

Untersuchung der Quartärstruktur der
Proteinkinase CK2:
Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung
der CK2 α / β -Interaktion sowie von Hemmstoffen
dieser Protein-Protein-Wechselwirkung

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Miriam Lauwers

aus Bonn

Köln

2023

Berichterstatter: Prof. Dr. Karsten Niefind
(Gutachter) Prof. Dr. Jan Riemer

Tag der mündlichen Prüfung: 01.06.2023

Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere Dr. Markus Pietsch und Prof. Dr. Karsten Niefind für die Betreuung der Arbeit sowie Prof. Dr. Mats Paulsson und Prof. Dr. Jan Riemer für die Beratung im Rahmen meines Thesis Advisory Committee. Außerdem danke ich den Mitarbeiter*innen der Arbeitsgruppen Pietsch und Matthes am Zentrum für Pharmakologie der Uniklinik Köln und der AG Niefind am Institut für Biochemie an der Universität zu Köln, besonders Dr. Christoph Hauser, Paul Sommerfeld, Dr. Michaela Steinkrüger, Vera Wiesmüller, Cora Fried, Sarah Salamon, Dr. Jenni Hochscherf und Dirk Lindenblatt.

Ich danke der Graduate School for Biological Sciences (GSfBS) und dem Graduate Program in Pharmacology and Experimental Therapeutics. Dank geht auch an die Protein Interaction Platform Cologne (PIPC) und Dr. Jan Gebauer für das Ermöglichen der Messungen der Fluoreszenzspektren und an die DFG für die finanzielle Unterstützung des Projekts (PI806/2-2, Struktur-Funktionsbeziehungen der Proteinkinase CK2).

Außerdem danke ich Dominik Schwark und meinen Eltern, Maria Luise Regh und Dr. Paul Lauwers.

Abkürzungsverzeichnis

ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung
ATP	Adenosintriphosphat
CML	Chronische myeloische Leