem und reziprokem Raum. Die Kugel hat den Radius $1/\lambda$. Der Ursprung des reziproken Gitters liegt in O . \vec{s}_0 bezeichnet die Richtung des einfallenden Röntgenstrahls, \vec{s}_1 ist der Vektor des gebeugten Strahls. Kommt ein reziproker Gitterpunkt [hier $P(hkl)$] auf der Oberfläche der Ewaldschen Lagekugel zu liegen, tritt ein Reflex auf.

3.1.3.4 Fouriertransformation und Phasenproblem

Die bis jetzt dargestellten Zusammenhänge erklären nur die Lage der Röntgenreflexe, nicht aber die Intensitäten. Diese werden von dem Strukturfaktor $F_{(hkl)}$ bestimmt, der abhängig von der Art und Verteilung der Atome in der Elementarzelle ist. Die gemessene Intensität ist proportional zum Quadrat der Strukturfaktoramplitude, gleichzeitig ist der Strukturfaktor die Fouriertransformation der Elektronendichte.

$$I_{(hkl)} \propto |F_{(hkl)}|^2 \quad \text{[Gleichung 6]}$$

- $I_{(hkl)}$: Intensität des Reflexes
- $|F_{(hkl)}|$: Strukturfaktoramplitude
- h, k, l : Millersche Indices

Die Fouriertransformation entspricht dem Übergang von einem realen Gitter zum reziproken Gitter, ist also die mathematische Beschreibung des Röntgenbeugungsvorganges.

$$F(\vec{S}) = \int_V \rho(\vec{r}) e^{-2\pi i \vec{r} \cdot \vec{S}} dV \quad \text{[Gleichung 7]}$$

- $F(\vec{S})$: Strukturfaktorfunktion
- V : Volumen der Elementarzelle
- i : Index über alle symmetrieäquivalenten Einzelmessungen eines Röntgenreflexes
- \vec{r} : Ortsvektor im realen Gitter
- \vec{S} : Streuvektor, Gittervektor des reziproken Systems

Mit der reversen Fouriertransformation lässt sich vom Strukturfaktor zurück auf die Elektronendichte rechnen:

$$\rho(\vec{r}) = \int_{V_{\text{rezipr.}}} F(\vec{S}) e^{2\pi i \vec{r} \cdot \vec{S}} dV_{\text{rezipr.}} \quad \text{[Gleichung 8]}$$

- $\rho(\vec{r})$: Elektronendichtefunktion
- $V_{\text{rezipr.}}$: reziprokes Volumen der Elementarzelle

Diese Rückrechnung lässt sich mit der Fourierreihe vereinfachen: [Gleichung 9]

$$\rho(\vec{r}) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} F_{(hkl)} e^{2\pi i (hx + ky + lz)} = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} |F_{(hkl)}| e^{i \varphi_{(hkl)}} e^{2\pi i (hx + ky + lz)}$$

- x, y, z : Atomkoordinaten in der Elementarzelle, ergeben \vec{r}
- $\varphi_{(hkl)}$: Phasenwinkel des Strukturfaktors

Ziel dieser Rechnung ist es, die Koordinaten der Atome x , y , z zu bestimmen. $|F_{(hkl)}|$ lässt sich durch die Quadratwurzel der gemessenen Intensitäten errechnen. Durch die Beugung kommt es jedoch auch zu einer Verschiebung der einzelnen Phasen untereinander. Beim Diffraktionsexperiment kann man aber nur die Intensität der Reflexe messen. Die Phasenbeziehungen $\varphi_{(hkl)}$ gehen dabei jedoch verloren. Dies wird als Phasenproblem der Röntgenstrukturanalyse bezeichnet. Es gibt verschiedene Methoden, um dieses Problem zu lösen: die Verwendung von Schweratomderivaten beim isomorphen Ersatz, mit Hilfe der anomalen Dispersion (*multi-wavelength anomalous dispersion*, MAD; *single wavelength anomalous dispersion*, SAD), direkte Methoden und durch den molekularen Ersatz (*molecular replacement*; MR) [91], [94].

3.1.3.5 Das Röntgendiffraktionsexperiment

Bei einem Röntgendiffraktionsexperiment wird der Kristall mit einer Nylonschleufe auf einen drehbaren Goniometerkopf gebracht, wo er von einer *Cryo*-Anlage permanent auf 100 K gekühlt wird. Der Kristall wird so justiert, dass er von dem monochromatischen Röntgenstrahl getroffen wird. Die gebeugten Strahlen treffen dann auf den Detektor, der Primärstrahl wird abgefangen. Der Kristall wird während der Datensammlung in kleinen Winkelintervallen ($\Delta\varphi$) um eine definierte Achse gedreht. In jeder neuen Position wird ein Beugungsbild vom Detektor aufgezeichnet. Der Rotationsbereich hängt von der Kristallsymmetrie ab (Abbildung 3.4).

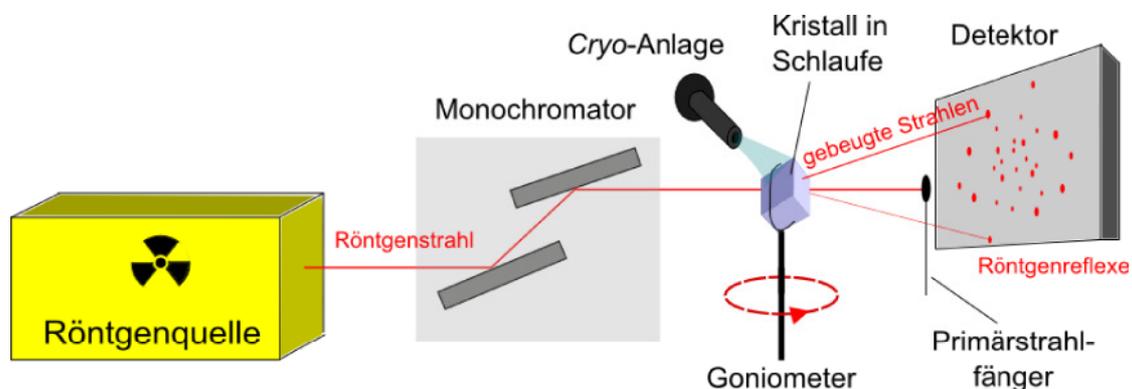


Abbildung 3.4: Aufbau eines Röntgendiffraktionsexperimentes. Der Kristall wird in den monochromatischen Röntgenstrahl gebracht und um wenige Grad gedreht. In jeder neuen Position wird das Beugungsbild von dem Detektor aufgezeichnet. Während der ganzen Messung wird der Kristall von einem Stickstoffstrom auf 100 K gekühlt.

Das experimentelle Ergebnis des Diffraktionsexperimentes ist ein Röntgenbeugungsmuster. Die Geometrie und Symmetrie des Beugungsbildes enthält alle Informationen über die Geometrie der Elementarzelle und die Symmetrie des Kristalls. Die Intensitäten der Reflexe beinhalten die Information über die dreidimensionale Anordnung der Atome im Kristall (Elektronendichteverteilung) und deren thermische Bewegung (Temperaturfaktor) [91].

3.1.4 Auswertung der Diffraktionsdaten

3.1.4.1 Prozessierung, Skalierung und Reduktion kristallographischer Daten

Ziel der Prozessierung ist es, jedem Reflex h, k, l eine gemittelte Intensität zuzuordnen. Zunächst werden starke Reflexe zur Ermittlung der Raumgruppe verwendet und dann die integralen Intensitäten aller Reflexe berechnet (Integration). Danach werden Messparameter, Abmessung der Elementarzelle und Mosaizität verfeinert. Man erhält die integrierten Reflexe und deren Standardabweichungen. Es folgt die Skalierung der Intensitäten, um Schwankungen der Intensität des Röntgenstrahls und Strahlenschäden am Kristall während der Messung auszugleichen. Darüber hinaus liefert die Skalierung Informationen über systematische Auslöschungen, mit denen sich Schraubenachsen identifizieren lassen. Bei der Datenreduktion werden dann die Intensitäten symmetrieäquivalenter Reflexe gemittelt und auf die asymmetrische Einheit des reziproken Raums reduziert [91].

3.1.4.2 Packungsdichte und Anzahl der Protomere pro asymmetrischer Einheit

Zu Beginn der Strukturanalyse ist unklar, wie groß der Anteil des Lösungsmittels im Kristall ist und wie viele Proteinmoleküle in einer asymmetrischen Einheit vorliegen. Mit dem Matthews- oder Packungsparameter V_m [93] lässt sich die Packungsdichte und Anzahl der Proteine pro asymmetrischer Einheit abschätzen:

$$V_m = \frac{V_{EZ}}{m * n * M} = \frac{V_{ASU}}{n * M} \quad \text{[Gleichung 10]}$$

V_m : Packungsparameter, Matthews-Koeffizient ($\text{\AA}^3/\text{Da}$)

V_{EZ} : Volumen der Elementarzelle

m : Multiplizität (Zahl der asymmetrischen Einheiten pro Elementarzelle)

$V_{ASU} = V_{EZ}/m$: Volumen der asymmetrischen Einheit

M : Molmasse des Proteins (Da)

n : Zahl der Proteinmoleküle pro asymmetrischer Einheit

Der V_m -Wert liegt gewöhnlich in einem Bereich von 1,8–4,5 $\text{\AA}^3/\text{Da}$. Die mögliche Anzahl von Protomeren pro asymmetrischer Einheit lässt sich unter dieser Einschränkung abschätzen.

3.1.4.3 Patterson-Funktion

Die Patterson-Funktion basiert nur auf den Strukturfaktoramplituden und kommt ganz ohne die Phaseninformation aus. Sie ist die Fouriersynthese der Reflexintensitäten [97]:

$$P(uvw) = \frac{1}{V_{EZ}} \sum_{hkl} |F_{(hkl)}|^2 \cos[2\pi(hu + kv + lw)] \quad \text{[Gleichung 11]}$$

u, v, w : Koordinaten innerhalb der Patterson-Zelle

Die Patterson-Funktion beschreibt die Abstände der einzelnen Atome innerhalb der Elementarzelle relativ zueinander und eignet sich dafür, die Positionen von Atomen direkt zu bestimmen, solange nur wenige in der Elementarzelle vorhanden sind. Dies ist bei Proteinkristallen nicht der Fall. Die Methode eignet sich aber auch für Proteinkristalle, wenn man nur die Position von Schweratomen bestimmen muss.

3.1.4.4 Phasenbestimmung durch molekularen Ersatz

Die Methode des molekularen Ersatzes eignet sich, wenn bereits die Struktur eines Proteins bekannt ist, das dem, dessen Struktur aufgeklärt werden soll, ähnlich ist. Dabei nimmt man an, dass Proteine, die eine Sequenzidentität von mehr als 30 % aufweisen, wahrscheinlich auch eine vergleichbare Faltung besitzen. Eine solche bereits bekannte Struktur wird beim molekularen Ersatz als Suchmodell verwendet und dabei in der asymmetrischen Einheit der unbekanntes Kristallstruktur platziert. Um die korrekte Position zu finden, führt man eine dreidimensionale Rotations- und Translationssuche durch [98]. Dabei vergleicht man die Pattersonfunktionen von Suchmodell und Zielmolekül. Wurde das Modell in der Elementarzelle positioniert, kann die Phase bestimmt werden und zusammen mit den experimentell bestimmten Amplituden zu einer Elektronendichte rücktransformiert werden [91].

3.1.4.5 Substruktur- und Phasenbestimmung mit Hilfe der anomalen Dispersion

Im Rahmen dieser Arbeit spielten spezielle Methoden der Röntgendiffraktometrie eine wesentliche Rolle, deren theoretischer Hintergrund im Folgenden in groben Zügen geschildert werden soll. Diese Methoden werden in der Literatur gemeinhin als „anomale Streuung“ oder „anomale Dispersion“⁵ bezeichnet, um sie von der „normalen“ Streuung und Beugung von Röntgenstrahlen zu unterscheiden.

⁵ Mit Dispersion wird normalerweise die Erscheinung bezeichnet, dass Wellenlängen verschiedener Frequenz unterschiedlich stark gebrochen werden. Deshalb ist der Begriff „anomale Dispersion“ streng genommen nicht korrekt.

Im Normalfall gilt nämlich für ein Röntgendiffraktionsmuster das sogenannte Friedelsche Gesetz:

$$\begin{aligned} I_{(hkl)} &= I_{(-h-k-l)} && \text{[Gleichungen 12–14]} \\ |F_{(hkl)}| &= |F_{(-h-k-l)}| \\ \varphi_{(hkl)} &= -\varphi_{(-h-k-l)} \end{aligned}$$

Das heißt, das Röntgenbeugungsmuster hat nicht nur die aus der Kristallsymmetrie (Raumgruppe) stammende Symmetrie, sondern – ihr überlagert – eine zusätzliche Inversionssymmetrie: die sogenannte die „Friedel-Symmetrie“. Dies bedeutet, zu jedem Röntgenreflex hkl gibt es einen „Friedel-Partner“ $-h-k-l$ mit gleicher Beugungsintensität, gleicher Strukturfaktoramplitude, aber negativer Phase.

Dieses Friedelsche Gesetz gilt, wie erwähnt, im Normalfall, in dem das Beugungsmuster ausschließlich ein Resultat der Interferenz von Wellen ist, die aus der Streuung des Primärstrahls an den Elektronen der kristallinen Probe hervorgehen. Die Streubeiträge aller Elektronen eines Atoms werden typischerweise zu einem „atomaren Streufaktor“ f zusammengefasst. Der atomare Streufaktor eines am Nullpunkt liegenden Atoms lässt sich in der Gaußschen Zahlenebene durch einen Pfeil symbolisieren, der auf der reellen Achse liegt (Abbildung 3.5 A).

Dieser Normalfall eigentlich ein Idealfall, denn in Wahrheit spielt die Absorption des Röntgenlichtes immer auch eine gewisse Rolle. Wenn ein Elektron das Röntgenlicht teilweise absorbiert, wird das Streulicht verzögert. Mit anderen Worten: Es kommt schon durch die elementaren Vorgänge am Entstehungsort des Streulichtes – und nicht erst durch spätere Interferenzen – zu Veränderungen von Längen und Phasen von Strukturfaktoren.

Diese Veränderungen betreffen also bereits den atomaren Streufaktor eines Atoms, das absorbierende Elektronen beherbergt (das Atom ist dann ein sogenannter anomaler Streuer). Um das Phänomen mathematisch und graphisch zu erfassen, wird zu diesem Streufaktor eine anomale Komponente addiert (Abbildung 3.5 B):

$$f = f_{norm} + f_{ano} = f_{norm} + f' + if'' \quad \text{[Gleichung 15]}$$

f : atomaren Streufaktor

f_{norm} : normaler Streuanteil

f_{ano} : anomaler Streuanteil

f' : reale Komponente des anomalen Streuanteils

i : Drehung um 90° gegen den Uhrzeigersinn

f'' : imaginäre Komponente des anomalen Streuanteils

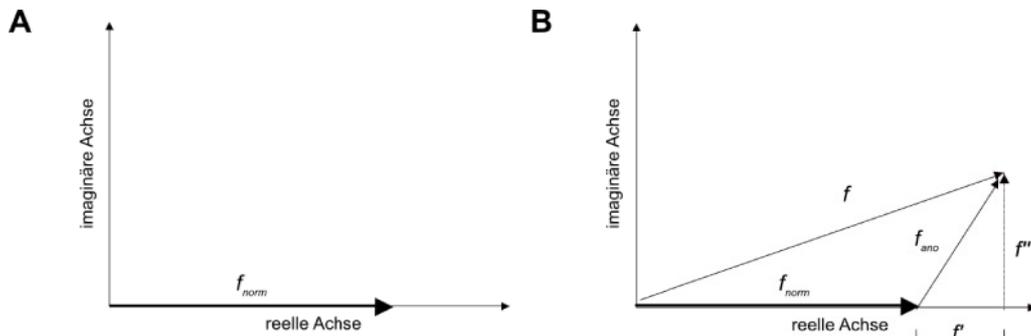


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des atomaren Streufaktors. (A) freies Elektron (B) absorbierendes Elektron (anomaler Streuer)

Die anomale Komponente f_{ano} ist umso stärker, je näher die Wellenlänge des Primärstrahls den Absorptionskanten der Atome kommt. Proteinkristalle bestehen typischerweise aus leichten Atomen (H, C, O, N, S) – bei den üblichen Wellenlängen sind ihre Absorptionskanten so weit entfernt, dass f_{ano} vernachlässigbar klein ist. Anders sieht es jedoch aus, wenn es durch Addition schwererer Atome und/oder gezielter Veränderung der die Wellenlänge zu signifikanten Absorptionseffekten an bestimmten Atomen kommt. Nun kann f_{ano} nicht mehr ignoriert werden. Die Konsequenz sieht man in Abbildung 3.6, in der zwei Gesamtstrukturfaktoren $F_{(hkl)}$ (oberer Quadrant) und $F_{(-h-k-l)}$ (unterer Quadrant) einer zweiatomigen Struktur – bestehend aus einem normal und einem anomal streuenden Atom – graphisch berechnet werden. Der Strukturfaktor $F_{(hkl)}$ ist eine komplexe Zahl, dessen Lage in der komplexen Zahlenebene durch den Phasenwinkel und dessen Länge durch die Strukturfaktoramplitude beschrieben werden. Bei allen nicht-phasenverzögerten Streubeiträgen (f_{norm}, f') erfolgt beim Übergang von hkl zu $-h-k-l$ entsprechend der Friedelschen Gleichung für die Phase eine Spiegelung der reellen Achse. Der absorptionsbeeinflusste Term f'' jedoch wird an der imaginären Achse gespiegelt. In der Gesamtaddition bedeutet dies, dass das Friedelsche Gesetz keine Gültigkeit mehr hat:

$$|F_{(hkl)}| \neq |F_{(-h-k-l)}| \text{ und daher} \quad \text{[Gleichungen 16–18]}$$

$$I_{(hkl)} \neq I_{(-h-k-l)}$$

$$\varphi_{(hkl)} \neq -\varphi_{(-h-k-l)}$$

Man bezeichnet zwei Strukturfaktoren $F_{(hkl)}$ und $F_{(-h-k-l)}$ im allgemeinen als „Bijvoet-Partner“⁶ und nur im Spezialfall der Gültigkeit des Friedelschen Gesetzes als „Friedel-Partner“.

⁶ Der Begriff geht zurück auf Johannes Martin Bijvoet, durch die anomalen Streuung erstmals die absolute Konfiguration einer chemischen Verbindung (Natriumrubidiumtartrat) experimentell bestimmen konnte.

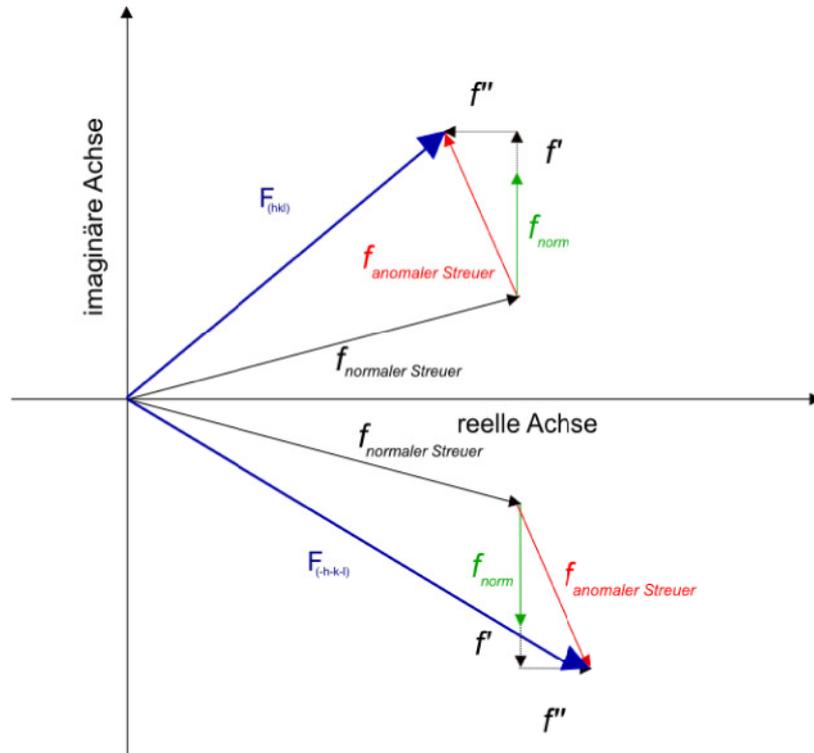


Abbildung 3.6: Strukturfaktor unter der Annahme, dass zwei Atome zur Streuung beitragen. Eines davon ist ein anomaler Streuer. Die Komponente des anomalen Streuers (rot) setzt sich aus einem anomalen Anteil (gestrichelt) und einem normalen Anteil (grün) zusammen. Da $|F_{(hkl)}| \neq |F_{(-h-k-l)}|$ ist, gibt es keine Friedelsymmetrie.

Der Bruch der Friedelsymmetrie durch anomal-streuende Atome lässt sich dazu ausnutzen, diese anomalen Streuzentren zu lokalisieren. Dazu berechnet man eine „anomale Fourierdichte“, eine Dichtekarte, in die idealerweise nur partielle Strukturfaktoren eingehen, die ausschließlich auf den f'' -Termen beruhen. Man gelangt an diese partiellen Strukturfaktoren durch zwei Näherungen:

- Die Amplituden dieser partiellen Strukturfaktoren sind ungefähr gleich den anomalen Differenzen:

$$D = |F_{(hkl)}| - |F_{(-h-k-l)}|. \quad \text{[Gleichung 19]}$$

- Die Phasen dieser partiellen Strukturfaktoren sind ungefähr gleich den Endphasen, die sich aus der verfeinerten Struktur berechnen lässt, jeweils vermindert um 90° . Man subtrahiert 90° , da durch die Absorption die Schwingung der Elektronen verzögert wird.

Mit der aus der folgenden Fouriersynthese resultierenden anomale Dichtekarte enthält Maxima an den Orten der anomalen Streuer.

$$\rho(\vec{r})_{ano} = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} (|F_{(hkl)}| - |F_{(-h-k-l)}|) e^{i \cdot \varphi_{(hkl)} - 90^\circ} e^{2\pi \cdot i (hx + ky + lz)} \quad \text{[Gleichung 20]}$$

3.1.4.6 Verfeinerung

Ziel einer kristallographischen Verfeinerung ist es, eine möglichst gute Anpassung des Modells an die gemessenen Daten zu erreichen, d.h. die Differenz zwischen F_{calc} und F_{obs} (berechneter und gemessener Strukturfaktoramplitude) unter Beibehaltung sinnvoller Strukturparameter (Bindungslängen und -winkel etc.) zu minimieren. Der kristallographische und der freie R-Wert sind das Maß für die Übereinstimmung (Kapitel 3.1.4.7). Dabei werden zunächst nur die Positionen der Atome, später auch die Temperaturfaktoren (B-Faktoren) iterativ optimiert. In den zyklischen Prozess der Verfeinerung gehen auch Informationen über Standardbindungslängen und -winkel oder Van-der-Waals-Abstände als Randbedingungen ein, die je nach Qualität des Datensatzes unterschiedlich gewichtet werden können. Eine andere Einschränkung, die vor allem am Anfang der Verfeinerung Sinn macht, ist, Molekülbereiche zu einem starren Körper zusammenzufassen (*rigid body*), die dann nur gemeinsam verändert werden können. Eine weitere Möglichkeit ist das virtuelle Aufheizen und anschließende Abkühlen des Proteinmoleküls, um die Energie der Struktur in das globale Minimum zu bringen. Die Modelle der Verfeinerungsschritte können jeweils in Graphikprogrammen wie O [99] oder COOT [100] überprüft und manuell verbessert werden. Dafür werden die $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ und die $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichten berechnet. Die $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Dichte gibt ein Abbild der Elektronendichte im Kristall wieder, während die $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Dichte die Unterschiede zwischen berechneter und beobachteter Elektronendichte zeigt. Positive Bereiche bedeuten, dass die Elektronendichte nicht angemessen gefüllt wurde, negative Bereiche bedeuten, dass die Dichte überinterpretiert ist [91].

3.1.4.7 Qualitätskriterien

Die Qualität der prozessierten Daten wird mit dem linearen R-Wert und der Multiplizität angegeben. Die Multiplizität gibt die Häufigkeit symmetrieverwandter Reflexe an. Der lineare R-Wert (R_{sym} -Wert) gibt die Übereinstimmung mehrfach gemessener identischer Reflexe für symmetrieverwandte Reflexintensitäten $I_{(hkl)}$ an:

$$R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{i(hkl)} - \overline{I_{(hkl)}}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_{i(hkl)}} \quad [\text{Gleichung 21}]$$

R_{sym} : linearer R-Wert

$I_{(hkl)}$: Reflexintensitäten

$\overline{I_{(hkl)}}$: Mittelwert der Reflexintensitäten für jeden Reflex

Die Qualität der endverfeinerten Struktur kann mit dem Korrelationskoeffizienten und dem kristallographischen R-Wert bewertet werden. Ziel der Verfeinerung ist es, den R-Wert von Zyklus zu Zyklus zu verringern:

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{obs}(hkl)| - k |F_{calc}(hkl)| \right|}{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl)|} \quad \text{[Gleichung 22]}$$

R : R-Wert

$|F_{obs}(hkl)|$: gemessene Strukturamplituden

$|F_{calc}(hkl)|$: Strukturamplituden aus den Atomkoordinaten des Suchmodells

k : Skalierungsfaktor

$$C = \frac{\sum_{hkl} \left[(|F_{obs}(hkl)| - \overline{|F_{obs}(hkl)|}) * (|F_{calc}(hkl)| - \overline{|F_{calc}(hkl)|}) \right]}{\sqrt{\sum_{hkl} (|F_{obs}(hkl)| - \overline{|F_{obs}(hkl)|})^2 * \sum_{hkl} (|F_{calc}(hkl)| - \overline{|F_{calc}(hkl)|})^2}} \quad \text{[Gleichung 23]}$$

C : Korrelationskoeffizient

Der freie R-Wert (R_{free}) stellt ein besseres Konvergenzmerkmal zwischen Modell und gemessenen Daten dar und dient dazu, eine Überanpassung (*overfitting*) zu vermeiden. Dabei wird eine zufällige Auswahl an Reflexen vorgenommen (5–10%), die nicht in die Verfeinerung miteinbezogen wird. Sinkt der freie R-Wert bei der Verfeinerung, obwohl die Reflexintensitäten des Testdatensatzes nicht miteingehen, so wird die Struktur wirklich besser. Besonders wichtig ist es aber auch, Details der Geometrie mit Programmen wie z.B. PROCHECK [101] während der Verfeinerung zu überprüfen [91].

3.2 Kalorimetrie – Zugang zu Stabilitäts- und Bindungseigenschaften von Proteinen

3.2.1 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Strukturelle Daten alleine, auch in Kombination mit informatischen Methoden, können oft nur wenig über die treibende Kraft oder die Affinität einer Bindung aussagen. Um die Thermodynamik einer Bindung zu untersuchen, eignen sich kalorimetrische Methoden.

Zum Verständnis der isothermalen Titrationskalorimetrie (*isothermal titration calorimetry*, ITC) müssen zunächst einige thermodynamische Grundbegriffe erklärt werden. Chemische Stabilität und thermodynamisches Gleichgewicht repräsentieren die Balance zwischen zwei gegenläufigen Tendenzen: Das Bestreben von Systemen geringere Energien anzunehmen (weniger Enthalpie H) und das Bestreben eine Vielfalt von verschiedenen Zuständen anzunehmen (höhere Unordnung bzw. Entropie S). Diese Tendenzen werden in der Änderung der Freien Enthalpie (ΔG) ausgedrückt:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S = \Delta G^\circ - RT \ln \left(\frac{[AB]}{[A][B]} \right) = \Delta G^\circ - RT \ln(K_B) \quad [\text{Gleichung 24}]$$

ΔG : Änderung der Freien Enthalpie, J mol^{-1}

ΔH : Enthalpieänderung, J mol^{-1}

T : Absolute Temperatur, K

ΔS : Entropieänderung, $\text{J (K}^{-1}\text{mol}^{-1})$

ΔG° : Änderung der Freien Standardenthalpie, J mol^{-1}

R : Gaskonstante, $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

K_B : Bindungskonstante, M^{-1}

Änderungen können dabei spontan ablaufen, wenn ΔG einen negativen Wert hat. Ist ein System im Gleichgewicht ($\Delta G = 0$) gilt:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln(K_B) = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad [\text{Gleichung 25}]$$

ΔH° : Änderung der Standardenthalpie, J mol^{-1}

ΔS° : Änderung der Standardentropie, $\text{J (K}^{-1}\text{mol}^{-1})$

ITC ist eine direkte Methode zur Bestimmung der Bindungswärme zweier Bindungspartner. Die Bindungswärme wird bei gleichbleibender Temperatur gemessen, indem ein Bindungspartner zum anderen Bindungspartner in der Messzelle des Kalorimeters titriert wird. Nach jeder Injektion eines

kleinen Aliquots aus der computergesteuerten, hochpräzisen Spritze in die Messzelle wird die freigegebene oder absorbierte Wärme in der Messzelle in Bezug auf die Referenzzelle gemessen, die mit Wasser gefüllt ist. Dabei wird die Referenzzelle auf eine bestimmte, gleichbleibende Temperatur geheizt. Die Heiztemperatur für die Messzelle wird nun so angepasst, dass die Temperatur beider Zellen, die sich in einem adiabatischen Mantel befinden, stets gleich ist. Gleichzeitig wird die Spritze gedreht und mit den Rührflügeln an der Spritzenspitze die Messzelle durchmischt (Abbildung 3.7).

Die Bindungskonstante (K_B), die Reaktionsstöchiometrie (n) und die Standardenthalpieänderung (ΔH°) können durch eine Kurvenanpassung bestimmt werden. Schließlich kann die Standardentropieänderung (ΔS°) gemäß:

$$\Delta S^\circ = \frac{RT \ln(K_B) + \Delta H^\circ}{T} \quad [\text{Gleichung 26}]$$

bestimmt werden.

Führt man die ITC-Experimente bei unterschiedlichen Temperaturen aus, so kann man auch die Änderung der Wärmekapazität (ΔC_p) ermitteln. Unter der Bedingung, dass ΔG° temperaturunabhängig ist, gilt:

$$\Delta C_p = \frac{d(\Delta H^\circ)}{dT} = T \frac{d(\Delta S^\circ)}{dT} \quad [\text{Gleichung 27}]$$

Auf diese Weise ist es mit isothermaler Titrationskalorimetrie möglich ein Bindungssystem vollständig thermodynamisch zu beschreiben.

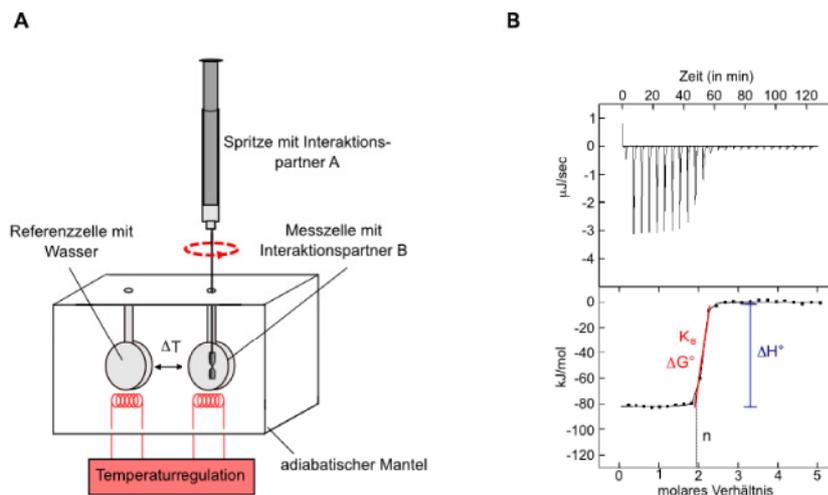


Abbildung 3.7: (A) ITC-Aufbau. Mess- und Referenzzelle befinden sich in einem adiabatischen Mantel und werden auf eine gleichbleibende Temperatur geheizt. Nach jeder Injektion aus der Spritze wird die Temperatur abgeglichen. (B) ITC-Messung. Die obere Hälfte zeigt die Rohdaten. Jeder Peak entspricht einer Injektion. Die untere Hälfte zeigt die integrierten Peaks. Die Kurve ist das Ergebnis einer Kurvenanpassung. Es lassen sich Bindungskonstante (K_B), Reaktionsstöchiometrie (n), Standardenthalpieänderung (ΔH°) und Standardentropieänderung (ΔS°) ermitteln.

Die Änderung der Standardenthalpie (ΔH°) spiegelt die Änderungen der Interaktionen zwischen Atomen wider. Die Zunahme an Bindungen bewirkt das Freiwerden von Wärme, oder eine negative Änderung der Enthalpie, d.h. die Reaktion ist exotherm. Die beobachtete Enthalpie repräsentiert die Summe von vielen brechenden und neu gebildeten Bindungen, die ihrerseits positive und negative Beiträge leisten [102].

Die Änderung der Standardentropie ΔS° steht im Zusammenhang mit der Unordnung im System. Die Zunahme von Bindungen an sich bewirkt schon eine Abnahme der Unordnung. Ein negativer Wert für ΔH° und ein positiver ΔS° -Wert ist für eine Reaktion begünstigend. Es wird häufig beobachtet, dass die Zunahme von Bindungen sowohl negative Werte für ΔH° und ΔS° zur Folge hat, was zu gegensätzlichen Beiträgen zu ΔG° führt (Enthalpie/Entropie-Kompensation). Die Änderung der Wärmekapazität ΔC_p bestimmt, inwieweit sich ΔH° und ΔS° mit der Temperatur ändern.

Hydrophobe Wechselwirkungen sind oft charakterisiert durch kleine (häufig positive) Änderungen der Enthalpie, große positive Änderungen der Entropie und einen negativen Beitrag zur Wärmekapazität. In Gegenwart von nicht-polaren Oberflächen wird das normale Wasserstoffbrückennetzwerk von Wasser reorganisiert. Die Wassermoleküle ordnen sich um die unpolare Komponente an und gehen untereinander stärkere Bindungen ein, da die unpolaren Gruppen keine Wasserstoffbrückenbindungen bereitstellen können. Die Ordnung der Wassermoleküle, die direkt an die hydrophoben Moleküle angrenzen, ist höher, die Standardentropie entsprechend geringer. Die Bindungsthermodynamik von hydrophoben Wechselwirkungen ist durch eine Zunahme der Entropie gekennzeichnet, die auf die Rückkehr von relativ hochgeordneten Wassermolekülen aus der Grenzfläche zu der hydrophoben Oberfläche, die nun zur Interaktionsfläche der beiden interagierenden Moleküle wird, in das übrige Wasser zurückzuführen ist. Der negative Beitrag zur Wärmekapazität kann dadurch erklärt werden, dass die geordnete Hülle aus Wassermolekülen an der hydrophoben Oberfläche bei höheren Temperaturen schwächer ist [102].

Für die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einem Makromolekül und einem Ligand müssen vorher genauso viele Wasserstoffbrückenbindungen zu Wassermolekülen gebrochen werden. Daher ist der thermodynamische Beitrag zur Bindung nur sehr gering. Auch Konformationsänderungen verursachen nur kleine Beiträge zu ΔH° und ΔS° , die auch noch mit großer Enthalpie/Entropie-Kompensation einhergehen [102].

Eine alternative Technik zur Bestimmung von Bindungskonstanten ist die Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance*; SPR), bei der ein Interaktionspartner auf einem Chip immobilisiert wird. Das thermodynamische Profil kann mit SPR nicht direkt⁷ bestimmt werden, dafür aber die kinetischen Konstanten k_{on} und k_{off} .

3.2.2 Differentialrasterkalorimetrie (DSC)

Die Differentialrasterkalorimetrie („*differential scanning calorimetry*“) wird oft zur Bestimmung der Entfaltungstemperatur (*transition midpoint*; T_m) eines Makromoleküls angewendet. Im Verlauf einer DSC-Messung wird die Temperatur der Probe systematisch erhöht oder gesenkt und dabei die Wärmekapazität C_p gemessen (Abbildung 3.8). Das DSC-Gerät besteht aus jeweils einer wärmeisolierten Referenz- und Probenzelle. Der Puffer in der Referenzzelle muss identisch mit demjenigen in der Probenzelle sein. Beiden Zellen wird Wärmeenergie zugeführt, entsprechend ihrer Wärmekapazität heizen sie sich unterschiedlich schnell auf. Damit die Temperatur der Zellen gleich bleibt, muss eine von ihnen stärker geheizt werden. Die Differenz der zugeführten elektrischen Energie dient als Maß für die Wärmekapazität ΔC_p der Probe.

Die Größe der Wärmekapazität hängt davon ab, wie viele Möglichkeiten es gibt die zugeführte Energie im System zu verteilen. Bei der Entfaltung eines Makromoleküls ändert sich die Wärmekapazität deutlich. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Wasserstoffbrücken brechen und sich die Lösungsmittelmoleküle um die unpolaren Seitenketten anordnen, die während der Entfaltung zum Lösungsmittel exponiert werden.

Die Form und die Fläche einer Übergangskurve enthalten die thermodynamischen Informationen des Entfaltungsprozesses unter der Annahme, dass die Entfaltung reversibel ist. Die integrierte Fläche unter der Kurve, bezogen auf die Stoffmenge des Proteins in der Messzelle, ist ein Maß für die Standardenthalpie des Übergangs. Die Temperatur am Peakmaximum (T_m) ist der Punkt an dem die Hälfte der Proteinmoleküle entfaltet sind [103].

Mit DSC kann unter anderem untersucht werden, welche Rolle Liganden bei der Stabilisierung bzw. Destabilisierung eines Proteins spielen. Bindet ein Ligand (dieser kann ein kleines Molekül oder ein anderes Protein sein) vorzugsweise an die gefaltete Form eines Proteins, dann stabilisiert dies den nativen Zustand, d.h. der T_m ist höher. Indirekt lässt sich aus der Verschiebung der Schmelzpunkte, der Änderung der Standardenthalpie ΔH° und der Änderung der Wärmekapazität ΔC_p unter der Voraussetzung einer reversiblen Entfaltung die Bindungskonstante berechnen.

⁷ Mit SPR kann das thermodynamische Profil einer Bindung nur indirekt über eine Temperaturabhängigkeit von K_B bestimmt werden (Messungen bei verschiedenen Temperaturen). Daraus lassen sich ΔH° und ΔS° berechnen.

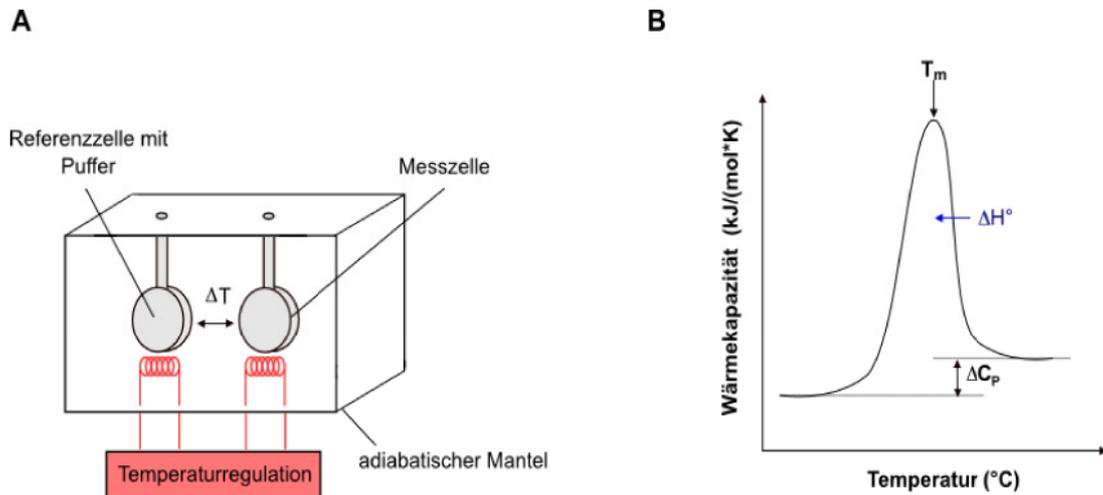


Abbildung 3.8: (A) DSC-Aufbau. Der Referenz- und Probenzelle wird Wärmeenergie zugeführt. Entsprechend ihrer Wärmekapazität heizen sie sich unterschiedlich schnell auf. Die Differenz der zugeführten elektrischen Energie dient als Maß für die Wärmekapazität ΔC_p der Probe. (B) DSC-Messung nach Abzug der Referenzmessung und der Basislinie. Die Übergangskurve enthält die Informationen über ΔC_p , ΔH° und die Entfaltungstemperatur T_m .

Weitere Informationen kann man auch durch den Vergleich von der direkt gemessenen kalorimetrische Enthalpie $\Delta H^\circ_{\text{cal}}$ und der errechneten van't Hoff Enthalpie $\Delta H^\circ_{\text{vH}}$ ⁸ erhalten. Die van't Hoff Enthalpie $\Delta H^\circ_{\text{vH}}$ berechnet sich folgendermaßen:

$$\Delta H^\circ_{\text{vH}} = -R \left(\frac{d \ln(K_B)}{d(1/T)} \right) \quad [\text{Gleichung 28}]$$

Stimmt die van't Hoff Enthalpie nicht mit der kalorimetrischen Enthalpie überein, kann es sich bei der Entfaltung um einen mehrstufigen Prozess handeln. In diesem Fall wird der Übergang breiter als angenommen und $\Delta H^\circ_{\text{vH}}$ wird kleiner als $\Delta H^\circ_{\text{cal}}$. Alternativ kann das Protein kooperativ als Dimer oder höheres Oligomer entfalten. Dann wird der Übergang schärfer als für einen zweistufigen Prozess eines Monomers. In diesem Fall ist $\Delta H^\circ_{\text{vH}}$ größer als $\Delta H^\circ_{\text{cal}}$ [103].

⁸ Die van't Hoff Enthalpie ΔH_{vH} wird häufig im sogenannten van't Hoff-Plot experimenteller Daten bestimmt. Dabei wird $\ln(K_B)$ gegen $1/T$ aufgetragen, die Steigung der Geraden entspricht ΔH_{vH} dividiert durch R .

4. Material und Methoden

4.1 Verwendete Materialien, Geräte und EDV-Systeme

4.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien hatten *p.a.* Qualität und wurden von den Herstellern Sigma-Aldrich, GE Healthcare, Fermentas, NEB, Merck, J. T. Baker, Roth, Roche, Fluka. bezogen. Das Wasser wurde in einer Reinstwasseranlage aufbereitet und Lösungen, mit Ausnahme von Nährmedien und Enzymverdünnungen, wurden durch eine 0,2 µm Membran filtriert.

4.1.2 Materialien, Geräte und EDV-Systeme

Die wichtigsten Materialien, Geräte und EDV-Systeme sind in den Tabellen 4.1, 4.2 und 4.3 zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Autoklaven	
Autoklav, 2540 EL	Systemec, Wettenberg, DE
Autoklav, Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, DE
Chromatographie	
FPLC-System	Pharmacia Biotech, Freiburg, DE
Kalorimetrie	
Differential scanning calorimeter (DSC)	Microcal, Northampton, US
Isothermal titration calorimeter (ITC)	Microcal, Northampton, US
Thermovac und sonstiges Zubehör	Microcal, Northampton, US
Orbitalschüttler	
Certomat BS-1	B. Braun Biotech, Melsungen, DE
KL-2C	Edmund Bühler, Hechingen, DE
Waagen	
Analysewaage FA-210-4	Faust, Köln, DE
Laborwaage SBA 52	Scaltec, Heiligenstadt, DE
Zentrifugen	
RC 3B Plus und RC 5B Plus	Sorvall, Newtown CT, US
5417 C und 5810 R	Eppendorf, Hamburg, DE

Bezeichnung	Hersteller
sonstige Geräte	
Agarose Gelelektrophoresekammern	CBS Scientific Co., Del Mar, US
Agarose Gelelektrophoresekammern „Primo Gelsystem“	Thermo, Erlangen, DE
Digitalkamera EOS 400D	Canon, Tokio, JP
Elektrophorese Netzgerät	BioRad, München, DE
French Press Aminco	SLM-Instruments, Rochester, USA
Inkubationsschrank	Heraeus Instruments, Hanau, DE
Mikromixer (Vortex) Reax 2000	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
PCR-Maschine	Applied Biosystems, Foster City, US
PCR-Maschine, Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg, DE
PH-Elektrode	Knick, Berlin, DE
PH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin, DE
Photometer Ultraspec 200	Pharmacia Biotech, Freiburg, DE
Pipettierautomat Hydra II	Matrix, ThermoFisher Scientific, Handforth, UK
Reinstwasseranlage Seralpur Delta UV	Eseral, Ransbach-Baumbach, DE
Research-Pipetten	Eppendorf, Hamburg, DE
SDS-Gelkammer für Minigele	BioRad, München, DE
Sequenzierungsmaschine, 310 Genetic Analyzer ABI PRISM™	Applied Biosystems, Foster City, US
Stereomikroskop Leica S8APO Stereo Zoom mit Kamera	Leica, Solms, DE
Stereomikroskop Stemi 2000-C	Zeiss, Jena, DE
Sterilbank	Heraeus Instruments, Hanau, DE
UV-Flächenstrahler	Faust, Schaffhausen, CH
UV-Kammer	LTF Labortechnik, Wasserburg, DE

Tabelle 4.2: Verwendete Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Chromatographie	
CM Sepharose-Säule	Whatman, Kent, UK
P11 Cellulose-Säule	Whatman, Kent, UK
HiPrep Superdex 200-Säule	Amersham Pharmacia, Freiburg, DE
HiTrap Heparin-Säule	Amersham Pharmacia, Freiburg, DE
Kristallisation	
Cryoloops	Hampton Research, Aliso Viejo, US
sonstige Cryowerkzeuge	Hampton Research, Aliso Viejo, US
Kristallisationsschalen (24-Vertiefungen)	Hampton Research, Aliso Viejo, US
Intelli Plates (96 Vertiefungen, jeweils zwei Tropfen pro Reservoir)	Art-Robins Instruments, Sunnyvale, US
Kristallisations-Screens	Hampton Research, Aliso Viejo, US und Jena Bioscience, Jena, DE
sonstige Materialien	
Centricon 10	Millipore, Eschborn, DE
Bradford Proteinassay	BioRad, München, DE
Celluloseacetatfilter 0,2 µm	Sartorius, München, DE
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit	Peqlab, Erlangen, DE
Minipräparationskit	Sigma-Aldrich, München, DE
QIAquick spin Kit	Qiagen, Hilden, DE
QuikChange®II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, US

Tabelle 4.3: Verwendete EDV-Systeme

Programm (-Paket)	Entwickler, Referenz
Bild-, Tabellen- und Textverarbeitung	
Adobe Illustrator 10	Adobe Systems, San Jose, US
ImageJ 1.41	National institute of health, US (<i>open source</i>)
Inkscape 0.46	inkscape.org (<i>open source</i>)
Open Office 3.0	openoffice.org (<i>open source</i>)
Origin 7.0	Origin Lab, Northampton, US
Darstellung von Proteinstrukturen	
BOBSCRIPT	Esnouf (1997); [1]
BRAGI	Schomburg & Reichelt (1988); [4]
COOT	Emsley & Cowtan (2004); [100]
O	Jones et al. (1991); [99]
PyMol	DeLano Scientific LLC (2002); [3]
RASTER3D	Merrit & Cacon (1997); [2]
Kinetik	
GraFit 4.0	Erithacus Software, Horley, UK
Swift	Pharmacia Biotech, Freiburg, DE
Klonierung	
Serial Cloner 1.3	Serialbasics
Kristallographie	
CCP4-Programmpaket	CCP4 (1994); [104]
CNS-Programmpaket	Brunger et al. (1998); [105]
HKL-Programmpaket	Otwinowski & Minor (1997); [106]

4.2 Puffer und Lösungen

4.2.1 LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)

tryptisch verdautes Casein	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g

Es wurde auf 1 l mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ aufgefüllt und anschließend autoklaviert. Für LB-Platten wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 17 g Agar-Agar pro Liter Medium hinzugefügt. Anschließend wurde das Medium in Petrischalen gegossen. Ein Antibiotikum wurde erst nach dem Abkühlen auf unter 50 °C hinzugegeben. Die Platten wurden bei 4 °C aufbewahrt.

4.2.2 SOC-Medium

tryptisch verdautes Casein	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g

Alle Stoffe wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gelöst, auf 980 ml aufgefüllt und 10 ml einer 250 mM KCl-Lösung hinzugefügt. Anschließend wurde die Lösung mit 5 M NaOH-Lösung auf pH 7 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden 5 ml einer getrennt autoklavierten 2 M MgCl_2 -Lösung und 20 ml einer 1 M Glucoselösung hinzugefügt.

4.2.3 TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)

10 mM	Tris
1 mM	EDTA

Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf 1 l aufgefüllt.

4.2.4 50-fach TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)

2 M	Tris
1 M	Essigsäure
50 mM	EDTA pH 8

Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf 1 l aufgefüllt.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Verwendete Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind mit ihren genotypischen Eigenschaften und ihren Bezugsquellen in folgender Tabelle aufgelistet:

Tabelle 4.4: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle, Referenz
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F- <i>endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rK-,mK+) supE44 relA1 (80D lacZΔM15) Δ(lacZYA-argF)U169</i>	Amersham Pharmacia, Uppsala, SE [107]
<i>E. coli</i> DH5α	F- <i>endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK-,mK+) supE44 relA1 (Φ80D lacZΔM15) Δ(lacZYA-argF)U169</i>	Invitrogen, Carlsbad, US [108]
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10(Tetr)]</i>	Stratagene, La Jolla, US

4.3.2 Expressionsvektor

Zur Expression der Proteine in *E. coli* wurde der Vektor pT7-7 verwendet (Abbildung 4.1). Dieser beinhaltet einen T7-RNA-Polymerase-Promotor, ein Ampicillinresistenzgen, den ColE1 Replikationsursprung, eine Ribosomenbindungsstelle (rbs) und ein Startkodon (ATG) vor der Polylinker-Sequenz.

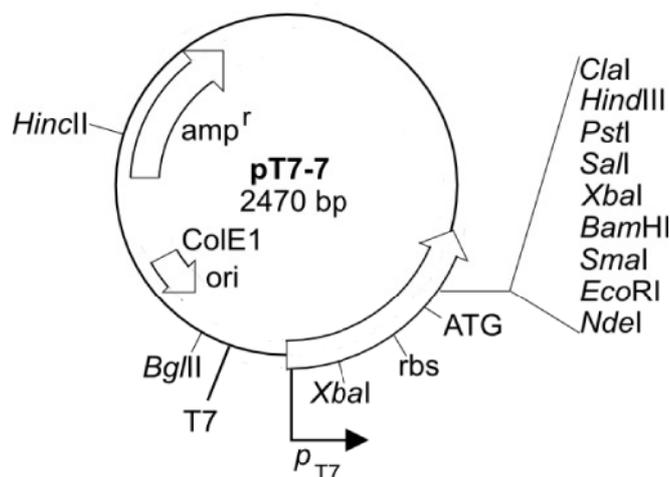


Abbildung 4.1: Aufbau des Expressionsvektors pT7-7

4.3.3 Verwendete Oligonucleotide

Folgende synthetisch hergestellte Oligonucleotide (Firma: DNA Technology A/S, Aarhus, DN) wurden bei den molekularbiologischen Arbeiten verwendet:

Tabelle 4.5: Verwendete Oligonucleotide

Name	Sequenz	Funktion
B1134	5' GGAATTCATATGTCGGGACCCGTGCCAAG 3'	Vorwärtsprimer <i>hsCK2α</i> ¹⁻³³⁵
B1165	5' CCCAAGCTTTCAAATCCCTGACATCATATTGGCGC 3'	Rückwärtsprimer für <i>hsCK2α</i> ¹⁻³⁵⁵
B1166	5' CCCAAGCTTTACGTAGAAATAGGGGTGCTCCATTGCC 3'	Rückwärtsprimer für CK2 α ¹⁻³²⁶ (für die Fusion mit dem C-Terminus von <i>hsCK2α</i>)
B1158	5' GAAATCAAGATGACTACCAGGCGGTTGAAAAT-TAGGCCGAG 3'	Vorwärtsprimer <i>hsCK2α</i> ^{1-335, Leu41Ala}
B1159	5' CTCGGCCTAATTTTCGAACCGCCTGGTAGT-CATCTTGATTC 3'	Rückwärtsprimer <i>hsCK2α</i> ^{1-335 Leu41Ala}
B1160	5' GCCATCAACATCACAAATAATGAAAAAGTTGTTGT-TAAAGCTCTCAAGCCAGTAAAAAAGA 3'	Vorwärtsprimer <i>hsCK2α</i> ^{1-335 Ile69Ala}
B1161	5' TCTTTTTTACTGGCTTGAGAGCTTTAACAACAACCTTTTTCATTATTTGTGATGTTGATGGC 3'	Rückwärtsprimer <i>hsCK2α</i> ^{1-335 Ile69Ala}
B1162	5' GAAATCAAGATGACTACCAGGCGGCTCGAAAAT-TAGGCCGAGGTA 3'	Vorwärtsprimer <i>hsCK2α</i> ^{1-335 Leu41Ala, Val42Ala}
B1163	5' TACCTCGGCCTAATTTTCGAGCCGCCTGGTAGT-CATCTTGATTC 3'	Rückwärtsprimer <i>hsCK2α</i> ^{1-335 Leu41Ala, Val42Ala}
B1167	P 5' CCTGTGGTGAAGGAGCAGTCCCAGCCTTGTG-CAGACAATGCTGTGCTTTCCAGTGGTCTCACGG-CAGCACGATG 3'	<i>Annealing</i> -Oligonucleotid für den C-Terminus von <i>hsCK2α</i>
B1168	P 5' AGCTTTCATCGTGCTGCCGTGAGAC-CACTGGAAAGCACAGCATTGTCTGCACAAGGCTGG-GACTGCTCCTCACCACA 3'	<i>Annealing</i> -Oligonucleotid für den C-Terminus von <i>hsCK2α</i>
B119	5' ATAGGGAGACCACAACG 3'	Sequenzierungsprimer für <i>hsCK2α</i>
B21	5' GTAAAAGACCCTGTG 3'	Sequenzierungsprimer für <i>hsCK2α</i>
B771	5' GCTGGCAAGTATGATCTTTC 3'	Sequenzierungsprimer für <i>hsCK2α</i>
B25	5' CTGGACAAACTGCTG 3'	Sequenzierungsprimer für <i>hsCK2α</i>
B22	5' GGAATTATGCACAGA 3'	Sequenzierungsprimer für <i>hsCK2α</i>
B24	5' ACAGAAGATTTATAT 3'	Sequenzierungsprimer für <i>hsCK2α</i>
T7	5' TAATACGACTCCTATAGGG 3'	Standardprimer des ZMMK

4.3.4 Polymerasekettenreaktion zur Amplifizierung von Teilen des *hsCK2 α* -Gens

Mit der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) können spezifische Nucleotidsequenzen durch enzymatisch katalysierte Reaktionen *in vitro* amplifiziert werden. Durch wiederholte Zyklen aus Hitzedenaturierung, Oligonucleotidbindung (*primer annealing*) und DNA-Synthese kann pro Zyklus unter optimalen Bedingungen eine Verdopplung der Sequenz zwischen den Oligonucleotiden herbeigeführt werden. Somit kommt es zu einer exponentiellen Amplifizierung der Ziel-DNA.

Der PCR-Ansatz setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

59,5 µl	H ₂ O _{bidest.}
10 µl	10-fach Taq Puffer
10 µl	dNTPs (2mM)
5 µl	Vorwärtsprimer (B1134; 20 pmol/µl)
5 µl	Rückwärtsprimer (B1165 oder B1166; 20 pmol/µl)
0,5 µl	Taq Polymerase
10 µl	pT7-7/CK2α (1 ng/µl)

Das PCR-Programm ist der folgenden Tabelle 4.6 zu entnehmen. Es wurden insgesamt 25 Zyklen durchlaufen:

Tabelle 4.6: PCR-Programm zur Amplifizierung des *hsCK2α*-Gens

<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Funktion</u>
5 min	95°C	Initiale Denaturierung
30 s	95°C	Denaturierung
30 s	55°C	<i>Annealing</i>
90 s	72°C	Synthese
7 min	72°C	Finale Verlängerung
∞	4°C	

Anschließend wurden das Gelingen der Polymerasekettenreaktion durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

4.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde sowohl für analytische Zwecke, wie die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe, als auch für präparative Zwecke, wie die Isolierung von DNA-Fragmenten genutzt. Das Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese beruht darauf, dass sich Nucleinsäuren auf Grund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphatrückgrates im elektrischen Feld zur Anode bewegen. Die Elektrophorese wurde in einer gelartigen Agarosematrix, die aus Kohlenhydratpolymeren besteht, durchgeführt. Die Geschwindigkeit, mit der sich lineare Nucleinsäuren durch die Poren der Matrix auf die Anode zubewegen, ist proportional zu ihrer Größe [109]. Es wurden 1 % (w/v) Agarose in 1-fachem TAE-Puffer gelöst. Dieser diente auch als Laufpuffer in der Elektrophoresekammer. Zur Größen- und Konzentrationsabschätzung der Fragmente wurde parallel ein DNA-Größenmarker aufgetragen. Den aufzutragenden Proben wurde glycerinhaltiger Bromphenolblaupuffer zugefügt, um ein Absinken in die Geltaschen und eine Sichtbarkeit der Lauffront zu gewährleisten. Nach Auftrennung bei 90 V wurde die DNA mit dem Farbstoff Ethidiumbromid oder Gel-REDTM gefärbt. Beide Farbstoffe interkalieren zwischen die Basen der DNA und fluoreszieren im UV-B-Licht. Dadurch konnten die DNA-Fragmente mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und photographisch festgehalten werden.

4.3.6 Reinigung der PCR-Produkte

Um die PCR-Produkte von den Bestandteilen der PCR-Reaktion, wie Polymerase und Puffer zu befreien, wurden sie mit Hilfe des *QIAquick spin Kits* der Firma Qiagen gereinigt. Dies erfolgte entsprechend der Herstellerangaben und den mitgelieferten Säulen. Das gereinigte PCR-Produkt wurde in 30 µl 5 mM Tris-HCl; pH 8,0 eluiert.

4.3.7 Schneiden der PCR-Produkte und des leeren Expressionsvektors pT7-7

Die PCR-Produkte und der leere Vektor pT7-7 wurden mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten, um sie anschließend miteinander zu verknüpfen. Für das Schneiden wurden folgende Komponenten verwendet:

Ansatz für die PCR-Produkte:

30 µl	PCR-Produkt
2 µl	<i>Hind</i> III
4 µl	<i>Nde</i> I
6 µl	10-fach Puffer R (Fermentas)
18 µl	H ₂ O _{bidest.}

Ansatz für den leeren Expressionsvektor pT7-7

5,3 µl	pT7-7 (2 µg)
1 µl	<i>Hind</i> III
2 µl	<i>Nde</i> I
3 µl	10-fach Puffer R (Fermentas)
18,7 µl	H ₂ O _{bidest.}

Die Ansätze wurden für 2 h bei 37°C inkubiert.

4.3.8 Extraktion der DNA aus einem präparativen Agarose-Gel

Nachdem die geschnittenen PCR-Produkte zusammen mit dem geschnittenen leeren Vektor mit einer Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt worden waren, wurden die entsprechenden Banden mit Hilfe eines Skalpell auf einem UV-Tisch herausgeschnitten. Die Gelstücke wurden gewogen und pro 100 mg 300 µl QG Puffer aus dem *QIAquick spin Kit* hinzugegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei 50 °C löste sich das Gel auf und die Mischung wurde auf eine Säule aus dem *Kit* aufgetragen. Es wurde im Weiteren entsprechend den Herstellerangaben vorgegangen. Die gereinigte, geschnittene DNA wurde mit 30 µl 5 mM Tris-HCl; pH 8,0 eluiert.

4.3.9 Dephosphorylierung des geschnittenen Expressionsvektors pT7-7

Um eine Religation des leeren Expressionsvektors pT7-7 zu vermeiden, wurde er am 5'-Ende dephosphoryliert. Der Reaktionsansatz bestand dabei aus den folgenden Komponenten:

26 µl	geschnittener Vektor pT7-7
3 µl	10-fach Dephosphorylierungspuffer
1 µl	Phosphatase

Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte durch 15 minütige Inkubation bei 85 °C.

4.3.10 Ligation der PCR-Produkte mit dem Expressionsvektor pT7-7

Jeweils 3 µl der geschnittenen PCR-Produkte und des dephosphorylierten Vektors wurden auf ein Agarose-Gel aufgetragen, um ihre Konzentrationen abschätzen zu können. Anhand der Intensität der Banden wurde entschieden, dass das Verhältnis von Vektor zu PCR-Produkt (bzw. „Insert“) 1:4 betragen soll. Der Ligationsansatz bestand aus den folgenden Komponenten:

1 µl	geschnittener und dephosphorylierter Vektor pT7-7
4 µl	geschnittenes PCR-Produkt
1 µl	T4 Ligase
1 µl	10-fach Ligasepuffer
3 µl	H ₂ O _{bidest.}

4.3.11 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

Zu den Ligationsansätzen wurden jeweils 100 µl chemisch kompetente⁹ *E. coli* DH5α oder XL1-Blue-Bakterien gegeben. Anschließend wurden die Mischungen 30 min auf Eis gestellt, 90 s lang bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt und dann wieder 2 min auf Eis gestellt. Zu jedem Reaktionsgefäß wurde 0,5–1 ml SOC-Medium hinzugefügt und für 45 min bei 37 °C unter langsamen Drehen inkubiert [108]. Schließlich wurden die Kulturen bei 5000 Umdrehungen pro Minute 4 min zentrifugiert und ein Teil des Überstandes verworfen. Die Bakterien auf LB-Platten mit 75 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert.

4.3.12 Kolonie-PCR

Die Polymerasekettenreaktion eignet sich auch zur Identifikation von Klonen, die das Plasmid mit dem gewünschten *Insert* tragen. Dabei werden die gleichen *Primer* benutzt, die auch für die Amplifikation des Genes benutzt wurden. Nur wenn das *Insert* vorhanden ist, funktioniert die Polymerasekettenreaktion.

⁹ Die *E. coli* DH5α-Zellen waren zuvor gemäß der Rubidiumchlorid-Methode [108] chemisch kompetent gemacht worden und lagerten bereits als Aliquots bei –80 °C, die kompetenten XL1-Blue-Zellen waren Bestandteil des Strategene-Kits.

Jeweils die Hälfte einer Kolonie wurde in 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ und in 100 μl LB + 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin resuspendiert. Die in Wasser gelösten Kolonien wurden ca. 30 s auf einem Vortex-Mischer gemischt und wurden für die PCR verwendet. Die in LB-Medium resuspendierten Kolonien wurden als Übernachtskultur bei Raumtemperatur stehen gelassen. Ein PCR-Ansatz bestand aus den folgenden Komponenten:

0,2 μl	Vorwärtsprimer (B1134)
0,2 μl	Rückwärtsprimer (B1165, B1166)
1 μl	10-fach Taq-Puffer
0,1 μl	Taq-Polymerase
1 μl	dNTPs
6,5 μl	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
1 μl	der in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ resuspendierten Zellen

Als Negativkontrolle wurde ein Reaktionsansatz mit Wasser statt resuspendierten Zellen versetzt.

Das PCR-Programm ist der folgenden Tabelle 4.7 zu entnehmen. Dabei wurden insgesamt 35 Zyklen durchlaufen:

Tabelle 4.7: Programm für die Kolonie-PCR

Zeit	Temperatur	Funktion
4 min	95°C	Initiale Denaturierung
45 s	95°C	Denaturierung
45 s	55°C	<i>Annealing</i>
90 s	72°C	Synthese
8 min	72°C	Finale Verlängerung
∞	4°C	

Anschließend wurde mit einem Agarose-Gel überprüft, ob eine Polymerasekettenreaktion stattgefunden hat und mit den entsprechenden LB-Kulturen weitergearbeitet.

4.3.13 *Annealing* von Oligonucleotiden zur Klonierung des C-Terminus von *hsCK2 α'*

Zur Herstellung einer *hsCK2 α/α'* -Chimäre sollte der Kinasegrundkörper der *hsCK2 α* (Aminosäuren 1–326) mit dem C-Terminus von *hsCK2 α'* kombiniert werden (Abbildung 4.2). Um die DNA-Sequenz für den C-Terminus von *hsCK2 α'* zu erhalten, wurden zwei komplementäre Oligonucleotide aneinander gelagert (*Annealing*). Die DNA-Sequenz von *hsCK2 α* , die bis zur Aminosäureposition 326 kodiert, wurde aus dem *hsCK2 α* -Gen amplifiziert, in den pT7-7-Vektor kloniert. Anschließend wurde über die *HindIII* und *SnaBI*-Schnittstelle die Sequenz des C-Terminus von *hsCK2 α'* hinter die Sequenz von *hsCK2 α* ^{1–326} in den Vektor gebracht (siehe nachfolgende Kapitel 4.3.14–15).

Da es sich bei einer Schnittstelle um ein nichtüberhängendes Ende (*blunt end*) handelte, wurde die Inkubation bei Raumtemperatur auf 2 h verlängert. Anschließend wurden 10 µl des Ligationsansatzes zur Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* DH5α-Zellen verwendet.

4.3.16 Ortsgerichtete Mutagenese des *hsCK2α*-Gens

Mit dem *QuikChange®II Site-Directed Mutagenesis Kit* von Stratagene wurden ausgewählte hydrophobe Aminosäuren der CK2α/CK2β-Kontaktfläche von *hsCK2α* durch Alaninreste ausgetauscht. Dafür mussten die entsprechenden Kodons im *hsCK2α*-Gen entsprechend dem genetischen Code *in vitro* ausgetauscht werden. Um dies zu erreichen, wurde zunächst eine PCR mit dem das *hsCK2α*¹⁻³³⁵-Gen enthaltenden Expressionsvektor (pT7-7) und zwei Oligonucleotid-Primern, die beide die gewünschte Mutation enthielten, durchgeführt. Jeder der Primer war, mit Ausnahme der Mutation, komplementär zu gegenüberliegenden Einzelsträngen des Vektors. Der PCR-Ansatz bestand aus den folgenden Komponenten:

5 µl	10 fach Reaktionspuffer
10 µl	dNTP-Mix
2 µl	pT7-7+CK2α ¹⁻³³⁵ (10 ng/ µl)
125 ng	Vorwärtsprimer (B1158, B1160 oder B1162)
125 ng	Rückwärtsprimer (B1159, B1161 oder B1163)
1 µl	Pfu-Ultra HF DNA-Polymerase

Es wurde mit H₂O_{bidest.} auf 50 µl aufgefüllt.

Das folgende PCR-Programm (Tabelle 4.8) wurde verwendet, die Synthesezeit richtete sich dabei nach der Synthesegeschwindigkeit der Polymerase (1kb/min) und der Länge des Plasmids (4 kb). Es wurden 18 Zyklen durchlaufen:

Tabelle 4.8: PCR-Programm für die ortsgerechte Mutagenese des *hsCK2α*-Gens

Zeit	Temperatur	Funktion
1 min	95°C	Initiale Denaturierung
30 s	95°C	Denaturierung
1 min	55°C	<i>Annealing</i>
4 min, 15 s	68°C	Synthese
8 min	68°C	Finale Verlängerung
∞	4°C	

Während der PCR wurden die Primer verlängert, ohne verdrängt zu werden und es entstand ein neues Plasmid mit der gewünschten Mutation und versetzten Lücken des Zuckerphosphatrückgrats. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit der *Dpn I* Endonuclease (Zielsequenz: 5'-Gm⁶ATC-3') behandelt, die methylierte und hemimethylierte DNA erkennt und zerschneidet. Methylierungen sind charakteristisch für das parentale Plasmid¹⁰, und entstehen nicht bei der PCR mit den

¹⁰ Dabei ist der Ursprung des parentalen Vektors von Bedeutung. Nur bei *E. coli*-Stämmen mit dem Genotyp *dam*⁺ wird die DNA methyliert.

mutagenen Primern. Auf diese Weise konnte die neu synthetisierte DNA mit der Mutation von der Ursprünglichen getrennt und in kompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert werden, wo dann auch die Lücken repariert wurden. Um den Erfolg der ortsgerichteten Mutagenese zu überprüfen, wurde das Plasmid aus einzelnen Kolonien der transformierten Zellen präpariert und mit den Primern T7 und B22 (Tabelle 4.5) sequenziert.

4.3.17 Plasmidpräparation im 1,5 ml Maßstab

Die Plasmidpräparation im 1,5 ml Maßstab wurde mit dem Minipräparationskit von Sigma durchgeführt. Die Kolonien der transformierten *E. coli* DH5 α -Bakterien wurden jeweils in ein steriles Reagenzglas mit 5 ml LB-Medium und mit 100 μ g/ml Ampicillin übertragen und über Nacht bei 37 °C und 220 Umdrehungen pro Minute auf einem Orbitalschüttler inkubiert.

Ein Teil der Kulturen wurde am folgenden Tag in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 12000 Umdrehungen pro Minute 1 min lang zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde gemäß dem Protokoll der alkalischen Lyse aufgeschlossen und mit den mitgelieferten Säulen gereinigt. Dabei wurde entsprechend der Herstellerangaben des Minipräparationskits von Sigma oder Peqlab vorgegangen und die DNA in 50 μ l 5mM Tris-HCl pH 8 oder H₂O_{bidest.} eluiert.

4.3.18 Restriktionsanalyse

Um festzustellen, ob die Ligation von Restriktionsfragmenten und dem Vektor erfolgreich war, wurden die präparierten Plasmide wieder mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten (dieser Schritt entfiel bei der ortsgerichteten Mutagenese). Zusätzlich wurde auch der Vektor einzeln mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisiert, um bei der Agarose-Gelelektrophorese die Größe vergleichen zu können.

4.3.19 Sequenzierung

4.3.19.1 PCR der zu sequenzierenden DNA

Um eine Sequenzierung durchführen zu können, musste die DNA zunächst durch eine Polymerasekettenreaktion vervielfacht werden. Ein Reaktionsansatz bestand dabei aus den folgenden Komponenten:

5 μ l	Verdünnungspuffer
7 μ l	DNA
1 μ l	Primer
5 μ l	<i>Big Dye Terminator</i> ® (Applied Bioscience)
4 μ l	H ₂ O _{bidest.}

Das PCR-Programm ist der Tabelle 4.9 zu entnehmen. Dabei wurden insgesamt 25 Zyklen durchlaufen:

Tabelle 4.9: PCR-Programm zur Vorbereitung der Sequenzierung

Zeit	Temperatur	Funktion
10 s	97°C	Denaturierung
15 s	50°C	<i>Annealing</i>
4 min	55°C	Synthese
∞	4°C	

4.3.19.2 DNA-Konzentrierung für die Sequenzierung

Zur Konzentrierung der DNA wurde eine Fällung mit dem 2,5-fachen Volumen 99,9 %-igem Ethanol und 0,1-fachem Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung pH 4,6 durchgeführt. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine 15 minütige Zentrifugation mit 14000 Umdrehungen pro Minute bei Raumtemperatur. Nach dem Entfernen des Überstandes, wurde das Pellet in 500 µl 70 %-igem Ethanol (v/v) gewaschen und erneut 15 min bei Raumtemperatur und 14000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet unter Vakuum getrocknet. Danach wurde das Pellet in 50 µl *Template Suppression Reagent* der Firma Applied Bioscience gelöst und 2 min lang bei 95 °C inkubiert. Die Probe wurde dann auf Eis abgekühlt und in ein 0,5 ml Sequenzierungsreaktionsgefäß überführt.

Die Sequenzierung wurde in Odense, Dänemark mit der hauseigenen Sequenzierungsmaschine nach der Sanger-Methode [110] durchgeführt. In Köln konnte die zu sequenzierende DNA direkt zusammen mit den passenden Oligonucleotiden im ZMMK abgegeben werden.

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Rekombinante Expression von *hsCK2α*-Varianten im 5 ml Maßstab

Es wurden eine Übernachtskultur der Expressionszellen *E. coli* BL21 (DE3) mit dem das entsprechende *hsCK2α*-Gen enthaltenden Vektor pT7-7 in 5 ml LB-Medium mit 75 µg/ml Ampicillin angeimpft und bei 37 °C und 220 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Am nächsten Morgen wurden jeweils 300 µl dieser Kultur in zwei 2 ml Reaktionsgefäße mit 1 ml LB-Medium mit 75 µg/ml Ampicillin überführt und 30 min lang bei 37 °C und 220 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Dann wurde zu einer der beiden Kulturen 26 µl einer 0,1 M IPTG-Lösung hinzugegeben, um die Proteinproduktion zu induzieren. Nach 4 h weiterer Inkubation wurden die Zellen durch 3 minütige Zentrifugation bei 3000 Umdrehungen pro Minute vom Medium abgetrennt. Anschließend wurden die Pellets bei -80 °C eingefroren und nach dem Auftauen mit 150 µl Puffer (500 mM

NaCl; 25 mM Tris-HCl; pH 8,5) resuspendiert. Danach wurden die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen (3 x 20 s, 40 %) und dabei in einem mit Eis gefüllten Becher gekühlt. Das Lysat wurde 5 min lang bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt (löslicher Extrakt). 13 µl des löslichen Extraktes wurden mit 5 µl SDS-Auftragspuffer versehen, während zu den Pellets (unlöslicher Extrakt) 100 µl des SDS-Auftragspuffers gegeben wurden. Die mit SDS versehenen Proben wurden anschließend für 3 min bei 95 °C erhitzt und dann auf ein SDS-Gel aufgetragen.

4.4.2 Rekombinante Expression *hsCK2α*- und *hsCK2β*-Varianten im 9 l

Maßstab

Es wurden Übernachtskulturen der Expressionszellen *E. coli* BL21 (DE3) mit dem das entsprechende *hsCK2α* bzw. *hsCK2β*-Gen enthaltenden Vektor pT7-7 in 100 ml LB-Medium mit 75 µg/ml Ampicillin angeimpft und bei 37 °C und 220 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Am nächsten Morgen wurden jeweils 5 ml der Übernachtskultur in 2–3 l Erlenmeyerkolben mit 500 ml LB-Medium und 75 µg/ml Ampicillin überführt und weiter inkubiert bis eine OD_{600nm} von 0,6 erreicht wurde. Um die Proteinproduktion zu induzieren, wurden dann 250 µl einer 1 M IPTG-Lösung hinzugegeben und weitere 3 h inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen in 500 ml Zentrifugenbecher überführt und bei 4500 Umdrehungen pro Minute 15 min lang bei 4 °C abzentrifugiert. Jedes Pellet wurde danach in 200 ml eiskalter Waschlösung (0,9 % NaCl; 0,2 mM PMSF) resuspendiert und erneut bei 4500 Umdrehungen pro Minute 15 min lang bei einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in insgesamt 200 ml Waschlösung resuspendiert und vereinigt. Die Bakteriensuspension wurde auf 6 SS34 Röhren verteilt und 10 min bei 12000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die Pellets wurden schließlich bei –80 °C eingefroren.

4.4.3 Zellaufschluss

Jeweils zwei Zellpellets wurden in 30 ml Aufschlusspuffer (300 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl; pH 8,5 mit einer Tablette Proteaseinhibitorgemisch (*Complete* der Firma Roche) resuspendiert und in der "French Press Cell" bei einem Druck von 500 psi aufgeschlossen. Für die Reinigung von *hsCK2*-Holoenzymvarianten wurden die Lysate der entsprechenden Untereinheiten vereinigt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die aufgeschlossenen Zellen wurden bei 4 °C und 19000 Umdrehungen pro Minute 50 min lang zentrifugiert, um die Zelldebris zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand mit Filterpapier von Resten der Zelltrümmer befreit und zur Reinigung der Proteine verwendet.

4.5 Chromatographische Methoden

4.5.1 Kationenaustausch/Affinitäts-Chromatographie mit P11-Cellulose

Für die Reinigung von *hsCK2 α -*, *hsCK2 β -* und *hsCK2*-Holoenzymvarianten wurde eine Phosphocellulose-Säule für den ersten Reinigungsschritt verwendet. Das Säulenmaterial (P11-Cellulose) ist ein bifunktionseller Kationenaustauscher, der schwache und starke saure Gruppen enthält und wird meist für die Trennung von Enzymen verwendet, die ATP-abhängige Wechselwirkungen der Phosphogruppen katalysieren. Aus diesem Grund handelt es sich eigentlich um eine Affinitätschromatographie. Auch *hsCK2 β* bindet an die Phosphocellulosesäule.

Die Säule wurde mit 300 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl; pH 8,5 äquilibriert. Der Überstand der vorangegangenen Zentrifugation wurde mit einer Flussrate von maximal 0,2 ml/min mit einem *Superloop* (50 ml) auf die Säule aufgetragen. Das Protein wurde in einem linearen Salzgradienten mit einem Puffer höherer Salzkonzentration (1 M NaCl; 25 mM Tris-HCl; pH 8.5) eluiert und die entsprechenden Fraktionen vereinigt.

4.5.2 Affinitäts-Chromatographie mit Heparin

Als zweiter Reinigungsschritt folgte bei allen *hsCK2 α -* und *hsCK2*-Holoenzym-Varianten eine Chromatographie mit einer Heparinsäule (HiTrap Heparin HP). Die Fraktionen aus dem ersten Reinigungsschritt wurden mit 25 mM Tris-HCl; pH 8,5 auf eine NaCl-Konzentration von unter 400 mM verdünnt und mit einer Flussrate von 1–2 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die Elution fand in einem Gradienten von 400 mM bis 1 M NaCl statt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt.

4.5.3 Kationenaustausch-Chromatographie mit Sepharose Q

Als zweiter Reinigungsschritt folgte für die *hsCK2 β -*Varianten eine Chromatographie mit einer HiTrap Sepharose Q Säule. Die Äquilibrierungs- und Niedrigsalzkomponente des Gradienten war ein Puffer mit 400 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl; pH 8,5. Entsprechend wurden die vereinigten Fraktionen aus dem ersten Reinigungsschritt mit 25 mM Tris-HCl; pH 8,5 auf eine NaCl-Konzentration von etwa 400 mM verdünnt und mit einer Flussrate von 5 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die Elution fand in einem Gradienten von 400 mM bis 1 M NaCl statt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt.

4.5.4 Gel-Permeations-Chromatographie

Als abschließender Reinigungsschritt und zur Analyse folgte eine Gel-Permeations-Chromatographie mit der HiPrep Superdex 200 HP Säule. Diese wurde mit 500 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl; pH 8,5 äquilibriert und mit Cytochrom C (12 kDa), BSA (66,4 kDa), Katalase (240 kDa), und Ferritin (440 kDa) geeicht.

4.5.5 Konzentrierung der Proteine durch Ultrazentrifugation

Die Proteine wurden mit Ultrafiltrationsröhrchen der Firma AMICON mit einer Ausschlussgröße von 10.000 Da konzentriert und in einen 500 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl; pH 7,5-Puffer überführt. Dies erfolgte bei einer Zentrifugation von 5700 Umdrehungen pro Minute bei 4 °C.

4.6 Proteinanalytische Methoden

4.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden vorgefertigte Gele der Firma Invitrogen verwendet. Die Proteinproben wurden mit 500 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl; pH 8,5 auf eine Konzentration zwischen 60 und 100 µM gebracht. 13 µl des verdünnten Proteins wurden mit 5 µl Auftragspuffer gemischt, 5 min bei 95 °C inkubiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer gefüllt. Nach etwa 40 minütiger Trennung bei 120 mA wurden die Gele mit Rotiphorese Blau R der Firma Roth etwa 1 h lang gefärbt. Zur Entfärbung wurden die Gele mehrere Stunden mit 8 % Essigsäure, 25 % Ethanol behandelt.

4.6.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur quantitativen Proteinbestimmung wurde zum Einen die Methode nach Bradford [111] verwendet. Dabei wurde die „Standard Assay“ Lösung von Biorad verwendet. Dieses Reagenz bildet mit dem Protein einen gefärbten Komplex, der bei 595 nm absorbiert. Die Komplexbildung verläuft linear zu Proteinkonzentration. Anhand einer Eichkurve mit Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA) konnte die Proteinkonzentration berechnet werden. Es wurden jeweils 200 µl BioRad-Reagenz mit 800 µl Wasser-Proteingemisch versehen und 5 min lang inkubiert. Die Extinktion wurde dann bei 595 nm gemessen, zum Nullabgleich des Photometers diente eine Probe mit 200 µl BioRad-Reagenz und 800 µl Wasser.

Zum Anderen wurde auch die direkte Absorption der Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm zur Konzentrationsbestimmung verwendet. Die Extinktionskoeffizienten der Proteine wurden mit

Hilfe des ProtParam-Programms der ExPASy Internetseite¹¹ berechnet. War eine besonders genaue Konzentrationsbestimmung nötig, wie z.B. bei kalorimetrischen Experimenten, wurden ein Wellenlängenscan von 250–400 nm durchgeführt. Die Basislinie, die sich aus der Absorption nach 280 nm abschätzen lässt, wurde von der Absorption bei 280 nm subtrahiert.

4.6.3 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Um das Molekulargewicht und Reinheit von verschiedenen CK2 α -Varianten zu bestimmen, wurden MALDI-TOF-Messungen (*matrix assisted laser desorption ionization-time of flight*) am ZMMK durchgeführt. Dafür wurde das Protein auf einem metallischen Probenträger mit einer Matrix (in diesem Fall aus Sinapinsäure) co-kristallisiert und anschließend mit Laser bestrahlt. Dabei verdampft die Matrix explosionsartig und die Proteinprobe wird ionisiert und mitgerissen. Die entstandenen Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und schließlich in einem Flugzeitanalysator detektiert. Die Flugzeit (TOF; *time of flight*) ist dabei abhängig von Masse (m) und Ladung (z). Im Analysator werden die Ionen nach ihrem Masse/Ladungsverhältnisses getrennt.

Im ZMMK erfolgte eine lineare Kalibrierung mit dem Protein Calibration Mix II von Bruker auf die Standardproteine Trypsinogen (23982 Da) Protein A (44613 Da) und BSA (66431 Da). Für die Messungen wurde eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml und ein Volumen von 20 μ l benötigt. Die Proteinlösung wurde vor der Messung am ZMMK entsalzt und mit dem Matrixmaterial (gesättigte Sinapinsäurelösung in 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) und 70 % Acetonitril) co-kristallisiert.

4.6.4 Gekoppelter Aktivitätstest

Bei dem gekoppelten enzymatischen Aktivitätstest wurden die in Abbildung 4.3 dargestellten verknüpften Reaktionen ausgenutzt.

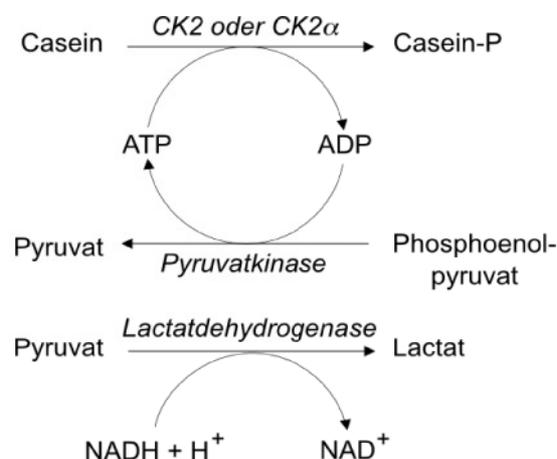


Abbildung 4.3: Schema des gekoppelten Aktivitätstests

11 <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>

Die Aktivität wurde in einem Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 500 μ l gemessen. Ein solcher Ansatz bestand aus 100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 1 mM Phosphoenolpyruvat; 3 mg/ml Casein; 5 μ g/l Lactatdehydrogenase; 5 μ g/ml Pyruvatkinase, 0,2 mM NADH und 0,02 mg/ml CK2 α -Variante oder 0,034 mg/ml CK2 Holoenzymvariante. Die ATP Konzentration wurde zwischen 5 μ M und 200 μ M variiert. Zur Ermittlung der Inhibitionskonstante von DRB wurden zusätzlich Messungen in Gegenwart von 50 μ M und 100 μ M durchgeführt. Für die verschiedenen Varianten der CK2 α -Untereinheit beinhaltete der Reaktionsansatz 20 mM MgCl₂, bei den CK2-Holoenzymvarianten waren 10 mM MgCl₂ und zusätzlich 200 mM KCl im Ansatz, um Aggregate zu verhindern. Die photometrische Messung der Abnahme der NADH-Konzentration fand bei 340 nm und 37 °C statt.

4.7 Kristallographische Studien

4.7.1 Allgemeine Vorgehensweise

Alle untersuchten Proteine wurden vor der Kristallisationsansätze durch Ultrafiltration auf eine Konzentration zwischen 5 und 15 mg/ml gebracht. Die Kristallisationsansätze wurden nach der Dampfdiffusionsmethode mit sitzendem Tropfen entweder per Hand oder mit einem Automaten (Hydra II von Matrix) pipettiert. Dafür wurden entweder Cryschem-Platten mit 24 Vertiefungen oder Intelli-Platten mit 96 Vertiefungen verwendet. Um initiale Kristallisationsbedingungen zu finden, wurden Kristallisationsexperimente mit kommerziell erhältlichen *Screens* (der Firmen Hampton Research und Jena Bioscience) angesetzt. Die Tropfen wurden aus Proteinlösung, Reservoirlösung und gegebenenfalls aus Additiven gemischt. Anschließend wurden die Kristallisationsplatten bei 20 °C gelagert und die Tropfen in regelmäßigen Abständen mit einem Stereomikroskop durchgeschaut. Die initialen Kristallisationsbedingungen wurden durch systematische Variation des pH-Wertes und der Fällungsmittel- und Proteinkonzentration optimiert.

4.7.2 Co-Kristallisation

Zur Aufklärung von Komplexstrukturen von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* mit verschiedenen kleinen organischen Molekülen, wie die Inhibitoren DRB und Emodin, wurde die Methode der Co-Kristallisation verwendet. Dabei wurde die Proteinlösung vor dem Pipettieren des Kristallisationstropfens mit der Ligandlösung gemischt und 30 min lang bei 20 °C inkubiert.

4.7.2.1 *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* mit Emodin

Eine 10 mM Emodinlösung (IUPAC-Name: 1,3,8-Trihydroxy-6-methylantracen-9,10-dion; 2,7 mg Emodin wurden in 1 ml H₂O_{bidest.} unter Zugabe von NaOH gelöst) wurde mit einem gleichen Volumen einer *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* Lösung (10 mg/ml) vermischt und 30 min lang bei 20 °C inkubiert. Entstehendes Präzipitat wurde durch Zentrifugation entfernt. Der Tropfen setzte sich aus 2 μ l der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*/Emodin-Lösung und 1 μ l Reservoirlösung zusammen. Im Kapitel 5.3.1 werden Kristallisations- und *Cryo*-Bedingungen beschrieben.

4.7.2.2 *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* mit DRB

DRB ist ein seit langem bekannter ATP-kompetitiver Inhibitor der Proteinkinase CK2, eine Komplexstruktur mit CK2 α gab es bis jetzt allerdings nicht. *HsCK2 α ¹⁻³³⁵* (11,3 mg/ml) wurde mit dem gleichen Volumen einer 10 mM 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB)-Lösung gemischt und 30 min lang bei 20 °C inkubiert. Für eine DRB-Stocklösung (10 mM) wurden 3,19 mg DRB in 1 ml 1 % iger Dioxanlösung unter Zugabe weniger Tropfen KOH gelöst. Bei dem *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*/DRB-Gemisch entstand ein milchiges Präzipitat, das durch Zentrifugation abgetrennt wurde. Für die Kristallisationsansätze wurde nur der Überstand benutzt. Es wurden 2 μ l der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*/DRB-Lösung mit 1 μ l Reservoirlösung gemischt. Die Kristallisations- und *Cryo*-Bedingungen sind Kapitel 5.3.2 zu entnehmen.

4.7.2.3 *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* mit Glycerin

Der Kristallisationstropfen setzte sich aus 1 μ l *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* (10mg/ml), 3 μ l AMPPNP (1 mM), 0,6 μ l MgCl₂ (10 mM), 0,1 μ l Glycerin (100%) und 1 μ l Reservoirlösung zusammen. Die Kristallisations- und *Cryo*-Bedingungen werden in Kapitel 5.3.3 erläutert.

4.8 Röntgendiffraktometrie

4.8.1 Kristallmontage

Die *Cryo*-Bedingungen für die Kristalle konnten durch einen Austausch des Reservoirs erreicht werden (siehe Kapitel 4.7.2). Zur Messung wurden die Kristalle mit einer Nylonschleife (*cryo loop*, Durchmesser 0,1–0,2 mm) aus dem, nach dem Austausch des Reservoirs äquilibrierten, Kristallisationstropfen entnommen. Danach wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren oder direkt auf den Goniometerkopf der Röntgenanlage in den 100 K kalten Stickstoffstrom gebracht.

4.8.2 Diffraktionsexperimente

Sämtliche Datensätze wurden bei 100 K am DORIS Speicherring des DESY in Hamburg an den Messplätzen des EMBL unter Verwendung von Synchrotronstrahlung gemessen. Die Details der Messungen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 4.10: Details der Röntgendiffraktionsmessungen

Kristall	<i>hsCK2α¹⁻³³⁵/DRB</i> [2 Å-Datensatz]	<i>hsCK2α¹⁻³³⁵/Glycerin</i>	<i>hsCK2α¹⁻³³⁵/Emodin</i> (dunkelrot)	<i>hsCK2α¹⁻³³⁵/Emodin</i> (hellrot)
Temperatur (K)	100	100	100	100
Wellenlänge (in Å)	0,9000 [2]	0,9537	0,8423	0,9537
Detektorabstand (°)	170 [60]	250	220	170
$\Delta\Phi$ (°)	1 [1]	0,5	0,5	0,5
Anzahl der Bilder	100 [360]	360	360	450
Messplatz	X12 (DESY)	X12 (DESY)	BW7B (DESY)	X12 (DESY)

4.8.3 Datenreduktion

Die Diffraktionsbilder wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK aus dem HKL-Programmpaket [106], indiziert, integriert und skaliert.

4.8.4 Strukturlösung

4.8.4.1 Molekularer Ersatz

Die Strukturen wurden durch molekularen Ersatz mit einem initialen Strukturmodell gelöst. Dazu wurde das Programm MOLREP aus dem CCP4-Programmpaket [104] verwendet. Details der Auswertung und Verfeinerung werden in Kapitel 3.1.4 dargelegt.

4.8.5 *Ab initio* Strukturlösung und Substrukturlösung mit SAD

Die guten Beugungseigenschaften der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/DRB*-Kristalls legten es nahe, den Kristall zusätzlich bei einer Wellenlänge von 2 Å (daher SAD; *single wavelength anomalous dispersion*) zu vermessen um ein stärkeres anomales Signal zu erhalten. Bei der Messung wurde die Wellenlänge des EMBL-Messplatzes X12 auf 2 Å geändert und ein zweiter Datensatz mit dem gleichen Kristall aufgenommen. Um die anomalen Differenzen vollständig zu erfassen, wurden Diffraktionsaufnahmen von 360° gemacht. Wie auch bei dem 0,9 Å-Datensatz erfolgte die Datenaufnahme bei 100 K. Um die Absorption der Röntgenstrahlen in der Luft zu minimieren, wurde der Kristall-Detektor-Abstand auf 60 mm reduziert.

Diese Wellenlänge eignet sich auch dazu, mit Hilfe der anomalen Dispersion experimentelle Phasen zu erhalten und die Struktur ohne ein initiales Strukturmodell, d.h. ohne molekularen Ersatz zu lösen. Die Details der Vorgehensweise sind dem Kapitel 3.1.4.5 zu entnehmen.

4.9 Kalorimetrische Studien

4.9.1 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Alle Experimente wurden mit dem Gerät VP-ITC der Firma Microcal durchgeführt. *HsCK2 α* - und *hsCK2 β* -Untereinheiten wurden in Pufferlösung (500 mM NaCl und 25 mM Tris-HCl, 25 mM HEPES oder 25 mM PIPES; pH 7,4–9,0), die aus der gleichen Flasche stammte, suspendiert und vor den Messungen etwa 5 min unter Vakuum entgast. Die Lösung mit den *hsCK2 β* -Dimeren wurde mit Konzentrationen zwischen 9 und 20 μ M in die Messzelle gefüllt, während die *hsCK2 α* beinhalten Lösung mit einer Konzentration zwischen 80 und 200 μ M in der Injektionsspritze vorlag. Jedes Experiment bestand aus 25 Injektionen à 10 μ l. Die Injektion erfolgte über einen Zeitraum von 20 s. Zwischen zwei aufeinander folgenden Injektionen lag jeweils ein Intervall von 300 s, damit die Kurve nach dem Ausschlag zur Basislinie zurückkehren konnte.

Die kalorimetrischen Ergebnisse wurden durch Integration der entstandenen Peaks mit der dem Kalorimeter beigelegten Software (ORIGIN Software, Origin Lab, Northampton, USA) ausgewertet. Die Verdünnungswärme (gesättigter Bereich der Titration) wurde von den Rohdaten subtrahiert, wodurch sich die aus der Protein-Proteinwechselwirkung resultierende Wärme ergab.

Die Daten der Titrationsen wurden unter Annahme einer Stöchiometrie von 2 (ein *hsCK2 β* -Dimer bindet zwei *hsCK2 α* -Monomere) ausgewertet. Die Anpassung der korrigierten Daten erlaubte eine Bestimmung der Standardenthalpie (ΔH°), der Bindungskonstante (K_B) und der Standardentropie (ΔS°). Die thermodynamischen Parameter wurden durch eine nicht-lineare Anpassung mit dem *single set of sites*-Modell ermittelt. Es wurden jeweils mindestens drei Messungen durchgeführt.

4.9.2 Differentialrasterkalorimetrie (DSC)

Die Datenaufnahme erfolgte mit dem Gerät VP-DSC der Firma Microcal. Es wurde ein Temperaturgradient von 20 bis 80 °C mit einer *Scan*-Rate von 25 °C/h durchlaufen. Dabei lagen die folgenden Proteinkonzentrationen vor: *hsCK2 α* -Varianten zwischen 55 und 100 μ M, *hsCK2 β* -Varianten zwischen 30 und 70 μ M und die entsprechenden Holoenzyme zwischen 70 und 80 μ M. In die Referenzzelle wurde der Puffer, in dem das Protein vorlag, gefüllt. Die Proben wurden kurz vor

Gebrauch unter Vakuum entgast. Zur Bestimmung der Entfaltungstemperatur wurde der „*non-2-state cursor init*“-Modus der ORIGIN-Software, Origin Lab, Northampton, USA verwendet. Es wurden jeweils mindestens drei Messungen durchgeführt.

5. Ergebnisse

5.1 Expression und Reinigung

5.1.1 Expression und Reinigung der *hsCK2α*-Varianten

Nach der Verifizierung der Nucleotidsequenz der *hsCK2α*-Varianten durch Sequenzierung (Kapitel 4.3.19) wurde zunächst eine Expression im kleinen Maßstab durchgeführt. Alle *hsCK2α*-Varianten waren ausreichend löslich und konnten anschließend in großem Maßstab exprimiert und gereinigt werden. Stellvertretend für die übrigen Varianten werden in dieser Arbeit nur die einzelnen Reinigungsschritte der Punktmutante *hsCK2α*^{1-335, Ile69Ala} gezeigt. Dabei wurde wie in Kapitel 4.5 beschrieben und entsprechend Niefind *et al.* 2007 [56] vorgegangen.

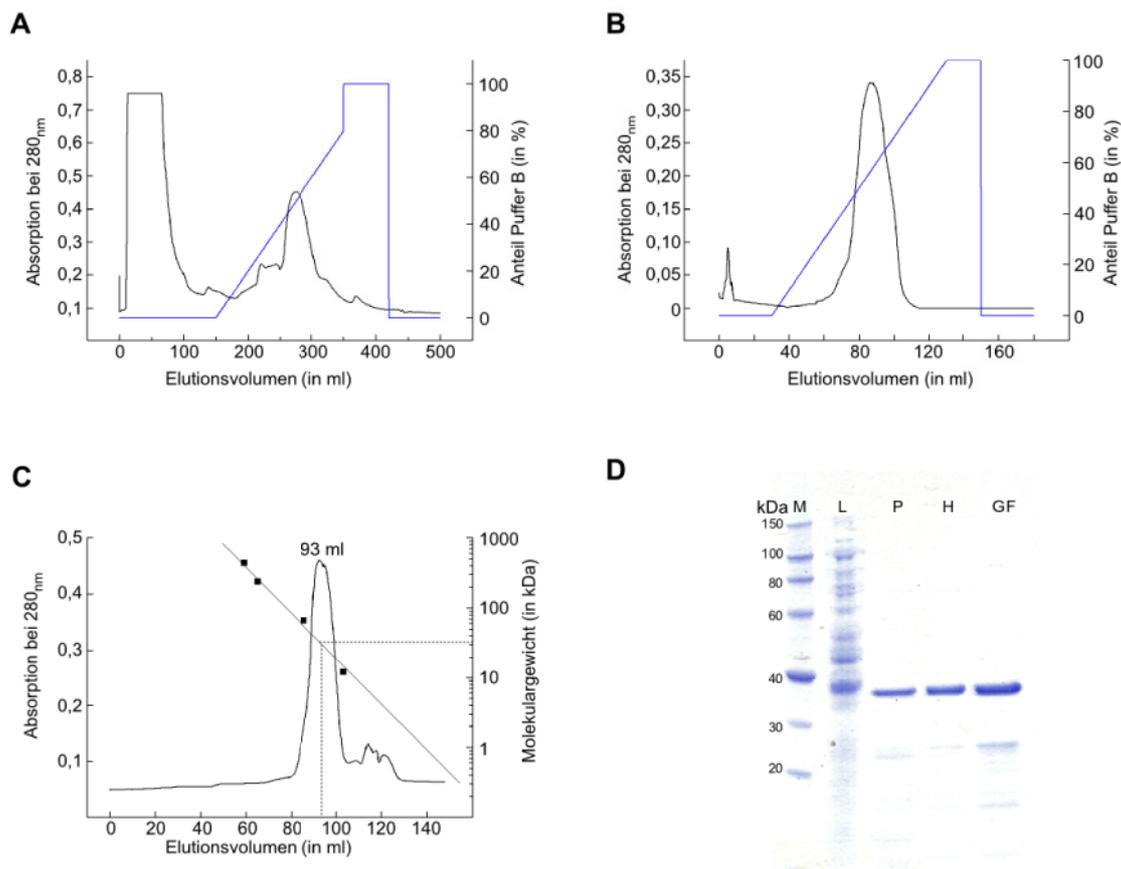


Abbildung 5.1: Reinigung von *hsCK2α*^{1-335, Ile69Ala} (A) Affinitäts-Chromatographie mit der Phosphocellulosesäule (B) Affinitäts-Chromatographie mit der Heparinsäule (C) Gel-Permeations-Chromatographie mit der Hi Load 16/60 Superdex 200 Säule (D) SDS-Gel der einzelnen Reinigungsschritte: L: Lysat, P: Phosphocellulosesäule, H: Heparinsäule, GF: Hi Load 16/60 Superdex 200 Säule.

Es wurde mit Ausnahme von *hsCK2α*¹⁻³⁵⁵ und der *hsCK2α/α'*-Chimäre immer ein *hsCK2α*-Konstrukt mit einem verkürzten C-Terminus verwendet (*hsCK2α*¹⁻³³⁵), das eine bessere Stabilität

als der *hsCK2α*-Wildtyp mit einer Länge von 391 Aminosäuren aufweist [90]. Die C-terminale Deletionsmutante hat ein Molekulargewicht von 39874 Da. Wie in dem SDS-Gel der einzelnen Reinigungsschritte erkennbar (Abbildung 5.1 D), ist bereits im Lysat der Bakterienzellen eine deutliche Bande im Bereich von 40000 Da zu erkennen und nach dem ersten Reinigungsschritt waren kaum noch Fremdproteine detektierbar.

In der Gelfiltration mit der HiLoad 16/60 Superdex 200 Säule würde man für 39870 Da ein Elutionsvolumen von 99 ml erwarten¹², tatsächlich ist der Peak des *hsCK2α*-Monomers etwas verschoben und tritt bereits bei 93 ml auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass nicht nur das Molekulargewicht, sondern auch die Form des Proteins das Passieren durch die Säule beeinflusst. Alle *hsCK2α*-Konstrukte eluieren bei etwa 90 ml bei der Gelfiltration.

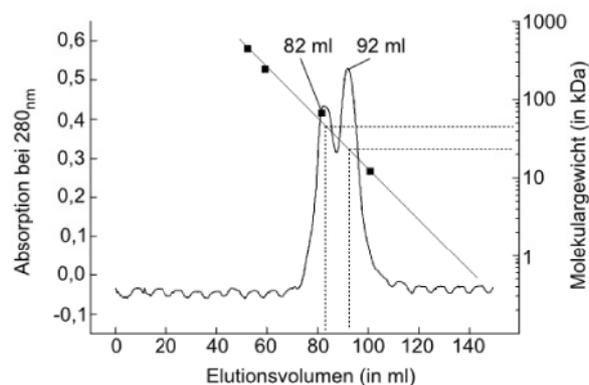


Abbildung 5.2: Die Gel-Permeations-Chromatographie mit der *hsCK2α/α'*-Chimäre zeigt mit dem Auftreten von Dimeren deutliche Abweichungen vom Elutionsprofil der anderen *hsCK2α*-Varianten.

Lediglich bei der Reinigung der *hsCK2α/α'*-Chimäre gab es Abweichungen vom normalen Elutionsprofil bei der Gelfiltration: Das Chromatogramm in Abbildung 5.2 zeigt zwei deutliche Peaks, einer bei einem Elutionsvolumen von 82 ml und einer bei 92 ml. Oligomere Zustände passieren die Säulenmatrix gemäß dem Prinzip der Größenausschluss-Chromatographie schneller als Monomere und eluieren demnach in einem kleineren Volumen.

Mit der Gleichung der Eichgeraden¹³ ergibt sich für den früheren Peak etwa das doppelte Molekulargewicht als für den späteren Peak (52215 Da gegenüber 25751 Da). Man kann demnach von einem monomeren und einem dimeren Zustand der *hsCK2α/α'*-Chimäre ausgehen. Trennt man die Fraktionen mit dem *hsCK2α/α'*-Chimäre-Monomer von denen mit dem Dimer und führt wieder eine Gelfiltration durch, gibt es wieder eine Aufteilung in Monomer und Dimer.

¹² Gleichung der Eichgeraden: $f(\log(MW Da)) = -0,030 \log(MW Da)/ml * x ml + 7,580 \log(MW Da)$

¹³ Gleichung der Eichgeraden: $f(\log(MW Da)) = -0,031 \log(MW Da)/ml * x ml + 7,235 \log(MW Da)$

5.1.2 Reinigung der *hsCK2β*-Varianten

Auch bei der *hsCK2β*-Untereinheit hat der Wildtyp keine gute Stabilitätseigenschaften. Daher wurden bei den Experimenten C-terminale Deletionsmutanten (*hsCK2β*¹⁻¹⁹³ und *hsCK2β*¹⁻²⁰⁸) verwendet, von denen aus der Literatur [112] bekannt war, dass sie wie der Wildtyp mit *hsCK2α* wechselwirken.

Exemplarisch wird hier die Reinigung der längeren *hsCK2β*-Variante (*hsCK2β*¹⁻²⁰⁸) beschrieben. Bei der abschließenden Gel-Permeations-Chromatographie eluierte *hsCK2β*¹⁻²⁰⁸ bei 80 ml, was nach der Gleichung der Eichgerade¹⁴ einem Molekulargewicht von 60145 Da entspricht und dem nativen dimeren Zustand zugeordnet werden kann (das mit der Sequenz errechnete Molekulargewicht beträgt 48320 Da). Um die Stabilität von *hsCK2β*¹⁻²⁰⁸ zu überprüfen, wurde nach der ersten Reinigung 5 Tage lang täglich ein Aliquot einer bei 20 °C lagernden *hsCK2β*¹⁻²⁰⁸-Lösung eingefroren und später auf ein SDS-Gel aufgetragen. Dieser Stabilitätstest zeigte, dass *hsCK2β*¹⁻²⁰⁸ nicht degradiert (Abbildung 5.3).

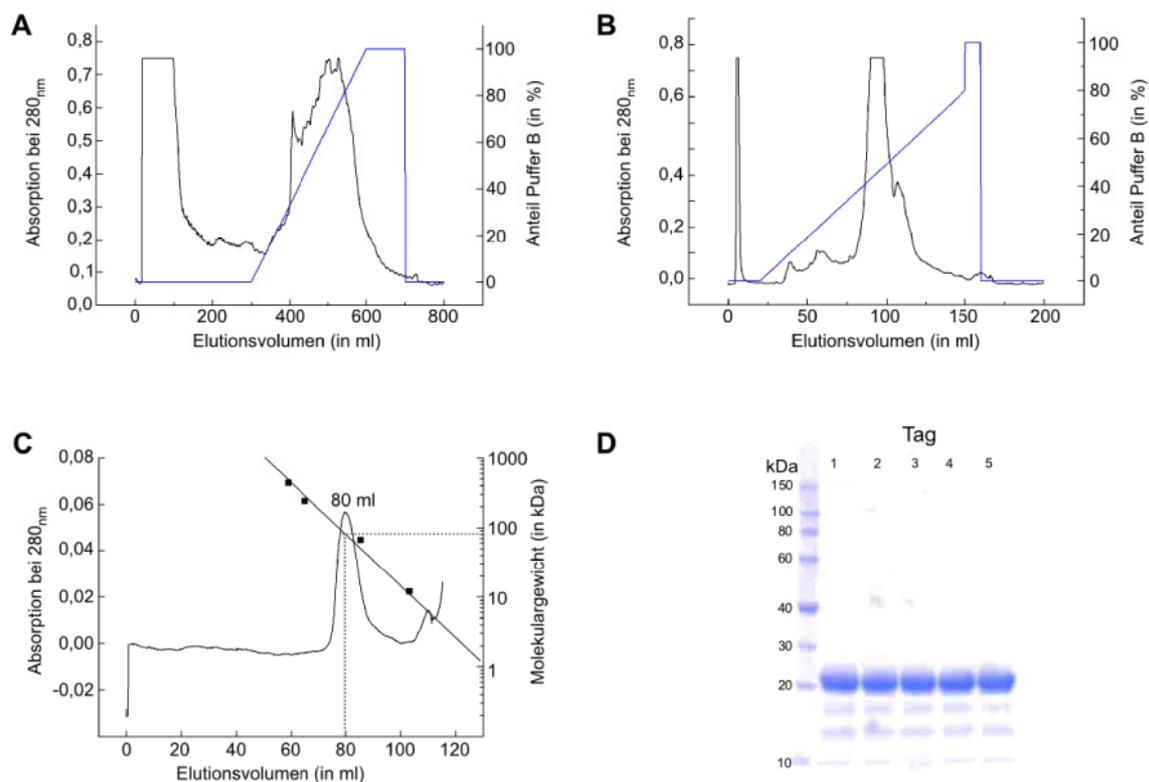


Abbildung 5.3: Reinigung von *hsCK2β*¹⁻²⁰⁸ (A) Chromatographie mit der Phosphocellulosesäule (B) Kationenaustausch-Chromatographie mit der Sepharose Q Säule (C) Gel-Permeations-Chromatographie mit der HiLoad 26/60 Superdex 200 Säule (D) Stabilitätstest. Jeden Tag wurde ein Aliquot einer bei 20 °C lagernden *hsCK2β*¹⁻²⁰⁸-Lösung entnommen und eingefroren. Nach 5 Tagen wurden die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen.

14 Gleichung der Eichgeraden: $f(\log(MW Da)) = -0,030 \log(MW Da)/ml * x ml + 7,580 \log(MW Da)$

5.1.3 Reinigung der CK2-Holoenzym-Varianten

Aus zwei *hsCK2β*- und 6 *CK2α*-Varianten lassen sich theoretisch 12 Holoenzymkomplexe konstruieren. Tatsächlich wurden nur vier verschiedene CK2-Holoenzymvarianten gereinigt (*hsCK2α*¹⁻³³⁵/*hsCK2β*¹⁻¹⁹³, *hsCK2α*¹⁻³³⁵/*hsCK2β*¹⁻²⁰⁸, *hsCK2α*¹⁻³⁵⁵/*hsCK2β*¹⁻²⁰⁸ und *hsCK2α/α'*-Chimäre/*hsCK2β*¹⁻²⁰⁸). Im Angesicht der Fülle der darzustellenden Daten wird nur eine Größenausschluss-Chromatographie des *hsCK2α*¹⁻³³⁵/*hsCK2β*¹⁻²⁰⁸-Holoenzym stellvertretend für alle anderen Reinigungen von *hsCK2*-Holoenzym-Varianten gezeigt (Abbildung 5.4 A). Der Peak bei ca. 72 ml ist dem Holoenzym zuzuordnen, dessen Elutionsvolumen bei einem Molekulargewicht von 128060 Da bei 69 ml zu erwarten war¹⁵. Der zweite Peak bei 92 ml gehört zur *hsCK2α*¹⁻³³⁵-Untereinheit, die im Überschuss vorlag.

Eine Ausnahme war auch hier das Holoenzym mit der *hsCK2α/α'*-Chimäre, das nicht das charakteristische Elutionsprofil zeigte (Abbildung 5.4 B). Mit 80 ml ist der Peak der *hsCK2α/α'*-Chimäre-Untereinheit im Vergleich zu *hsCK2α*¹⁻³³⁵ für ein Monomer zu früh. Wahrscheinlich liegt auch hier ein Dimer vor. Die beiden Peaks bei 52 ml und 61 ml müssen höheren Aggregaten des Holoenzym zugeordnet werden. Ein Elutionsvolumen von 52 ml entspricht anhand der Eichgeraden einem Molekulargewicht von etwa 450000 Da, ein Elutionsvolumen von 61 ml einem Molekulargewicht von etwa 230000 Da. Der letztere Peak könnte einem Holoenzym mit der Stöchiometrie (*hsCK2α/α'*-Chimäre)₄/*(hsCK2β*¹⁻²⁰⁸)₂ zuzuordnen sein.

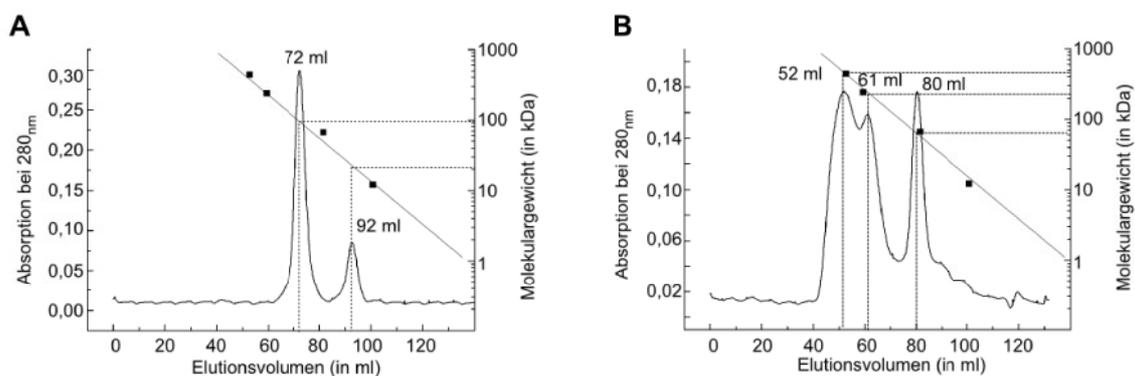


Abbildung 5.4: Gel-Permeations-Chromatographie von *hsCK2*-Holoenzymvarianten (A) *hsCK2α*¹⁻³³⁵/*hsCK2β*¹⁻²⁰⁸-Holoenzym, der Peak bei 72,5 ml entspricht dem Holoenzym, der Peak bei 92 ml der *hsCK2α*¹⁻³³⁵-Untereinheit. (B) *hsCK2α/α'*-Chimäre/*hsCK2β*¹⁻²⁰⁸-Holoenzym.

Mehr Aufschluss über das Verhältnis von *hsCK2α/α'*-Chimäre zu *hsCK2β*¹⁻²⁰⁸ im Holoenzym bringt ein Gel einer anderen Gelfiltration mit dieser CK2-Holoenzym Variante im Vergleich mit dem *hsCK2α*¹⁻³³⁵/*hsCK2β*¹⁻²⁰⁸-Holoenzym (Abbildung 5.5). Dabei wurden die Intensitäten der Banden mit dem Programm *ImageJ* bestimmt und verglichen. Bei dem *hsCK2α*¹⁻³³⁵/*hsCK2β*¹⁻²⁰⁸-Holoenzym

¹⁵ Gleichung der Eichgeraden: $f(\log(MW Da)) = -0,031 \log(MW Da)/ml * x ml + 7,235 \log(MW Da)$

ergab sich dabei das für CK2 charakteristische CK2 α /CK2 β -Verhältnis von 1:1, während es bei dem Holoenzym mit der *hsCK2 α '*-Chimäre in den verschiedenen Fraktionen zwischen 6:1 und 2:1 variiert.

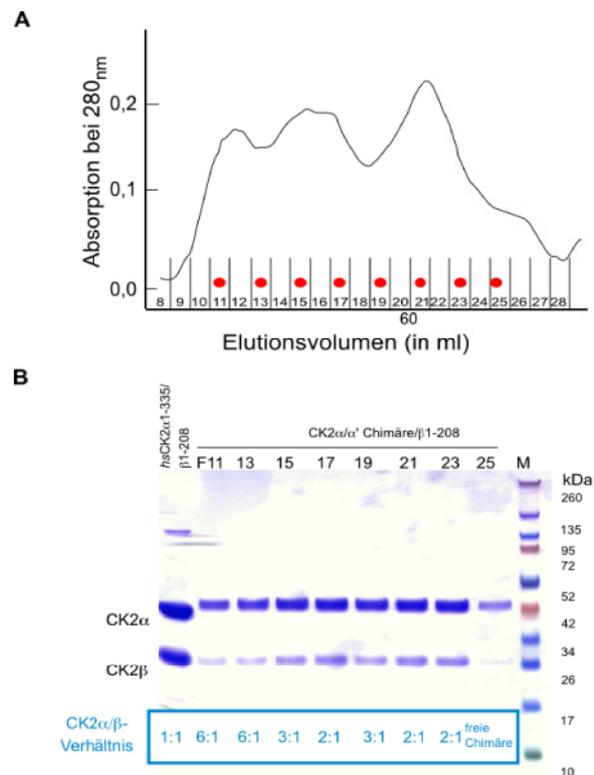


Abbildung 5.5: SDS-Gel von verschiedenen Fraktionen einer Gelfiltration mit dem *hsCK2 α '*-Chimäre/*hsCK2 β ¹⁻²⁰⁸*-Holoenzym (**A**) Gelfiltration (**B**) SDS-Gel der Fraktionen im Vergleich zum *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*/*hsCK2 β ¹⁻²⁰⁸*-Holoenzym. Das CK2 α /CK2 β -Verhältnis, dass anhand der Intensitäten der Banden berechnet wurde, schwankt bei dem Holoenzym mit der *hsCK2 α '*-Chimäre zwischen 6:1 und 2:1, während es im *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*/*hsCK2 β ¹⁻²⁰⁸*-Holoenzym 1:1 ist.

5.2 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Das Molekulargewicht der *hsCK2 α '*-Chimäre und von *hsCK2 α ¹⁻³⁵⁵* wurde auch anhand eines MALDI-TOF-Spektrums überprüft, um Degradation auszuschließen. Zuvor war allerdings schon ein Stabilitätstest über eine Woche bei 20 °C durchgeführt worden, bei dem kein Abbau beobachtet worden war. Das MALDI-TOF-Spektrum gab auch Informationen über den oligomeren Zustand der beiden Konstrukte.

Das Spektrum von *hsCK2 α ¹⁻³⁵⁵* zeigt für das einfach geladene Molekülion [MH]⁺ des Monomers einen relativ breiten Peak bei einem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) von 41552 mit einer Schulter bei m/z=41691 (Abbildung 5.6 A). Das mit der Aminosäuresequenz errechnete Molekulargewicht 41738 Da¹⁶ ist größer als das mit MALDI-TOF bestimmte. Die Breite des Peaks deutet darauf hin, dass das Protein heterogen ist, was wahrscheinlich auf den Verlust weniger Aminosäuren bei einem

¹⁶ Im Fall eines einfach geladenen Molekülions bzw. eines einfach geladenen Dimers ist das Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) mit dem Molekulargewicht gleichzusetzen.

Großteil der Proteine zurückzuführen ist. Das Maximum der Schulter ($m/z=41691$) kann, unter der Annahme einer Genauigkeit von ± 100 Da, das nichtdegradierte Protein repräsentieren. Erkennbar ist außerdem eine leichte Tendenz zur Dimerisierung.

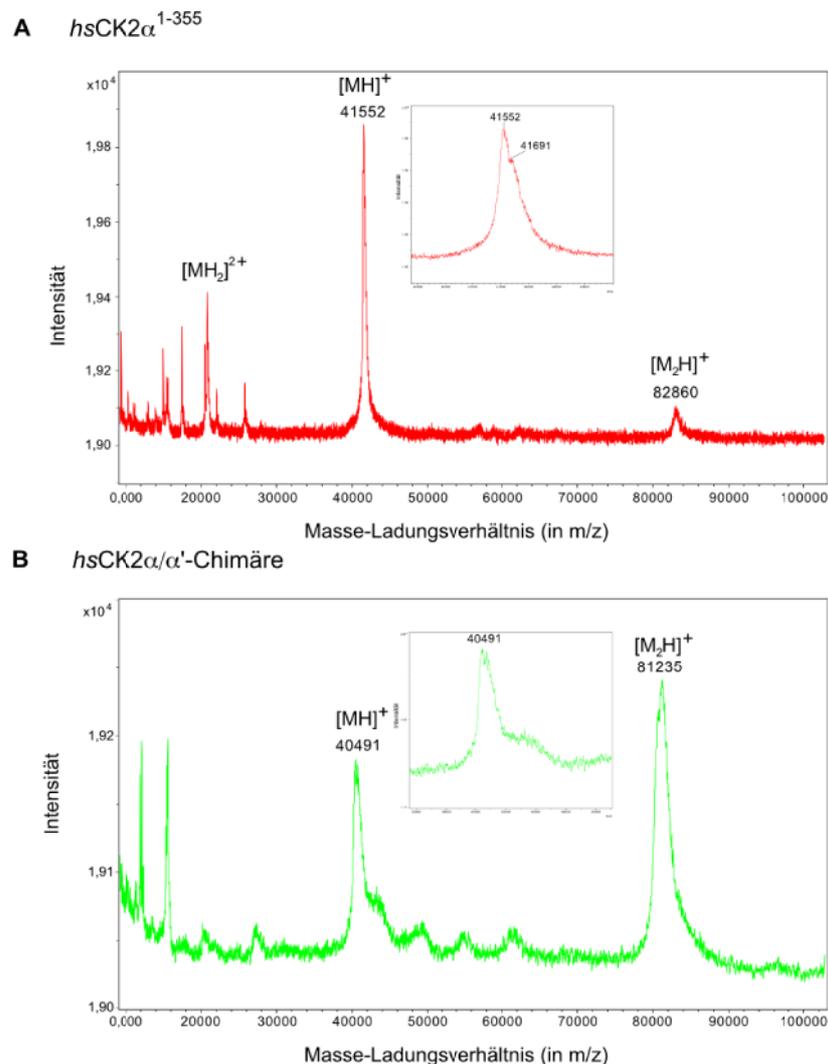


Abbildung 5.6: MALDI-TOF-Spektren (A) *hsCK2 α ¹⁻³⁵⁵* das mit der MALDI-TOF-Messung ermittelte m/z -Verhältnis von 41552 für das einfach geladene Molekülion ($[MH]^+$) ist etwas geringer als das mit der Aminosäuresequenz errechnete Molekulargewicht. Erkennbar ist eine leichte Tendenz zur Dimerisierung ($[M_2H]^+$). (B) Auch bei *hsCK2 α / α' -Chimäre* ist das m/z -Verhältnis von 40491 kleiner als das erwartete Molekulargewicht von 41208 Da. Es ist eine starke Tendenz zur Dimerisierung ($[M_2H]^+$) erkennbar, die wahrscheinlich auf eine Disulfidbrücke im C-Terminus zurückzuführen ist.

Bei dem Spektrum *hsCK2 α / α' -Chimäre* (Abbildung 5.6 B) ist auf Grund der Breite des Peaks ebenfalls von einer Heterogenität auszugehen. Auch hier ist das ermittelte das Masse/Ladungsverhältnis von 40491 für das einfach geladene Molekülion ($[MH]^+$) kleiner als das erwartete Molekulargewicht (41208 Da). Des Weiteren ist eine starke Tendenz zur Dimerisierung ($[M_2H]^+$) erkennbar. Bei der *hsCK2 α / α' -Chimäre* kann man wegen eines Cysteinrestes im C-Terminus (Cys 336) von einem kovalenten Dimer ausgehen. Dafür spricht die Beobachtung, dass die monomere *hsCK2 α / α' -Chimäre*, die durch die Gelfiltration von den Dimeren abgetrennt worden war, im Laufe mehrerer Tage unter oxidativen Bedingungen wieder Dimere bildete.

5.3 Kristallisation und Röntgendiffraktometrie

5.3.1 Komplexstruktur von $hsCK2\alpha^{1-335}$ und Emodin

Emodin (IUPAC-Name: 1,3,8-Trihydroxy-6-methylantracen-9,10-dion) ist ein Naturstoff, der aus den Wurzeln des Handlappigen Rhabarbers (*Rheum palmatum*) gewonnen wird. Emodin wurde im Orient als pflanzliche Medizin gegen Schmerzen, Entzündungen und Krebs eingesetzt [54]. Studien zeigten, dass Emodin die Substanz der Wurzelextrakte ist, die einen inhibitorischen Effekt auf Ser/Thr Proteinkinasen hat [113]. Seit der Entdeckung diente Emodin als Leitstruktur für die Entwicklung verschiedener Anthrachinonderivate, die als Inhibitoren gegenüber CK2 wirken, wie z.B. 1,8-Dihydroxy-4-nitroxanthen-9-on (MNX; $K_I = 0,80 \mu\text{M}$), 1,8-Dihydroxy-4-nitro-Anthrachinon (MNA; $K_I = 0,78 \mu\text{M}$) und 1,4-Diamino-5,8-dihydroxy-Anthrachinon (DAA; $K_I = 0,35 \mu\text{M}$) [114], [115]. Bis jetzt wurden alle strukturellen Studien der $CK2\alpha$ /Inhibitor-Komplexe mit der Mais- $CK2\alpha$ durchgeführt (*zmCK2\alpha*). Dies wurde mit der hohen Sequenzidentität zur menschlichen $CK2\alpha$ im Bereich der ATP-Bindungs tasche (mehr als 77 % [116]) begründet. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde eine Co-Kristallisation von $hsCK2\alpha^{1-335}$ mit Emodin durchgeführt.

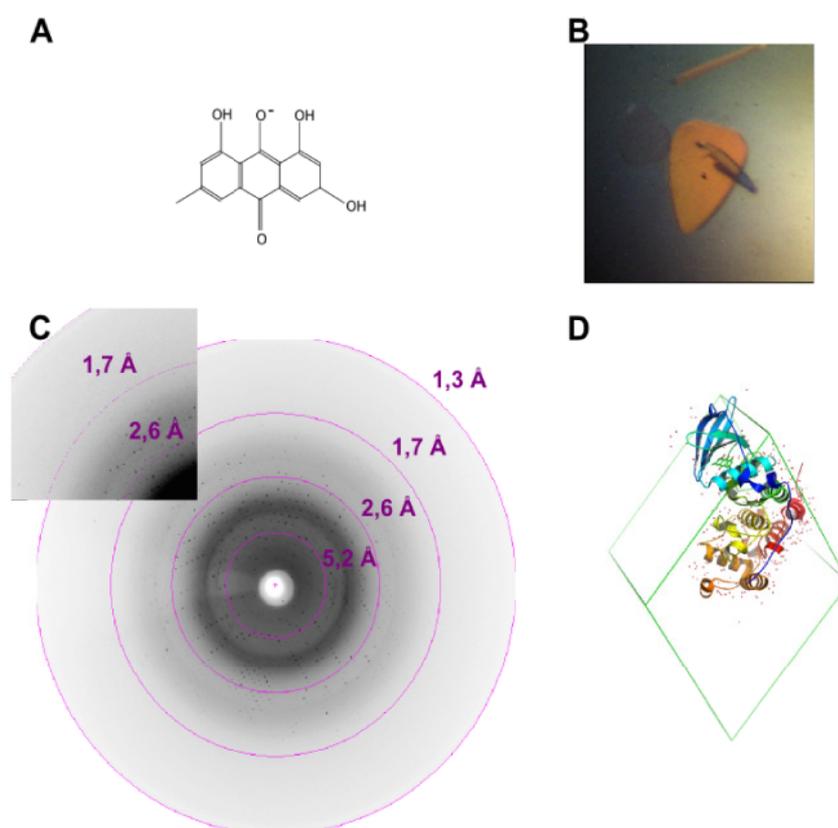


Abbildung 5.7: (A) Emodin-Anion, das unter basischen Bedingungen vorliegt und eine rote Färbung hat. (B) $hsCK2\alpha^{1-335}$ /Emodin-Kristall, entstanden bei der Bedingung: 30 % PEG4000; 0,1 M Tris-HCl; pH 8,5 und 0,2 M Lithiumsulfat (C) Röntgendiffraktionsaufnahme, die Auflösungsring liegt bei 1,5 Å (D) Elementarzelle mit der asymmetrischen Einheit, bestehend aus einer $hsCK2\alpha^{1-335}$ -Kette.

Es konnten bei zwei verschiedenen Bedingungen gut streuende Kristalle erhalten werden, eine der Bedingungen war basisch (30 % PEG4000; 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5 und 0,2 M Lithiumsulfat; Gesamt-pH 8,66), die andere sauer (30 % PEG4000; 0,1 M tri-Na-Citrat, pH 5,6 und 0,2 M Ammoniumacetat; Gesamt-pH 6,59). Bei der basischen Bedingung hatten die Kristalle eine tiefrote Färbung und waren dünne Plättchen mit abgerundeten Kanten (Durchmesser 0,3 mm), bei der sauren Bedingung waren die Kristalle hellrot und etwas verwachsen (Durchmesser 0,2 mm) (Abbildungen 5.7 und 5.8). Beide Färbungen legen nahe, dass das rotfarbene Emodin im Kristall an das Protein gebunden war. Die Farbänderung von Emodin ist auf eine Deprotonierung zurückzuführen. Im konjugierten π -Elektronensystem des Emodin-Anions sind die Elektronen mehr delocalisiert als in der neutralen Form. Die Energie für den Übergang in einen angeregten Zustand ist kleiner und die beobachtete Farbe verschiebt sich von gelb (sauer) zu rot (basisch). *Cryo*-Bedingungen konnten in beiden Fällen durch das Ersetzen des Reservoirs durch 50 % PEG4000 und anschließende Äquilibrierung erreicht werden.

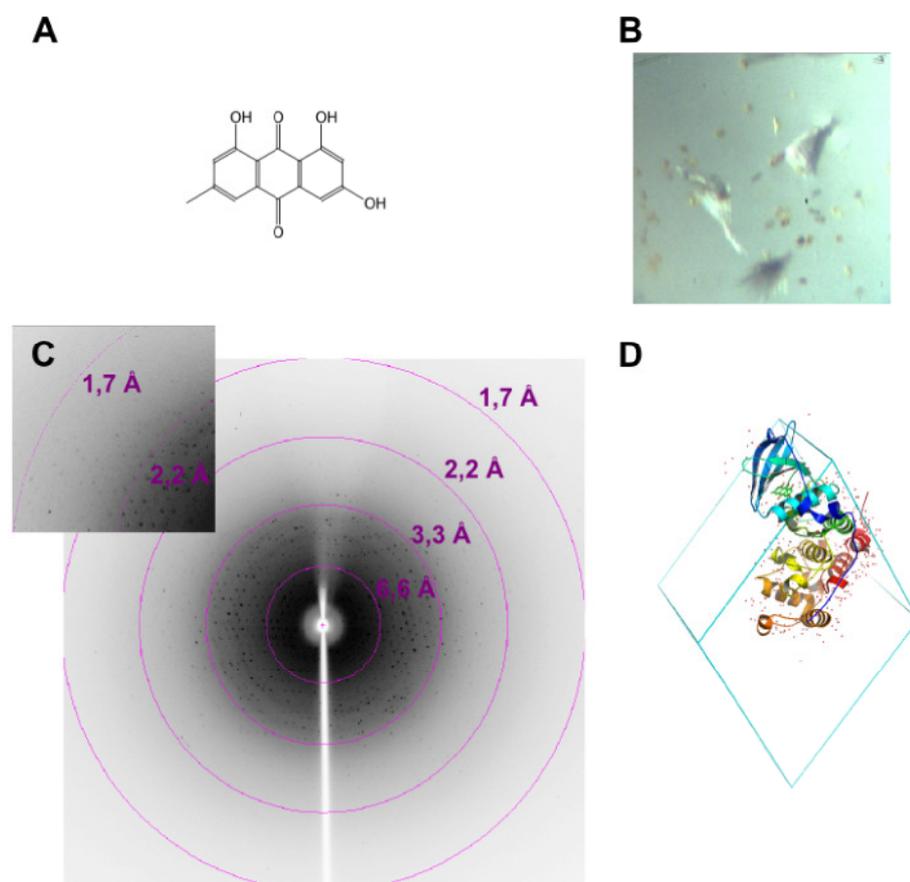


Abbildung 5.8: (A) Emodinmolekül (B) *hsCK2α¹⁻³³⁵*/Emodin-Kristall, entstanden bei der Bedingung: 30 % PEG4000; 0,1 M tri-Na-Citrat, pH 5,6 und 0,2 M Ammoniumacetat (C) Röntgendiffraktionsaufnahme, die Auflösungsgrenze liegt bei 1,95 Å (D) Elementarzelle mit der asymmetrischen Einheit, bestehend aus einer *hsCK2α¹⁻³³⁵*-Kette.

Beide Kristalle wurden vermessen und die Diffraktionsdaten wurden mit dem HKL-Programmpaket [106] prozessiert. Die Struktur des *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/Emodin-Komplexes* wurde mit molekularem Ersatz mit MOLREP aus dem CCP4-Programmpaket [104] bestimmt. Als Suchmodell diente die Struktur von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* (PDB-Datei 1PJK [90]). Zur Verfeinerung wurde REFMAC verwendet [104]. Die Topologie von Emodin wurde mit Hilfe des PRODRG-Servers [117] berechnet. Manuelle Korrekturen wurden mit O [99] und COOT [100] durchgeführt. Beide Datensätze wurden zu akzeptablen R-Werten verfeinert. Die Statistik ist Tabelle 5.1 zu entnehmen. Beide Kristalle waren isomorph und hatten die für PEG-Bedingung typische Raumgruppe P2₁. Auch strukturell gab es keine signifikanten Unterschiede. Ein Vergleich des *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/Emodin-Komplex* mit dem *zmCK2 α -Emodin-Komplex* (PDB-Datei 1F0Q [87]) zeigte jedoch große strukturelle Unterschiede im Bereich der Nucleotidbindungsstelle und eine andere Bindungsweise des Inhibitors. Die Koordinaten und Strukturparameter wurden in der PDB unter den Codes 3BQC (basische Bedingung) und 3C13 (saure Bedingung) hinterlegt [118]

Tabelle 5.1: Röntgen- und Verfeinerungsstatistik der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/Emodin*-Datensätze. Werte in Klammern gelten für die Schale mit der höchsten Auflösung, $R_{\text{sym}} = \sum_h \sum_j |I_{h,j} - \langle I_h \rangle| / \sum_h \sum_j I_{h,j}$, wobei $I_{h,j}$ die Intensität des j-ten Auftretens eines einzigen Reflexes h und $\langle I_h \rangle$ die mittlere Intensität dieses Reflexes ist. Friedelpartner wurden vereint.

	<i>hsCK2α¹⁻³³⁵/Emodin</i> (dunkelrot)	<i>hsCK2α¹⁻³³⁵/Emodin</i> (hellrot)
Datensammlung		
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁
Gitterkonstanten a, b, c (Å)	58,87; 45,74; 63,50	58,73; 45,68; 63,24
α, β, γ (°)	90,00; 111,78; 90,00	90,00; 111,80; 90,00
Auflösung (Å)	34,3-1,5 (1,55-1,5)	19,7-1,95 (2,02-1,95)
R_{sym} (%)	3,6 (60,7)	11,2 (62,6)
Signal-Rauschverhältnis I/ σ I	35,3 (1,9)	13,9 (2,0)
Vollständigkeit	99,1 (98,3)	98,1 (97,8)
Redundanz	3,7 (2,7)	4,0 (3,8)
Lösungsmittelanteil (%)	38,0	37,5
V_m (Å ³ /Da)	1,99	1,97
Verfeinerung		
Auflösung (Å)	34,3-1,5	19,7-1,95
Anzahl der Reflexe	50195	22776
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)	13,0/19,0	18,5/23,3
Anzahl der Atome		
Protein	2773	2773
Ligand/Ion	22	22
Wasser	300	300
B-Faktoren (Å ²)		
Protein	28,4	33,2
Ligand/Ion	29,8	24,3
Wasser	40,8	36,4
Standardabweichung		
Bindungslängen (Å)	0,012	0,013
Bindungswinkel (°)	1,390	1,392

5.3.2 Komplexstruktur von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* und DRB

Bei der Co-Kristallisation von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* mit 5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) bildeten sich bei der Bedingung 1,5 M Ammoniumsulfat; 0,2 M Na-Citrat; 0,2 M Na/K-Tartrat, pH 5.6 (oder alternativ 1,5 M Ammoniumsulfat; 0,3 M Na-Citrat; 0,1 M Na/K-Tartrat, pH 5,6) Kristalle. Die initiale Kristallisationsbedingung resultierte aus dem *Hampton Research Crystal Screen II*. Die Kristalle bildeten sich bei 20 °C innerhalb von einem Tag und hatten Kantenlängen von ca. 0,2 mm \times 0,1 mm \times 0,1 mm (Abbildung 5.9). *Cryo*-Bedingungen konnten durch den Austausch des Reservoirs gegen gesättigte Ammoniumsulfatlösung (ca 3,9 M) und anschließende Äquilibrierung erreicht werden.

Bei der Messung am DESY (EMBL Hamburg) zeigten die Kristalle sehr gute Beugungseigenschaften (Auflösung von 1,56 Å, siehe Abbildung 5.9). Da es sich bei DRB um ein chlorhaltiges Molekül handelt und da Chlor bei einer Wellenlänge von 2 Å schon ein deutliches anomales Signal aufweist, wurde zusätzlich ein Diffraktionsdatensatz bei 2 Å Wellenlänge gemessen, um die Chlorpositionen zu bestimmen. Zur Optimierung des anomalen Signals wurde der Kristall-Detektor-Abstand auf 60 mm vermindert.

Für die Kristalle konnte dabei die Raumgruppe $P4_32_12$ bestimmt werden. Mit den Abmessungen der Elementarzelle (Tabelle 5.2) ließ sich ein Monomer pro Asymmetrischer Einheit mit einem Lösungsmittelanteil von 38,85 % bestimmen ($V_m=2,01 \text{ \AA}^3/\text{Da}$).

Die Struktur des *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*/DRB-Komplexes wurde mit molekularem Ersatz mit dem Programm MOLREP aus dem CCP4-Programmpaket [104] bestimmt. Als Suchmodell diente die Struktur von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* (PDB-Datei 1PJK [90]). Zur Verfeinerung wurde REFMAC verwendet [104]. Die DRB-Topologie wurde mit Hilfe des PRODRG-Servers [117] berechnet. Manuelle Korrekturen wurden mit O [99] durchgeführt.

Die mit PROCHECK [104] erstellte Ramachandran-Plot-Statistik des *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*/DRB-Komplexes nach der Verfeinerung war: 92,1 % der Aminosäuren der Peptidkette in günstigem Bereich, 7,6 % in zusätzlich erlaubtem Bereich, 0,0 % in gerade noch erlaubtem Bereich und 0,3 % in unerlaubtem Bereich. Dabei lag nur Alanin 193, für das bereits vorher eine Spannung des Peptidrückgrats beschrieben worden war [56], im unerlaubten Bereich des Ramachandran Plots. Die Koordinaten und Strukturdaten wurden in der PDB unter dem Code 2RKP hinterlegt [119].

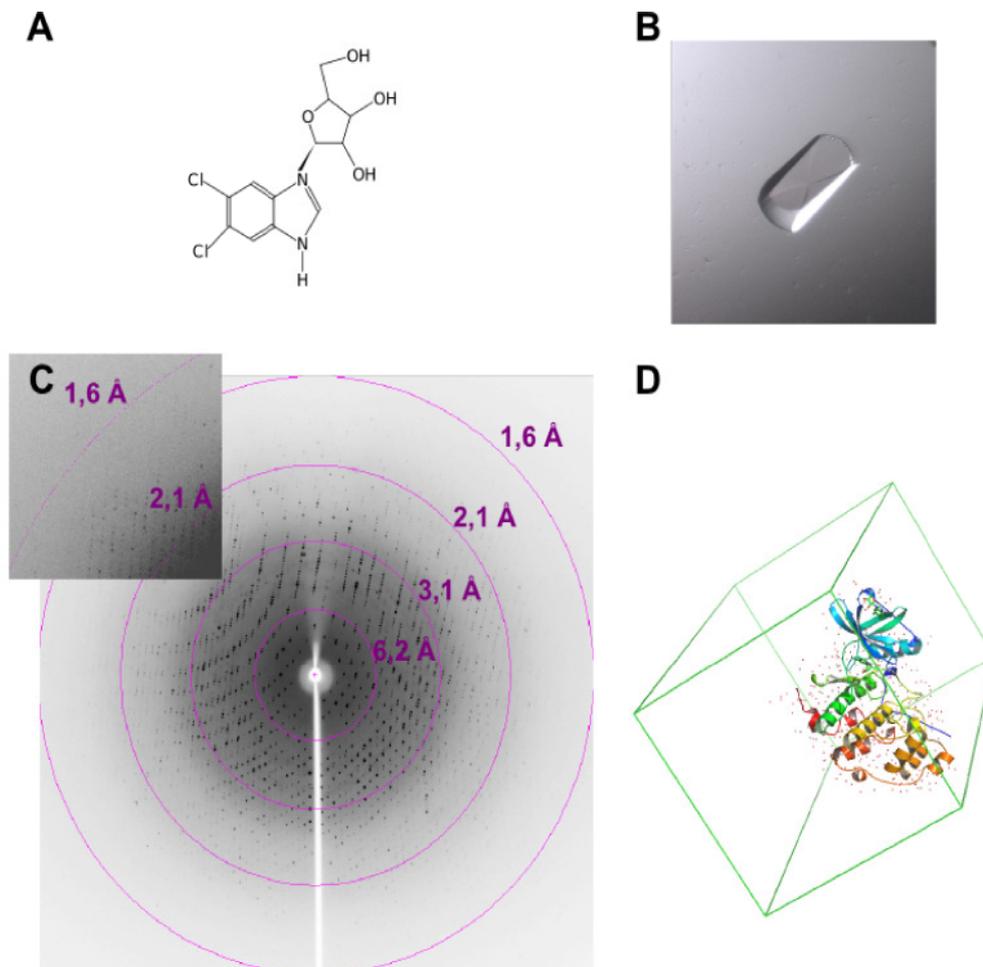


Abbildung 5.9: **(A)** 5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazol-Molekül (DRB) **(B)** *hsCK2α¹⁻³³⁵*/DRB-Kristall, entstanden bei der Bedingung: 1,5 M Ammoniumsulfat; 0,2 M Na-Citrat; 0,2 M Na/K-Tartrat, pH 5,6. **(C)** Röntgendiffraktionsaufnahme der 0,9 Å-Messung, die Auflösungsgrenze liegt bei 1,56 Å. **(D)** Elementarzelle mit der asymmetrischen Einheit, bestehend aus einem *hsCK2α¹⁻³³⁵*-Monomer.

Überraschenderweise fand sich nicht nur ein DRB-Molekül in der kanonischen ATP-Bindungsstelle, sondern auch an der CK2α/CK2β-Interaktionsfläche. Dieser Befund ist besonders hinsichtlich der Entwicklung von kleinen organischen Molekülen, die die CK2α/CK2β-Wechselwirkung beeinflussen, von Bedeutung. Um eine Fehlinterpretation auszuschließen, wurde eine OMIT-Elektronendichte nach „*simulated annealing*“ Molekulardynamik mit CNS [105] berechnet. Dafür wurden die DRB-Moleküle zur Berechnung der Elektronendichte weggelassen, die demnach weniger mit dem Modell „vorbelastet“ ist (kleinerer *model bias*). Eine eindeutigere Methode war die Lokalisierung der Chlorsubstituenten der DRB-Moleküle.

5.3.2.1 Substrukturlösung mit anomaler Fouriersynthese

Der 2 Å-Datensatz wurde zunächst nur aufgenommen, um mit Hilfe einer sogenannten anomalen Differenz-Fourier-Dichte die Chlorsubstituenten der DRB-Moleküle eindeutig zu bestimmen und zusätzlich die aus verschiedenen Chlor-Ionen bestehende Substruktur des Komplexes und die inhärenten Schwefelatome des Proteins zu erfassen.

Der Datensatz hatte eine hohe Auflösung von 2,0 Å, im Mittel konnte jedes Diffraktionsmaximum 25,2 mal unabhängig gemessen werden. Der R_{sym} -Wert von 6,3 % zeigt die gute Qualität des Datensatzes an.

Die Röntgendaten wurden mit dem HKL-Programmpaket [106] prozessiert. Bei der Skalierung mit SCALEPACK [106] werden normalerweise Mittelwerte über alle symmetrieäquivalenten Observationen berechnet. In diesem Fall aber wurden keine Mittelwerte von Friedelpartnern berechnet (Option „*anomalous*“), um das anomale Signal beizubehalten. Die skalierten Diffraktionsintensitäten wurden weiter im CCP4-Programmpaket bearbeitet und in mit TRUNCATE [104] in Strukturfaktoramplituden überführt. Um eine anomale Fourierdichte, in der die anomalen Streuer hervorstechen, zu berechnen, wurden Fourierkoeffizienten der Form

$$DANO_{(hkl)} * \exp[i\varphi_{(hkl)} - 90^\circ] \text{ benötigt.}$$

$DANO_{(hkl)}$ bezeichnet die anomalen Differenzen zwischen den Strukturfaktoramplituden der Bijvoet-Partner aus einem Diffraktionsdatensatz, der mit Röntgenstrahlen längerer Wellenlänge aufgenommen wurde (sogenannte „weiche“-Röntgenstrahlen). Die Terme $\varphi_{(hkl)}$ sind die Phasen der Strukturfaktoren, die anhand der verfeinerten $hsCK2\alpha^{1-335}/DRB$ -Struktur berechnet wurden. Beide Datentypen wurden mit dem CCP4-Programm CAD [104] kombiniert und anschließend wurde mit dem Programm FFT [104] eine Fourier-Transformation durchgeführt. Mit PEAKMAX [104] wurden die Peaks systematisch analysiert. Dabei wurden statistische Parameter (Mittelwert und Standardabweichung) berechnet, Peaks über einem bestimmten Grenzwert Pseudoatome zuordnet, diese entsprechend der Peakhöhe sortiert und in einer PDB-Datei herausgeschrieben. Diese Pseudoatom-Datei zusammen mit der ursprünglichen anomalen Fourierdichte, der $hsCK2\alpha^{1-335}/DRB$ -Komplexstruktur und der dazugehörigen $2F_oF_c$ -Elektronendichte wurde schließlich im Graphikprogramm O [99] betrachtet, um die Zuverlässigkeit der Methode zu überprüfen.

Alle Positionen der inhärenten Schwefelatome konnten mit dieser Methode ermittelt werden, was die Aussagekraft der Daten bestätigte. Auch die Positionen der DRB-Moleküle konnte mit der anomalen Dispersion der Chlorsubstituenten bewiesen werden. Zudem konnten 16 Chlorid-Ionen

bestimmt werden, die in vorher veröffentlichten Strukturen als Wassermoleküle interpretiert wurden. Viele dieser Chlorid-Ionen sind an strukturell oder funktionell wichtige Bereiche gebunden und lassen sich hinsichtlich der konstitutiven Aktivität der CK2 α und ihrer acidophilen Substratspezifität deuten.

Tabelle 5.2: Röntgendaten- und Verfeinerungsstatistik des *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/DRB*-Datensatzes. Werte in Klammern gelten für die Schale mit der höchsten Auflösung, $R_{\text{sym}} = \sum_h \sum_j |I_{h,j} - \langle I_h \rangle| / \sum_h \sum_j I_{h,j}$, wobei $I_{h,j}$ die Intensität des j -ten Auftretens eines einzigen Reflexes h und $\langle I_h \rangle$ die mittlere Intensität dieses Reflexes ist. Friedelpartner wurden nur beim 0,9 Å-Datensatz vereint.

	<i>hsCK2α¹⁻³³⁵/DRB</i> (0,9 Å-Datensatz)	<i>hsCK2α¹⁻³³⁵/DRB</i> (2 Å-Datensatz)
Datensammlung		
Raumgruppe	P4 ₃ -2	P4 ₃ -2
Gitterkonstanten a, b, c (Å)	71,5; 71,5; 125,8	71,6; 71,6; 125,9
α, β, γ (°)	90,0; 90,0; 90,0	90,0; 90,0; 90,0
Auflösung (Å)	24,8-1,56 (1,62-1,56)	21-1,95 (1,98-1,95)
R_{sym} (%)	6,0 (60,9)	6,3 (31,9)
Signal-Rauschverhältnis I/σ	11,7 (3,2)	59,9 (10,3)
Vollständigkeit	99,9 (100,0)	98,6 (95,9)
Redundanz	7,6 (7,5)	25,2 (21,1)
Lösungsmittelanteil (%)	38,9	39,0
V_m (Å ³ /Da)	2,01	2,01
Verfeinerung		
Auflösung (Å)	24,8 – 1,56	
Anzahl der Reflexe	45706	26180
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)	14,4 / 19,9	
Anzahl der Atome		
Protein	2861	
Ligand/Ion	56	
Wasser	338	
B-Faktoren (Å ²)		
Protein	26,6	
Ligand/Ion	42,4	
Wasser	36,4	
Standardabweichung		
Bindungslängen (Å)	0,017	
Bindungswinkel (°)	1,583	

5.3.2.2 *Ab initio*-Strukturlösung mit SAS

Nachdem die Struktur bereits mit molekularem Ersatz gelöst war, wurden die Positionen der anomalen Streuer mit der Differenzelektronendichte bestimmt. Erst später stellte sich heraus, dass sich aus dem 2 Å-Datensatz mit Hilfe des „*AutoRickshaw*“ Servers [120] sehr einfach die Phasen bestimmen lassen konnten. Dabei wurde das SAS (*single wavelength anomalous dispersion on the basis of sulphur*) Protokoll ausgewählt, dass zur Auswertung von SAD-Signalen auf der Basis von Schwefel dient. Auf diese Weise konnten die initialen Phasen berechnet werden, die zusammen mit den hochaufgelösten Strukturfaktoramplituden dazu genutzt wurden Elektronendichten zu

berechnen. Diese wurden zunächst automatisch [121], und schließlich manuell mit der Polypeptidkette gefüllt. Die so erhaltene Struktur zeigt kaum strukturelle Abweichungen von der mit molekularem Ersatz bestimmten. Damit ist sowohl die Zuverlässigkeit der Struktur bestätigt, die mit molekularem Ersatz ermittelt wurde, als auch die einfache Lösung der Struktur durch rein experimentelle Daten mit Hilfe des „AutoRickshaw“ Servers demonstriert worden.

5.3.3 Komplexstruktur von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* und Glycerin

Die Kristalle der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*/DRB-Komplexstruktur waren isomorph zu bereits vorher bekannten Kristallen einer *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*-Punktmutante (*hsCK2 α ¹⁻³³⁵*-V66A/M163L) [122], die ebenfalls unter salzhaltigen Bedingungen entstanden waren (und zwar: 2,2 M Na Citrat). Bei einer genaueren Betrachtung dieser Struktur zeigte sich, dass auch dort Restelextronendichte im Bereich der *CK2 α* /*CK2 β* -Interaktionsfläche zu finden war. Diese hatte die Form eines Glycerinmoleküls, was verwunderlich war, denn weder in der Kristallisations-, noch in der *Cryo*-Bedingung war Glycerin vorhanden gewesen. Es stellte sich jedoch heraus, dass die *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*-Punktmutante während der Reinigung mit Glycerin in Kontakt gekommen war und diesen Liganden bis zur Kristallisation gebunden hielt. In der Struktur überlappt das Glycerinmolekül mit dem Benzimidazolrest von DRB.

Die Bindung eines kleinen Moleküls an die allosterische Bindungsstelle scheint also einen Einfluss auf das Kristallisationsverhalten von *hsCK2 α* zu haben. Dies äußert sich in einer Präferenz für eine tetragonale Kristallpackung und Salze wie Ammoniumsulfat oder Natriumcitrat als Fällungsmittel. Ansonsten kristallisiert *CK2 α* meist in PEG-haltigen Bedingungen in der Raumgruppe $P2_1$ (wie z.B. beim *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*/Emodin-Komplex). Die Präferenz der Raumgruppe $P4_32_12$ muss auf neue Möglichkeiten für Kristallkontakte zurückzuführen sein. Diese resultieren wahrscheinlich aus Konformationsänderungen, die durch die Bindung des Moleküls hervorgerufen wurden oder direkt auf das kleine Molekül zurückzuführen sind.

Um diesen Annahmen nachzugehen, wurde eine Co-Kristallisation mit Glycerin und *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* durchgeführt, bei der sich tatsächlich Kristalle (Durchmesser 0,2 mm) bei 2 M Ammoniumsulfat und 2 M NaCl bildeten (Abbildung 5.10). Es konnten direkt die initialen Kristallisationsbedingungen aus dem *Jena Bioscience-Sceen 6* von Jena Bioscience verwendet werden. Auch hier wurde das Reservoir gegen gesättigte Ammoniumsulfatlösung (ca 3,9 M) ausgetauscht, um *Cryo*-Bedingungen zu erreichen.

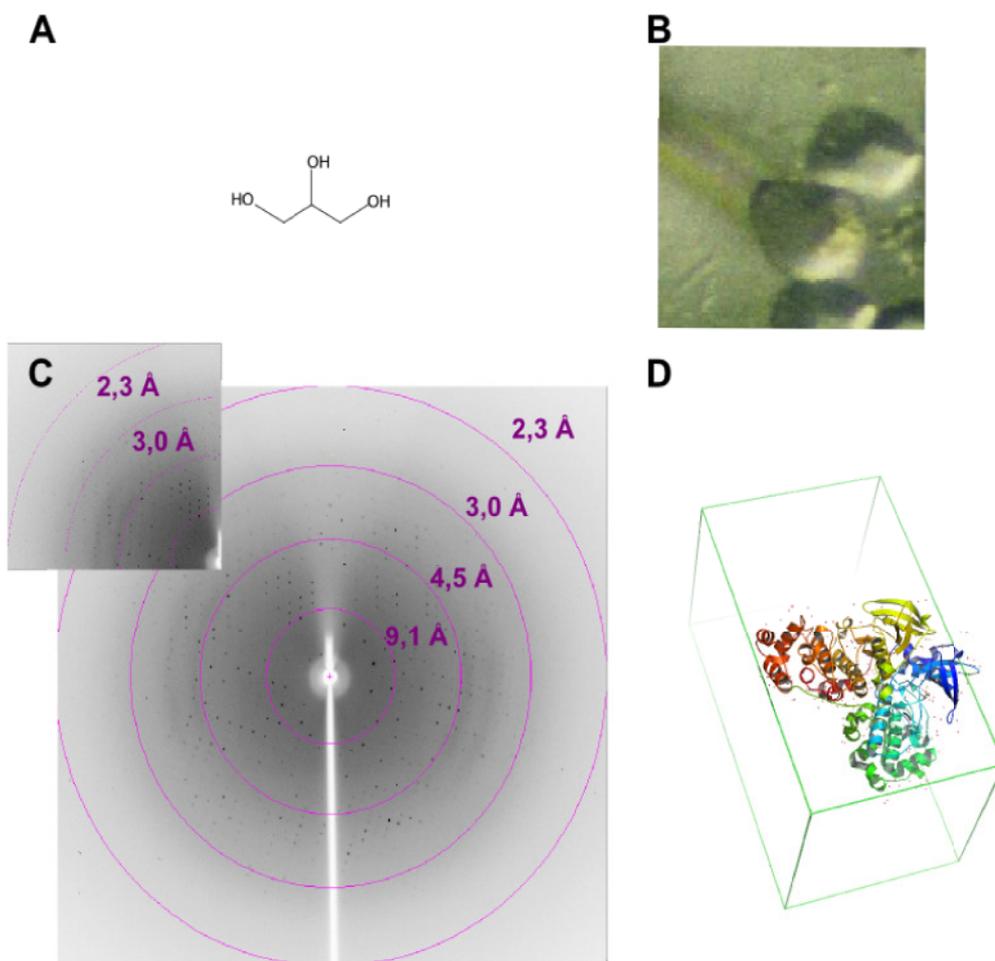


Abbildung 5.10: (A) Glycerinmolekül (B) *hsCK2α*¹⁻³³⁵/Glycerin-Kristall, entstanden bei der Bedingung: 2 M Ammoniumsulfat und 2 M NaCl (C) Röntgendiffraktionsaufnahme, die Auflösungsgrenze liegt bei 2,3 Å. (D) Elementarzelle mit asymmetrischen Einheit, bestehend aus einem *hsCK2α*¹⁻³³⁵-Dimer.

Die Kristalle hatten eine Auflösung von 2.3 Å. Zunächst schienen sie auch der gleichen Raumgruppe ($P4_32_12$) anzugehören und besaßen die gleichen Gitterkonstanten. Bei der Verfeinerung der Komplexstruktur stellte sich allerdings heraus, dass es sich bei den Kristallen um perfekte merohedrische Zwillinge handelte. Die Symmetrie musste daher auf $P4_3$ zurückgesetzt werden. Die Berücksichtigung der Verzwilligung sorgte dafür, dass auch Bereiche der Struktur, die mit der höheren Symmetrie ungeordnet waren, eine interpretierbare Elektronendichte vorwiesen (Abbildung 5.11).

Die asymmetrische Einheit der Kristalle wird unter der Annahme der Raumgruppe $P4_3$ von zwei *hsCK2α*¹⁻³³⁵-Ketten, die in C_2 Punktsymmetrie angeordnet sind, belegt. Die Struktur wurde mit molekularem Ersatz mit MOLREP [104] unter der Verwendung der Struktur von *hsCK2α*¹⁻³³⁵ (PDB-Datei 2PVR, [56]) gelöst. Zur Verfeinerung wurde REFMAC [104] genutzt, manuelle Korrekturen wurden mit COOT [100] durchgeführt. Die Statistik zum Datensatz und zur Verfeinerung ist in Tabelle 5.3 aufgelistet. Die Koordinaten und Strukturdaten wurden in der PDB unter dem Code 3FWQ hinterlegt [123]

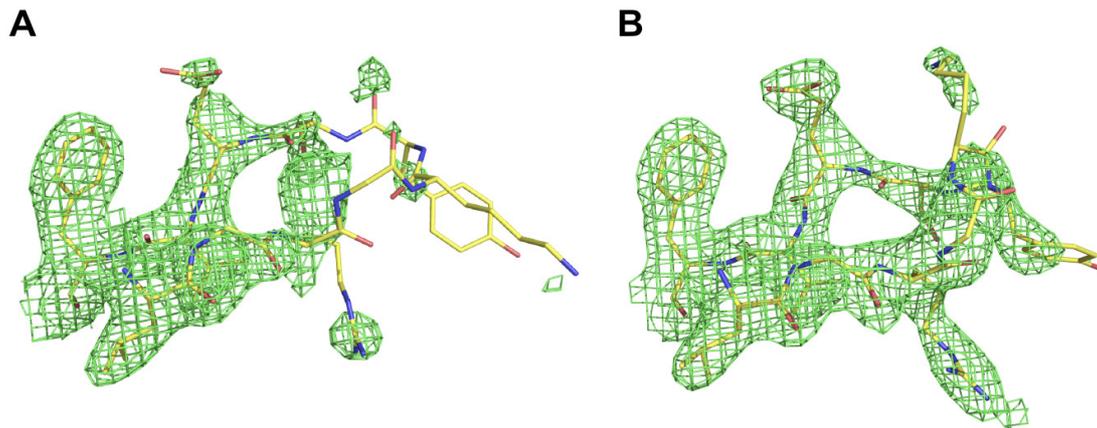


Abbildung 5.11: Vergleich der Güte der $2F_oF_c$ -Elektronendichten im Bereich der glycinreichen Schleife (AS 45–54). Die Struktur, die ohne die Annahme der Verzwilligung mit der Raumgruppe $P4_32_12$ gelöst wurde (**A**), hat in diesem Bereich sehr schwach ausgeprägte Elektronendichten. Die Kette A der Struktur unter Annahme einer Verzwilligung und der Raumgruppe $P4_3$ (**B**) zeigt deutliche Elektronendichten bei den Resten der glycinreichen Schleife. Beide Elektronendichten wurden mit einem Konturlevel von $1,0 \sigma$ abgebildet.

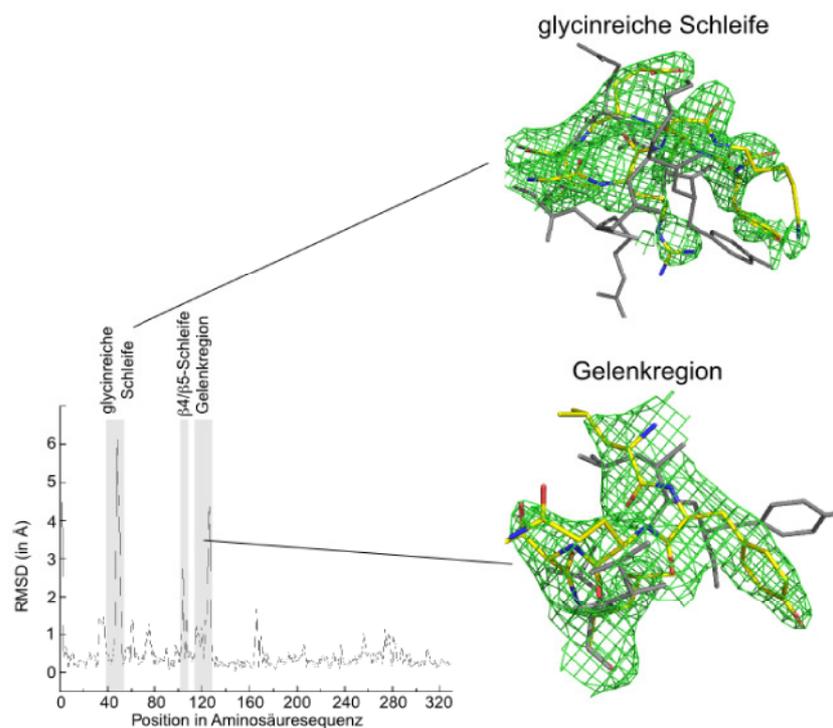


Abbildung 5.12: Vergleich der beiden $hsCK2\alpha^{1-335}$ -Ketten. Abweichungen sind bei der glycinreichen Schleife, der $\beta 4/\beta 5$ -Schleife und der Gelenkregion beobachtbar (RMSD wurde mit BRAGI berechnet [4]). Die Überlagerung der beiden Ketten im Bereich der glycinreichen Schleife und der Gelenkregion zeigen die Konformationsunterschiede im Detail. Kette B wurde mit gelben Kohlenstoffatomen gezeichnet, Kette A wurde in grau dargestellt. Die $2F_oF_c$ -Elektronendichte um die Kette B wurde mit einem Konturlevel von $0,9 \sigma$ dargestellt.

Ein Vergleich der beiden $hsCK2\alpha^{1-335}$ -Ketten zeigt, dass diese im Bereich der glycinreichen Schleife, der $\beta 4/\beta 5$ -Schleife und der Gelenkregion voneinander abweichen und daher asymmetrisch sind (Abbildung 5.12). Der größte Unterschied besteht darin, dass nur Kette A ein Glycerinmolekül

in der CK2 β -Bindungstasche und ein Sulfat-Ion in der Substratbindungsstelle gebunden hat. Bei beiden Ketten ist ein Glycerinmolekül im C-terminalen Bereich vorhanden (Abbildung 6.11).

Die wichtigste strukturelle Eigenschaft ist jedoch, dass sowohl Kette A (wird in Kapitel 6.3 ausführlich dargestellt), als auch in Kette B (Elektronendichte siehe Abbildung 5.12) in einer inaktiven Konformation vorliegen. Dies wurde bis jetzt nicht bei der als konstitutiv aktiv angenommenen CK2 α -Untereinheit beobachtet. Diese inaktive Konformation entspricht nicht der für EPKs charakteristischen Konformation, sondern die ATP-Bindungsstelle wird durch eine kollabierte glycinreiche Schleife blockiert. Ausgeprägter ist diese Konformation in Kette A. Details dieser Konformation und resultierende Erklärungen für die Regulation der CK2 werden in den Kapiteln 6.3.2 und 6.3.3 besprochen.

Tabelle 5.3: Röntgendaten- und Verfeinerungsstatistik des *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/Glycerin*-Datensatzes. Werte in Klammern gelten für die Schale mit der höchsten Auflösung, $R_{\text{sym}} = \sum_h \sum_j |I_{h,j} - \langle I_h \rangle| / \sum_h \sum_j I_{h,j}$, wobei $I_{h,j}$ die Intensität des j -ten Auftretens eines einzigen Reflexes h und $\langle I_h \rangle$ die mittlere Intensität dieses Reflexes ist. Friedelpartner wurden vereint.

<i>hsCK2α¹⁻³³⁵/Glycerin</i>	
Datensammlung	
Raumgruppe	P4 ₃
Gitterkonstanten a, b, c (Å)	71,32; 71,32; 125,68
α, β, γ (°)	90,0; 90,0; 90,0
Auflösung (Å)	34,50-2,30 (2,38-2,30)
R_{sym} (%)	10,0 (72,4)
Signal-Rauschverhältnis I/σ	17,6 (2,0)
Vollständigkeit	96,9 (98,3)
Redundanz	7,7 (7,2)
Lösungsmittelanteil (%)	38,4
V_m (Å ³ /Da)	2,00
Verfeinerung	
Auflösung (Å)	34,5 - 2,3
Anzahl der Reflexe	26999
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)	17,0/23,3
Anzahl der Atome	
Protein	5634
Ligand/Ion	28
Wasser	204
B-Faktoren (Å ²)	
Protein	41,4
Ligand/Ion	46,3
Wasser	33,2
Standardabweichung	
Bindungslängen (Å)	0,006
Bindungswinkel (°)	0,885

5.4 Kalorimetrie

5.4.1 Isothermale Titrationskalorimetrie

5.4.1.1 Thermodynamisches Profil der *hsCK2 α /hsCK2 β* -Interaktion

Mit isothermaler Titrationskalorimetrie wurde die Bindungsaffinität zwischen *hsCK2 α* und *hsCK2 β* quantifiziert und das thermodynamische Profil wie in Kapitel 4.9.1 beschrieben, bestimmt. Dabei wurde angenommen, dass das *hsCK2 β* -Dimer zwei äquivalente Bindungsstellen für *hsCK2 α* aufweist ($n=2$, *single set of sites*-Auswertungsmodus). *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* wurde sowohl gegen die kürzere *hsCK2 β* -Variante (*hsCK2 β ¹⁻¹⁹³*) als auch gegen die längere Variante (*hsCK2 β ¹⁻²⁰⁸*) bei verschiedenen Temperaturen titriert. Der Mittelwert der Bindungskonstante für die Interaktion von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* und *hsCK2 β ¹⁻¹⁹³* für alle durchgeführten Messungen ist $2,20 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ ($K_D = 4,51 \text{ nM}$). Bei den Messungen mit *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* und *hsCK2 β ¹⁻²⁰⁸* wurde eine mittlere Bindungskonstante von $1,94 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ ($K_D = 5,17 \text{ nM}$) bestimmt. Beide Wechselwirkungen sind stark exotherm und zeigen durch den negativen entropischen Beitrag eine Enthalpie/Entropie-Kompensation. Abbildung 5.13 zeigt die Rohdaten und die integrierten Peaks mit der angepassten Kurve zur Ermittlung der thermodynamischen Parameter.

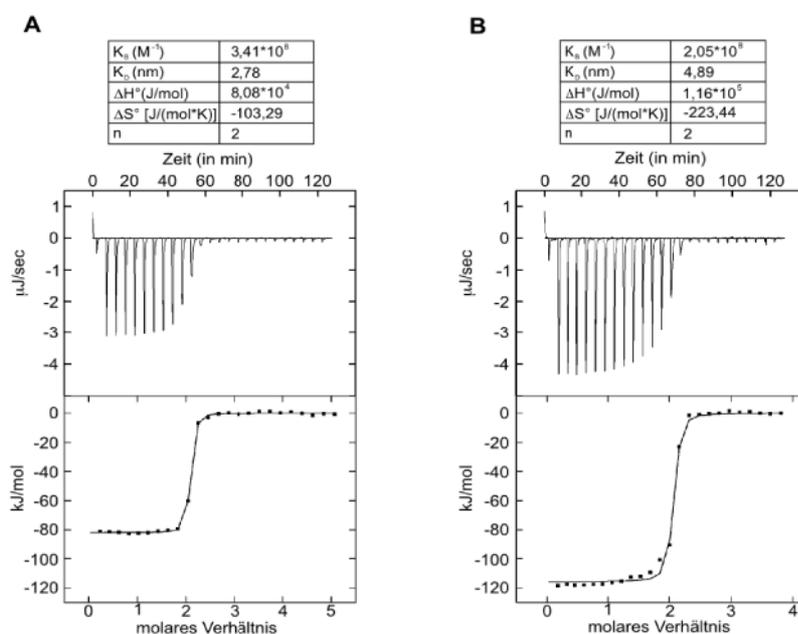


Abbildung 5.13: ITC-Messungen bei 30 °C. Die oberen Hälften zeigen die Rohdaten. Jeder Peak entspricht einer Injektion. Die unteren Hälften zeigen die integrierten Peaks mit der angepassten Kurve. (A) *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/hsCK2 β ¹⁻¹⁹³*-Interaktion (B) *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/hsCK2 β ¹⁻²⁰⁸*-Interaktion. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen wurden jeweils in einer Tabelle zusammengefasst. Beide Messungen wurden mit einem 25 mM Tris-HCl; 500 mM NaCl; pH 8,5-Puffer durchgeführt.

Bei der $hsCK2\alpha^{1-335}$ und $hsCK2\beta^{1-208}$ -Wechselwirkung bei 30 °C ist der enthalpische Beitrag höher, als bei der $hsCK2\alpha^{1-335}$ und $hsCK2\beta^{1-193}$ -Wechselwirkung bei 30 °C ($1,16 \cdot 10^5 \pm 174$ J/mol gegenüber $8,08 \cdot 10^4 \pm 1,7 \cdot 10^3$ J/mol). Es sei erwähnt, dass sich die Kurve vor allem im ungesättigten Bereich bei den $hsCK2\alpha^{1-335}/hsCK2\beta^{1-208}$ -Messungen schlechter mit dem *single set of sites* Modus an die integrierten Peaks anpassen ließ als bei den $hsCK2\alpha^{1-335}/hsCK2\beta^{1-193}$ -Messungen (Abbildung 5.13 B). Dies könnte auf eine unterschiedliche Affinität der beiden CK2 α -Bindungsstellen des $hsCK2\beta^{1-208}$ -Dimers hindeuten. Die Auswertung mit dem Modus für zwei unabhängige Bindungsstellen oder für sequentielle Bindung resultierte allerdings in einem deutlich höheren Fehler bei der Anpassung der Kurve. Mit beiden $hsCK2\beta$ -Varianten und $hsCK2\alpha^{1-335}$ wurden Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen (20, 25, 30 und 35 °C) durchgeführt, um die Änderung der Wärmekapazität zu ermitteln. Die thermodynamischen Profile dieser Messungen (Abbildung 5.14. A, dargestellt sind nur die Messungen der $hsCK2\alpha^{1-335}/hsCK2\beta^{1-193}$ -Wechselwirkung) zeigen einen Einfluss der Temperatur auf ΔH° und ΔS° , die beide mit steigender Temperatur negativer werden. Beide Beiträge kompensieren sich und resultieren in einer gleichbleibenden freien Standardenthalpie ΔG° .

Mit den ΔH° - und ΔS° -Werten bei den verschiedenen Temperaturen wurde für die Änderung der Wärmekapazität ΔC_p für die $hsCK2\alpha^{1-335}/hsCK2\beta^{1-193}$ -Interaktion ein Wert von -1355 J/(mol*K) aus $d\Delta H^\circ/dT$ und -1257 J/(mol*K) aus $T d(\Delta S^\circ)/dT$ bestimmt. Für die $hsCK2\alpha^{1-335}$ und $hsCK2\beta^{1-208}$ -Interaktion wurde aus $d\Delta H^\circ/dT$ ein Wert von -2253 J/(mol*K) und aus $T d(\Delta S^\circ)/dT$ ein Wert von -1995 J/(mol*K) ermittelt (siehe Abbildung 5.14. B).

Zudem wurde für die $hsCK2\alpha^{1-335}$ und $hsCK2\beta^{1-193}$ -Wechselwirkung eine mögliche Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht. Dazu wurde der pH-Wert des Tris-Puffers innerhalb seines Pufferbereiches ($pK_s = 8,3$ bei 20 °C; der Pufferbereich liegt etwa zwischen pH 7 und 9) variiert. Die Messungen wurden bei 35 °C durchgeführt, da das Signal auf Grund des bei dieser Temperatur besonders großen enthalpischen Beitrages am deutlichsten war. Die aus diesen Messungen resultierenden thermodynamischen Profile (Abbildung 5.14 C) zeigten jedoch keine eindeutige Abhängigkeit vom pH-Wert in diesem Bereich.

Um zu untersuchen, ob bei der Assoziation der CK2-Untereinheiten ein Protonenaustausch mit dem Lösungsmittel stattfindet, wurden ITC-Experimente in Puffern unterschiedlicher Ionisierungsenthalpie (Tris: 48,50 kJ/mol; HEPES: 20,96 kJ/mol; PIPES: 11,46 kJ/mol, [124]) durchgeführt. Bei der Auftragung der gemessenen Bindungsenthalpie gegen die Ionisierungsenthalpie des Puffers kann die Anzahl der zwischen dem Protein und dem Lösungsmittel ausgetauschten Protonen direkt über die Steigung ermittelt werden. Zudem zeigt das Vorzeichen der Steigung die Richtung des Transfers an. Wie in Abbildung 5.14 D erkennbar ist, zeigten sich keine interpretierbaren

Tendenzen, da kein eindeutiger linearer Zusammenhang erkennbar ist.

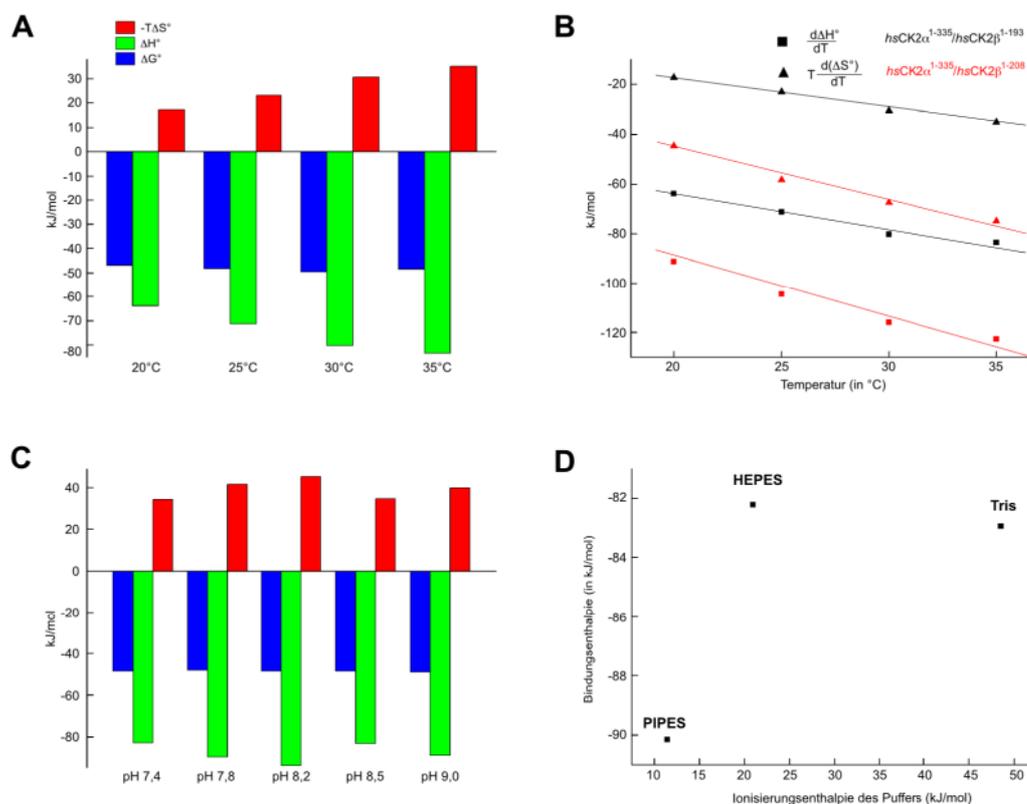


Abbildung 5.14: (A) Temperaturabhängigkeit der *hsCK2α*¹⁻³³⁵ und *hsCK2β*¹⁻¹⁹³-Wechselwirkung (B) ΔH° und ΔS° der *hsCK2α*¹⁻³³⁵ und *hsCK2β*¹⁻¹⁹³- bzw. *hsCK2α*¹⁻³³⁵/*hsCK2β*¹⁻²⁰⁸-Wechselwirkung bei verschiedenen Temperaturen zur Berechnung von ΔC_p (C) pH-Abhängigkeit der *hsCK2α*¹⁻³³⁵ und *hsCK2β*¹⁻¹⁹³-Interaktion (D) Abhängigkeit der *hsCK2α*¹⁻³³⁵ und *hsCK2β*¹⁻¹⁹³-Wechselwirkung von der Ionisierungsenthalpie von verschiedenen Puffern.

5.4.1.2 Thermodynamisches Profil der Interaktion von *hsCK2α*¹⁻³³⁵-Punktmutanten und *hsCK2β*¹⁻¹⁹³

In dem N-terminalen Bereich der CK2α-Untereinheit, der mit CK2β interagiert (im Folgenden auch β-Faltblattgelenkpfanne genannt), gibt es verschiedene hydrophobe Aminosäurereste, die ihrerseits mehr oder weniger große Beiträge zur Bindung leisten. Wie bereits einleitend in Kapitel 2.1 erwähnt, gibt es bei Protein-Protein-Wechselwirkungen jedoch oft sogenannte *hot spots*, also wenige Aminosäurereste, die den Hauptbeitrag zur Bindung leisten. Aus diesem Grund wurden die Punktmutanten *hsCK2α*^{1-335, Leu41Ala}, *hsCK2α*^{1-335, Leu41Ala, Val42Ala} und *hsCK2α*^{1-335, Ile69Ala} erstellt und in ITC-Experimenten gegen *hsCK2β*¹⁻¹⁹³ titriert, um die thermodynamischen Parameter mit denen der Titration mit *hsCK2α*¹⁻³³⁵ zu vergleichen. Alle Messungen wurden bei 20 °C durchgeführt, da die Punktmutanten auf Grund niedriger Entfaltungstemperaturen zur Aggregation in der Titrationspritze neigten.

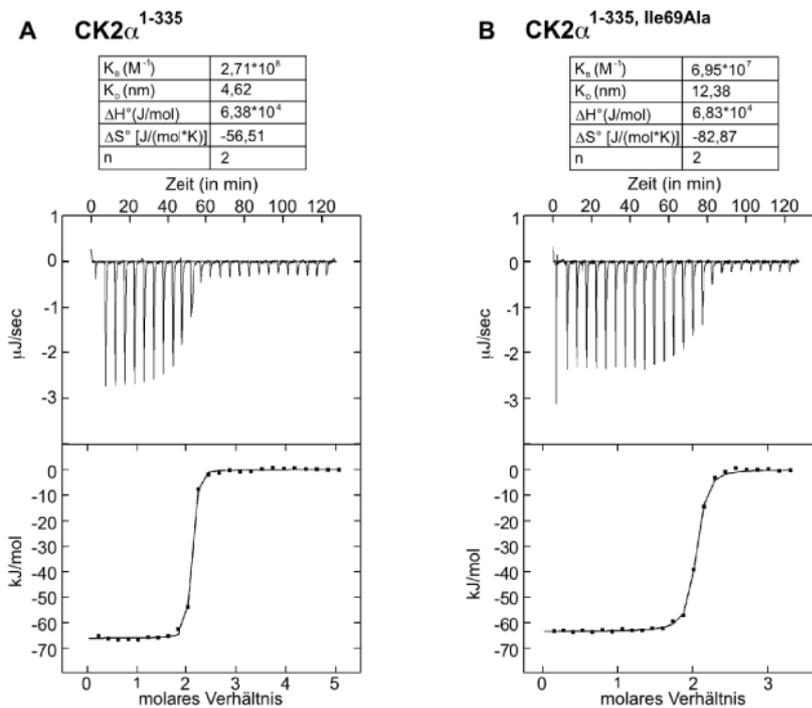


Abbildung 5.15: ITC-Messungen bei 20 °C. Die obere Hälfte zeigt die Rohdaten. Jeder Peak entspricht einer Injektion. Die untere Hälfte zeigt die integrierten Peaks mit der angepassten Kurve. Es wurde jeweils gegen die $hsCK2\beta^{1-193}$ -Untereinheit titriert. (A) $hsCK2\alpha^{1-335}$ (B) $hsCK2\alpha^{1-335, Ile69Ala}$

Der Austausch von Ile69 durch Ala hatte dabei den geringsten Einfluss auf die Wechselwirkung. Die Bindungskonstante ist im Vergleich zur Messung mit $hsCK2\alpha^{1-335}$ kleiner ($6,95 \cdot 10^7 \pm 1,83 \cdot 10^7 M^{-1}$ gegenüber $2,71 \cdot 10^8 \pm 9,15 \cdot 10^7 M^{-1}$), ΔH° und ΔS° haben beide einen negativeren Wert, kompensieren sich aber auch hier (Abbildung 5.15).

Im Gegensatz dazu gibt es bei der $hsCK2\alpha^{1-335, Leu41Ala}/hsCK2\beta^{1-193}$ -Interaktion keine Entropie/Enthalpie-Kompensation. Obwohl ΔS° nun begünstigend für die Bindung ist, sorgt der im Vergleich zur $hsCK2\alpha^{1-335}/hsCK2\beta^{1-193}$ -Wechselwirkung geringere enthalpische Beitrag ($2,66 \cdot 10^4 \pm 9,75 \cdot 10^3 J/mol$ gegenüber $6,38 \cdot 10^4 \pm 2,26 \cdot 10^3 J/mol$) für eine kleinere Bindungskonstante ($5,38 \cdot 10^6 \pm 1,40 \cdot 10^6 M^{-1}$ gegenüber $2,71 \cdot 10^8 \pm 9,15 \cdot 10^7 M^{-1}$) bei der Messung mit $hsCK2\alpha^{1-335, Leu41Ala}$. Wird auch der Valin-Rest neben Leu41 gegen Alanin ausgetauscht findet keine Interaktion der Untereinheiten mehr statt (Abbildung 5.16).

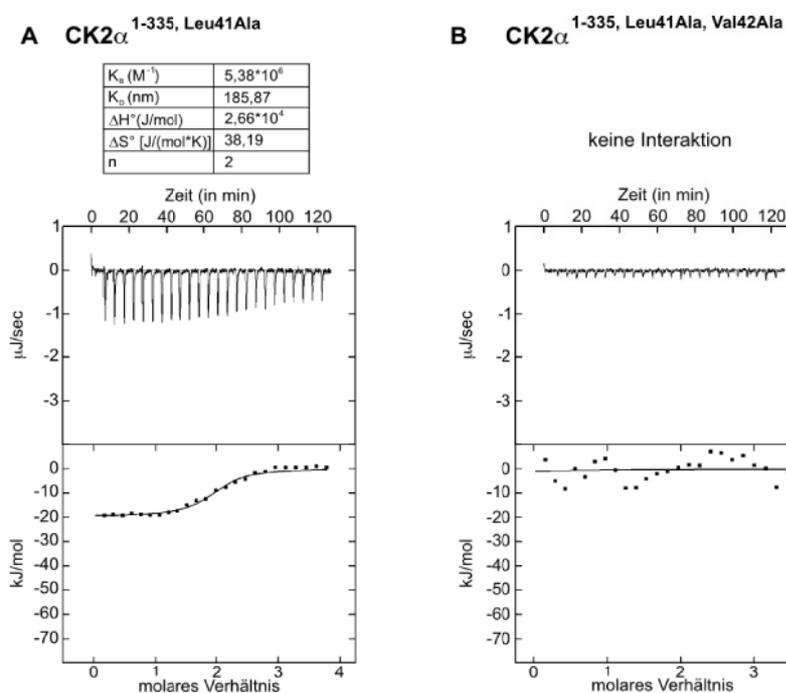


Abbildung 5.16: ITC-Messungen bei 20 °C. Die oberen Hälften zeigen die Rohdaten. Jeder Peak entspricht einer Injektion. Die unteren Hälften zeigen die integrierten Peaks mit der angepassten Kurve. Es wurde jeweils gegen die *hsCK2 β ¹⁻¹⁹³*-Untereinheit titriert. **(A)** *hsCK2 α ^{1-335, Leu41Ala}* **(B)** *hsCK2 α ^{1-335, Leu41Ala, Val42Ala}*

5.4.2 Differentialrasterkalorimetrie

5.4.2.1 Stabilitätseigenschaften von verschiedenen *hsCK2*-Holoenzymvarianten und deren Untereinheiten

Um die Thermostabilität der einzelnen Varianten der Untereinheiten und des Holoenzym zu ermitteln, wurden DSC-Messungen durchgeführt. Der Entfaltungsübergang der Proteine bzw. Proteinkomplexe erfolgt dabei jeweils bei einer charakteristischen Temperatur, dem sogenannten „Übergangsmittelpunkt“ (*transition midpoint*, T_m , im Folgenden auch Entfaltungs- oder Schmelztemperatur genannt).

Dabei stellte sich heraus, dass alle Entfaltungen irreversibel sind. Da sich die Berechnungen der Standardenthalpie (ΔH°), der van't Hoff Enthalpie (ΔH°_{vH}), der Änderung Wärmekapazität ΔC_p und Bindungsaffinität auf eine reversible Entfaltung beziehen, konnten nur die Entfaltungstemperaturen sicher bestimmt werden.

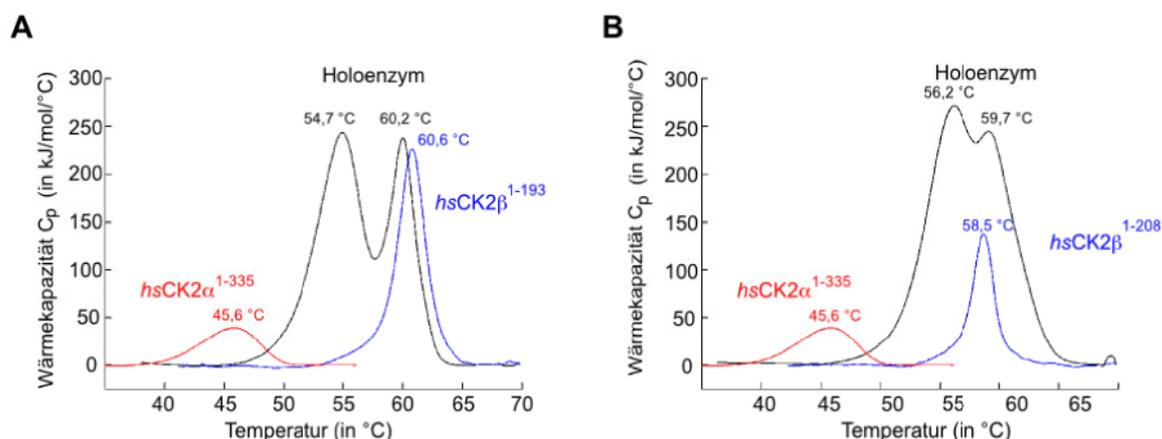


Abbildung 5.17: DSC-Messungen (A) $hsCK2\alpha^{1-335}/hsCK2\beta^{1-193}$ -Holoenzym und die entsprechenden einzelnen Untereinheiten (B) $hsCK2\alpha^{1-335}/hsCK2\beta^{1-208}$ -Holoenzym und die einzelnen Untereinheiten. Es wurden jeweils drei Messungen durchgeführt. Dargestellt ist nur eine repräsentativ für alle anderen Messungen. Die Schmelztemperaturen (T_m) sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen.

Die katalytische Untereinheit $hsCK2\alpha^{1-335}$ hat mit 45,6 °C einen deutlich niedrigeren Schmelzpunkt, als die beiden nichtkatalytischen Untereinheiten ($hsCK2\beta^{1-208}$ und $hsCK2\beta^{1-193}$). Die längere $hsCK2\beta^{1-208}$ -Untereinheit ihrerseits hat mit 58,5 °C einen niedrigeren Schmelzpunkt als das kürzere $hsCK2\beta^{1-193}$ -Konstrukt ($T_m = 60,6$ °C; Abbildung 5.17).

Bei den DSC-Messungen mit den verschiedenen Holoenzymkonstrukten (Abbildung 5.18 B) zeigen sich jeweils zwei Schmelzpunkte, wobei der höhere dem jeweiligen Dimer aus $hsCK2\beta$ -Untereinheiten zugeordnet werden kann. Die erste Schmelztemperatur hingegen gehört zur $hsCK2\alpha$ -Untereinheit. Im Holoenzym ist diese Schmelztemperatur zu höheren Temperaturen verschoben. Die $hsCK2\beta$ -Untereinheit erhöht bekanntermaßen die Thermostabilität der $hsCK2\alpha$ -Untereinheit [125]. Auffällig ist dabei jedoch, dass die längere $hsCK2\beta^{1-208}$ -Untereinheit die $hsCK2\alpha$ -Untereinheit offensichtlich besser stabilisiert, als die kürzere $hsCK2\beta^{1-193}$ -Untereinheit. Im $hsCK2\alpha^{1-335}/hsCK2\beta^{1-208}$ -Holoenzym liegt der erste T_m bei 56,2 °C und im $hsCK2\alpha^{1-335}/hsCK2\beta^{1-193}$ -Holoenzym bei 54,7 °C. Die $hsCK2\beta^{1-208}$ -Untereinheit, die dem Wildtyp ähnlicher ist, als das kürzere Konstrukt, ist allerdings alleine weniger thermostabil als das kürzere Konstrukt.

Die verschiedenen $hsCK2\alpha$ -Konstrukte haben sehr ähnliche Entfaltungstemperaturen (Abbildung 5.18 A). Das längere $hsCK2\alpha^{1-355}$ -Konstrukt hat nur eine 0,4 °C tiefere Schmelztemperatur als das Referenzkonstrukt $hsCK2\alpha^{1-335}$. Die $hsCK2\alpha/\alpha'$ -Chimäre hat eine 0,7 °C höheren Schmelzpunkt als die Referenz. Bei den entsprechenden Holoenzymvarianten zeigen sich deutlichere Unterschiede: Die $hsCK2\alpha^{1-355}$ -Untereinheit im Holoenzym hat eine Schmelztemperatur von 55,3 °C der damit 0,9 °C unter der der Referenz liegt. Der T_m der $hsCK2\beta^{1-208}$ -Untereinheit im $hsCK2\alpha^{1-355}/hsCK2\beta^{1-208}$ -Holoenzym ändert sich hingegen nur vernachlässigbar um 0,1 °C. Beim $hsCK2\alpha/\alpha'$ -Chimäre/ $hsCK2\beta^{1-208}$ -Holoenzym gibt es nur einen Schmelzpunkt bei 57,3 °C, d.h. Beide Untereinheiten entfalten sich simultan.

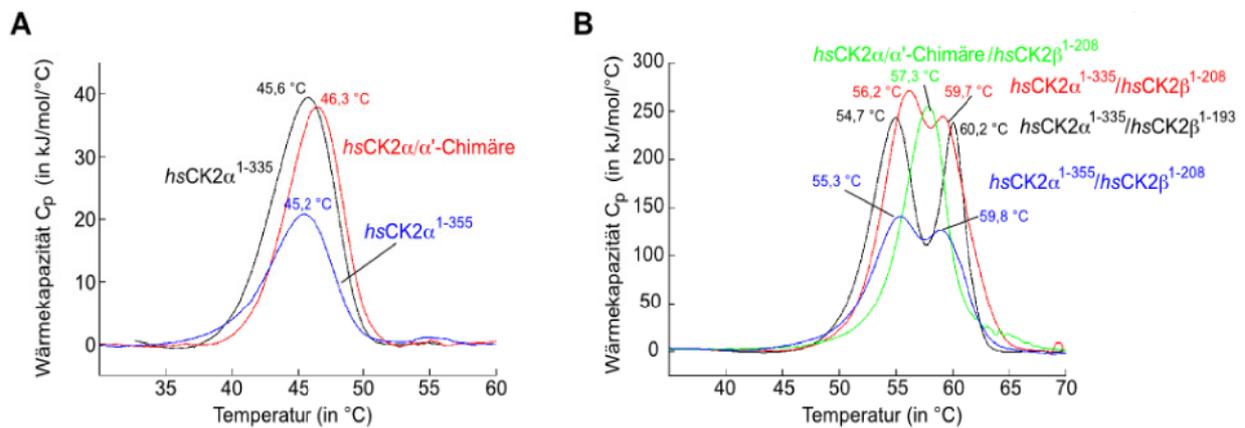


Abbildung 5.18: DSC-Messungen (A) verschiedene *hsCK2α*-Konstrukte (B) verschiedene Holoenzymkombinationen. Es wurden jeweils drei Messungen durchgeführt. Dargestellt ist nur eine repräsentativ für alle anderen Messungen. Die Schmelztemperaturen (T_m) sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen.

5.4.2.2 Stabilitätseigenschaften der *hsCK2α*¹⁻³³⁵-Punktmutanten

Die Punktmutanten *hsCK2α*^{1-335, Leu41Ala}, *hsCK2α*^{1-335, Leu41Ala, Val42Ala} und *hsCK2α*^{1-335, Ile69Ala}, die zur Charakterisierung von Schlüsselresten der CK2α/CK2β-Interaktion erstellt worden waren, wurden zusätzlich auf ihre Thermostabilität als Monomer hin überprüft. Die Interaktion mit der CK2β-Untereinheit wurde in ITC-Experimenten (Kapitel 5.4.1.2) untersucht. Der Austausch von hydrophoben Resten in der N-terminalen Domäne hatte in allen drei Fällen einen niedrigeren Schmelzpunkt zur Folge (Abbildung 5.19).

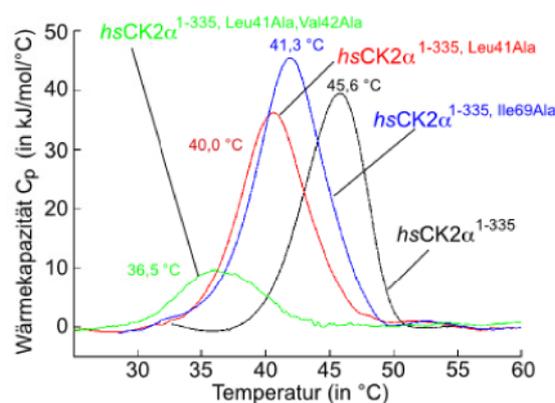


Abbildung 5.19: DSC-Messungen der *hsCK2α*-Punktmutanten *hsCK2α*^{1-335, Leu41Ala}, *hsCK2α*^{1-335, Leu41Ala, Val42Ala} und *hsCK2α*^{1-335, Ile69Ala} im Vergleich mit dem Referenzkonstrukt *hsCK2α*¹⁻³³⁵. Es wurden jeweils drei Messungen durchgeführt. Dargestellt ist nur eine repräsentativ für alle anderen Messungen. Die Schmelztemperaturen (T_m) sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen.

Der T_m von $hsCK2\alpha^{1-335, Ile69Ala}$ liegt mit $41,3\text{ }^\circ\text{C}$, $4,3\text{ }^\circ\text{C}$ unter der Schmelztemperatur von $hsCK2\alpha^{1-335}$. $hsCK2\alpha^{1-335, Leu41Ala}$ hat mit einem $40,0\text{ }^\circ\text{C}$ einen $5,6\text{ }^\circ\text{C}$ niedrigeren Schmelzpunkt als die Referenz und die Doppelmutante $hsCK2\alpha^{1-335, Leu41Ala, Val42Ala}$ sogar einen um $9,1\text{ }^\circ\text{C}$ verminderte Entfaltungstemperatur. Aus diesem Grund wurden die ITC-Experimente wie bereits erwähnt bei $20\text{ }^\circ\text{C}$ statt bei $35\text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt.

5.4.2.3 DSC zum Nachweis des Einflusses von DRB auf die CK2 α /CK2 β -Interaktion

DSC eignet sich auch dazu, den Einfluss von Liganden nachzuweisen, was im Fall von DRB ausgenutzt wurde (Abbildung 5.20). Bei den DSC-Messungen der beiden Holoenzymkonstrukte ($hsCK2\alpha^{1-335}/hsCK2\beta^{1-193}$ und $hsCK2\alpha^{1-335}/hsCK2\beta^{1-208}$) lagen $30\text{ }\mu\text{M}$ DRB und 2% Dioxan im Puffer vor. Bei vorher durchgeführten Kontrollläufen wurde gezeigt, dass 2% Dioxan die Entfaltung nicht beeinflusst. Bei beiden Holoenzymen kam es zu einer Verschiebung der Schmelztemperaturen für beide Untereinheiten.

In Anwesenheit von DRB sinken die Entfaltungstemperaturen beim $hsCK2\alpha^{1-335}/hsCK2\beta^{1-193}$ -Holoenzym auf $52,8\text{ }^\circ\text{C}$ und $59,8\text{ }^\circ\text{C}$ und beim $hsCK2\alpha^{1-335}/hsCK2\beta^{1-208}$ -Holoenzym auf $54,3\text{ }^\circ\text{C}$ und $58,7\text{ }^\circ\text{C}$. DRB hat also einen destabilisierenden Einfluss auf das Holoenzym. Messungen mit verschiedenen DRB-Konzentrationen zeigten, dass der Effekt konzentrationsunabhängig ist.

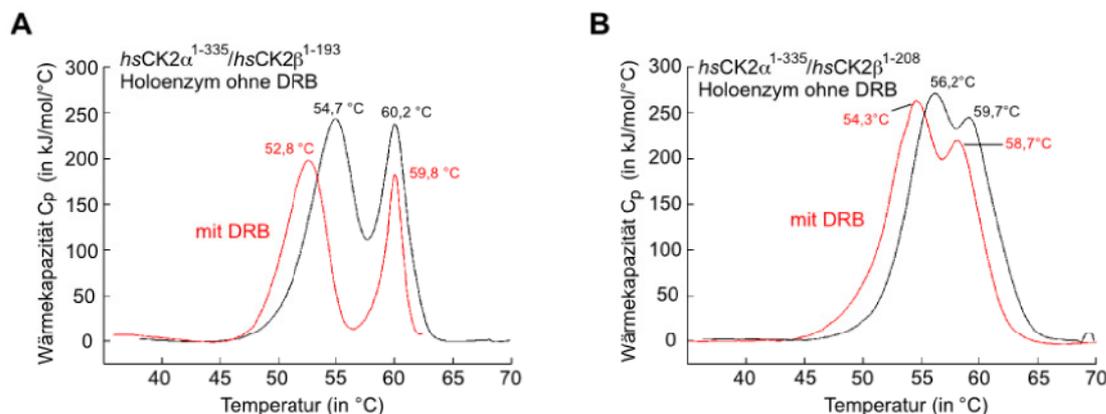


Abbildung 5.20: DSC-Messungen zum Nachweis des Einflusses von DRB (A) $hsCK2\alpha^{1-335}/hsCK2\beta^{1-193}$ -Holoenzym mit und ohne $30\text{ }\mu\text{M}$ DRB (B) $hsCK2\alpha^{1-335}/hsCK2\beta^{1-208}$ -Holoenzym mit und ohne $30\text{ }\mu\text{M}$ DRB. In beiden Fällen destabilisiert DRB das Holoenzym. Es wurden jeweils drei Messungen durchgeführt. Dargestellt ist nur eine repräsentativ für alle anderen Messungen. Die Schmelztemperaturen (T_m) sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen.

5.5 Enzymkinetische Messungen

5.5.1 Kinetische Parameter der CK2 α - und CK2-Holoenzym-Varianten

Die kinetischen Kenngrößen der CK2 α - und CK2-Holoenzym-Varianten wurden mit dem in Kapitel 5.5.1 beschriebenen gekoppelten Aktivitätstest ermittelt und sind in Tabelle 5.4 aufgelistet. Bei den *hsCK2 α* -Varianten, die sich in der Länge und Sequenz ihrer C-Termini unterscheiden und den entsprechenden Holoenzymen, spalten sich die K_M -Werte in zwei Gruppen auf, nämlich in die Gruppe der *hsCK2 α* -Untereinheiten und die Gruppe der Holoenzyme (Abbildung 5.21). Die K_M -Werte der Holoenzyme (5,73 μ M-6,67 μ M) sind generell kleiner als die für die humane katalytische Untereinheit alleine (9,95 μ M-12,26 μ M).

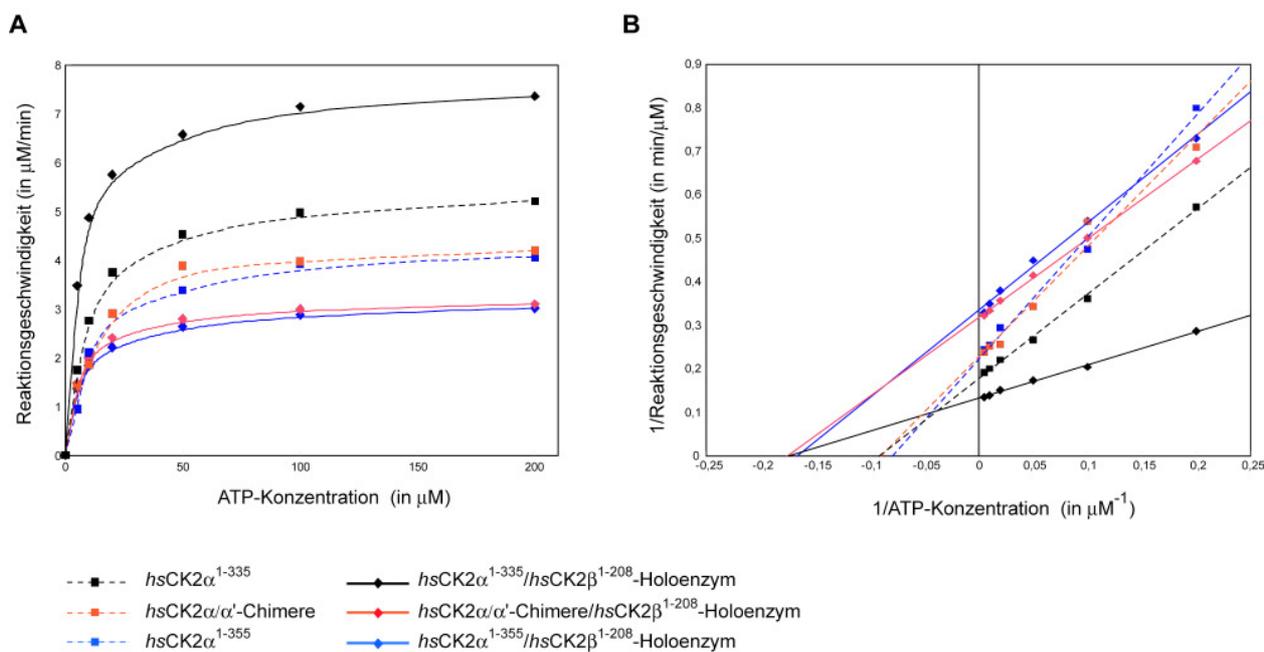


Abbildung 5.21: (A) Michaelis-Menten-Auftragung der enzymkinetischen Messungen von verschiedenen CK2 α und CK2-Holoenzym-Varianten. (B) Lineweaver-Burk-Auftragung zur Ermittlung der kinetischen Parameter K_M und V_{max} .

K_M (18,82 μ M) und k_{kat} (5,65 min^{-1}) der katalytischen Untereinheit aus Mais sind eher vergleichbar mit den Werten, die für die *hsCK2 α* -Punktmutanten *hsCK2 α ^{1-335, Leu41Ala}* (K_M = 21,33 μ M; k_{kat} : 6,04 min^{-1}) und *hsCK2 α ^{1-335, Ile69Ala}* (K_M = 18,78 μ M; k_{kat} : 6,58 min^{-1}) ermittelt wurden (Abbildung 5.22). Die Doppelmutante *hsCK2 α ^{1-335, Leu41Ala, Val42Ala}* hingegen ist auch dann nicht aktiv, wenn man die Temperatur während des Aktivitätstest wegen ihrer Entfaltungstemperatur von 36,5 °C von 37 °C auf 22 °C reduziert.

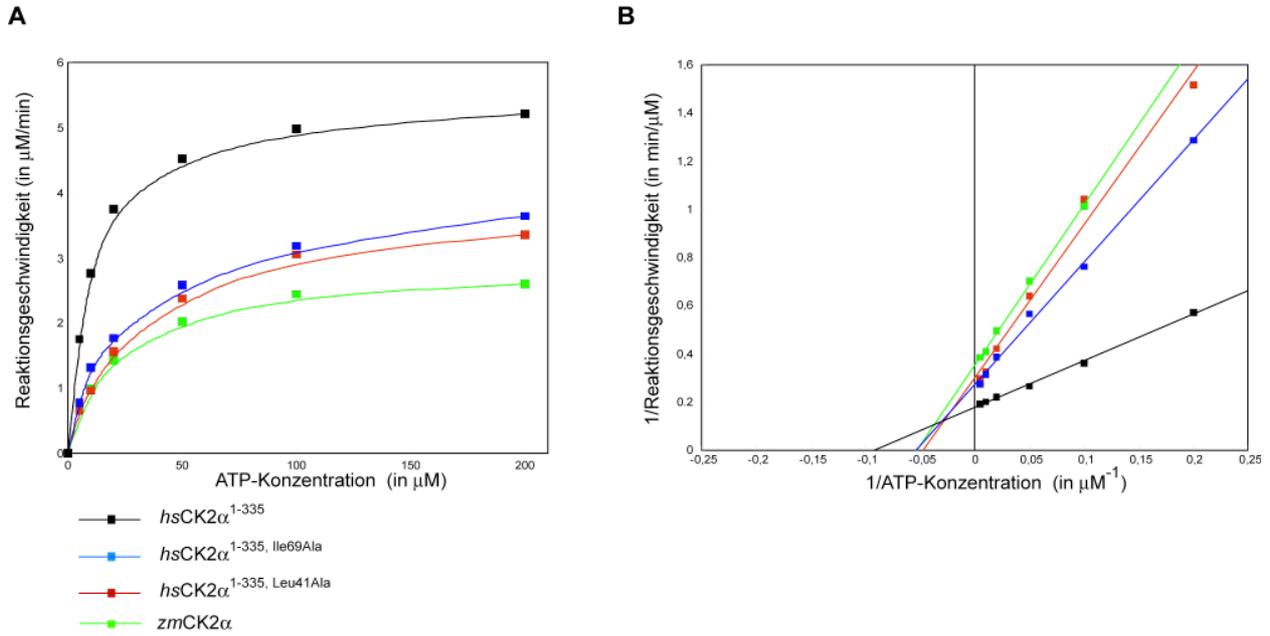


Abbildung 5.22: (A) Michaelis-Menten-Auftragung zum Vergleich der enzymkinetischen Messungen von $hsCK2\alpha^{1-335}$, den beiden Punktmutanten $hsCK2\alpha^{1-335, Leu41Ala}$ und $hsCK2\alpha^{1-335, Ile69Ala}$ und der katalytischen Untereinheit aus Mais. (B) Lineweaver-Burk-Auftragung zur Ermittlung der kinetischen Parameter K_M und V_{max} .

Tabelle 5.4: Kinetische Kenngrößen der einzelnen Enzymvarianten. Bei der Berechnung von k_{kat} der Holoenzyme wurde berücksichtigt, dass pro Holoenzym, zwei katalytische Untereinheiten vorliegen.

	$hsCK2\alpha^{1-335}$	$hsCK2\alpha^{1-355}$	$hsCK2\alpha/\alpha'$
V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	6,62	4,55	4,35
K_M (μM)	10,9	12,73	11
k_{kat} (min^{-1})	12,47	8,97	8,63
k_{kat}/K_m ($\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	1,14	0,7	0,78

	$hsCK2\alpha^{1-335, Leu41Ala}$	$hsCK2\alpha^{1-335, Ile69Ala}$	$zmCK2\alpha$
V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	3,33	3,7	2,82
K_M (μM)	21,33	18,78	18,82
k_{kat} (min^{-1})	6,04	6,58	5,65
k_{kat}/K_m ($\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	0,28	0,35	0,3

	$hsCK2\alpha^{1-335}/hsCK2\beta^{1-208}$	$hsCK2\alpha^{1-355}/hsCK2\beta^{1-208}$	$hsCK2\alpha/\alpha'/hsCK2\beta^{1-208}$
V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	7,49	3,03	3,13
K_M (μM)	5,72	6,09	5,66
k_{kat} (min^{-1})	56,53	22,87	23,62
k_{kat}/K_m ($\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	9,88	3,75	4,17

5.5.2 Inhibitionskinetik mit DRB

Zur Aufklärung des Inhibitionsmechanismus von DRB hinsichtlich der katalytischen Untereinheit und des CK2-Holoenzym wurde eine Inhibitionskinetik mit variierenden DRB-Konzentrationen aufgenommen.

Die s/v -Auftragung nach Cornish-Bowden [126] liefert im Falle einer kompetitiven Inhibition parallele Geraden. Dies ist für das *hsCK2*-Holoenzym und näherungsweise auch für die katalytische Untereinheit aus Mais der Fall. Bei *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* liegt jedoch keine reine ATP-kompetitive Hemmung vor, sondern ein gemischter Inhibitionsmechanismus Abbildung 5.23. Die kinetischen Parameter der Messungen sind in Tabelle 5.5 aufgelistet.

Tabelle 5.5: Ergebnisse der Inhibitionskinetik mit DRB

DRB-Konzentration (in μM)	<i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i>		<i>hsCK2α¹⁻³³⁵/<i>hsCK2β¹⁻²⁰⁸</i></i>		<i>zmCK2α</i>	
	K_M bzw. K_M^{app} (in μM)	V_{max} bzw. $V_{\text{max}}^{\text{app}}$ (in $\mu\text{M}/\text{min}$)	K_M bzw. K_M^{app} (in μM)	V_{max} bzw. $V_{\text{max}}^{\text{app}}$ (in $\mu\text{M}/\text{min}$)	K_M bzw. K_M^{app} (in μM)	V_{max} bzw. $V_{\text{max}}^{\text{app}}$ (in $\mu\text{M}/\text{min}$)
0	10,90	6,62	5,72	7,49	18,82	2,82
50	14,15	4,93	15,60	7,03	42,19	2,76
100	12,15	4,14	25,41	7,19	46,31	2,32

K_{ic} [μM]	„29,2“	29,2	37,25
K_{iu} [μM]	39,7		

Um die nichtkompetitive Konstante (K_{iu}) zu berechnen, wurde die Gleichung für eine partiell nicht kompetitive Inhibition verwendet:

$$V = \frac{(V_1 + \frac{V_2[I]}{K_{iu}})[S]}{K_M(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}) + (1 + \frac{[I]}{K_{iu}})[S]} \quad \text{[Gleichung 29]}$$

Bildet man den Kehrwert, so erhält man folgende Geradengleichung:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right)}{V_1 + \frac{V_2[I]}{K_{iu}}} \frac{1}{[S]} + \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)}{V_1 + \frac{V_2[I]}{K_{iu}}} \quad \text{[Gleichung 30]}$$

mit der Form:

$$y = mx + n \quad \text{[Gleichung 31]}$$

Die Steigung m und der y -Achsenabschnitt n können aus der Geradengleichung der Lineweaver-Burk-Auftragung bestimmt werden. K_{ic} wurde mit der Gleichung für die kompetitive Hemmung für das *hsCK2*-Holoenzym bestimmt (29,2 μM).

Für die Steigung m gilt:

$$m = \frac{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_{Ic}}\right)}{V_1 + \frac{V_2 [I]}{K_{Iu}}} = \frac{y}{x} = \frac{\frac{1}{V}}{\frac{1}{[S]}} = \frac{[S]}{V} \quad \text{[Gleichung 32]}$$

In dieser Gleichung gibt es zwei Unbekannte: V_2 und K_{Iu} . V_1 entspricht $k_2^*[E_0]$ und damit V_{\max} .

Löst man die Gleichung nach $\frac{V_2 [I]}{K_{Iu}}$ auf, erhält man:

$$\frac{V_2 [I]}{K_{Iu}} = \frac{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_{Ic}}\right)}{m} - V_1 \quad \text{[Gleichung 33]}$$

Den Wert für $\frac{V_2 [I]}{K_{Iu}}$ kann man nun in Gleichung 34 einsetzen und K_{Iu} bestimmen.

$$n = \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_{Ic}}\right)}{V_1 + \frac{V_2 [I]}{K_{Iu}}} \quad \text{[Gleichung 34]}$$

Auf diese Weise wurde ein K_{Iu} -Wert von 39,7 μM berechnet.

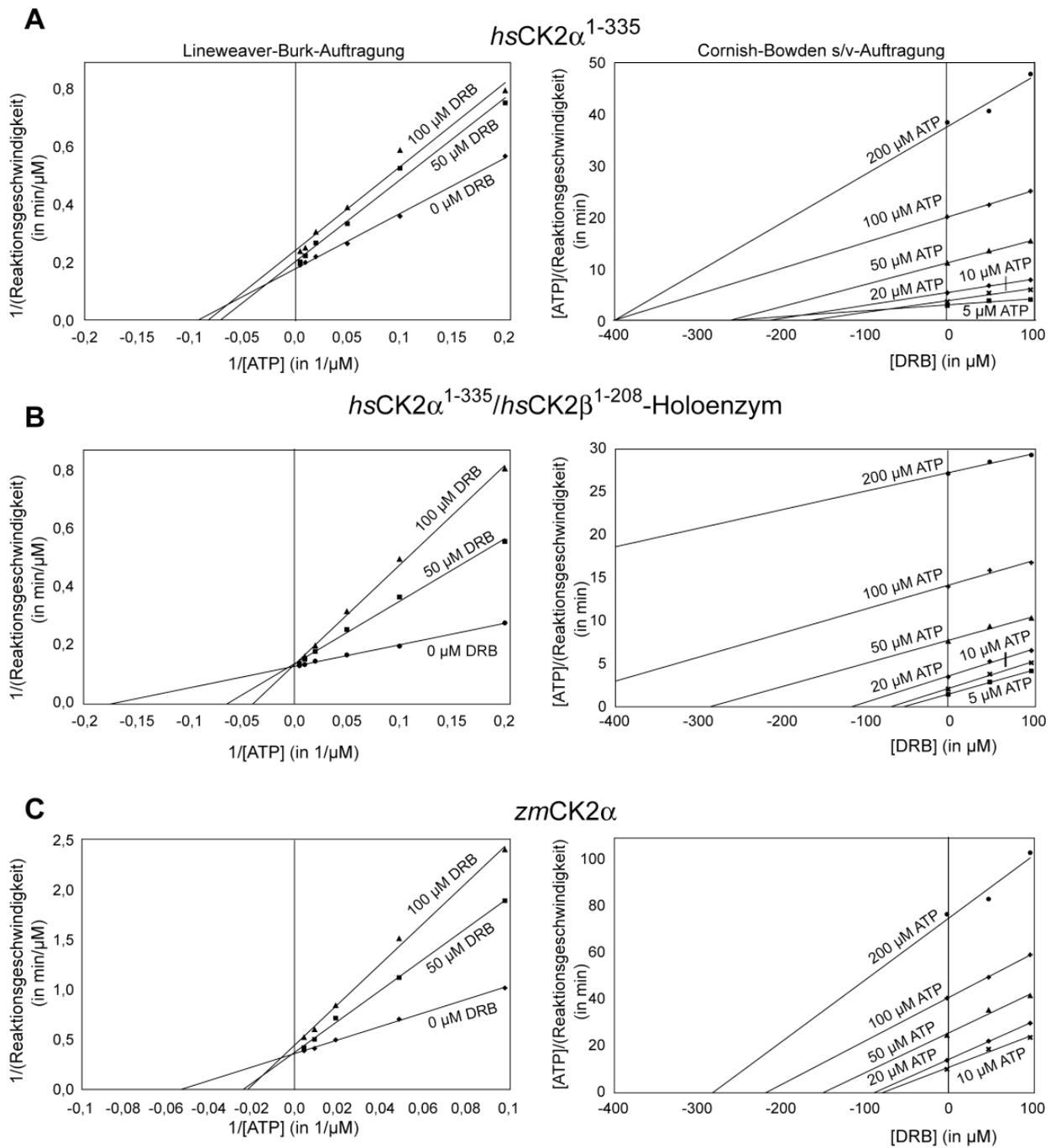


Abbildung 5.23: Inhibitionskinetik mit *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* (A), *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/hsCK2 β ¹⁻²⁰⁸*-Holoenzym (B), *zmCK2 α* (C). Linke Seite: Lineweaver-Burk-Auftragungen, rechte Seite s/v-Auftragung nach Cornish-Bowden [126]. Im Falle einer kompetitiven Inhibition zeigt die s/v-Auftragung parallele Geraden.

6. Diskussion

6.1 Der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*/Emodin-Komplex

Strukturelle Studien mit CK2 α und verschiedenen Inhibitoren wurden bis jetzt immer mit der katalytischen Untereinheit aus Mais durchgeführt, die bessere Stabilitätseigenschaften als humane Wildtyp-CK2 α hat. Die Annahme war dabei, dass die humane und die Mais-CK2 α nur geringe Unterschiede in der ATP-Bindungsstelle aufweisen, da die Sequenzidentität mehr als 77% beträgt [116]. Um diese Annahme zu überprüfen wurde ein Komplex aus *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* und Emodin kristallisiert und die Struktur mit dem äquivalenten Komplex mit der CK2 α -Untereinheit aus Mais (PDB-Datei 1F0Q [87]) und dem *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*/AMPPNP-Komplex (PDB-Datei 2PVR [56]) verglichen. Bei der Co-Kristallisation von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* wurden bei zwei verschiedenen Bedingungen gut streuende Kristalle erhalten, eine der Bedingungen war basisch (pH 8,66; PDB-Datei 3C13 [118]), die andere war sauer (pH 6,59; PDB-Datei 3BQC [118]).

Die rote Färbung der Kristalle bei der basischen Bedingung wies auf eine Deprotonierung hin. Mit seiner flachen, farbstoffähnlichen Struktur hat Emodin die strukturellen Eigenschaften eines unspezifischen Kinaseinhibitors [41]. Die relativ geringe Spezifität äußert sich auch dadurch, dass Emodin CK2-unabhängige Effekte auf den Phosphoinosid 3-Kinase/AKT-Signalweg hat [127]. Strukturell gibt es zwischen beiden Strukturen keine signifikanten Unterschiede, was mit der Beobachtung im Einklang steht, dass die Affinität von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* gegenüber Emodin pH-unabhängig ist [114]. Im Folgenden wird nur auf die besser aufgelöste Struktur, die aus dem Kristall der basischen Bedingung resultiert, eingegangen.

Die Kristalle der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*/AMPPNP-Struktur (PDB-Datei 2PVR [56]) und des *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*/Emodin-Komplexes haben die gleiche Raumgruppe (P2₁), Konformationsunterschiede sollten daher auf die verschiedenen Liganden zurückzuführen sein und nicht auf die Kristallpackung. Bei dem Vergleich der beiden Strukturen ergaben sich die größten lokalen Veränderungen der Konformation im Bereich der Gelenkregion (*Hinge*-Region), die eine geschlossenen Konformation einnimmt. Asn118 und seine Umgebung bewegen sich zu Emodin hin und besetzen die „hydrophobe Region II“ der ATP-Bindungsstelle [39] (Abbildung 6.1). Diese geschlossene Konformation wird nicht bei der katalytischen Untereinheit aus Mais beobachtet, während die *Hinge*-Region der menschlichen CK2 α -Untereinheit sowohl eine offene als auch eine geschlossenen Form annehmen kann (Abbildung 6.3). Auf die Plastizität der humanen CK2 α -Gelenkregion wird zusammenfassend auch in Kapitel 6.4 eingegangen.

Die *Hinge*-Region ist allerdings nicht der einzige Bereich in dem sich die menschliche und CK2 α -Untereinheit aus Mais unterscheiden. Weitaus größere Unterschiede treten in der glycinreichen Schleife auf. Im *zmCK2 α /Emodin-Komplex*, der von Battistutta *et al.* [87] aufgeklärt wurde, bewegen sich einige Reste dieser Schleife (Arg47, Gly48 und Lys49) in die ATP-Bindungstasche. Gleichzeitig dreht sich His160 und bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Carbonylsauerstoff von Arg47 und verschließt so den Zugang zu ATP-Bindungsstelle. Diesem Rearrangement wurde eine wichtige Rolle bei der Bindung von Emodin zugeschrieben [87]. Eine solche Konformation wird allerdings nicht in dem *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/Emodin-Komplex* beobachtet und dennoch ist Emodin fest an das Enzym gebunden und die umgebende Elektronendichte ist sehr gut definiert. Beide CK2 α -Homologe führen Konformationsänderungen durch, um den Platz in der ATP-Bindungsstelle einzuschränken und so Emodin zu fixieren. Bei der katalytischen Untereinheit aus Mais wird der Raum durch die glycinreiche Schleife eingeschränkt, während dies in der humanen CK2 α durch die *Hinge*-Region auf der gegenüberliegenden Seite der ATP-Bindungstasche bewerkstelligt wird.

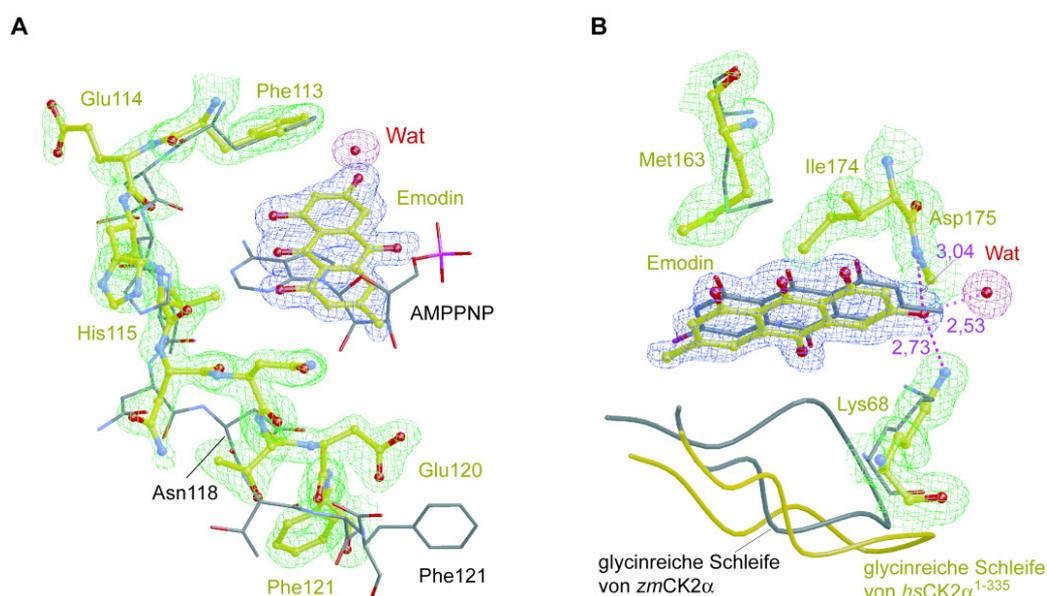


Abbildung 6.1: (A) Strukturelle Anpassungen von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* bei der Bindung von Emodin. Der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/Emodin-Komplex* (gelbe Kohlenstoffatome) wurde mit dem *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/AMPPNP/Sulfat-Komplex* (PDB-Datei 2PVR [56], graue Kohlenstoffatome) überlagert. Die 2F_o-F_c-Elektronendichte der dargestellten Bereiche des *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/Emodin-Komplexes* ist entweder grün (Protein), rot (Wassermolekül) oder blau (Emodin) und wurde mit einem Konturlevel von 1,0 σ dargestellt. Die Elektronendichte um Glu114 ist schwächer, da die Seitenkette in zwei alternativen Konformationen vorkommt (nur eine wird in der Abbildung gezeigt). (B) Unterschiedliche Orientierung und Bindungsweise von Emodin bei *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* (gelb) und *zmCK2 α* (grau). Die 2F_o-F_c-Elektronendichte einiger Bereiche des *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/Emodin-Komplexes* wurde mit einem Konturlevel von 1,0 σ dargestellt, die Farben sind wie in (A) gewählt. Violette gestrichelte Linien stehen für Wasserstoffbrückenbindungen. Abstände sind in Å angegeben.

Die Unterschiede der Emodin-Komplexe von menschlicher und Mais-CK2 α sind nicht nur auf das Proteingerüst im Bereich des aktiven Zentrums beschränkt, sondern betreffen auch die Orientierung

des Inhibitors. Emodin hat eine pseudo-zweifache Symmetrieachse (Abbildung 6.2), jede Hälfte hat dabei unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich Hydrophobizität und der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Dies betrifft im einzelnen nur die Methylgruppe in der Position 6 des Anthrachinongerüsts und die Hydroxygruppe in Position 3. Es gibt also zwei verschiedene Möglichkeiten, Emodin in eine passende Elektronendichte zu legen und nur das Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen lässt eine eindeutige Unterscheidung zu.

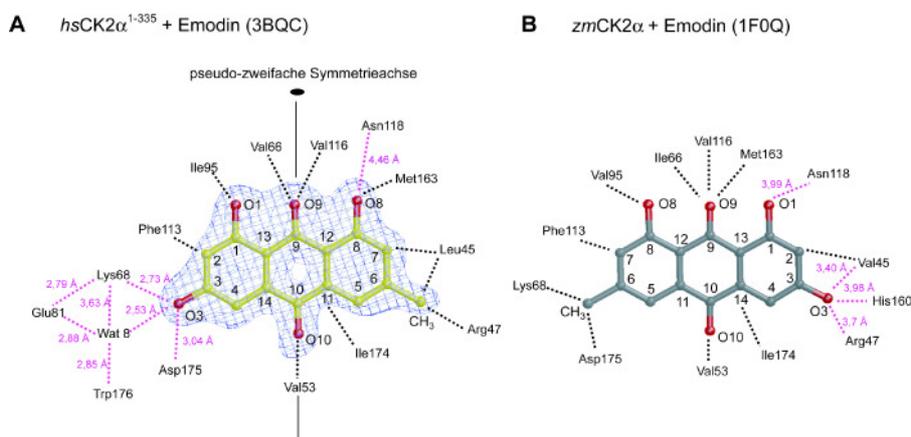


Abbildung 6.2: Wechselwirkungen von Emodin und menschlicher CK2 α (A) und CK2 α aus Mais (B). Die Elektronendichte um das Emodinmolekül aus dem Komplex mit *hsCK2α*¹⁻³³⁵ wurde mit einem Konturlevel von 1,0 σ dargestellt. Violette gestrichelte Linien stehen für Wasserstoffbrückenbindungen, schwarze gestrichelte Linien stehen für van der Waals-Interaktionen. Abstände sind in Å angegeben. Beim *hsCK2α*¹⁻³³⁵/Emodin-Komplex spielen im Gegensatz zum Komplex mit Mais-CK2 α hauptsächlich Wasserstoffbrückenbindungen bei der Interaktion mit dem Inhibitor eine Rolle.

Beim *hsCK2α*¹⁻³³⁵/Emodin-Komplex hat das Atom, das am weitesten in die ATP-Bindungsstelle hineinragt, einen Abstand zur terminalen Aminogruppe von Asp175 und einem Wassermolekül (Wat8, zentrales Wassermolekül, in Abbildung 6.1), der im Bereich von Wasserstoffbrückenbindungen liegt (2,4–5 Å). Aus diesem Grund wurde die Orientierung von Emodin so gewählt, dass das O3-Atom der 3-Hydroxygruppe diese Position einnimmt. In dieser Orientierung machen auch die anderen Kontakte zwischen Ligand und Kinase Sinn. Auch die Tatsache, dass die Elektronendichte bei der 3-Hydroxygruppe größer ist, als bei der 6-Methylgruppe spricht für die richtige Orientierung.

Bei der Struktur von *zmCK2α* positionierten Battistutta *et al.* [87] Emodin in umgekehrter Orientierung in die Elektronendichte. Die 6-Methylgruppe weist in das Innere des Proteins, während die 3-Hydroxygruppe zum Lösungsmittel gerichtet ist. Es gibt zwei Hinweise dafür, dass diese Orientierung beim Maishomolog richtig ist: Zum Einen gibt es kein zu Wat8 vergleichbares Wassermolekül im Inneren der ATP-Bindungsstelle und die Region wird dadurch hydrophober. Zum Anderen liegt der Rest Lys68 in einem anderen Seitenkettenrotamer vor, das von dem Liganden wegweist. Da das Wassermolekül fehlt, kann Emodin entsprechend tiefer in die Bindungstasche der *zmCK2α*-Untereinheit eindringen als bei dem menschlichen Homolog.

Die unterschiedlichen Orientierungen der Emodinmoleküle und die Abwesenheit des zentralen Wassermoleküls kann auch auf verschiedene Vorgehensweisen bei der Kristallisation zurückzuführen sein: Bei der *zmCK2α*/Emodin-Komplex-Struktur wurde ein Kristall von *zmCK2α* mit Emodin getränkt (*Soaking-Methode*), beim *hsCK2α*¹⁻³³⁵/Emodin-Komplex wurde die Co-Kristallisationstechnik angewendet.

Des Weiteren hat der *zmCK2α*/Emodin-Komplex eine relativ geringe Auflösung (2,63 Å gegenüber 1,5 Å in dieser Arbeit), was die Erkennung der Wassersubstruktur und die Verfeinerung erschwert. Die Elektronendichten des Komplexes mit Mais konnten nicht überprüft werden, da bei dem PDB-Eintrag 1F0Q [87] keine Strukturfaktoramplituden hinterlegt wurden. Auch eine spätere Veröffentlichung legt nahe, dass das Fehlen des zentralen Wassermoleküls ein technisches Artefakt ist, da es bei den Komplexstrukturen mit anderen Anthrachinonderivaten {1,8-Dihydroxy-4-nitro-Anthrachinon (MNA) und 1,8-Dihydroxy-4-nitroxanthen-9-on (MNX) [114]} vorhanden war. In der bereits in einer vergleichenden Studie [128] wurde gezeigt, dass dieses Wassermolekül konserviert ist und bei der Bindung von Liganden eine Rolle spielt.

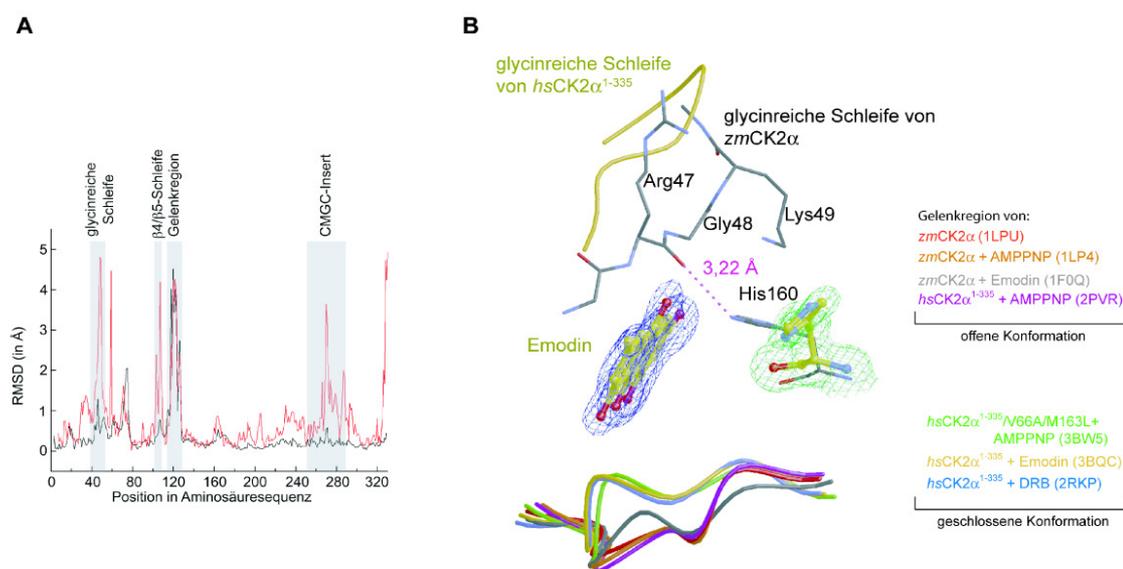


Abbildung 6.3: Strukturelle Plastizität von CK2α in der ATP-Bindungstasche. (A) RMSD der Hauptketten nach Überlagerung der Moleküle, erstellt mit BRAGI [4]. Schwarze Kurve: *hsCK2α*¹⁻³³⁵/Emodin-Komplex im Vergleich mit dem *hsCK2α*¹⁻³³⁵/AMPPNP/Sulfat-Komplex (PDB-Datei 2PVR [56]), rote Kurve: Vergleich von *hsCK2α*¹⁻³³⁵/Emodin-Komplex und *zmCK2α*/Emodin-Komplex (PDB-Datei 1F0Q [87]). Besonders im Bereich der glycinreichen Schleife und der Gelenkregion gibt es Abweichungen. Unterschiede im Bereich der β4/β5-Schleife und des CMGC-Insertion sind in diesem Kontext nicht wichtig (werden aber in Kapitel 6.4 näher erläutert). (B) Hauptunterschiede der Bindung von Emodin an *hsCK2α*¹⁻³³⁵ (gelb) und *zmCK2α* (grau). Bei den Konformationen der *Hinge*-Regionen verschiedener CK2α-Strukturen (PDB-Dateien 1LPU [122], 1LP4 [122], 1F0Q [87], 2PVR [56], 3BW5 [122], [119], 2RKP [119] siehe Kapitel 6.2.1) gibt es eine Aufspaltung in zwei Gruppen: Die 2F_o-F_c-Elektronendichte ausgewählter Bereiche des *hsCK2α*¹⁻³³⁵/Emodin-Komplexes wurde mit einem Konturlevel von 1,0 σ dargestellt. Violette gestrichelte Linien stehen für Wasserstoffbrückenbindungen. Abstände sind in Å angegeben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass humane CK2 α und CK2 α aus Mais trotz ihrer hohen Identität in der ATP-Bindungsstasche bei der Bindung des gleichen Liganden unterschiedliche lokale Konformationsänderungen durchmachen. Bei der Struktur mit Mais-CK2 α wird die Bindung von Emodin durch die glycinreiche Schleife vermittelt. Bei der humanen Struktur spielt vor allem die *Hinge*-Region bei der Bindung des Liganden eine Rolle und es sind deutlich mehr Wasserstoffbrücken involviert (Abbildung 6.2). Die Verwendung von *zm*CK2 α bei strukturellen Studien mit Inhibitoren ist demnach fraglich, da die lokalen Konformationsunterschiede bei *hs*CK2 α Auswirkungen auf die Selektivität der Inhibitoren haben.

6.2 Der *hs*CK2 α ¹⁻³³⁵/DRB-Komplex

6.2.1 DRB hat einen dualen Bindungsmodus

Bei der *hs*CK2 α ¹⁻³³⁵/DRB-Komplexstruktur (PDB-Datei 2RKP [119]) waren überraschenderweise zwei DRB-Moleküle an *hs*CK2 α ¹⁻³³⁵ gebunden. Eines (DRB1) besetzt die kanonische ATP-Bindungsstelle und das zweite (DRB2) befindet sich in einer hydrophoben Tasche an der Oberfläche der N-terminalen Domäne (Abbildung 6.4). Dieser Bereich bildet im CK2-Holoenzym die Kontaktfläche zu CK2 β . Der duale Bindungsmodus von DRB konnte sowohl mit einer F_o-F_c-OMIT-Elektronendichte, als auch mit einer anomalen Fourierdichte bestätigt werden.

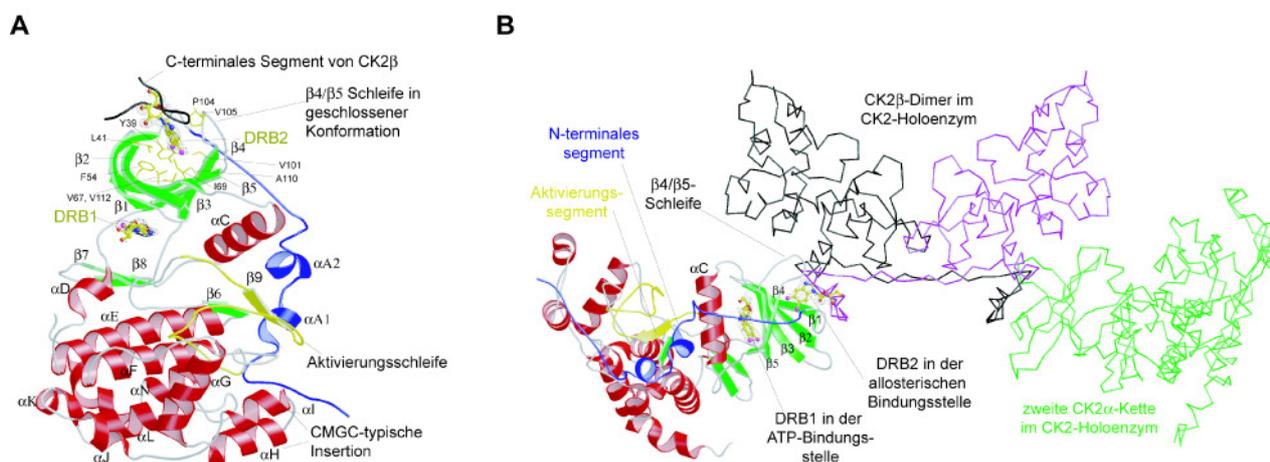


Abbildung 6.4: Dualer Bindungsmodus von DRB. (A) *hs*CK2 α ¹⁻³³⁵-Monomer mit den beiden DRB-Molekülen, die von einer F_o-F_c-OMIT-Elektronendichte umgeben sind (Konturlevel 3,0 σ). DRB1 befindet sich in der kanonischen ATP-Bindungsstelle, DRB2 ist in der CK2 α /CK2 β -Interaktionsfläche lokalisiert. (B) *hs*CK2 α ¹⁻³³⁵/DRB-Komplex, wie er im CK2-Holoenzym anzuordnen wäre. Dafür wurde der Komplex und das CK2-Holoenzym (PDB-Datei 1JWH, [56]) überlagert und der *hs*CK2 α ¹⁻³³⁵/DRB-Komplex anstelle der ersten CK2 α -Kette dargestellt.

Die Benzimidazolgruppe von DRB1 besetzt in der ATP-Bindungsstelle entsprechend der Nomenklatur des „Pharmakophormodells“ nach Traxler und Furet [39] die „Adenin-Region“ und ist mit den Chlorsubstituenten zur Gelenkregion ausgerichtet (Abbildung 6.5). Die „hydrophobe Region I“, die bei CK2 α durch einen großen *Gatekeeper*-Rest sehr eng ist, wird von zwei Wassermolekülen

und einem Chlorid-Ion besetzt. Der gleiche Mechanismus wie in der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/Emodin*-Struktur sorgt für eine Einschränkung des Platzes im aktiven Zentrum: die „hydrophobe Region II“ wird von Teilen der *Hinge*-Region gefüllt. Auf die Plastizität der *Hinge*-Region in der humanen *CK2 α* wird näher in Kapitel 6.4 eingegangen.

Bei DRB2 ist die Elektronendichte der Ribosegruppe weitaus schlechter definiert als bei DRB1, während die Benzimidazolgruppe deutlich sichtbar in der hydrophoben Tasche steckt (Abbildung 6.6) Die Ribosegruppe liegt an der Oberfläche des Komplexes und ist wahrscheinlich flexibler als der in der Tasche fixierte Teil des Inhibitors. Dennoch könnte die Ribosegruppe wichtig für die Bindung von DRB sein, indem sie als „hydrophiler Deckel“ an der Oberfläche des Proteins dem Lösungsmittel exponiert ist. Die Tasche wird von verschiedenen hydrophoben Resten des N-terminalen β -Faltblatts und der β 4/ β 5-Schleife gebildet. Die β 4/ β 5-Schleife liegt in einer geschlossenen Konformation vor. Bei der Bindung von *CK2 β* im *CK2*-Holoenzym öffnet sich die Schleife. DRB könnte also durch die Blockierung der *CK2 α /CK2 β* -Interaktionsfläche und der Fixierung der β 4/ β 5-Schleife im geschlossenen Zustand ein Antagonist der Wechselwirkung sein.

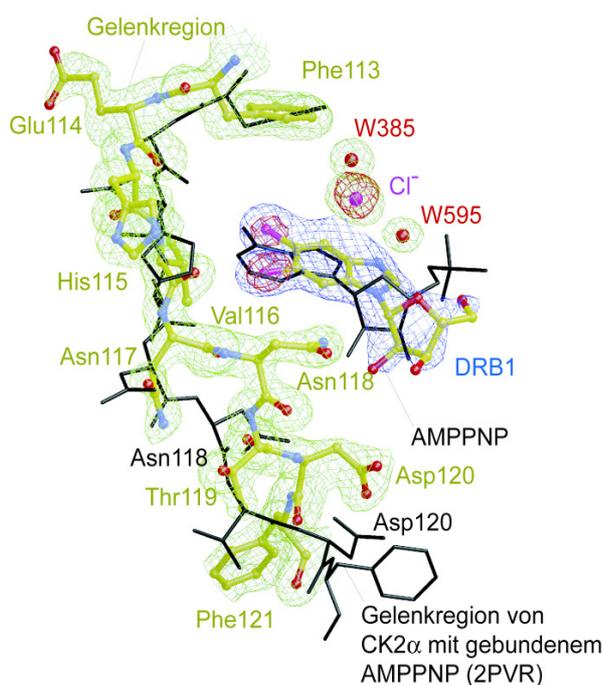


Abbildung 6.5: Bindung von DRB1 in der ATP-Bindungsstelle. Der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/DRB*-Komplex ist von einer $2F_o-F_c$ -Elektronendichte mit einem Konturlevel von $1,0 \sigma$ umgeben. Diese ist entweder grün (Protein, Wassermoleküle und das Chlorid-Ion) oder blau (DRB), dargestellt. Der entsprechende Bereich aus der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/AMPPNP*-Komplexstruktur (PDB-Datei 2PVR [56]) ist in schwarz gezeichnet. Die roten Gitter entsprechen der anomalen Fourierdichte (Konturlevel $6,0 \sigma$).

Gelfiltrationsexperimente in Anwesenheit beider *CK2*-Untereinheiten in DRB-haltigem Puffer ($100 \mu\text{M}$) zeigten jedoch, dass sich das Holoenzym trotzdem bildet. Um dennoch einen subtilen destabilisierenden Effekt von DRB auf das *CK2*-Holoenzym nachzuweisen und um auszuschließen,

dass es sich bei dem dualen Bindungsmechanismus von DRB um ein kristallographisches Artefakt handelt, wurden DSC-Messungen mit dem Holoenzym durchgeführt (Abbildung 5.20). Normalerweise stabilisieren die CK2 β -Untereinheiten bei der Assoziation die katalytische Untereinheit, so dass die Schmelztemperatur von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* von 45,6 °C auf 54,7 °C (mit *hsCK2 β ¹⁻¹⁹³*) bzw. 56,2 °C (mit *hsCK2 β ¹⁻²⁰⁸*) steigt. In Anwesenheit von DRB sinkt der T_m der CK2 α -Untereinheit bei beiden Holoenzymvarianten um 1,9 °C. Der destabilisierende Effekt von DRB gegenüber dem Holoenzym erwies sich als konzentrationsunabhängig. Dies kann dadurch erklärt werden, dass DRB katalytisch wirkt: Es bindet an die CK2 α -Untereinheit und begünstigt die Dissoziation von CK2 β . Ohne den stabilisierenden Effekt von CK2 β denaturiert CK2 α , wenn der Schmelzpunkt überschritten wird, und setzt zuvor das gebundene DRB frei. Mit ITC-Messungen zur thermodynamischen Charakterisierung der DRB/CK2 α -Interaktion konnte kein auswertbares Signal erhalten werden, was auf die schlechte Löslichkeit von DRB und auf ausfallendes Protein zurückzuführen war.

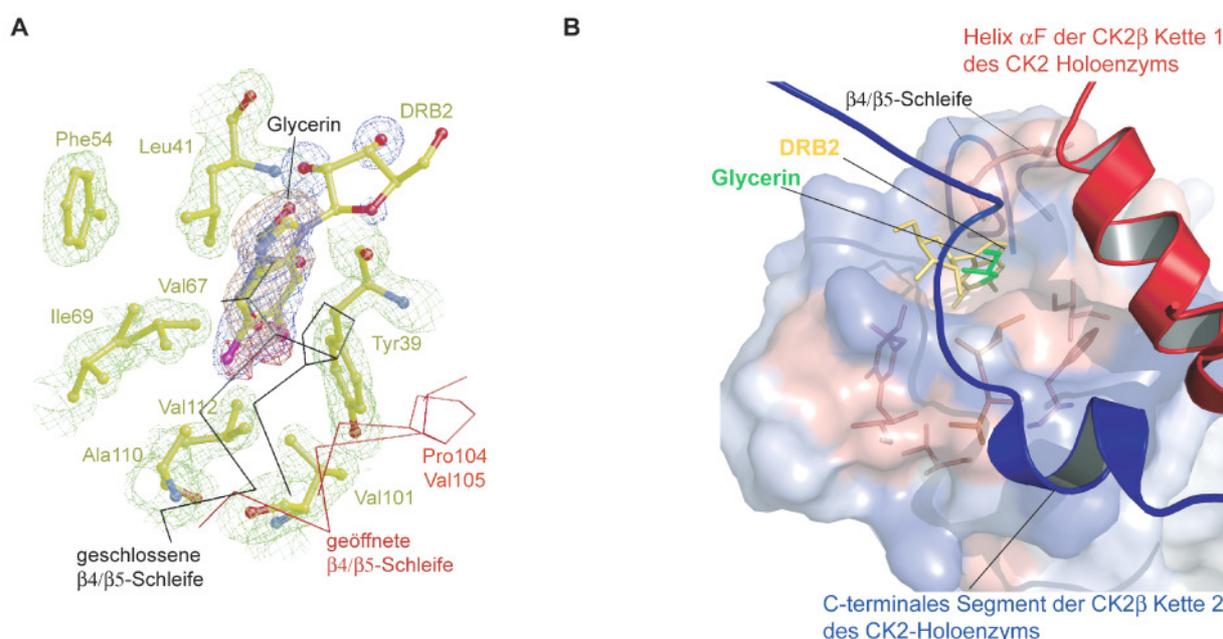


Abbildung 6.6: (A) Allosterische Bindungsstelle mit gebundenem DRB2 (blaue $2F_o-F_c$ -Elektronendichte) im *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*/DRB-Komplex oder Glycerin (orange $2F_o-F_c$ -Elektronendichte) im *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*/V66A/M163L/Glycerin-Komplex (PDB-Datei 3BW5 [122], [119]). Die umgebenden hydrophoben Seitenketten (grüne $2F_o-F_c$ -Elektronendichte) stammen aus dem Komplex mit DRB. Alle $2F_o-F_c$ -Elektronendichten wurden mit einem Konturlevel von 1,0 σ gezeichnet. Die beiden Chlorsubstituenten des DRB-Moleküls sind von anomaler Fourierdichte umgeben (rot; Konturlevel 3,5 σ). Die β 4/ β 5-Schleife (schwarze C_α -Spur) wurde zum Vergleich auch in der offenen Konformation (rote C_α -Spur), wie sie im CK2-Holoenzym vorkommt (PDB-Datei 1JWH [43]) dargestellt. (B) Hydrophobe Oberfläche im Bereich des CK2 α /CK2 β -Kontaktes. Wichtige hydrophobe Reste und Strukturelemente in diesem Bereich sind hervorgehoben. Blaue Farbe zeigt die hydrophilen, rot die hydrophoben Bereiche an.

Auch bei der Inhibitionskinetik des *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*-Monomers bzw. des *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*/*hsCK2 β ¹⁻²⁰⁸*-Holoenzym mit variierenden DRB-Konzentrationen wird deutlich, dass DRB kein reiner kompetitiver Inhibitor ist. Bei der Hemmung der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*-Untereinheit führt die Bindung von DRB an die ATP-Bindungsstelle und an die allosterische Bindungsstelle zu einer gemischten

Inhibition, die sich in der Lineweaver-Burk-Auftragung in verschiedenen Schnittpunkten mit der y-Achse (also veränderten V_{\max} -Werten) äußert. In der s/v-Auftragung nach Cornish-Bowden [126] ergeben sich bei $hsCK2\alpha^{1-335}$ entsprechend nicht-parallele Geraden (Abbildung 5.23). Demgegenüber beobachtet man beim CK2-Holoenzym eine reine kompetitive Inhibition, da die allosterische DRB-Bindungsstelle mit der CK2 β -Untereinheit besetzt ist. Zum Vergleich wurde eine Inhibitionskinetik mit CK2 α aus Mais aufgenommen, von der man aus strukturellen Studien weiß, dass die $\beta 4/\beta 5$ -Schleife auch in Abwesenheit der CK2 β -Untereinheit geöffnet sein kann. Bei $zmCK2\alpha$ wurde vorherrschend eine kompetitive Inhibition festgestellt, ein kleiner nichtkompetitiver Anteil zeigt, dass auch hier eine geringfügige Affinität für DRB in der allosterischen Bindungsstelle besteht.

Für das $hsCK2\alpha^{1-335}/hsCK2\beta^{1-208}$ -Holoenzym wurde eine kompetitive Inhibitionskonstante (K_{ic}) von 29,1 μM bestimmt. Dieser Wert wurde zur Berechnung der nichtkompetitiven Inhibitionskonstante (K_{iu}) für die katalytische Untereinheit herangezogen (siehe Kapitel 5.5.2). Der K_{iu} -Wert von 39,7 μM zeigt, dass die Affinität der allosterischen Bindungsstelle gegenüber DRB deutlich geringer ist als die Affinität der ATP-Bindungsstelle und nicht ausreicht, um die Dissoziation des Holoenzym-Komplexes zu veranlassen oder die Assoziation zu verhindern.

Ist es dennoch realistisch, auf die DRB-Bindungstasche zu setzen, um diese mit kleinen organischen Molekülen zu adressieren? Eine bioinformatische Oberflächenanalyse der $hsCK2\alpha^{1-335}$ -Untereinheit (mit dem Mark-Us-Server; <http://luna.bioc.columbia.edu/honiglab/mark-us>; der auch die sogenannte SCREEN-Methode beinhaltet [129]) zeigte, dass die DRB2-Bindungstasche durchaus die Kriterien zur Adressierung mit kleinen Molekülen besitzt (im Englischen auch „*druggability*“ genannt) [119]. Hinsichtlich der Fläche der Kavität erreichte die ATP-Bindungsstelle mit einer Fläche von 786 \AA^2 Rang 1, die allosterische Bindungsstelle von DRB erreichte Platz 3 mit 113 \AA^2 . Mit der Gewichtung auf die Kriterien, die wichtig für die Adressierbarkeit mit kleinen Molekülen sind (mittlere und maximale Tiefe) erreichte die DRB2-Bindungsstelle sogar Platz 2, direkt hinter der ATP-Bindungsstelle. Die allosterische Bindungstasche erreichte unter den 16 Kavitäten, der Oberfläche von $hsCK2\alpha^{1-335}$ mit einem Wert von 0,14 den dritthöchsten „*druggability index*“. Dieser Wert ist zwar im Hinblick auf die ATP-Bindungsstelle (0,90) klein ist, aber im allgemeinen Vergleich mit einer Studie, bei der insgesamt 1286 Vertiefungen von 99 Proteinen untersucht wurden [129] unter den 100 besten liegt.

In der bereits veröffentlichten Struktur von $hsCK2\alpha^{1-335}/V66A/M163L$ [122] wurde nachträglich ein Glycerinmolekül gefunden, das in großen Teilen mit DRB überlappt. Die Tatsache, dass neben DRB auch Glycerin in der allosterischen Bindungstasche bindet, zeigt, dass wahrscheinlich verschiedene Liganden mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften an die relativ

unspezifische Tasche binden können. Es ist also wahrscheinlich, dass noch weitaus mehr kleine Moleküle in der Bindungstasche binden können. Eine Kombination der verschiedenen strukturellen Eigenschaften der unterschiedlichen Moleküle könnte letztendlich zu einem starken Antagonisten der CK2 α /CK2 β -Interaktion führen. Unter den Molekülen, die an die allosterische Bindungstasche binden, könnten auch Metabolite sein, die *in vivo* einen Beitrag zur Regulation der Proteinkinase CK2 leisten. Dieses Szenario wird in Kapitel 6.3.3 näher ausgeführt.

6.2.2 Aufklärung der Chlor- und Schwefelsubstruktur des *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/DRB-Komplexes*

Der duale Bindungsmodus von DRB war ein so unerwarteter und ungewöhnlicher Befund, dass er mit einer anomalen Fourierdichte bestätigt werden sollte. Dazu diente der in Kapitel 5.3.2.1 erwähnte Diffraktionsdatensatz. Die eingesetzte Wellenlänge von 2 Å eignet sich bei Proteinen besonders gut, weil sie in der Nähe der Absorptionskanten von den Elementen Schwefel (K-Kante bei 5.016 Å), Calcium (K-Kante bei 3.070 Å) oder Chlor (K-Kante bei 4.393 Å) liegt. Diese Elemente sind oft strukturelle Komponenten von Proteinen oder sind in Form von Ionen an Proteinmoleküle gebunden.

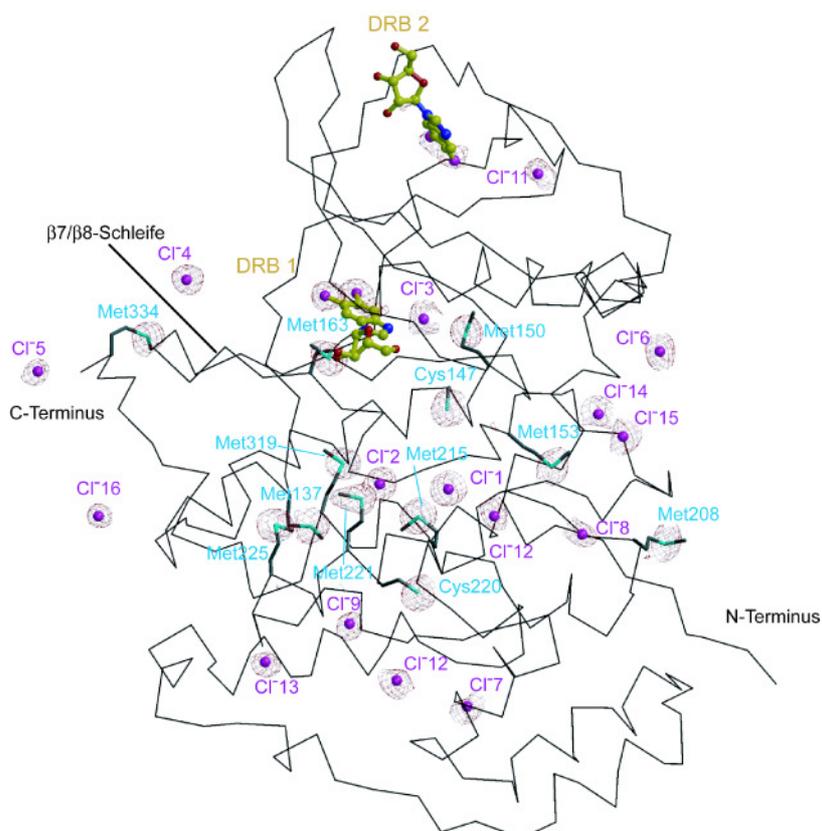


Abbildung 6.7: Substruktur der anomalen Streuer, umgeben von anomaler Differenzfourierdichte. *HsCK2 α ¹⁻³³⁵* ist als C α -Spur (grau) mit den entsprechenden Cystein- und Methioninresten dargestellt. Schwefelatome sind hellblau, Chlorid-Ionen und Chlorsubstituenten sind violett gefärbt. Der Grenzwert für die anomale Differenzfourierdichte beträgt 2,5 σ .

Im Normalfall ist es schwierig einer Elektronendichte ein bestimmtes Ion zuzuordnen. Einzelne, kugelförmige Elektronendichten werden routinemäßig als Wassermoleküle interpretiert, auch wenn sie eigentlich zu Chlorid-, Sulfat-, Phosphat- oder Metall-Ionen gehören. Ionen werden meist am Ende der Verfeinerung per Hand in die Struktur eingesetzt, dabei sind die Bestandteile der Kristallisationsbedingung, niedrige B-Faktoren und die Ladungseigenschaften der Umgebung die einzigen Hinweise. Dies führt dazu, dass viele Wassermoleküle der in der PDB hinterlegten Strukturen eigentlich Ionen sind, die oft auch eine funktionelle oder strukturelle Bedeutung haben [130].

Tatsächlich ließen sich beide DRB-Liganden auf diese Weise eindeutig bestätigen. Darüber hinaus zeigte die anomale Fourierdichte eine Reihe weiterer Details, die eine eigene Diskussion verlangen. Es konnten neben den Chlorsubstituenten der DRB-Moleküle auch die inhärenten Schwefelatome des Proteins und 16 Chlorid-Ionen gefunden werden, die teilweise an funktionell oder strukturell entscheidenden Stellen gebunden waren (Abbildung 6.7, Tabelle 6.1 [131]).

Tabelle 6.1: Peak-Liste der anomalen Fourierdichte. Die Peaks wurden entsprechend ihrer relativen Höhe geordnet. Die Nummer in Klammern hinter den Chlorid-Ionen bezeichnet die Nummerierung in der PDB-Datei 2RKP.

Rang	Relative Peakhöhe (RMSD/Mittelwert)	Korrespondierendes Atom (PDB-Nummerierung)	Funktion/Position
1	24,16	Cl ⁻ 1 (336)	strukturelles Chlorid-Ion
2	18,80	Cys220-SG	inhärentes Schwefelatom
3	18,73	Met150-SD	inhärentes Schwefelatom
4	18,59	Cys147-SG	inhärentes Schwefelatom
5	18,36	Met215-SD	inhärentes Schwefelatom
6	17,96	Met319-SD	inhärentes Schwefelatom
7	16,23	Met137-SD	inhärentes Schwefelatom
8	15,81	Met153-SD	inhärentes Schwefelatom
9	13,61	Met225-SD	inhärentes Schwefelatom
10	13,51	Met163-SD	inhärentes Schwefelatom
11	12,55	Cl ⁻ 3 (338)	ATP-Bindungsstelle
12	12,09	Cl ⁻ 2 (337)	P-2 Substratposition
13	11,52	Cl ⁻ 6 (341)	P+X Substratposition
14	10,88	Met208-SD	inhärentes Schwefelatom
15	10,62	Met221-SD	inhärentes Schwefelatom
16	10,14	Met334-SD	inhärentes Schwefelatom
17	9,94	Cl ⁻ 15 (350)	P+3 Substratposition
18	9,34	DRB 1 Cl2	Chlorsubstituent von DRB1
19	8,74	Cl ⁻ 4 (339)	-
20	8,30	Cl ⁻ 14 (349)	P+3 Substratposition
21	8,23	DRB 1 Cl1	Chlorsubstituent von DRB1
22	7,74	Cl ⁻ 8 (343)	P+1 Substratposition
23	7,58	Cl ⁻ 11 (346)	-
24	7,20	Cl ⁻ 9 (344)	-
25	7,05	Cl ⁻ 12 (347)	-
26	6,89	Cl ⁻ 10 (345)	P-1 Substratposition
27	6,73	Cl ⁻ 7 (342)	-
28	6,59	Cl ⁻ 16 (351)	-
29	6,23	Cl ⁻ 13 (348)	-
30	6,05	Cl ⁻ 5 (340)	-
31	5,54	DRB 2 Cl2	Chlorsubstituent von DRB2
32	4,40	DRB 2 Cl1	Chlorsubstituent von DRB2

6.2.2.1 Die Schwefelsubstruktur des *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/DRB-Komplexes*

Das *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*-Konstrukt beinhaltet 11 Methionin- und 2 Cysteinreste. Met1 war dabei nie in einer Kristallstruktur sichtbar, obwohl der Rest des C-Terminus gut definiert war. Dies ließ darauf schließen, dass dieser Rest wahrscheinlich bei der post-translationalen Prozessierung in *E. coli* verloren geht. Dies trifft auch auf die *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/DRB-Komplexstruktur* zu, die Schwefelatome der übrigen 10 Methionine und 2 Cysteine konnten aber eindeutig mit der anomalen Fourierdichte bestimmt werden und haben allesamt relative Peakhöhen höher als 10 (Tabelle 6.1). Damit konnte die Verlässlichkeit der Methode und der mit dem 0,9 Å-Datensatz gelösten Struktur demonstriert werden.

Normalerweise sind bei allen bekannten CK2 α -Strukturen (sowohl humanen Ursprungs, als auch aus Mais) die Aminosäuren nach der Position 330 flexibel und daher nur spärlich mit Elektronendichte bedeckt. Dies ist in der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/DRB-Komplex-Struktur* nicht der Fall, sondern die Elektronendichte des C-Terminus ist gut definiert und das Schwefelatom von Met334 ist deutlich in der anomalen Differenzdichte sichtbar. Die Seitenkette von Met334 steht in direktem Kontakt zur β 7/ β 8-Schleife aus dem N-terminalen Bereich, was darauf hindeuten könnte, dass der C-Terminus des *hsCK2 α* -Wildtyps zum N-Terminus zurückfaltet, wie es z.B. für die cAMP-abhängige Kinase bekannt ist [132] (Abbildung 6.7). Der C-terminale Bereich des *hsCK2 α* -Wildtyps konnte wegen seiner Instabilität bis jetzt nicht strukturell charakterisiert werden. Auch Versuche die längere Variante *hsCK2 α ¹⁻³⁵⁵* im Rahmen dieser Arbeit zu kristallisieren, scheiterten.

6.2.2.2 Die Chlorsubstruktur des *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/DRB-Komplexes*

Die Chlorsubstituenten beider DRB-Moleküle waren in der anomalen Differenzfourierdichte sichtbar, so dass das Vorhandensein und die Orientierung der Moleküle bestätigt werden konnte. Auch hier ist das DRB1-Molekül, das in der ATP-Bindungstasche sitzt, besser definiert als das DRB2-Molekül aus der allosterischen Bindungstasche. Alle weiteren signifikanten Peaks der anomalen Fourierdichte mussten von Ionen stammen, die sich im Kristallisationsansatz (Reservoir: 1,5 M Ammoniumsulfat; 0,2 M Na-Citrat; 0,2 M Na/K-Tartrat, pH 5,6; Proteinpuffer: 500 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl, pH 8,5) befanden. Die einzig relevanten Ionen in Hinblick auf die positiven Ladungen in der Umgebung der anomalen Differenzfourierdichten waren Chlorid- und Sulfat-Ionen. Da keine der $2F_0 - F_c$ Elektronendichten eine tetraedrische Form hatte, konnten Sulfat-Ionen ausgeschlossen werden. Entsprechend wurden allen Maxima der anomalen Fourierdichte, die weder zu den inhärenten Schwefelatomen, noch zu den Chlorsubstituenten der DRB-Moleküle gehörten, Chlorid-Ionen zugeordnet. In allen 16 Fällen wurden die Atomabstände und die Ladungen der chemischen Umgebung überprüft.

Ein strukturelles Chlorid-Ion

Der stärkste Peak der anomalen Differenzfourierdichte wurde dem Chlorid-Ion Cl⁻1 zugeordnet. Mehrere Beobachtungen sprechen dafür, dass Cl⁻1 kein kurzweiliger Bindungspartner an der Oberfläche des Proteins, sondern ein inhärentes Stabilisierungselement der CK2 α -Struktur ist:

- (i) Der Peak ist höher als bei allen anderen Chlorid-Ionen und sogar höher als bei den inhärenten Schwefelatomen (Tabelle 6.1).
- (ii) Cl⁻1 ist tief im Protein in einer strukturell wichtigen Position verborgen. Dort vermittelt das Chlorid-Ion zusammen mit einem Cluster hochkonservierter Wassermoleküle den Kontakt zwischen dem N-terminalen Segment, der Helix α M des C-terminalen Segmentes, dem Aktivierungssegment und der katalytischen Schleife (Abbildung 6.8). Cl⁻1 wird von zwei Stickstoffatomen des Proteins (Peptidbindungsstickstoff von Ala315 und N-Atom aus His148 aus dem C-terminalen Teil der Helix α E) und von zwei Wassermolekülen koordiniert, die ihrerseits zu dem konservierten Wasser-Cluster gehören. Der enge Kontakt des N-terminalen Segments, der Aktivierungsschleife und der Helix α C, der diese in der aktiven Konformation hält, ist die strukturelle Basis für die konstitutive Aktivität der CK2 α . Die N-terminale Region der CK2 α erfüllt dabei funktionell eine ähnliche Aufgabe, wie Cyclin A beim CDK2/Cyclin A-Komplex und interagiert dabei auch mit dem gleichen Bereich [55].

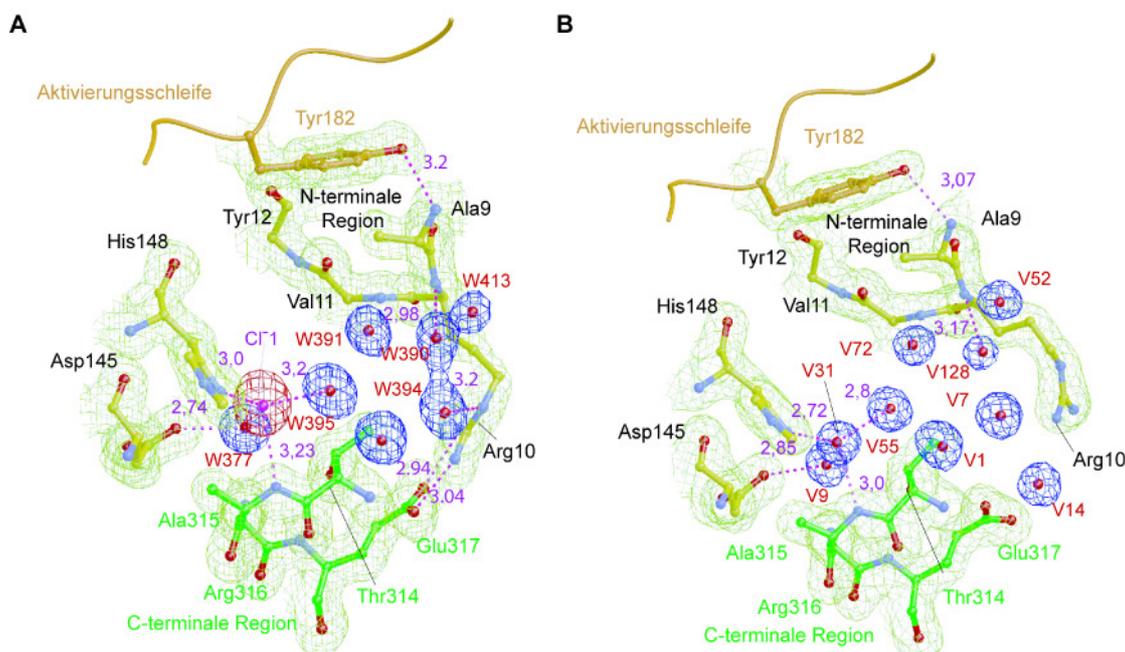


Abbildung 6.8: Strukturelles Chlorid-Ion mit einem charakteristischen Arrangement von Wassermolekülen im (A) *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/DRB*-Komplex und im Maishomolog (PDB-Datei 1LP4 [122]) (B). Die 2F_o-F_c-Elektronendichte des Proteins ist grün, die der Wassermoleküle blau (Konturlevel 1,0 σ) dargestellt. Die anomale Fourierdichte um Cl⁻1 ist rot gefärbt und wurde mit einem Konturlevel von 6,0 σ gezeichnet. Violette gestrichelte Linien stehen für Wasserstoffbrückenbindungen. Donor-Akzeptor-Abstände sind in Å angegeben. Bei der äquivalenten Region in *zmCK2 α* korrespondiert das Wassermolekül V31 mit dem strukturellen Chlorid-Ion. Ein Hinweis dafür, dass V31 durch ein Chlorid-Ion ersetzt werden könnte ist der geringe B-Faktor von 17,7 Å².

- (iii) Das Cluster von Wassermolekülen in der Umgebung von Cl^-1 wird in allen hochaufgelösten CK2 α -Strukturen aus Mensch und Mais beobachtet. Abbildung 6.8 B zeigt die entsprechende Stelle in *hsCK2 α* und *zmCK2 α* .

Das strukturelle Chlorid-Ion Cl^-1 gehört also offensichtlich zu den Elementen, die die aktive Konformation der CK2 α stabilisieren.

Ein Chlorid-Ion im positiv geladenen Bereich der ATP-Bindungsstelle

Das Chlorid-Ion mit dem zweithöchsten Peak der anomalen Differenzfourierdichte befindet sich in der ATP-Bindungstasche (Cl^-3 , Abbildung 6.9). Das Ion interagiert mit zwei Wassermolekülen (W385 und W595), die ihrerseits zu hochkonservierten Seitenketten der Kinase Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden (Glu81, Asp175). Cl^-3 und die beiden Wassermoleküle befinden sich in der „hydrophoben Region I“ [39] und liegen in einer Ebene mit der Benzimidazolgruppe von DRB. Alleine anhand der umgebenden Ladungen hätte man dieser Position kein Chlorid-Ion zuordnen können. Nur in einer weiteren Struktur, nämlich in der von *zmCK2 α* in Komplex mit dem Inhibitor 4,5,6,7-Tetrabromo-*N,N*-dimethyl-benzimidazol (TBB; PDB-Datei 1ZOE [133]), befindet sich ein Chlorid-Ion an der äquivalenten Stelle. In diesem Fall wurde statt eines Wassermoleküls ein Chlorid-Ion eingesetzt, weil die konventionelle $2F_o - F_c$ -Elektronendichte besonders stark war [133].

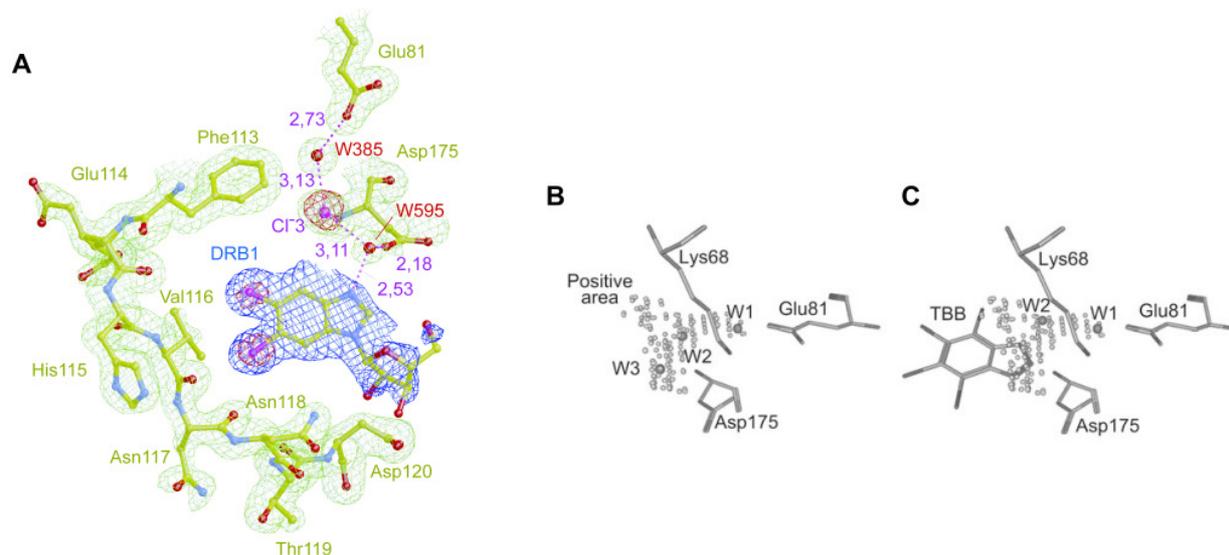


Abbildung 6.9: (A) Chlorid-Ion Cl^-3 in der ATP-Bindungstasche. Die $2F_o - F_c$ -Elektronendichte ist entweder grün (Protein, Wassermoleküle) oder blau (DRB) und wurde mit einem Konturlevel von $1,0 \sigma$ dargestellt. Das Chlorid-Ion Cl^-3 und die Chlorsubstituenten des DRB-Moleküls sind mit anomaler Fourierdichte umgeben (rot, Konturlevel $6,0 \sigma$). Violette gestrichelte Linien stehen für Wasserstoffbrückenbindungen. Abstände sind in Å angegeben. (B) Elektrostatische Eigenschaften der ATP-Bindungsstelle nach Battistutta *et al.* [128]. Die drei konservierten Wassermoleküle (W1, W2 und W3) liegen in der Nähe der Reste Lys68, Asp175 und Glu81. Das positive elektrostatische Potential ist durch kleine graue Kreise gekennzeichnet. (C) Beim *zmCK2 α* /TBB-Komplex wird die Position von W3 mit dem anionischen Stickstoff des 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol-Moleküls (TBB) ersetzt, während die anderen Wassermoleküle an der gleichen Stelle bleiben [128].

In der in dieser Arbeit gelösten Struktur konnte das Chlorid-Ion jedoch zum erstem Mal experimentell zweifelsfrei nachgewiesen werden. Das Arrangement von Cl⁻³ und den beiden Wassermolekülen passt zu einem Schema, das von Battistutta *et al.* [128] bei einer vergleichenden Studie aufgestellt wurde. Demnach entspricht W385 dem absolut konservierten Wassermolekül W1 in Abbildung 6.9, W595 dem Wassermolekül W3 und Cl⁻³ füllt einen Bereich mit positiven elektrostatischen Potential der ATP-Bindungsstelle, der in vielen CK2 α -Strukturen von Wassermolekül W2 besetzt wird.

Chlorid-Ionen an der Substratbindungsstelle

Auffällig ist auch eine Gruppe von Chlorid-Ionen (Cl⁻², Cl⁻¹⁰, Cl⁻⁸, Cl⁻¹⁴, Cl⁻¹⁵, Cl⁻⁶; Abbildung 6.10), die sich wie in einer Kette aufgereiht in die potentielle Bindungs- und Erkennungsstelle für Peptid- und Proteinsubstrate legen. Die sogenannte P+1-Schleife der Substratbindungsstelle ist verantwortlich für die acidophile Substratspezifität der CK2. Zieht man diese Eigenschaft in Betracht, können die Chlorid-Ionen als Markierung für Erkennungsstellen negativ geladener Seitenketten des Substrates gedeutet werden.

Im Gegensatz zu anderen Kinasen gibt es für CK2 α keine Komplexstruktur mit einem Substrat, sondern meistens Informationen aus gezielten Mutationen [134], [135], [136] und statistischen Studien [50]. Die einzige Struktur, die Spekulationen über die Substraterkennung zulässt, ist eine *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*-Struktur bei der zwei Sulfat-Ionen an die P+1 und P+2 Stelle gebunden sind (PDB-Datei 2PVR, [56]). Bei nahe verwandten Kinasen dienen diese beiden Positionen als Phosphorylierungsstellen, die bei der Regulation eine Rolle spielen und zeigen, dass die acidophile Substratspezifität und die konstitutive Aktivität der CK2 α in engem Zusammenhang stehen [56].

Durch die Positionierung der negativen Ladungen konnte ein Peptid mit der Sequenz DSDDD in die Bindungsstelle modelliert werden [56]). In Abbildung 6.10 werden das modellierte Peptid und die Chlorid-Ionen aus der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/DRB*-Komplex-Struktur gegenübergestellt. Dabei kommt es zu einigen Übereinstimmungen von negativ geladenen Aspartat-Seitenketten und Chlorid-Ionen. Das P-1 Aspartat stimmt mit Cl⁻¹⁰, das P+1 Aspartat mit Cl⁻⁸ und das P+3 Aspartat mit Cl⁻¹⁴ und Cl⁻¹⁵ überein. Die nicht mit einem Chlorid-Ion belegte P+2-Stelle ist bekanntermaßen weniger wichtig bei der Substraterkennung [136]. Über das modellierte Peptid hinaus kann Cl⁻² der P-2 Stelle zugeordnet werden. Zwei positiv geladene Reste – Lys122 und His160 – sind bei der Erkennung von negativ geladenen Seitenketten der P-2 beteiligt [137].

Eine Ausweitung des Modells in C-terminaler Richtung ist schwieriger. Wie auch in vielen anderen CK2 α -Strukturen ist das charakteristische Lysin-Quartett (Lys74–Lys77), das für die Erkennung negativ geladener Reste der P+4 und P+5 [135], [136] bekannt ist, teilweise ungeordnet, und es sind

entsprechend keine Chlorid-Ionen gebunden. Nur Cl⁻6 befindet sich in diesem Bereich und interagiert mit den Resten Lys76 und His183. Letzterer wurde bis jetzt nicht als in die Substratbindung involviert, beschrieben.

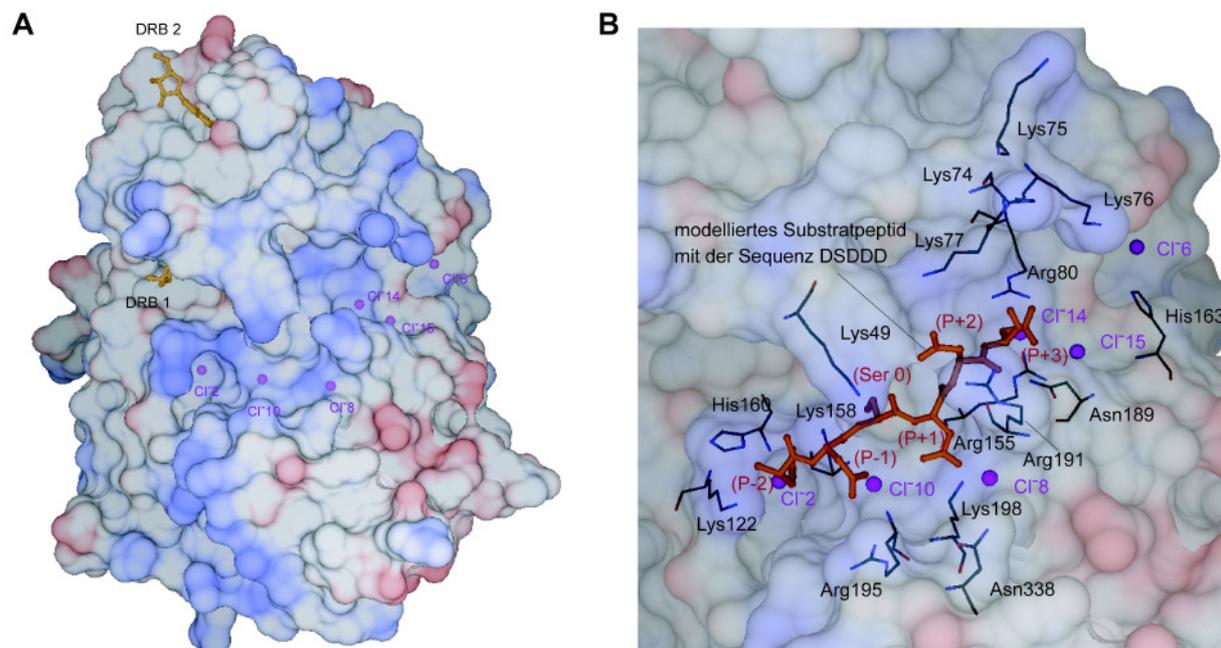


Abbildung 6.10: Chlorid-Ionen im Bereich der Substratbindungsstelle (A) Oberfläche des *hsCK2α*¹⁻³³⁵/DRB-Komplexes, gefärbt gemäß dem elektrostatischen Potential (blau: positiv geladen, rot: negativ geladen). Violette Kugeln stehen für Chlorid-Ionen. (B) Detailabbildung der Substratbindungsstelle mit den Aminosäureresten, die bei der Substraterkennung eine Rolle spielen. Das Peptidsubstrat Asp_(P-2)-Asp_(P-1)-Ser_(P)-Asp_(P+1)-Asp_(P+2)-Asp_(P+3) wurde in den Bereich modelliert.

Die Aufklärung der Substruktur des *hsCK2α*¹⁻³³⁵/DRB-Komplexes ergab nicht nur ein besseres Strukturmodell in kristallographischer Hinsicht, sondern erbrachte auch wertvolle strukturelle Einblicke und Interpretationsmöglichkeiten. Die Struktur bestätigt damit eine Studie mit 19 verschiedenen Proteinen darin, dass viele versteckte Ionen mit der Verwendung weicher Röntgenstrahlen detektiert werden können [130]. Während der Datensammlung an einem Synchrotron, bei dem die Wellenlänge des Röntgenstrahles variiert werden kann, ist die Aufnahme eines zusätzlichen 2 Å-Datensatzes sehr lohnenswert. Allerdings sollte darauf geachtet werden, dass die Redundanz des Datensatzes hoch und die Absorptionseffekte in der Luft gering sind (möglichst kleiner Kristall-Detektor-Abstand).

6.3 Der $hsCK2\alpha^{1-335}$ /Glycerin-Komplex

6.3.1 Bildet $hsCK2\alpha$ Dimere?

Die Co-Kristallisation von $hsCK2\alpha^{1-335}$ und Glycerin wurde wegen der Beobachtung, dass Glycerin an die CK2 α /CK2 β -Interaktionsfläche der Punktmutante $hsCK2\alpha^{1-335}$ -V66A/M163L [122], [119] bindet, durchgeführt. Die asymmetrischen Einheit des Kristalls besteht aus zwei $hsCK2\alpha^{1-335}$ -Ketten, die als Dimer mit C₂-Punktsymmetrie angeordnet sind (Abbildung 6.11). Um festzustellen, ob es sich dabei auch um ein physiologisches Dimer handelt oder nur um ein kristallographisches Artefakt, wurden die Koordinaten dem PISA-Server übermittelt [14]. Dieser berechnete einen Wert von 1295,7 Å² für die Interaktionsfläche der beiden Monomere. Dieser Wert ist im typischen Bereich für Homodimere mit einer monomeren Molekulargewicht von 40 kDa [10]. Dabei sind es die letzten sieben Reste der $hsCK2\alpha^{1-335}$, die in die homodimere Interaktion involviert sind. Dies lässt darauf schließen, dass die Tendenz zur Dimerisierung bei dem 57 Reste längeren $hsCK2\alpha$ -Wildtyp noch stärker ausgeprägt ist. In der Tat zeigte die 20 Reste längere $hsCK2\alpha^{1-355}$ -Variante zumindest bei dem MALDI-TOF-Spektrum einen gewissen Dimer-Anteil. Berücksichtigt man bei der Auswertung mit Hilfe des PISA-Servers mehr Kriterien als nur die Größe der Kontaktfläche, wird keine stabile Quartärstruktur für $hsCK2\alpha^{1-355}$ in Lösung vorhergesagt. Aus diesem Grund kann keine sichere Aussage darüber getroffen werden, ob das Dimer biologische Relevanz und dabei eventuell eine regulatorische Funktion hat.

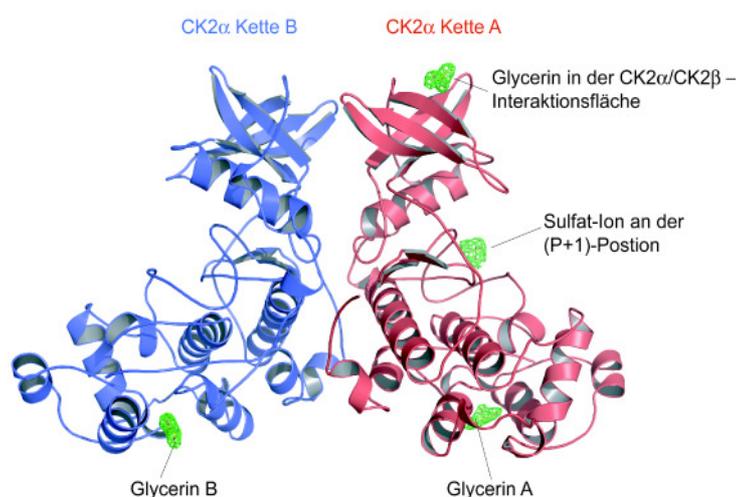


Abbildung 6.11: $hsCK2\alpha^{1-335}$ -Dimer in der asymmetrischen Einheit. Die beiden Ketten haben unterschiedliche Liganden und zeigen kleinere konformationelle Unterschiede. Die Elektronendichten der Liganden wurden mit einem Konturlevel von 1,0 σ gezeichnet.

6.3.2 Humane CK2 α kann eine inaktive Konformation annehmen

Beide Monomere sind sich strukturell sehr ähnlich (der Vergleich beider Ketten wird in Kapitel 5.3.3 gezeigt). Allerdings befindet sich nur in der allosterischen Bindungsstelle von Kette A Glycerin. Dieses Glycerinmolekül überlappt größtenteils mit den Liganden aus dem *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/DRB*- und *hsCK2 α ¹⁻³³⁵-V66A/M163L/Glycerin*-Komplex [122], [119], steckt aber weniger tief in der Tasche und lässt Platz für ein Wassermolekül (Abbildung 6.12). Beide *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*-Ketten besitzen im C-terminalen Bereich ein weiteres Glycerinmolekül (Abbildung 6.11).

Ein Vergleich der Komplexstrukturen mit Glycerin und DRB sollte nur Konformationsänderungen aufzeigen, die nicht auf die Kristallpackung zurückzuführen sind, denn beide Strukturen haben eine ähnliche kristalline Umgebung. Dabei stechen vor allem Konformationsunterschiede im Bereich der glycinreichen ATP-bindenden Schleife hervor (Abbildung 6.13 B), während die typischen Elemente der EPK-Regulation (Aktivierungssegment und Helix α C) in beiden Strukturen gleich sind.

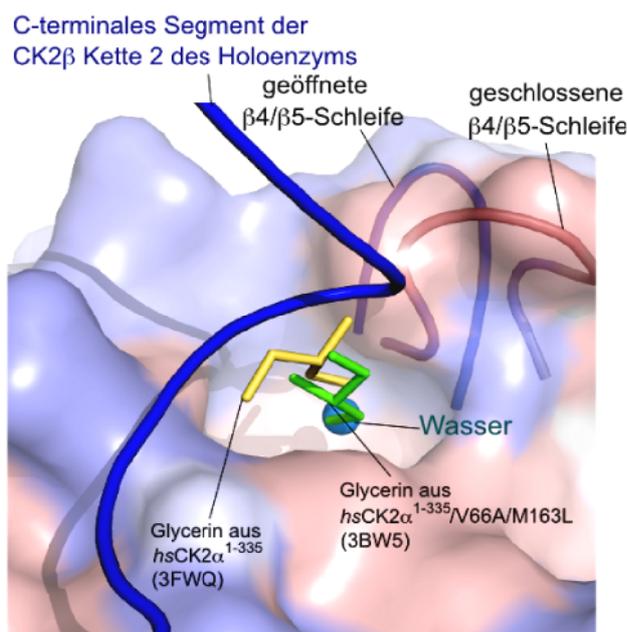


Abbildung 6.12: Glycerin in der allosterischen Bindungsstelle. Bei der Oberflächendarstellung im Bereich des CK2 α /CK2 β -Kontaktes zeigt blaue Farbe die hydrophilen, rote Farbe die hydrophoben Bereiche an. Zum Vergleich wurde das Glycerinmolekül aus der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵-V66A/M163L/Glycerin*-Komplexstruktur eingefügt (PDB-Datei 3BW5, [122], [119]). Das Glycerin aus der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/Glycerin*-Komplexstruktur sitzt weniger tief in der Bindungstasche, in der etwas tiefer auch ein Wassermolekül vorzufinden ist.

Trotz der Tatsache, dass die EPK-typischen regulatorischen Elemente der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*-Untereinheit in einer aktiven Konformation arrangiert sind, muss diese Struktur als inaktiv charakterisiert werden:

Die Salzbrücke zwischen Lys68 und Glu81, die zur ATP-Bindung notwendig ist, ist im *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/Glycerin-Komplex* nicht mehr vorhanden und die ATP-Bindungsstelle wird durch das Kollabieren der glycinreichen Schleife (ATP-bindende Schleife) blockiert (Abbildung 6.13 und 6.14). Lys68 findet dabei in Asp175 einen neuen Interaktionspartner zur Ausbildung einer Salzbrücke. Asp175 ist im aktiven Zustand für die Koordination zweier Mg^{2+} zuständig. Die glycinreiche Schleife besteht aus den ersten beiden Strängen ($\beta 1$ und $\beta 2$) der antiparallelen β -Faltblattarchitektur der N-terminalen Domäne und der verbindenden Schleife zwischen diesen Strängen. Bei den bis jetzt gelösten Strukturen reicht der $\beta 1$ -Strang bis Gly48 und der Strang $\beta 2$ beginnt mit Ser51. Die Umkehrschleife besteht dabei lediglich aus den Resten Lys49 und Tyr50. Diese „ausgestreckte“ Konformation findet sich sowohl in Mais *CK2 α* als auch in menschlicher *CK2 α* . Auch in dem Komplex von *zmCK2 α* mit Emodin [87], für den die bis jetzt größten Abweichungen in der glycinreichen Schleife bekannt waren, liegt die ausgestreckte Konformation vor und macht die Bindung des Liganden möglich. Im *CK2-Holoenzym* [43] wird die aktive Konformation der glycinreichen Schleife zusätzlich durch das *CK2 β -Dimer* stabilisiert, das mit allen fünf Strängen des N-terminalen Faltblatts in Kontakt steht (Abbildung 5.13 B).

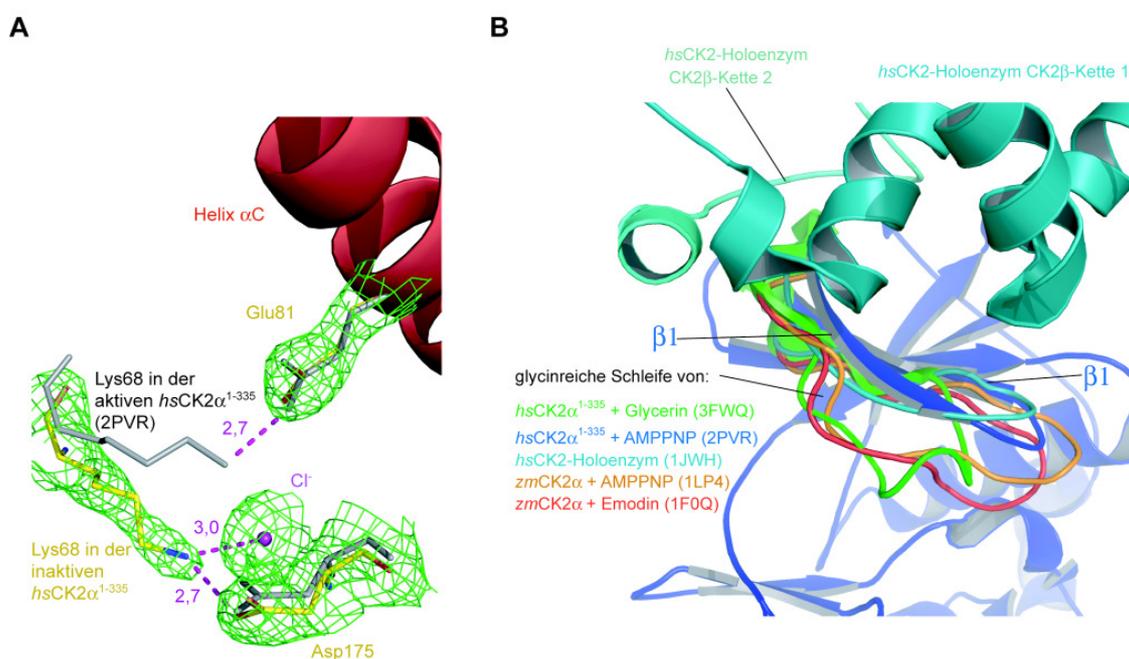


Abbildung 6.13: (A) Vergleich der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/Glycerin-* und *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/AMPPNP-*Komplexstruktur (PDB-Datei 2PVR [56]). Die grauen Elemente gehören zur aktiven Konformation. Die 2F_o-F_c-Elektronendichte wurde mit einem Konturlevel von 0,9 σ dargestellt. Violette gestrichelte Linien stehen für Wasserstoffbrückenbindungen. Abstände sind in Å angegeben. Das konservierte Lys68/Glu81-Ionenpaar, wie es in der aktiven Form der *CK2 α* vorkommt, bricht im *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/Glycerin-Komplex* auf. Die Salzbrücke ist für die Koordination der α - und β -Phosphogruppen des ATPs nötig. (B) Vergleich der Konformationen der glycinreichen Schleife, die ein Teil des antiparallelen β -Faltblattes der N-terminalen Domäne ist. Die ausgestreckte Konformation der Schleife ist im *zmCK2 α /AMPPNP-* (PDB-Datei 1LP4 [73]; orange), im *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/AMPPNP-* (PDB-Datei [122]; blau), im *zmCK2 α /Emodin-Komplex* (PDB-Datei [87]; rot) und im menschlichen *CK2-Holoenzym* (PDB-Datei [43]; türkis) zu finden. Die glycinreiche Schleife des *zmCK2 α /Emodin-Komplex* zeigt allerdings ebenfalls die Tendenz, die ATP-Bindungsstelle zu versperren, kann aber nicht das binden des Inhibitors verhindern. Die kollabierte glycinreiche Schleife des *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/Glycerin-Komplexes* ist grün gefärbt. Die Ketten des *CK2 β -Dimers* aus dem Holoenzym sind türkis gefärbt.

Bei dem *hsCK2 α^{1-335}* /Glycerin-Komplex ist das Kollabieren der glycinreichen Schleife mit einer Verkleinerung der β -Stränge um jeweils zwei Reste verbunden. Das Eindringen der glycinreichen Schleife blockiert die ATP-Bindungsstelle. Dies wird auch dadurch deutlich, dass in der Nucleotidbindungsstelle nicht das ATP-Analogon AMPPNP gebunden ist, obwohl es in ausreichender Konzentration zusammen mit Mg^{2+} im Kristallisationsansatz vorhanden war. Die strukturelle Basis für die Blockade sind vor allem die Reste Tyr50 und Arg47. Im Vergleich zur Komplexstruktur von *hsCK2 α^{1-335}* und AMPPNP (PDB-Datei 2PVR [56]) ist Arg47 aus dem *hsCK2 α^{1-335}* /Glycerin-Komplex in die ATP-Bindungsstelle hineingedreht und belegt die Zuckerregion [39] (Abbildung 6.14 A). Dabei geht Arg47 eine Wasserstoffbrückenbindung mit His160 ein, das seinerseits auch in die ATP-Bindungsstelle hineingedreht ist. Des Weiteren wird Arg47 durch eine ionische Wechselwirkung zu Asp120 aus der Gelenkregion stabilisiert (Abbildung 6.14 A).

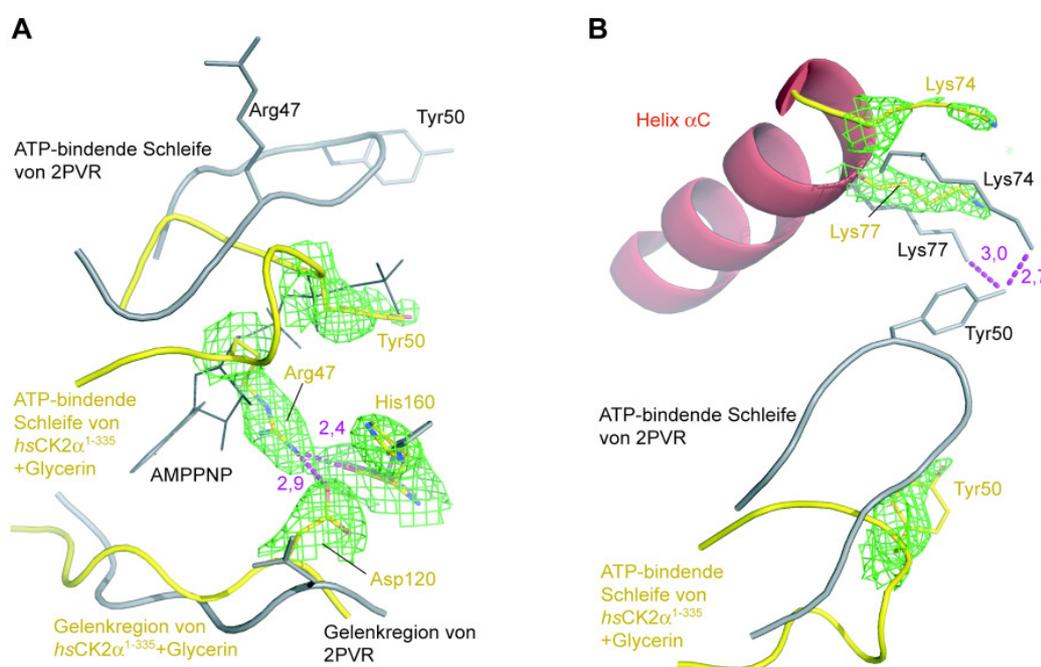


Abbildung 6.14: Vergleich der ATP-Bindungsstellen vom *hsCK2 α^{1-335}* /Glycerin- und *hsCK2 α^{1-335}* /AMPPNP-Komplex (PDB-Datei 2PVR [56]). Die grauen Elemente gehören zur aktiven Konformation. Die $2F_o - F_c$ -Elektronendichte wurde mit einem Konturlevel von $0,9 \sigma$ dargestellt. Violette gestrichelte Linien stehen für Wasserstoffbrückenbindungen. Abstände sind in Å angegeben. (A) Im aktiven Zustand wird die Nucleotid-Bindungstasche von ATP eingenommen. Im inaktiven Pendant kollabiert die glycinreiche Schleife (ATP-bindende Schleife). Als Folge dessen nehmen die Reste Arg47 und Tyr50 den Platz des Nucleotids ein. (B) Die Verankerung der Spitze der glycinreichen Schleife der aktiven Konformation durch zwei Lysinreste der Helix α C wird bei der inaktiven Konformation aufgehoben. Dadurch kann Tyr50 in den Bereich eindringen, in dem eigentlich die Triphosphogruppe des ATPs bindet.

Die Seitenkette von Tyr50 wird in der aktiven Konformation [56] von Lys74 und Lys77 koordiniert. In der inaktiven Konformation belegt der Tyr50 Rest den Platz, der normalerweise von dem Triphosphogruppe des ATPs eingenommen wird (Abbildung 6.14 B). Der Tyrosinrest 50 stand schon früh unter dem Verdacht das Enzym herunterzuregulieren [138], da das äquivalente Tyrosin (Tyr15) der CDK2 [139] der Regulation dient. Bei der CDK2 geschieht dies allerdings durch eine Phosphorylierung, nicht durch eine Konformationsänderung.

CK2 α kann also auf Grund der Plastizität der glycinreichen Schleife eine inaktive Konformation annehmen ohne dabei die EPK-charakteristischen Rearrangements, die bei der Inaktivierung normalerweise stattfinden (das Kollabieren der Aktivierungsschleife und die Drehung der Helix α C), durchzumachen. CK2 α ist in der aktiven Kinasekonformation durch intramolekulare Zwänge fixiert und wählt bei der Inaktivierung eine alternative Möglichkeit den Zugang zum aktiven Zentrum zu verhindern. Insgesamt passt die ungewöhnliche inaktive Konformation der CK2 α jedoch zu den Erkenntnissen, die die Kinaseforschung in den letzten Jahren gewonnen hat: Kinasen haben ähnliche aktive Konformationen, aber individuelle inaktive Zustände.

6.3.3 Hypothese zur Regulation von CK2 α

Durch welche Einflüsse wurde nun die inaktive Konformation induziert? Eine Möglichkeit ist, dass die Bindung von Glycerin an die allosterische Bindungsstelle das Kollabieren der glycinreichen Schleife bewirkt hat. Um dies zu überprüfen wurde die katalytische Aktivität der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* in Anwesenheit von verschiedenen Glycerinkonzentrationen getestet. Dabei wurde jedoch, im Gegensatz zur Bindung von DRB an die allosterische Bindungsstelle, kein inhibitorischer Effekt von Glycerin festgestellt.

Laudet *et al.* [89] veröffentlichten kürzlich eine Studie, bei der verschiedene kleine Moleküle die CK2 α /CK2 β -Interaktion behindern und gleichzeitig isolierte CK2 α inhibieren. Diese Inhibition kann durch steigende CK2 β -Konzentrationen, aber nicht durch ATP verhindert werden. Offensichtlich werden diese Substanzen in der CK2 α /CK2 β -Kontaktfläche der CK2 α und nicht in der ATP-Bindungsstelle gebunden. Die hier beschriebene inaktive Konformation könnte die Hemmung, die aus dem Binden an die CK2 α /CK2 β -Interaktionfläche resultiert, erklären.

Des Weiteren liegt der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*/Glycerin-Komplex als Dimer im Kristall vor, dessen biologische Bedeutung nicht ausgeschlossen werden kann. Die Dimerisierung könnte auch im Zusammenhang mit der Inaktivierung stehen. Diese Annahme ist allerdings rein spekulativ, denn alleine anhand der kristallographischen Studien kann man hier kein Urteil fällen.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass die inaktive Konformation ein kristallographisches Artefakt ist. Der Komplex mit DRB und die Struktur von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵-V66A/M163L* mit Glycerin [122], [119] hatten jedoch ähnliche Kristallisationsbedingungen und eine vergleichbare Kristallpackung und lagen beide in der aktiven Konformation vor. Diese Referenzfälle zeigen, dass Kristallparameter und Kristallisationsbedingung alleine nicht ausreichen, um zu bewirken, dass die glycinreiche Schleife kollabiert.

Die Annahme, dass kleine Moleküle an die CK2 α /CK2 β -Interaktionsfläche binden und damit eine inaktive Konformation hervorrufen, könnte den aktivierenden Effekt der CK2 β erklären: im CK2-Holoenzym bindet die CK2 β -Untereinheit an die N-terminale β -Faltblattgelenkpfanne, die dadurch stabilisiert wird und somit verhindert, dass die glycinreiche Schleife kollabiert. Dieser Mechanismus steht im Einklang mit der basalen Aktivierung der CK2 α durch CK2 β [112]. Eine Ausnahme in diesem Zusammenhang ist Calmodulin, das nur von der isolierten katalytischen Untereinheit phosphoryliert wird [64]. CK2 β hat in diesem Fall keinen stimulatorische Effekt auf CK2 α . Die substratspezifische Aktivierung gilt nicht für kleine Peptide: Verwendet man nur ein kurzes Calmodulin-Peptid, wird dieses auch wieder vom Holoenzym phosphoryliert. Es müssen also Wechselwirkungen mit dem Substrat eine Rolle spielen, die weit von der Phosphorylierungsstelle entfernt sind und die entweder sterisch begünstigend oder hindernd auf die Bindung wirken.

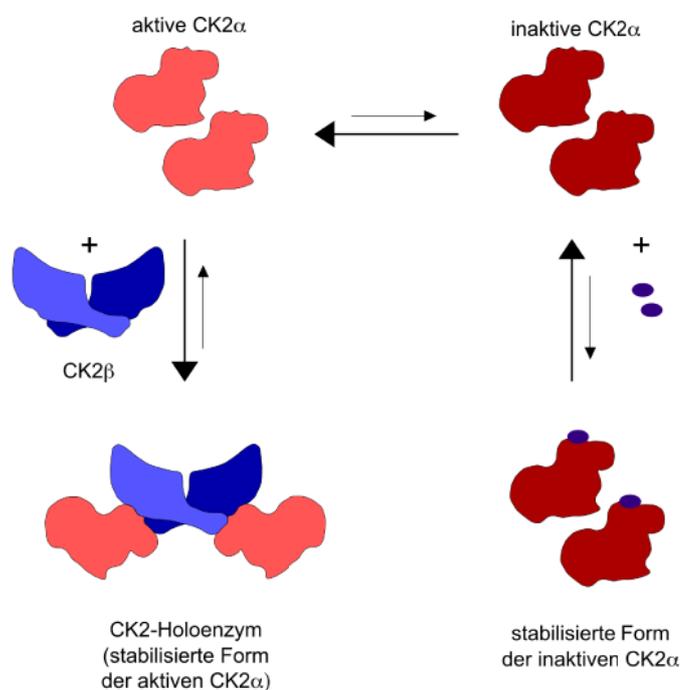


Abbildung 6.15: Hypothese zum Regulationsmechanismus von CK2 α .

Die verschiedenen Beobachtungen lassen sich in einer Hypothese zur Regulation von CK2 α im Sinne des in Kapitel 2.1 erklärten „*conformational selection*“-Modell zusammenfassen: *hsCK2 α* liegt hauptsächlich in einer aktiven Konformation vor, die allerdings im Gleichgewicht mit der inaktiven Konformation steht (Abbildung 6.15).

Ein experimenteller Hinweis darauf, dass CK2 α teilweise in inaktiver Form vorliegt ist, dass die IC₅₀-Werte von ATP-kompetitiven Inhibitoren für das Holoenzym in der Regel niedriger sind als für die CK2 α -Untereinheit [140]. Auch die K_M-Werte für ATP sind beim CK2-Holoenzym generell kleiner als für die katalytische Untereinheit alleine (siehe Kapitel 5.5.1).

Künstliche kleine Moleküle oder physiologische Metabolite könnten an die allosterische Bindungsstelle binden und das Gleichgewicht zur inaktiven Form verschieben. CK2 β hat eine Präferenz für die aktive Konformation und stabilisiert die ausgestreckte Form der glycinreichen Schleife. Gleichzeitig verhindert CK2 β das Binden von anderen Liganden an der CK2 α /CK2 β -Interaktionsfläche und verschiebt das Gleichgewicht zur aktiven Konformation von CK2 α (Abbildung 6.15).

6.4 Hinweise für eine größere Plastizität der humanen CK2 α gegenüber dem Maishomolog

Die Mehrheit der in der PDB veröffentlichten CK2 α -Strukturen stammen entweder aus Mais oder sind humanen Ursprungs. Bei der Aufklärung der verschiedenen *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*-Komplexstrukturen dieser Arbeit fielen immer wieder „ungewöhnliche“ Konformationen im Bereich der Gelenkregion auf, die zum ersten Mal bei der Punktmutante *hsCK2 α ¹⁻³³⁵-V66A/M163L* in Komplex mit AMPPNP beobachtet worden waren. Bei dieser Studie war die alternative Konformation aber zunächst als Folge der eingeführten Punktmutationen interpretiert [122] worden.

Bei einer Cluster-Analyse verschiedener CK2 α -Strukturen im Rahmen dieser Arbeit stellte sich heraus, dass die menschliche CK2 α entweder eine geschlossene oder eine geöffnete und damit Mais-ähnliche Konformation annehmen kann. Bei der geschlossenen *Hinge*-Region dreht sich Phe121 in die ATP-Bindungstasche, bei der geöffneten Konformation zeigt die Seitenkette von Phe121 zur Oberfläche. Im geschlossenen Zustand nimmt die Gelenkregion die hydrophobe Region II der ATP-Bindungsstelle ein.

Der Vergleich von *hsCK2 α /AMPPNP*-Komplex (PDB-Datei 2PVR [56]) und *hsCK2 α ¹⁻³³⁵-V66A/M163L* in Komplex mit AMPPNP (PDB-Datei 3BW5 [122], [119]) zeigt, dass die alternative Konformation der *Hinge*-Region wahrscheinlich einen unproduktiven Bindungsmodus des Nucleotids hervorruft [141] und somit einem teilweise inaktiven Zustand entspricht (Abbildung 6.16). Bei beiden Komplexstrukturen von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* mit Inhibitoren (DRB und Emodin), die in dieser Arbeit in der ATP-Bindungsstelle gelöst wurden, wurde die geschlossene *Hinge*-Region beobachtet.

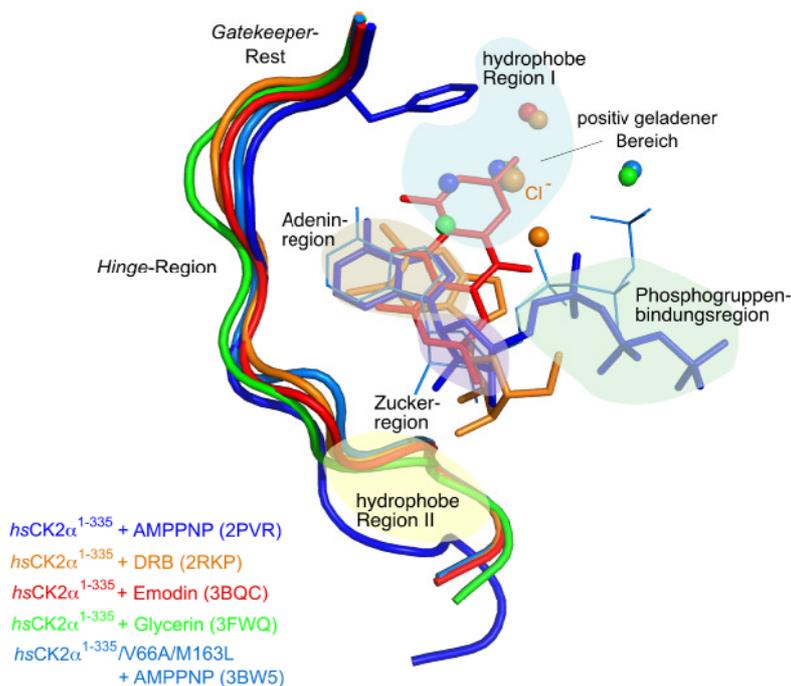


Abbildung 6.16: Pharmakophormodell für die verschiedenen $hsCK2\alpha^{1-335}$ -Strukturen, die in dieser Arbeit aufgeklärt wurden im Vergleich mit dem $hsCK2\alpha^{1-335}/AMPPNP/Sulfat$ -Komplex (PDB-Datei 2PVR [56] und dem $hsCK2\alpha^{1-335}-V66A/M163L/AMPPNP/Glycerin$ -Komplex (PDB-Datei 3BW5 [122])

Die Flexibilität der *Hinge*-Region spielt also offensichtlich eine Rolle bei der Bindung kleiner organischer Moleküle und muss bei der Verbesserung der ATP-kompetitiven Inhibitoren in Betracht gezogen werden. Unter der Annahme, dass es sich um eine unproduktive Konformation handelt, kann man die Moleküle als Typ II-Inhibitoren bezeichnen, da sie an die (teilweise) inaktive Konformation von $CK2\alpha$ binden.

Für die unproduktive Nucleotidbindung spricht auch, dass bei dem inaktiven $hsCK2\alpha^{1-335}/Glycerin$ -Komplex die geschlossene Konformation der *Hinge*-Region beobachtet wurde. Diese inaktive Konformation der $hsCK2\alpha^{1-335}$ ist ebenfalls auf eine lokale Flexibilität – nämlich der glycinreichen Schleife – zurückzuführen, die bei Mais in diesem Fall nur in Ansätzen zu beobachten war (Abbildung 6.17).

Des Weiteren ist $CK2\alpha$ im Bereich der $\beta 4/\beta 5$ -Schleife flexibel. Während die $\beta 4/\beta 5$ -Schleife in der $zmCK2\alpha$ -Untereinheit meist in der geöffneten Konformation vorliegt, besteht bei $hsCK2\alpha$ -Untereinheit ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Öffnung der Schleife und der Bildung des Holoenzym (Abbildung 6.17).

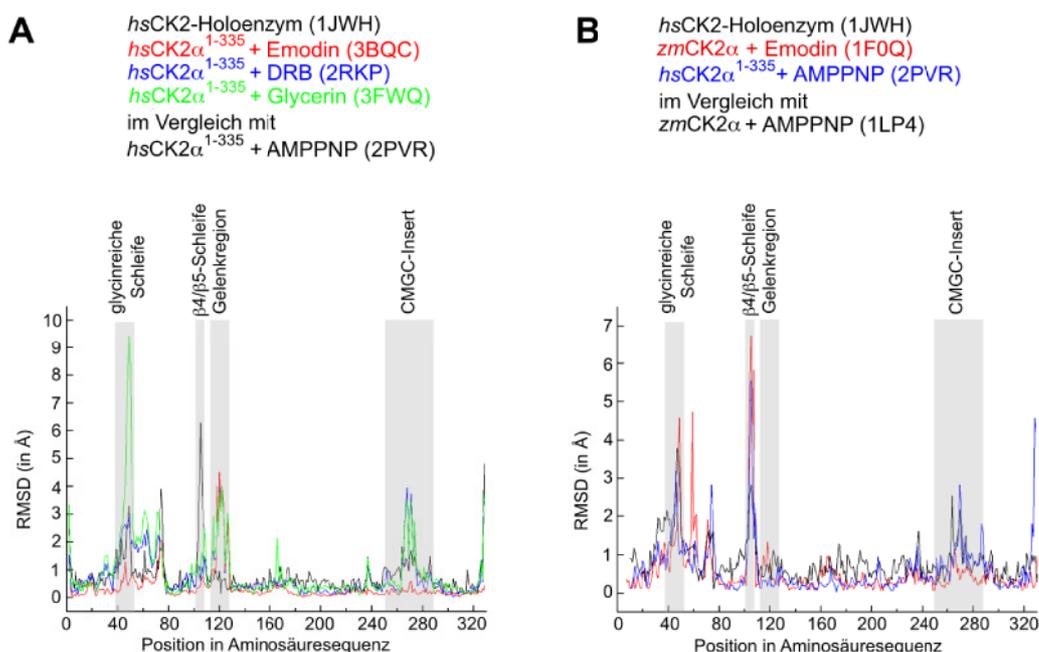


Abbildung 6.17: Strukturelle Plastizität von CK2 α (A) RMSD der Hauptketten nach Überlagerung verschiedener *hsCK2 α* -Moleküle mit der Referenzstruktur: *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵/AMPPNP/Sulfat-Komplex (PDB-Datei 2PVR [56]). Dabei fallen vor allem flexible Bereiche der ATP-Bindungstasche auf (glycinreiche Schleife und Gelenkregion). Der Peak im Bereich der β 4/ β 5-Schleife bei der CK2 α -Untereinheit des Holoenzym ist auf ein, für die Assoziation notwendiges, Öffnen zurückzuführen. Auch die CMGC-Insertion ist eine dynamische Region. (B) RMSD der Hauptketten nach Überlagerung verschiedener *hsCK2 α* -Moleküle mit der Referenzstruktur: *zmCK2 α* /AMPPNP-Komplex (PDB-Datei 1LP4 [122], [119]). Die einzige Mais-CK2 α -Struktur, die in diesen Vergleich eingeht ist der Komplex mit Emodin (PDB-Datei 1F0Q, [87]) der Abweichungen im Bereich der glycinreichen Schleife und der β 4/ β 5-Schleife zeigt. Beide humanen *hsCK2 α* -Strukturen liegen in der geöffneten Konformation der Gelenkregion vor, wie sie bei allen Mais-CK2 α -Strukturen gefunden wird. Auch hier treten Unterschiede bei der CMGC-Insertion auf. Die Kurven wurden mit BRAGI [4] erstellt.

Die CMGC-Insertion ist sowohl bei humaner, als auch bei Mais-CK2 α ein flexibler Bereich (Abbildung 6.17). Die Funktion dieses α -helikalen Bereiches ist für CK2 α unklar, jedoch wird angenommen, dass er eine Rolle bei der Bindung von Substraten spielt [142]. In diesem Zusammenhang wäre eine große Beweglichkeit des Segmentes von Vorteil [141].

6.5 Die CK2 α /CK2 β -Interaktion

6.5.1 Thermodynamische und strukturelle Charakteristika der *hsCK2 α /hsCK2 β* -Interaktion

Die Interaktion der *hsCK2*-Untereinheiten *hsCK2 α* und *hsCK2 β* wurde mit Hilfe von kalorimetrischen Techniken charakterisiert. Die Differentialrasterkalorimetrie gab dabei Aufschluss über die Entfaltungstemperaturen der einzelnen Untereinheiten und die der tetrameren Holoenzymvarianten. Wie in Kapitel 5.4.2.1 dargestellt, ändern sich die Schmelzpunkte der beiden *hsCK2 β* -Varianten (*hsCK2 β ¹⁻¹⁹³* und *hsCK2 β ¹⁻²⁰⁸*) bei der Assoziation zum CK2 Holoenzym kaum, während sich der T_m der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*-Untereinheit von 45,6 °C auf 54,7 °C (mit *hsCK2 β ¹⁻¹⁹³*) bzw. auf 56,2 °C (mit *hsCK2 β ¹⁻²⁰⁸*) erhöht. Der thermostabilisierende Effekt der *hsCK2 β* -Untereinheit wurde bereits mit den Wildtyp-Proteinen unter Verwendung der Circular dichroismusspektroskopie (CD-Spektroskopie) beobachtet [125]. Auffällig ist dabei jedoch, dass das längere *hsCK2 β* -Konstrukt die *hsCK2 α* -Untereinheit offensichtlich besser stabilisiert, als die kürzere *hsCK2 β ¹⁻¹⁹³*-Untereinheit. Die *hsCK2 β ¹⁻²⁰⁸*-Untereinheit, die dem Wildtyp ähnlicher ist, ist alleine weniger thermostabil ($T_m=58,5$ °C) als das kürzere Konstrukt ($T_m = 60,6$ °C).

Zur Quantifizierung der Bindungsaffinität wurde die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) verwendet (Kapitel 5.4.1). Unter der Annahme, dass ein *hsCK2 β* -Dimer zwei gleichwertige Bindungsstellen für *hsCK2 α* besitzt wurde für die Wechselwirkung von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* und *hsCK2 β ¹⁻¹⁹³* ein Mittelwert von $2,20 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ ($K_D = 4,51 \text{ nM}$) und für die *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/hsCK2 β ¹⁻²⁰⁸*-Interaktion eine mittlere Bindungskonstante von $1,94 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ ($K_D = 5,17 \text{ nM}$) bestimmt. Beide Werte fallen in den Bereich, der typischerweise für transiente Heterokomplexe beobachtet wird [9]. Die ermittelten Dissoziationskonstanten liegen in der gleichen Größenordnung wie der K_D -Wert von 5,4 nM der für die Interaktion von Vollängen *hsCK2 β* mit einem CK2 α /Gluthation-S-Transferase-Fusionsprotein mit Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance*; SPR) bestimmt wurde [143]. Dies zeigt, dass die letzten 7 Aminosäuren von *hsCK2 β* nicht wesentlich zur Bindungsaffinität beitragen. Die DSC-Messungen zeigten aber, dass die Länge des C-Terminus von *hsCK2 β* bei der Stabilisierung von *hsCK2 α* durchaus eine Rolle spielt.

Beide Wechselwirkungen sind stark exotherm und zeigen durch den negativen entropische Beitrag eine Enthalpie/Entropie-Kompensation. Die Bildung eines Komplexes ist grundsätzlich erst einmal entropisch ungünstig, da die Ordnung zunimmt. Der hohe enthalpische Beitrag bei der Assoziation ist in Hinblick auf die CK2-Holoenzymarchitektur [43] auf den ersten Blick verwunderlich, denn

die Kontaktfläche auf CK2 α , die sich an der Oberfläche der N-terminalen Faltblattgelenkpfanne befindet, besteht zu einem großen Anteil aus hydrophoben Resten (Abbildung 6.18 und 6.20). Aus diesem Grund würde man eher einen signifikant positiven entropischen Term erwarten, der aus dem Verdrängen von hochgeordneten Wassermolekülen von der Interaktionsfläche resultiert.

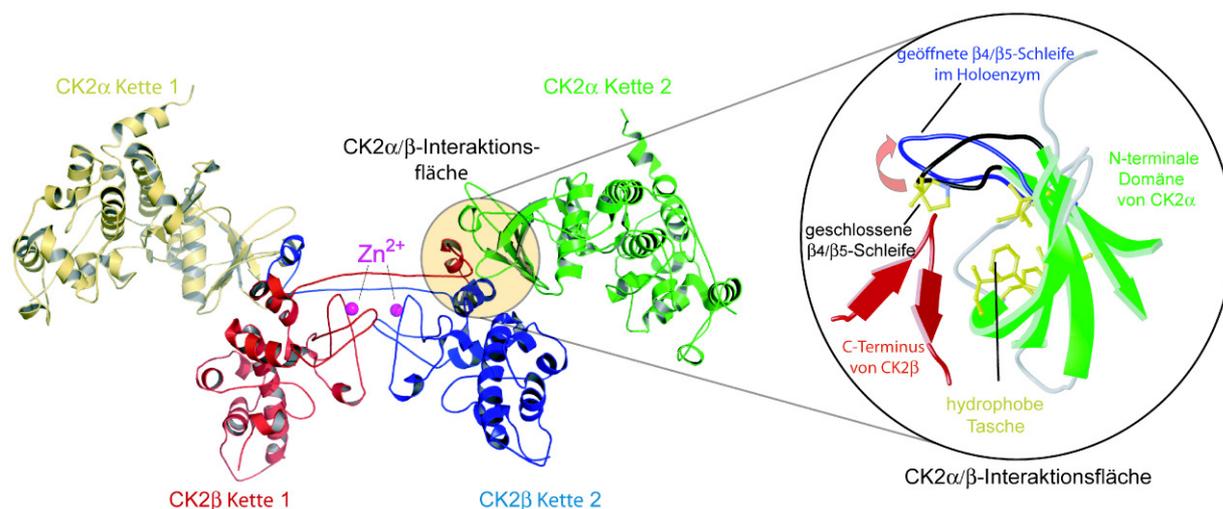


Abbildung 6.18: Die CK2 α /CK2 β -Kontaktfläche. Es gibt zwei Kontakte zwischen einem CK2 β -Dimer und der N-terminalen Domäne jeder einzelnen CK2 α -Untereinheit: Einer wird durch den C-Terminus der einen CK2 β -Kette und der andere durch die Helix α F der anderen CK2 β -Kette vermittelt. Die Kontaktoberfläche der CK2 α -Untereinheit hat einen hydrophoben Charakter. Im ungebundenen Zustand ist die β 4/ β 5-Schleife geschlossen, im Kontext des Holoenzym geöffnet [43].

Vergleicht man die Strukturen von *hs*CK2 α im monomeren Zustand und als Bestandteil des CK2-Holoenzym [43], zeigt sich, dass die β 4/ β 5-Schleife beim *hs*CK2 α -Monomer geschlossen und im Holoenzym geöffnet vorliegt. Demnach ist die hydrophobe Oberfläche von CK2 α im ungebundenen Zustand bedeckt und somit wenig solvatisiert. Die *hs*CK2 α ¹⁻³³⁵/Glycerin-Komplexstruktur zeigte jedoch in diesem Bereich ein Wassermolekül, das direkt unter dem Glycerinmolekül Platz fand. Bei der Assoziation werden dennoch nur wenige Wassermoleküle von dieser Oberfläche verdrängt.

Des Weiteren lässt die Unabhängigkeit von pH-Wert und Ionisierungsenthalpie des Puffers darauf schließen, dass Protonierungen oder Deprotonierungen keine Rolle bei der Wechselwirkung spielen. Die negative Änderung der Wärmekapazität (Kapitel 5.4.1.1) bestätigt den hydrophoben Charakter der Wechselwirkung und resultiert daraus, dass die geordnete Hülle aus Wassermolekülen an der hydrophoben Oberfläche bei höheren Temperaturen schwächer ist. Da die hydrophobe Interaktionsfläche der CK2 α -Untereinheit dem Lösungsmittel nur beschränkt zugänglich ist, muss dieser Effekt hauptsächlich von der Solvatisierung der hydrophoben Bereiche von CK2 β , die der Bindung dienen, zugeschrieben werden.

Der C-terminale Bereich der CK2 β -Untereinheit (Pro185–His193) bildet eine *Hairpin*-Struktur an deren Spitze sich Tyr188 und Phe190, befinden [144] und bindet bei der Assoziation zum Holoenzym an die Interaktionsfläche von CK2 α [43] (Abbildung 6.20. Das Rückgrat des „*Hairpins*“ ist für die Wechselwirkung vorgeformt, lediglich der Rest Phe190 geht bei der Wechselwirkung, dem Vergleich von Holoenzym- und *hsCK2 β ¹⁻¹⁹³*-Struktur nach (PDB-Dateien 1JWH [43] und 3EED [144]), in ein anderes Rotamer über [144].

Wie bereits erwähnt geht die Bindung von CK2 β an CK2 α mit Konformationsänderungen der β 4/ β 5-Schleife einher. Eventuell ist dieser geöffnete Zustand der β 4/ β 5-Schleife energetisch weniger gespannt als der geschlossene Zustand, Hier könnte der Ursprung der bei der Bindung freiwerdenden Wärme liegen. Dies ist allerdings nur eine Hypothese, die durch weitere Studien überprüft werden muss. Von der CK2 α -Untereinheit aus Mais ist bekannt, dass sie eine höhere Tendenz als Homologe aus anderen Organismen hat, *in vivo* als Monomer zu existieren [145]. Dazu passt die Beobachtung, dass die β 4/ β 5-Schleife bei der CK2 α -Untereinheit aus Mais meist in der geöffneten Konformation vorliegt.

In einigen *zmCK2 α* -Inhibitor-Komplexstrukturen [z.B. PDB-Datei 1M2R (mit 1,4-Diamino-5,8-dihydroxy-Anthrachinon, DAA [114]) oder PDB-Datei 1F0Q (mit Emodin) [87]] wurde allerdings auch die geschlossene Konformation der β 4/ β 5-Schleife beobachtet. Im Falle des *zmCK2 α* /DAA-Komplexes korrelierte die geschlossene Konformation mit einer – im Vergleich zu analogen Kristallpackungen – verkürzten B-Achse des Kristalls, mit einem geringeren Lösungsmittelanteil [114] und wurde auf Dehydratation zurückgeführt.

Es sind allerdings nicht nur hydrophobe Reste in der Interaktionsfläche zu finden. Auch die Sauerstoff- und Stickstoffatome des Peptidrückgrats haben einen Anteil an der Oberfläche dieses Bereiches und es ist außerdem elektrostatische Komplementarität wie beispielsweise bei den Resten (Asp37 aus *hsCK2 α* und Arg186 aus *hsCK2 β* , Abbildung 4.1) beobachtbar. Es ist also nicht auszuschließen, dass die wirklichen Schlüsselemente der Interaktion einen hydrophilen Charakter haben, was den geringen entropischen Beitrag erklären könnte.

6.5.2 Thermodynamische Beiträge von Schlüsselresten der CK2 α /CK2 β -Interaktion

Zur Charakterisierung der individuellen thermodynamischen Beiträge und um sogenannte *Hot spots* der CK2 α /CK2 β -Wechselwirkung an der Interaktionsfläche der katalytischen Untereinheit zu finden, wurden verschiedene hydrophobe Reste mit ortsgerichtete Mutagenese durch Alanin ersetzt. Dabei wurden zunächst nur Leu41, Ile69 und Leu41/Val42 in Kombination ausgetauscht, um die

Methode zu testen. In einer vorhergehenden Studie [146] war bereits Phe54 durch Alanin ersetzt worden, was dazu führte, dass die resultierende *hsCK2α*-Mutante bei der ITC-Messung keine Interaktion mit *hsCK2β*¹⁻¹⁹³ zeigte. In dieser Arbeit konnte anhand von Änderungen der thermodynamischen Profile bei der Interaktion mit den Punktmutanten gezeigt werden, dass das systematische Austauschen von weiteren Resten, die für die Interaktion wichtig sein könnten, und nachfolgende ITC-Messungen ein lohnenswerter Ansatz zum Verständnis der CK2α/CK2β-Interaktion ist. Das weitere Vorgehen in diesem Zusammenhang wird im Kapitel 7. besprochen.

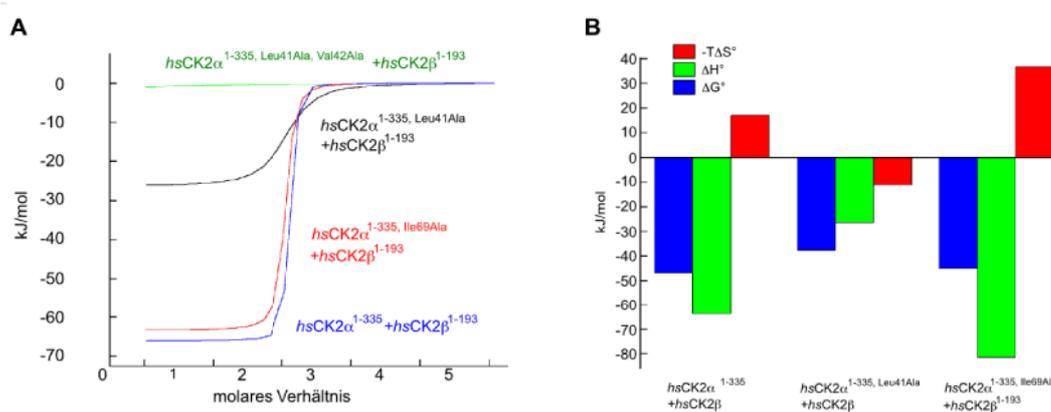


Abbildung 6.19: ITC-Messungen der *hsCK2α*¹⁻³³⁵-Punktmutanten-*hsCK2β*¹⁻¹⁹³-Wechselwirkung. (A) Vergleich der anhand der integrierten Peaks angepassten Kurven. (B) Thermodynamische Profile der Interaktionen.

Den geringsten Einfluss hatte dabei der Austausch von Ile69 durch Ala, der zu einer relativ geringen Abnahme der Affinität im Vergleich zu *hsCK2α*¹⁻³³⁵ führte ($K_B = 6,95 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ gegenüber $2,71 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$). Die entropischen und enthalpischen Beiträge haben beide einen negativeren Wert als bei *hsCK2α*¹⁻³³⁵, kompensieren sich aber zu einem etwas kleineren ΔG° (Abbildung 6.19).

Bei Austausch von Leu41 ändert sich bei der Interaktion mit *hsCK2β*¹⁻¹⁹³ das gesamte thermodynamisch Profil, es findet keine Entropie/Enthalpie-Kompensation mehr statt. Der entropische Beitrag ist nun positiv und ist für die Bindung begünstigend. Gleichzeitig wird die treibende Kraft der Interaktion – der enthalpische Beitrag – im Vergleich zur *hsCK2α*¹⁻³³⁵/*hsCK2β*¹⁻¹⁹³-Wechselwirkung reduziert ($2,66 \cdot 10^4 \text{ J/mol}$ gegenüber $6,38 \cdot 10^4 \text{ J/mol}$) und sorgt für eine erheblich kleinere Bindungskonstante ($K_B = 5,38 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ gegenüber $2,71 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$).

Leu41 liegt in der N-terminalen Domäne der *hsCK2α* gegenüber von der $\beta 4/\beta 5$ -Schleife (Abbildung 6.20). Das Ersetzen dieses Restes durch Alanin könnte dazu geführt haben, dass die $\beta 4/\beta 5$ -Schleife die geschlossene Konformation nicht oder nur teilweise einnehmen kann. In diesem Fall würde die hydrophobe Interaktionsfläche solvatisiert und die bereits geöffnete $\beta 4/\beta 5$ -Schleife könnte bei der Bindung von CK2β keine Konformationsänderung eingehen. Dieses Szenario würde den positiven

entropischen Beitrag und die Verminderung der treibenden enthalpischen Kraft aus der Öffnung der β 4/ β 5-Schleife erklären. In einer Arbeit, in der Phe54, das ebenfalls gegenüber der β 4/ β 5-Schleife liegt, durch Alanin ersetzt worden war [146], wurde gar keine Interaktion mehr beobachtet. Es könnte also auch sein, dass die β 4/ β 5-Schleife im Falle der Punktmutante $hsCK2\alpha^{1-335, Leu41Ala}$ nicht komplett geöffnet ist. Wird auch der Valin-Rest neben Leu41 gegen Alanin ausgetauscht findet ebenfalls keine Interaktion der Untereinheiten mehr statt. Val42 liegt zwar auch gegenüber der β 4/ β 5-Schleife, die Seitenkette ist allerdings von der Schleife abgewandt. Der niedrige Schmelzpunkt von 36,5 °C dieser Mutante lässt darauf schließen, dass Val42 ein stabilisierendes Element der $hsCK2\alpha$ -Untereinheit ist und durch den Austausch die Architektur des N-terminalen Faltblatts gestört wird, was sich auch durch die fehlende Aktivität dieser Mutante äußert.

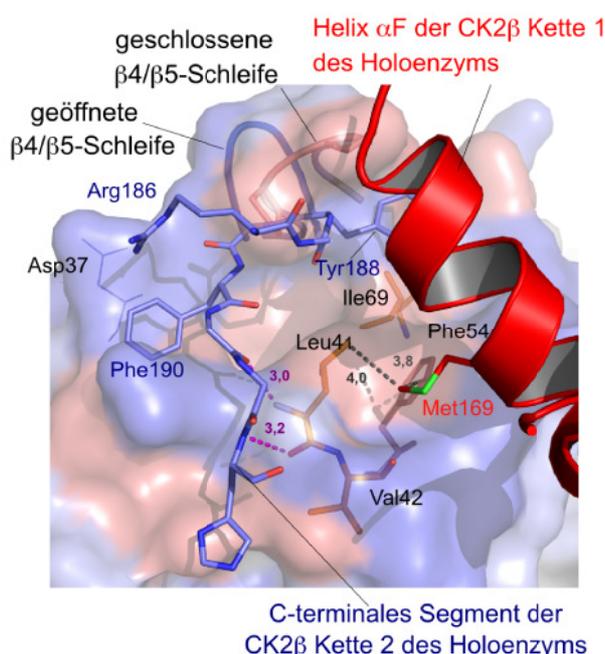


Abbildung 6.20: Oberflächendarstellung des CK2 α /CK2 β -Kontaktes. Hydrophobe Bereiche sind rot gefärbt, während hydrophile Bereiche blau gefärbt sind. Wichtige Strukturelemente der $hsCK2\beta$ -Untereinheit sind hervorgehoben. Die durch ortsgerichtete Mutagenese in dieser Arbeit oder in vorherigen Studien ausgetauschten Reste von $hsCK2\alpha$ und die Reste an der Spitze der β 4/ β 5-Schleife sind betont.

Eine Destabilisierung ist auch bei den anderen beiden Punktmutanten feststellbar (der T_m von $hsCK2\alpha^{1-335, Leu41Ala}$ liegt 5,6 °C und der T_m von $hsCK2\alpha^{1-335, Ile69Ala}$ 4,3 °C unter der Entfaltungstemperatur von $hsCK2\alpha^{1-335}$). Veränderungen der N-terminalen Region haben also große Auswirkungen auf die Thermostabilität von $hsCK2\alpha$. Diese Tendenz passt dazu, dass die nicht-katalytische Untereinheit CK2 β bei der Bindung an dieser Domäne einen thermostabilisierenden Einfluss auf CK2 α ausüben kann.

Des Weiteren liegt das Peptidrückgrat von Leu41 und Val42 in der Nähe des C-terminalen Teils von CK2 β (Abbildung 6.20). Die Abstände liegen im Bereich von Wasserstoffbrückenbindungen. Dabei ist allerdings die schlechte Auflösung der CK2-Holoenzym (3,1 Å) zu bedenken, die keine allzu genauen Informationen über Abstände zulässt. Das Ersetzen der Seitenketten dürfte jedoch auf den Kontakt keinen Einfluss haben, es sei denn es käme zu großen strukturellen Veränderungen.

Die Seitenkette von Leu41 bewegt sich bei der Bindung des CK2 β -Dimers zur Helix α F hin. Dies wird in Abbildung 6.20 durch das Herausragen aus der Oberfläche, die für das *hsCK2 α* -Monomer berechnet wurde, angedeutet. In einem Abstand von 4,0 Å von Leu41 befindet sich Met169 aus der Helix α F von CK2 β . Met169 steht ebenfalls in Kontakt zu Phe54. Beide Reste spielen den ITC-Messungen nach eine große Rolle bei der Interaktion. Der Austausch könnte also auch das Andocken der Helix α F erschweren bzw. verhindern.

Ile69 liegt viel näher an der β 4/ β 5-Schleife hat aber kaum Einfluss auf das thermodynamische Profil. Ob Leu41, Val42 und Phe54 wirklich beim Schließen der β 4/ β 5-Schleife im *hsCK2 α* -Monomer eine Rolle spielen, lässt sich durch die kalorimetrischen Messungen nicht eindeutig feststellen und die Annahme bleibt daher zunächst rein spekulativ. Andererseits vergrößert sich durch das Hinwenden zur Helix α F bei der Assoziation zum Holoenzym der Abstand der Seitenkette von Leu41 und Phe54 zur β 4/ β 5-Schleife und könnte so als Öffnungsmechanismus wirken.

6.6 Charakterisierung der verschiedenen *hsCK2 α* - und *hsCK2*-Holoenzym-Varianten

Die verschiedenen *hsCK2 α* -Konstrukte bzw. die entsprechenden Holoenzymvarianten wurden hinsichtlich ihrer Stabilität und Aktivität untersucht. Die beiden Varianten des C-Terminus – *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵ und die *hsCK2 α / α'* -Chimäre – zeigten bei den MALDI-TOF-Spektren eine gewisse Heterogenität (Kapitel 5.2), die wahrscheinlich auf die Degradation einiger Aminosäuren des C-Terminus zurückzuführen ist und die die Kristallisation erschwerte. Die Thermostabilität und die enzymkinetischen Eigenschaften beider Konstrukte konnte dennoch untersucht werden.

Die *hsCK2 α* -Konstrukte haben sehr ähnliche Entfaltungstemperaturen, während bei den entsprechenden Holoenzymvarianten vor allem die simultane Entfaltung bei 57,3 °C beider Untereinheiten beim *hsCK2 α / α'* -Chimäre/*hsCK2 β* ¹⁻²⁰⁸-Holoenzym zu erwähnen ist.

Die Tatsache, dass die *hsCK2 α / α'* -Chimäre im Vergleich zu *hsCK2 α* ¹⁻³³⁵ im Holoenzym eine um 1,1 °C höhere Schmelztemperatur hat und gleichzeitig der T_m der *hsCK2 β* ¹⁻²⁰⁸ um 2,4 °C sinkt, lässt nur Spekulationen zu. Durch den veränderten C-Terminus in der *hsCK2 α / α'* -Chimäre wird die Interaktion so beeinflusst, dass bei der Entfaltung der *hsCK2 α / α'* -Chimäre auch gleichzeitig die

Entfaltung von $hsCK2\beta^{1-208}$ bewirkt. Man kann daher vermuten, dass $hsCK2\beta^{1-208}$ in dem alternativen Holoenzym eine andere, labilere Konformation einnimmt, die trotzdem in der Lage ist, $hsCK2\alpha/\alpha'$ -Chimäre zu stabilisieren. In diesem Zusammenhang ist verwunderlich, dass die Entfaltungstemperatur der $hsCK2\alpha/\alpha'$ -Chimäre, die eine starke Tendenz hat kovalente Dimere zu bilden, nur 1,1 °C über dem T_m von $hsCK2\alpha^{1-335}$ liegt.

Bei den enzymkinetischen Studien mit $hsCK2\alpha$ -Konstrukten, die sich in Länge und Sequenz des C-Terminus unterscheiden und den entsprechenden Holoenzymvarianten teilen sich die K_M -Werte in die Gruppe der $hsCK2\alpha$ -Untereinheiten und die Gruppe der Holoenzyme auf, während die Wechselzahlen (k_{kat}) der $hsCK2\alpha$ - und CK2-Varianten sehr unterschiedlich sind. Die K_M -Werte der Holoenzyme sind stets kleiner als für die CK2 α -Monomere, was im Einklang mit der in Kapitel 6.3.3 vorgeschlagenen Hypothese zur Regulation steht. Die Anzahl der Substratmoleküle, die jedes aktive Zentrum pro Zeiteinheit unter Sättigung phosphoryliert, ist bei $hsCK2\alpha^{1-335}$, der $hsCK2\alpha/\alpha'$ -Chimäre und den entsprechenden Holoenzymen geringer als bei $hsCK2\alpha^{1-335}$, während die Affinität zu ATP sich nicht ändert. Diese Konstellation hat auch Einfluss auf die katalytische Effizienz (k_{kat}/K_M), die bei den C-terminalen Varianten geringer ist als bei den Referenzkonstrukten.

Es könnte also sein, dass der C-Terminus ähnlich wie bei einer nichtkompetitiven-Hemmung die Umsatzrate aber nicht die Affinität verändert. Aus der $hsCK2\alpha^{1-335}/DRB$ -Komplex-Struktur ist außerdem bekannt, dass sich der C-Terminus zur N-terminalen Domäne zurückfaltet, dabei kommt er in die Nähe der Rückseite des aktiven Zentrums. Bei einer Verlängerung des C-Terminus könnte dieser einen inhibitorischen Einfluss haben.

Die beiden Punktmutanten $hsCK2\alpha^{1-335, Leu41Ala}$ und $hsCK2\alpha^{1-335, Ile69Ala}$ haben eine geringere katalytische Effizienz als das Referenzkonstrukt $hsCK2\alpha^{1-335}$ ($0,28 \text{ min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ und $0,35 \text{ min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ gegenüber $1,14 \text{ min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$). Die höheren K_M -Werte der Punktmutanten zeigen, dass die Affinität zu ATP im Vergleich zu $hsCK2\alpha^{1-335}$ geringer ist. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass diese beiden Punktmutanten bei der Temperatur, bei der der Aktivitätstest durchgeführt wurde bereits zu einem kleinen Teil entfaltet vorliegen (Kapitel 5.4.2.2); um die Messungen vergleichbar mit den anderen zu lassen, wurde jedoch die Temperatur von 37 °C beibehalten). Demnach ist die Konzentration des aktiven Enzyms kleiner, als die gemessene Konzentration, die zur Berechnung von k_{kat} verwendet wurde. Die k_{kat} -Werte dieser Punktmutanten sind daher wahrscheinlich eigentlich höher. Bei der Punktmutante $hsCK2\alpha^{1-335, Leu41Ala, Val42Ala}$ kann man davon ausgehen, dass sie bei 37 °C fast vollständig denaturiert vorliegt. Es ist also nicht verwunderlich, dass sie nicht aktiv ist. Allerdings zeigt sie auch bei einer Temperatur von 22 °C keine Aktivität.

7. Ausblick

Durch die Erkenntnisse, die in dieser Arbeit gewonnen wurden, ergeben sich eine Reihe weiterer Fragen, die Ausgangspunkt für weiterführende Arbeiten sein können.

Mit den gelösten Komplexstrukturen von *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* konnten Strukturelemente ausgemacht werden, die in der menschlichen katalytischen Untereinheit weitaus flexibler sind als im Mais-homolog. Dies betrifft v.a. die Gelenkregion, die eine wichtige Rolle bei der Bindung von ATP-kompetitiven Inhibitoren spielt. Bis jetzt wurden Inhibitoren mit der CK2 α -Untereinheit aus Mais kristallisiert, von der man eine große Ähnlichkeit der Nucleotidbindungsstelle annahm. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass gerade in diesem Bereich die strukturellen Unterschiede auf Grund der Plastizität der humanen CK2 α besonders groß sind. Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren (DRB und Emodin) sind nur zwei Beispiele kleiner Moleküle, die hemmend auf CK2 wirken. Beide sind sowohl in Hinsicht auf Spezifität und Affinität verbesserungswürdig und eigentlich nur als Leitstrukturen für die Entwicklung besserer Inhibitoren anzusehen.

- Mittlerweile wurden verschiedene andere kleine organische Moleküle von DRB, Emodin und anderen Leitstrukturen abgeleitet oder beim Durchsuchen von Bibliotheken gefunden. Viele sind noch nicht auf struktureller Basis untersucht worden und bieten sich für die Co-Kristallisation mit *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* an.
- Die isothermale Titrationskalorimetrie ist bei der strategischen Optimierung von Inhibitoren eine bewährte Methode, muss allerdings durch Variation des Lösungsmittels, der Temperatur oder der Konzentration auf CK2 α abgestimmt werden.

Sowohl DRB, als auch Glycerin können an die CK2 α /CK2 β -Interaktionfläche binden.

- Durch die Suche nach weiteren Molekülen, die an diese Stelle binden und Kombination ihrer strukturellen Eigenschaften könnte man ein Molekül entwickeln, das die Wechselwirkung der beiden CK2-Untereinheiten signifikant stören kann.
- Solche Antagonisten der CK2 α /CK2 β -Interaktion wären interessant für zellbiologische Studien, um die Auswirkungen der Abwesenheit des CK2-Holoenzym auf die Zelle aufzuklären. So könnte man sich der Antwort auf die Frage nähern, welche Bedeutung der Assoziation beider CK2-Untereinheiten im zellulären Kontext zukommt. Auch in pharmakologischer Hinsicht könnten die Antagonisten interessant werden.

Durch die inaktive Konformation der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/Glycerin*-Komplexstruktur konnte eine Hypothese zur Regulation der CK2 formuliert werden.

- Bei der Suche nach kleinen organischen Molekülen, die an die allosterische Bindungsstelle binden, sollte man das Augenmerk auch auf physiologische Metabolite richten, denn diese Moleküle könnten eine Rolle bei der Regulation der CK2 spielen.

Bei der Suche nach *Hot spots* der CK2 α /CK2 β -Interaktion wurden verschiedene hydrophobe Reste der N-terminalen Domäne der *hsCK2 α* durch Alanin ersetzt und die Wechselwirkung der Punktmutanten mit CK2 β anhand isothermaler Titrationskalorimetrie charakterisiert.

- Ein systematisches Austauschen von Resten des Oberflächenbereichs der β -Faltblattgelenkpfanne und die thermodynamische Charakterisierung der Interaktion mit CK2 β könnte mehr Aufschluss über die Schlüsselreste und die treibenden Kräfte der Wechselwirkung geben.
- Auch die Aufklärung der Struktur der Punktmutanten wäre interessant, um die Theorie, dass die β 4/ β 5-Schleife durch den Austausch von gegenüberliegenden Resten geöffnet wird und die hydrophobe Interaktionsfläche auf diese Weise dem Lösungsmittel exponiert wird, zu überprüfen.
- CK2 α -Punktmutanten, die keine oder nur verminderte Affinität zur CK2 β -Untereinheit haben, dabei jedoch katalytisch aktiv sind, wären auch für zellbiologische Studien zur Untersuchung der physiologischen Rolle der CK2 α /CK2 β -Interaktion interessant. Ein Kandidat in diesem Zusammenhang wäre die *hsCK2 α* ^{1-335, Leu41Ala}-Mutante, die zwar eine verminderte Affinität zu CK2 β hat, aber dennoch aktiv ist.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die CK2 α /CK2 β -Interaktion der menschlichen Untereinheiten.

- Mit isothermaler Titrationskalorimetrie könnten auch die Wechselwirkungen der CK2-Untereinheiten aus anderen Organismen untersucht werden, um so Erkenntnisse über Veränderungen der Affinität und des thermodynamischen Profils im Laufe der Evolution zu gewinnen. In dieser Hinsicht ist CK2 aus Pflanzen sehr interessant, bei denen man oft mehrere unterschiedliche CK2 β -Untereinheiten mit C- oder N-terminalen Verlängerungen findet.
- Sowohl für CK2 α , als auch für CK2 β sind alternative Interaktionspartner identifiziert worden [147]. Auch diese Wechselwirkungen können mit ITC charakterisiert werden. Zu Beginn könnte beispielsweise die CHK1/CK2 β -Interaktion untersucht werden, die wahrscheinlich große Ähnlichkeiten zur CK2 α /CK2 β -Wechselwirkung aufweist. Der Oberflächenbereich des N-terminalen Faltblattes der *Checkpoint*-Kinase CHK1 ist ebenfalls mit hydrophoben Aminosäuren ausgestattet und sterisch zugänglich [116].

Eines der höher gesteckten Ziele dieser Arbeit – die strukturelle Charakterisierung der C-Termini von *hsCK2 α* und *hsCK2 α '* – konnte nicht erreicht werden. Bei der längeren *hsCK2 α ¹⁻³³⁵*-Variante bildeten sich keine Kristalle, was auf eine hohe Flexibilität von Teilen des Konstruktes hindeutet. Die *hsCK2 α / α '*-Chimäre, die den C-Terminus von *hsCK2 α '* beinhaltet, bildete Dimere. Diese sind wahrscheinlich kovalent über eine Disulfidbrücke von Cys336 verbunden, die sich nach dem Zellaufschluss bildet.

- Erst kürzlich wurde eine zellzyklusabhängige Abfolge von Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Resten im C-terminalen Bereich von CK2 α festgestellt [81]. Einige Interaktionspartner von CK2 können nur binden, wenn diese Reste phosphoryliert sind. Dabei bleibt die Aktivität der Kinase durch die Phosphorylierungen unbeeinflusst. Eines dieser für diese Phosphorylierungen spezifischen Proteine ist die Peptidyl-Prolyl-Isomerase Pin1 [148], die durch ihre Bindung an CK2 die Phosphorylierung der Topoisomerase II α verhindert. CK2 α hat in dem strukturell uncharakterisierten C-terminalen Bereich 10 Prolinreste, die entweder *cis* oder *trans* Konfiguration einnehmen können. Die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der Konfigurationen könnten für die Flexibilität dieses Bereiches verantwortlich sein. Pin1 könnte die Prolin-Konfigurationen modulieren und somit den C-Terminus auf eine bestimmte Konformation festlegen. Eine Strategie die man zur Aufklärung der Struktur des C-terminalen Segments verfolgen könnte, ist der Austausch der Prolinreste durch z.B. Alanin und anschließende Kristallisation.
- Zur Aufklärung des C-terminalen Bereiches von CK2 α ' könnte man den für die Disulfidbrücken kritischen Rest, Cys336 durch Serin ersetzen. Das so erhaltene Konstrukt könnte bessere Eigenschaften bei der Expression, Reinigung und Kristallisation haben und sich auch für weitere *in vitro*-Studien eignen.

In dieser Arbeit wurden strukturelle und biophysikalische Eigenschaften der CK2-Untereinheiten betrachtet. Dafür mussten die Untereinheiten dem zellulären Kontext entrissen und isoliert *in vitro* untersucht werden. CK2 ist Gegenstand vieler zellbiologischer Studien, die in Zukunft durch folgenden Ansatz ergänzt werden könnten:

- Bei sogenannten ASKAs (*analog sensitive kinase alleles*) wird die Kinase genetisch so modifiziert, dass sie selektiv von einem bestimmten ATP-kompetitiven Inhibitor adressiert werden kann. Dafür wird der *Gatekeeper*-Rest (bei *hsCK2 α* Phe113) im Inneren der Nucleotidbindungsstelle durch Alanin oder Glycin ersetzt. Aus Studien mit anderen Kinasen weiß man, dass diese Mutation keinen Einfluss auf die Struktur, Aktivität, Substrat-selektivität und zelluläre Funktion hat. ASKA-Inhibitoren haben keine Auswirkungen auf Wildtyp-Kinasen und sind zellpermeabel, eignen sich also für zellbiologische Studien [149].

Sollte sich die ASKA-Methode mit *hsCK2 α* und *hsCK2 α '* als erfolgreich herausstellen, könnte man sogar über eine „ASKA-Maus“ nachdenken. Klassische *Knockout*-Studien waren im Falle von *CK2 α* letal und *CK2 α* damit offensichtlich unentbehrlich für die Embryonalentwicklung. Mit der ASKA-Methode könnte die *CK2 α* -Aktivität zu einem späteren Zeitpunkt reduziert werden und so evtl. Auswirkungen auf den Organismus festgestellt werden.

8. Literaturverzeichnis

- [1] Esnouf, R. M. An extensively modified version of MolScript that include greatly enhanced coloring capabilities. *J. Mol. Graph.* **15**, 132–134, 1997
- [2] Merrit, E. A. & Bacon, D. J. Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Methods. Enzymol.* **277**, 505–524, 1997
- [3] DeLano, W. L. *DeLano Scientific*, San Carlos, CA, USA., 2002
- [4] Schomburg, D. & Reichelt, J. BRAGI: a comprehensive protein modeling program system. *J. Mol. Graph.* **6**, 161–165, 1988
- [5] Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242, 2000
- [6] Gavin, A. C., Bösch, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M. *et. al.* Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141–147, 2002
- [7] Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S. L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., *et. al.* Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**, 180–183, 2002
- [8] Nooren, I. M. A. & Thornton, J. M. Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J.* **22**, 3486–3492, 2003
- [9] Nooren, I. M. A., & Thornton, J. M. Structural characterization and functional significance of transient protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* **325**, 991–1018, 2003
- [10] Jones, S. & Thornton, J. M. Principles of protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13–20, 1996
- [11] LoConte, L., Chothia, C. & Janin, J. The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J. Mol. Biol.* **285**, 2177–2198, 1999
- [12] Jones, S. & Thornton, J. M. Protein-protein interactions: a review of protein dimer structures. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **63**, 31–65, 1995
- [13] Carugo, O. & Argos, P. Protein-protein crystal-packing contacts. *Protein Sci.* **6**, 2261–2263, 1997
- [14] Krissinel, E. & Henrick, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797, 2007
- [15] Yang, J., Swaminathan, C. P., Huang, Y., Guan, R., Cho, S., Kieke, M. C., Kranz, D. M., Mariuzza, R. A. & Sundberg, E. J. Dissecting cooperative and additive binding energetics in the affinity maturation pathway of a protein-protein interface. *J. Biol. Chem.* **278**, 12–21, 2003
- [16] Koshland, D. E. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44**, 98–104, 1958
- [17] Ma, B., Kumar, S., Tsai, C. J. & Nussinov, R. Folding funnels and binding mechanisms. *Protein Eng.* **12**, 713–720, 1999

- [18] Lange, O. F., Lakomek, N. A., Farès, C., Schröder, G. F., Walter, K. F. A., Becker, S., Meiler, J., Grubmüller, H., Griesinger, C. & de Groot, B. L. Recognition dynamics up to microseconds revealed from an RDC-derived ubiquitin ensemble in solution. *Science* **320**, 1471–1475, 2008
- [19] Boehr, D. D. & Wright, P. E. How do proteins interact? *Science* **320**, 1429–1430, 2008
- [20] Berg, T. Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit niedermolekularen organischen Molekülen. *Angew. Chem.* **115**, 2566–2586, 2003
- [21] Leonard, C. J., Aravind, L. & Koonin, E. V. Novel families of putative protein kinases in Bacteria and Archaea: Evolution of the “Eukaryotic” Protein Kinase Superfamily. *Genome Res.* **8**, 1038–1047, 1998
- [22] Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912–1934, 2002
- [23] Kostich, M., English, J., Madison, V., Gheysas, F., Wang, L., Qiu, P., Greene, J. & Laz, T. M. Human members of the eukaryotic protein kinase family. *Genome Biol.* **9**, research 0043.1–0043.12, 2002
- [24] Hunter, T. & Plowman G. D. The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 18–22, 1997
- [25] Morrison, D. K., Murakami, M. S. & Cleghon, V. Protein kinases and phosphatases in the Drosophila genome. *J. Cell. Biol.* **150**, F57–F62, 2000
- [26] Plowman, G. D., Sudarsanam, S., Bingham, J., Whyte, D. & Hunter, T. The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: a model for signal transduction in multicellular organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13603–13610, 1999
- [27] Manning, G., Plowman, G. D., Hunter, T. & Sudarsanam, S. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 514–520, 2002
- [28] Hanks, S. K. & Hunter, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576–596, 1995
- [29] Huse, M. & Kuriyan, J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109**, 275–282, 2002
- [30] Pellicena, P. & Kuriyan, J. Protein-protein interactions in the allosteric regulation of protein kinases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 702–709, 2006
- [31] Johnson, L. N., Noble, M. E. & Owen, D. J. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**, 149–158, 1996
- [32] Williams, B. R. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* **18**, 6112–6120, 1999
- [33] Romano, P. R., Garcia-Barrio, M. T., Zhang, X., Wang, Q., Taylor, D. R., Zhang, F., Herring, C., Mathews, M. B., Jun Qin, J. & Hinnebusch, A. G. Autophosphorylation in the activation loop is required for full kinase activity in vivo of human and yeast eukaryotic initiation factor 2 kinases PKR and GCN2. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2282–2297, 1998
- [34] Dar, A. C., Dever, T. E. & Sicheri, F. Higher-order substrate recognition of eIF2 α by the RNA-dependent protein kinase PKR. *Cell* **122**, 887–900, 2005

- [35] Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J. & Pavletich, N. P. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**, 313–320, 1995
- [36] Schlessinger, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* **103**, 211–225, 2000
- [37] Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A. & Kuriyan, J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* **125**, 1137–1149, 2006
- [38] Rosenberg, O. S., Deindl, S., Sung, R. J., Nairn, A. C. & Kuriyan, J. Structure of the autoinhibited kinase domain of CaMKII and SAXS analysis of the holoenzyme. *Cell* **123**, 849–860, 2005
- [39] Traxler, P. & Furet, P. Strategies toward the design of novel and selective protein tyrosine kinase inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **82**, 195–206, 1999
- [40] Liu, Y. & Gray, N. S. Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 358–364, 2006
- [41] Knight, Z. A. & Shokat, K. M. Features of selective kinase inhibitors. *Chem. Biol.* **126**, 621–637, 2005
- [42] Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Del. Rev.* **23**, 3–25, 1997
- [43] Niefind, K., Guerra, B., Ermakowa, I. & Issinger, O.-G. Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J.* **20**, 5320–5331, 2001
- [44] Padmanabha, R., Chen-Wu, J. L., Hanna, D. E. & Glover, C. V. Isolation, sequencing, and disruption of the yeast CKA2 gene: casein kinase II is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4089–4099, 1990
- [45] Lou, D. Y., Dominguez, I., Toselli, P., Landesman-Bollag, E., O'Brien, C. & Seldin, D. C. The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 131–139, 2008
- [46] Qian, X., Gozani, S. N., Yoon, H., Jeon, C. J., Agarwal, K. & Weiss, M. A. Novel zinc finger motif in the basal transcriptional machinery: three-dimensional NMR studies of the nucleic acid binding domain of transcriptional elongation factor TFIIS. *Biochemistry* **32**, 9944–9959, 1993
- [47] Buchou, T., Vernet, M., Blond, O., Jensen, H. H., Pointu, H., Olsen, B. B., Cochet, C., Issinger, O.-G., & Boldyreff, B. Disruption of the regulatory β subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 908–915, 2003
- [48] Bidwai, A. P., Reed, J. C. & Glover, C. V. Cloning and disruption of CKB1, the gene encoding the 38-kDa beta subunit of *Saccharomyces cerevisiae* casein kinase II (CKII). Deletion of CKII regulatory subunits elicits a salt-sensitive phenotype. *J. Biol. Chem.* **270**, 10395–10404, 1995
- [49] Marchiori, F., Meggio, F., Marin, O., Borin, G., Calderan, A., Ruzza, P. & Pinna, L. A. Synthetic peptide substrates for casein kinase 2. Assessment of minimum structural requirements for phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **971**, 332–338, 1988
- [50] Meggio, F. & Pinna, L. A. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.* **17**, 349–368, 2003

- [51] Guerra, B. & Issinger, O.-G. Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis* **20**, 391–408, 1999
- [52] Guerra, B. & Issinger, O.-G. Protein kinase CK2 in human diseases. *Curr. Med. Chem.* **15**, 1870–1886, 2008
- [53] Litchfield, D. W. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem. J.* **369**, 1–15, 2003
- [54] Ahmed, K., Gerber, D. A. & Cochet, C. Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell. Biol.* **12**, 226–230, 2002
- [55] Niefind, K., Guerra, B., Pinna, L. A., Issinger, O.-G. & Schomburg, D. Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays* at 2.1 Å resolution. *EMBO J.* **17**, 2451–2462, 1998
- [56] Niefind, K., Yde, C. W., Ermakova, I. & Issinger, O.-G. 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**, 427–438, 2007
- [57] Niefind, K. & Issinger, O.-G. 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**, 3–14, 2005
- [58] Solyakov, L., Cain, K., Tracey, B. M., Jukes, R., Riley, A. M., Potter, B. V. & Tobin, A. B. Regulation of casein kinase-2 (CK2) activity by inositol phosphates. *J. Biol. Chem.* **279**, 43403–43410, 2004
- [59] Keller, D. M. & Lu, H. p53 serine 392 phosphorylation increases after UV through induction of the assembly of the CK2-hSPT16-SSRP1 complex. *J. Biol. Chem.* **277**, 50206–50213, 2002
- [60] Filhol, O., Martiel, J. L. & Cochet, C. Protein kinase CK2: a new view of an old molecular complex. *EMBO J.* **5**, 351–355, 2004
- [61] Bosc, D. G., Graham, G. C., Saulnier, R. B., Zhang, C., Prober, D., Gietz R. D. & Litchfield, D. W. Identification and characterization of CKIP-1, a novel pleckstrin homology domain-containing protein that interacts with protein kinase CK2. *J. Biol. Chem.* **275**, 14295–14306, 2000
- [62] Zhang, C., Vilc, G., Canton, D. A. & Litchfield, D. W. Phosphorylation regulates the stability of the regulatory CK2 subunit. *Oncogene* **21**, 3754–3764, 2002
- [63] Bibby, A. C., & Litchfield, D. W. The multiple personalities of the regulatory subunit of protein kinase CK2: CK2 dependent and CK2 independent roles reveal a secret identity for CK2 α . *Int. J. Biol. Sci.* **1**, 67–79, 2005
- [64] Bidwai, A. P., Reed, J. C. & Glover, C. V. Phosphorylation of calmodulin by the catalytic subunit of casein kinase II is inhibited by the regulatory subunit. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 265–270, 1993
- [65] Ospina, B., Núñez, A. & Fernández-Renart, M. Purification of a soluble casein kinase II from *Dictyostelium discoideum* lacking the β subunit: regulation during proliferation and differentiation. *Mol. Cell. Biochem.* **118**, 49–60, 1992

- [66] Stigare, J., Buddelmeijer, N., Pigon, A. & Egyhazi, E. A majority of casein kinase II α subunit is tightly bound to intranuclear components but not to the β subunit. *Mol. Cell. Biochem.* **129**, 77–85, 1993
- [67] Guerra, B., Siemer, S., Boldyreff, B. & Issinger, O.-G. 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**, 353–357, 1999
- [68] Filhol, O., Nueda, A., Martel, V., Gerber-Scokaert, D., Benitez, M. J., Souchier, C., Saoudi, Y. & Cochet, C. Live cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual subunits. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 975–987, 2003
- [69] Guerra, B., Issinger, O.-G. & Wang, J. Y. Modulation of human checkpoint kinase Chk1 by the regulatory β -subunit of protein kinase CK2. *Oncogene* **22**, 4933–4942, 2003
- [70] Boldyreff, B. & Issinger, O.-G. A-Raf kinase is a new interacting partner of protein kinase CK2 beta subunit. *FEBS Lett.* **403**, 197–199, 1997
- [71] Hagemann, C., Kalmes, A., Wixler, V., Wixler, L., Schuster, T. & Rapp, U. R. The regulatory subunit of protein kinase CK2 is a specific A-Raf activator. *FEBS Lett.* **403**, 200–202, 1997
- [72] Chen, M., Li, D., Krebs, E. G. & Cooper, J. A. The casein kinase II β subunit binds to Mos and inhibits Mos activity. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1904–1912, 1997
- [73] Niefind, K., Pütter, M., Guerra, B., Issinger, O.-G. & Schomburg, D. GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 1100–1103, 1999
- [74] Chardot, T., Shen, H. & Meunier, J. C. Dual specificity of casein kinase II from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *C. R. Acad. Sci. III* **318**, 937–942, 1995
- [75] Glover, C. V. A filamentous form of *Drosophila* casein kinase II. *J. Biol. Chem.* **261**, 14349–14354, 1986
- [76] Valero, E., De Bonis, S., Filhol, O., Wade, R. H., Langowski, J., Chambaz, E. M. & Cochet, C. Quaternary structure of casein kinase 2. Characterization of multiple oligomeric states and relation with its catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 8345–8352, 1995
- [77] Yang-Feng, T. L., Naiman, T., Kopatz, I., Eli, D., Dafni, N. & Canaani, D. Assignment of the human casein kinase II alpha' subunit gene (CSNK2A1) to chromosome 16p13.2–p13.3. *Genomics* **19**, 173, 1994
- [78] Ackermann, K., Neidhart, T., Gerber, J., Waxmann, A. & Pyerin, W. The catalytic subunit alpha' gene of human protein kinase CK2 (CSNK2A2): genomic organization, promoter identification and determination of Ets1 as a key regulator. *Mol. Cell. Biochem.* **274**, 91–101, 2005
- [79] Xu, X., Toselli, P. A., Russell, L. D. & Seldin, D. C. Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit. *Nat. Genet.* **23**, 118–121, 1999
- [80] Olsen, B. B., Boldyreff, B., Niefind, K. & Issinger, O.-G. Purification and characterization of the CK2alpha'-based holoenzyme, an isozyme of CK2alpha: a comparative analysis. *Protein Expr. Purif.* **47**, 651–661, 2006

- [81] St-Denis, N. A., Derksen, D. R. & Litchfield, D. W. Evidence for regulation of mitotic progression through temporal phosphorylation and dephosphorylation of CK2 α . *Mol. Cell. Biol.* **29** 2068–2081, 2009
- [82] Litchfield, D. W., Luscher, B., Lozeman, F. J., Eisenman, R. N. & Krebs, E. G. Phosphorylation of casein kinase II by p34cdc2 in vitro and at mitosis. *J. Biol. Chem.* **270**, 25872–25878, 1995
- [83] Battistutta, R., De Moliner, E., Sarno, S., Zanotti, G. & Pinna, L. A. Structural features underlying selective inhibition of protein kinase CK2 by ATP site-directed tetrabromo-2-benzotriazole. *Protein Science* **10**, 2200–2206, 2001
- [84] Zandomeni, R. & Weinmann, R. Inhibitory effect of 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole on a protein kinase. *J. Biol. Chem.* **259**, 14804–14811, 1984
- [85] Moro, S., Varano, F., Cozza, G., Pagano, M. A., Zagotto, G., Chilin, A., Guiotto, A., Catarzi, D., Calotta, V. & Pinna, L. A. Pyrazoloquinazoline tricyclic system as novel scaffold to design new kinase CK2 inhibitors. *Lett. Drug Des. Discovery* **3**, 281–284, 2006
- [86] Füllbeck, M., Huang, X., Dumdey, R., Frommel, C., Dubiel, W. & Preissner, R. Novel curcumin- and emodin-related compounds identified by in silico 2D/3D conformer screening induce apoptosis in tumor cells. *BMC Cancer* **5**, 97, 2005
- [87] Battistutta, R., Sarno, S., De Moliner, E., Papinutto, E., Zanotti, G. & Pinna, L. A. The replacement of ATP by the competitive inhibitor emodin induces conformational modifications in the catalytic site of protein kinase CK2. *J. Biol. Chem.* **275**, 29618–29622, 2000
- [88] Laudet, B., Barrette, C., Dulery, V., Renaudet, O., Dumy, P., Metz, A., Prudent, R., Deshiere, A., Dideberg, O., Filhol, O. & Cochet, C. Structure-based design of small peptide inhibitors of protein kinase CK2 subunit interaction. *Biochem. J.* **408**, 363–373, 2007
- [89] Laudet, B., Moucadel, V., Prudent, R., Filhol, O., Wong, Y.-S., Royer, D. & Cochet, C. Identification of chemical inhibitors of protein-kinase CK2 subunit interaction. *Mol. Cell. Biochem.* **316**, 63–69, 2008
- [90] Ermakova, I., Boldyreff, B., Issinger, O.-G. & Niefind, K. Crystal structure of a C-terminal deletion mutant of human protein kinase CK2 catalytic subunit. *J. Mol. Biol.* **330**, 925–934, 2003
- [91] Drenth, J. Principles of Protein X-Ray Crystallography, **2. Auflage** ISBN 0387985875, 1999
- [92] Jancarik, J. & Kim, S.-H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.* **24**, 409–411, 1991
- [93] Matthews, B. W. Solvent content of proteins. *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497, 1968
- [94] Massa, W. Kristallstrukturbestimmung, **4. Auflage** ISBN 3519335271, 2005
- [95] Bragg, W. H. & Bragg, W. L. The reflection of X-rays by crystals. *Proc. Roy. Soc. (London) A* **88**, 428–438, 1913
- [96] Ewald P. P. Zur Theorie der Interferenzen der Röntgenstrahlen in Kristallen. *Physik. Z.* **14**, 465–472, 1913
- [97] Patterson, A. L. A fourier series method for the determination of the components of interatomic distances in crystals. *Phys. Rev.* **46**, 372–376, 1934

- [98] Rossmann, M. G. & Blow, D. M. The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst.* **15**, 24–31, 1962
- [99] Jones, T. A., Zou, J.-Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. Improved methods for building protein models in electron density maps and location of errors in these models. *Acta. Cryst. A* **47**, 110–119, 1991
- [100] Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst. D* **60**, 2126–2132, 2004
- [101] Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283–291, 1993
- [102] Holdgate, G. A. Making cool drugs hot: Isothermal titration calorimetry as a tool to study binding energetics. *BioTechniques* **30**, 164–184, 2001
- [103] Cooper, A., Nutley, M. A. & Wadood, A. Differential scanning microcalorimetry in Harding, S. E. & Chowdhry, B. Z (Eds.). Protein-ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry. *Oxford University Press*, 287–318, 2000
- [104] Collaborative Computing Project, Number 4. CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst. D* **50**, 760–763, 1994
- [105] Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. Crystallography & NMR System (CNS), a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst. D* **54**, 905–921, 1998
- [106] Otwinowski, Z. & Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307–326, 1997
- [107] Studier, F. W., Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130, 1986
- [108] Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580, 1983
- [109] Voet, D., Voet, J. & Pratt, C. Lehrbuch der Biochemie *Wiley VCH*, ISBN 3-527-30519-X, 2002
- [110] Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463–5467, 1997
- [111] 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**, 248–254, 1976
- [112] Boldyreff, B., Meggio, F., Pinna, L. A. & Issinger, O.-G. Reconstitution of normal and hyperactivated forms of casein kinase-2 by variably mutated beta subunits. *Biochemistry* **32**, 12672–12677, 1993
- [113] Yim, H., Lee, Y. H., Lee, C. H. & Lee, S. K. 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**, 9–13, 1999

- [114] De Moliner, E., Moro, S., Sarno, S., Zagotto, G., Zanotti, G., Pinna, L. A. & Battistutta, R. Inhibition of protein kinase CK2 by anthraquinone-related compounds a structural insight. *J. Biol. Chem.* **278**, 1831–1836, 2003
- [115] Sarno, S., Ruzzene, M., Frascella, P., Pagano, M. A., Meggio, F., Zambon, A., Mazzorana, M., Di Maira, G., Lucchini, V. & Pinna, L. A. Development and exploitation of CK2 inhibitors. *Mol. Cell. Biochem.* **274**, 69–76, 2005
- [116] Niefind, K. 50 Jahre Proteinkinase CK2 - ein Beitrag zur Strukturbiologie eukaryontischer Proteinkinasen *Habilitationsschrift*, 2004, urn:nbn:de:hbz:38-18600
- [117] Schüttelkopf, A. W. & van Aalten, D. M. F. PRODRG a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Cryst. D* **60**, 1355–1363, 2004
- [118] Raaf, J., Klopffleisch, K., Issinger, O.-G., & Niefind, K. 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**, 1–8, 2008
- [119] Raaf, J., Brunstein, E., Issinger O.-G. & Niefind, K. The CK2 α /CK2 β interface of human protein kinase CK2 harbors a binding pocket for small molecules. *Chem. Biol.* **15**, 111–117, 2008
- [120] Panjikar, S., Parthasarathy, V., Lamzin, V. S., Weiss, M. S. & Tucker, P. A. Auto-Rickshaw - an automated crystal structure determination platform as an efficient tool for the validation of an X-ray diffraction experiment. *Acta Cryst. D* **61**, 449–457, 2005
- [121] Perrakis, A., Morris, R. M. & Lamzin, V. S. Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 458–463, 1999
- [122] Yde, C. W., Ermakova, I., Issinger, O.-G. & Niefind, K. 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**, 399–414, 2005
- [123] Raaf, J., Issinger, O.-G. & Niefind, K. First inactive conformation of CK2 α , the catalytic subunit of protein kinase CK2. *J. Mol. Biol.* **386**, 1212–1221, 2009
- [124] Goldberg, R. N., Kishore, N. & Lennen, R. M. Thermodynamic Quantities for the Ionization Reactions of Buffers. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **31**, 231–370, 2002
- [125] Issinger, O.-G., Brockel, C., Boldyreff, B. & Pelton, J. T. Characterization of the α and β subunits of casein kinase 2 by far-UV CD spectroscopy. *Biochemistry* **31**, 6098–6103, 1992
- [126] Cornish-Bowden, A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. *Biochem. J.* **137**, 143–144, 1974
- [127] Olsen, B. B., Bjørling-Poulsen, M. & Guerra, B. Emodin negatively affects the phosphoinositide 3-kinase/AKT signalling pathway: a study on its mechanism of action. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **39**, 227–237, 2007
- [128] Battistutta, R., Mazzorana, M., Cendron, L., Bortolato, A., Sarno, S., Kazimierczuk, Z., Zanotti, G., Moro, S. & Pinna, L. A. The ATP-binding site of protein kinase CK2 holds a positive electrostatic area and conserved water molecules. *Chembiochem.* **8**, 1804–1809, 2007

- [129] Nayal, M. & Honig, B. On the nature of cavities on protein surfaces: application to the identification of drug-binding sites. *Proteins* **63**, 892–906, 2006
- [130] Müller-Dieckmann, C., Panjekar, S., Schmidt, A., Müller, S., Kuper, J., Geerlof, A., Wilmanns, M., Singh, R. K., Tucker, P. A. & Weiss, M. S. On the routine use of soft X-rays in macromolecular crystallography. Part IV. Efficient determination of anomalous substructures in biomacromolecules using longer X-ray wavelengths. *Acta Cryst. D* **63**, 366–380, 2007
- [131] Raaf, J., Issinger, O.-G. & Niefind, K. Insights from soft X-rays: the chlorine and sulfur sub-structures of a CK2 α /DRB complex. *Mol. Cell. Biochem.* **316**, 15–23, 2008
- [132] Zheng, J., Trafny, E. A., Knighton, D. R., Xuong, N., Taylor, S. S., Ten Eyck, L. F. & Sowadski, J. M. 2.2 Å refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor. *Acta Cryst. D* **49**, 362–365, 1993
- [133] Battistutta, R., Mazzorana, M., Sarno, S., Kazimierczuk, Z., Zanotti, G. & Pinna, L. A. Inspecting the structure-activity relationship of protein kinase CK2 inhibitors derived from tetrabromobenzimidazole. *Chem. Biol.* **12**, 1211–1219, 2005
- [134] Sarno, S., Boldyreff, B., Marin, O., Guerra, B., Meggio, F., Issinger, O.-G. & Pinna, L. A. Mapping the residues of protein kinase CK2 implicated in substrate recognition: mutagenesis of conserved basic residues in the alpha-subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **206**, 171–179, 1995
- [135] Sarno, S., Vaglio, P., Meggio, F., Issinger, O.-G. & Pinna, L. A. Protein kinase CK2 mutants defective in substrate recognition. Purification and kinetic analysis. *J. Biol. Chem.* **271**, 10595–10601, 1996
- [136] Sarno, S., Vaglio, P., Marin, O., Issinger, O.-G., Ruffato, K. & Pinna, L. A. Mutational analysis of residues implicated in the interaction between protein kinase CK2 and peptide substrates. *Biochemistry* **36**, 11717–11724, 1997
- [137] Sarno, S., Vaglio, P., Cesaro, L., Marin, O. & Pinna, L. A. A multifunctional network of basic residues confers unique properties to protein kinase CK2. *Mol. Cell. Biochem.* **191**, 13–19, 1999
- [138] Allende, J. E. & Allende, C. C. Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J.* **9**, 313–323, 1995
- [139] Welburn, J. P., Tucker, J. A., Johnson, T., Lindert, L., Morgan, M., Willis, A., Noble, M. E. & Endicott, J. A. How tyrosine 15 phosphorylation inhibits the activity of cyclin-dependent kinase 2-cyclin A. *J. Biol. Chem.* **282**, 3173–3181, 2007
- [140] Sandholt, I. S., Olsen, B. B., Guerra, B. & Issinger, O.-G. Resorufin: a lead for a new protein kinase CK2 inhibitor. *Anticancer Drugs*, **20**, 238–248, 2009
- [141] Niefind, K., Raaf, J. & Issinger, O.-G. Protein kinase CK2 – from structures to insights. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 1800–1816, 2009
- [142] Kannan, N. & Neuwald, A. F. Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2 α . *Protein Sci.* **13**, 2059–2077, 2004
- [143] Martel, V., Filhol, O., Nueda, A. & Cochet, C. Dynamic localization/association of protein kinase CK2 subunits in living cells: a role in its cellular regulation? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **973**, 272–277, 2002

-
- [144] Raaf, J., Brunstein, E., Issinger, O.-G. & Niefind, K. The interaction of CK2 α and CK2 β , the subunits of protein kinase CK2, requires CK2 β in a pre-formed conformation and is enthalpically driven. *Protein Sci.* **17**, 2180–2186, 2008
- [145] Dobrowolska, G., Meggio, F., Szczegieliak, J., Muszynska, G. & Pinna, L. A. Purification and characterization of maize seedling casein kinase IIB, a monomeric enzyme immunologically related to the α subunit of animal casein kinase-2. *Eur. J. Biochem.* **204**, 299–303, 1992
- [146] Klopffleisch, K. Strukturbiologische Untersuchung von CK2 in Anwesenheit von kleinen organischen Molekülen. *Diplomarbeit*, 2008
- [147] Allende, C. C. & Allende, J. E. Promiscuous subunit interactions: a possible mechanism for the regulation of protein kinase CK2. *J. Cell. Biochem.* **30/31**, 129–136, 1998
- [148] Messenger, M. M., Saulnier, R. B., Gilchrist, A. D., Diamond, P., Gorbsky, G. J. & Litchfield, D. W. Interactions between protein kinase CK2 and Pin1. Evidence for phosphorylation-dependent interactions. *J. Biol. Chem.* **277**, 23054–23064, 2002
- [149] Bishop, A. C., Ubersax, J. A., Petsch, D. T., Matheos, D. P., Gray, N. S., Blethrow, J., Shimizu, E., Tsien, J. Z., Schultz, P. G., Rose, M. D., Wood, J. L., Morgan, D. O. & Shokat, K. M. A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature* **407**, 395–401, 2000

9. Anhang

9.1 Thermodynamische Größen aus den ITC-Messungen

In der folgenden Tabelle sind die bei den ITC-Experimenten ermittelten thermodynamischen Größen aufgelistet. Bei der Berechnung wurde eine Stöchiometrie von 2 angenommen (ein CK2 β -Dimer bindet zwei CK2 α -Monomere. Es wurden jeweils drei Messungen durchgeführt und Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Tabelle 9.1: Ergebnisse der ITC-Messungen

Temperaturabhängigkeit der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/hsCK2 β ¹⁻¹⁹³*-Wechselwirkung

Temperatur (°C)	K_b (in M ⁻¹)	K_D (in nM)	ΔG° (in J/mol)	ΔH° (in J/mol)	ΔS° [in J/(mol*K)]
35	$1,76 \cdot 10^8 \pm 4,28 \cdot 10^7$	$5,68 \pm 1,67$	-48618 ± 678	-83191 ± 1701	$-112,25 \pm 3,89$
30	$3,41 \cdot 10^8 \pm 4,10 \cdot 10^7$	$2,78 \pm 0,36$	-49497 ± 303	-80793 ± 1706	$-103,29 \pm 6,49$
25	$3,20 \cdot 10^8 \pm 6,99 \cdot 10^7$	$3,48 \pm 0,81$	-48518 ± 586	-71114 ± 665	$-75,83 \pm 4,23$
20	$2,71 \cdot 10^8 \pm 9,15 \cdot 10^7$	$4,62 \pm 1,65$	-47304 ± 928	-63833 ± 2259	$-56,41 \pm 5,38$

Abhängigkeit der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/hsCK2 β ¹⁻¹⁹³*-Wechselwirkung von der Ionisierungsenthalpie des Puffers

Puffer	K_b (in M ⁻¹)	K_D (in nM)	ΔG° (in J/mol)	ΔH° (in J/mol)	ΔS° [in J/(mol*K)]
Tris	$1,86 \cdot 10^8 \pm 6,71 \cdot 10^7$	$5,37 \pm 1,78$	-48764 ± 871	-82941 ± 4351	$-110,96 \pm 16,60$
HEPES	$1,93 \cdot 10^8 \pm 1,34 \cdot 10^8$	$5,17 \pm 3,32$	-48858 ± 1625	-82215 ± 4426	$-109,51 \pm 17,76$
PIPES	$1,71 \cdot 10^8 \pm 7,35 \cdot 10^7$	$5,85 \pm 2,44$	-48543 ± 1053	-90151 ± 5696	$-135,57 \pm 21,87$

pH-Abhängigkeit der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/hsCK2 β ¹⁻¹⁹³*-Wechselwirkung

pH-Wert (bei 35 °C)	K_b (in M ⁻¹)	K_D (in nM)	ΔG° (in J/mol)	ΔH° (in J/mol)	ΔS° [in J/(mol*K)]
pH 7,4	$1,86 \cdot 10^8 \pm 6,71 \cdot 10^7$	$5,37 \pm 1,78$	-48764 ± 871	-82941 ± 4351	$-110,96 \pm 16,60$
pH 7,8	$1,47 \cdot 10^8 \pm 5,42 \cdot 10^7$	$6,80 \pm 3,54$	-48157 ± 1096	-89621 ± 2040	$-134,62 \pm 8,88$
pH 8,2	$1,77 \cdot 10^8 \pm 4,85 \cdot 10^7$	$5,66 \pm 1,95$	-48627 ± 778	-93819 ± 4911	$-146,73 \pm 17,27$
pH 8,5	$1,76 \cdot 10^8 \pm 4,28 \cdot 10^7$	$5,68 \pm 1,67$	-48618 ± 678	-83191 ± 1701	$-112,25 \pm 3,89$
pH 9,0	$2,33 \cdot 10^8 \pm 1,16 \cdot 10^8$	$4,29 \pm 2,41$	-49336 ± 1287	-89022 ± 6840	$-128,85 \pm 26,27$

Temperaturabhängigkeit der *hsCK2 α ¹⁻³³⁵/hsCK2 β ¹⁻²⁰⁸*-Wechselwirkung

Temperatur (°C)	K_b (in M ⁻¹)	K_D (in nM)	ΔG° (in J/mol)	ΔH° (in J/mol)	ΔS° [in J/(mol*K)]
35	$2,05 \cdot 10^8 \pm 1,31 \cdot 10^8$	$4,88 \pm 3,80$	-49009 ± 1664	-122828 ± 269	$-239,67 \pm 4,81$
30	$2,05 \cdot 10^8 \pm 7,91 \cdot 10^7$	$4,89 \pm 1,74$	-48209 ± 916	-115911 ± 174	$-223,44 \pm 2,45$
25	$1,81 \cdot 10^8 \pm 9,90 \cdot 10^7$	$5,52 \pm 2,75$	-47109 ± 1249	-103289 ± 2490	$-188,52 \pm 12,01$
20	$1,84 \cdot 10^8 \pm 4,27 \cdot 10^7$	$5,44 \pm 1,19$	-46353 ± 545	-89482 ± 3803	$-147,19 \pm 11,10$

hsCK2 β ¹⁻¹⁹³ in Wechselwirkung mit *hsCK2 α ¹⁻³³⁵* Punktmutanten

Mutante (bei 20 °C)	K_b (in M ⁻¹)	K_D (in nM)	ΔG° (in J/mol)	ΔH° (in J/mol)	ΔS° [in J/(mol*K)]
<i>hsCK2α¹⁻³³⁵</i>	$2,71 \cdot 10^8 \pm 9,15 \cdot 10^7$	$4,62 \pm 1,65$	-47304 ± 928	-63833 ± 2259	$-56,51 \pm 5,38$
<i>hsCK2α^{1-335, Leu41Ala}</i>	$5,38 \cdot 10^8 \pm 1,40 \cdot 10^9$	$185,87 \pm 50,07$	-37753 ± 641	-26564 ± 9745	$38,19 \pm 35,44$
<i>hsCK2α^{1-335, Ile69Ala}</i>	$6,95 \cdot 10^7 \pm 1,83 \cdot 10^7$	$12,38 \pm 4,72$	-43988 ± 709	-68269 ± 4315	$-82,87 \pm 15,41$

9.2 Entfaltungstemperaturen aus den DSC-Messungen

In nachfolgender Tabelle sind die mit DSC-Messungen bestimmten Entfaltungstemperaturen (T_m) der verschiedenen CK2-Konstrukte aufgelistet. Da sich alle Proteine irreversibel entfalteten, konnten die die Änderung der Wärmekapazität ΔC_p , die Enthalpie ΔH° und die van't Hoff Enthalpie ΔH°_{vH} nicht bestimmt werden. Es wurde jeweils der Mittelwert von den unabhängigen Messungen gebildet und die Standardabweichung berechnet.

Tabelle 9.2: Ergebnisse der DSC-Messungen

Protein	T_m 1(°C)	T_m 2(°C)
<i>hsCK2</i> α ¹⁻³³⁵	45,6 ± 0,2	
<i>hsCK2</i> α ¹⁻³⁵⁵	45,2 ± 0,2	
<i>hsCK2</i> α/α' -Chimäre	46,3 ± 0,2	
<i>hsCK2</i> α ^{1-335, Leu41Ala}	40,0 ± 0,6	
<i>hsCK2</i> α ^{1-335, Leu41Ala, Val42Ala}	36,5 ± 1,2	
<i>hsCK2</i> α ^{1-335, Ile69Ala}	41,3 ± 0,6	
<i>hsCK2</i> β ¹⁻¹⁹³	60,6 ± 0,2	
<i>hsCK2</i> β ¹⁻²⁰⁸	58,5 ± 0,2	
<i>hsCK2</i> α ¹⁻³³⁵ / <i>hsCK2</i> β ¹⁻¹⁹³	54,7 ± 0,1	60,2 ± 0,2
<i>hsCK2</i> α ¹⁻³³⁵ / <i>hsCK2</i> β ¹⁻²⁰⁸	56,2 ± 0,5	59,7 ± 0,3
<i>hsCK2</i> α ¹⁻³⁵⁵ / <i>hsCK2</i> β ¹⁻²⁰⁸	55,3 ± 0,1	59,8 ± 0,1
<i>hsCK2</i> α/α' -Chimäre/ <i>hsCK2</i> β ¹⁻²⁰⁸	57,3 ± 0,3	
<i>hsCK2</i> α ¹⁻³³⁵ / <i>hsCK2</i> β ¹⁻¹⁹³ + 30 μ M DRB	52,8 ± 0,5	59,8 ± 0,2
<i>hsCK2</i> α ¹⁻³³⁵ / <i>hsCK2</i> β ¹⁻²⁰⁸ + 30 μ M DRB	54,3 ± 0,3	58,5 ± 0,3

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 6 angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von PD Dr. Karsten Niefind betreut worden.

(Jennifer Raaf)

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Jennifer Raaf
Geburtstag: 29. Januar 1982
Geburtsort: Frechen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: Robert-Koch-Straße 2,
50226 Frechen

Schulische Ausbildung

August 1988 – Juni 1992 Grundsschule, Lindenschule Frechen
August 1992 – Juni 2001 Gymnasium der Stadt Frechen

Studium

WS 2001 – SS 2006 Universität zu Köln, Mathematisch-
Naturwissenschaftliche Fakultät,
Fachbereich Biologie
Diplomarbeit: Vergleich der metabolischen Profile von enzymgen-
unterbrechenden Transposonmutanten des
Corynebacterium glutamicum und ihren zugehörigen
Deletionsmutanten

Promotion

SS2006 – heute Universität zu Köln, Mathematisch-
Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Biochemie
Dissertation: Molekulare Interaktionen der Proteinkinase CK2
und ihrer Untereinheiten

Köln, 4. Mai 2009

Jennifer Raaf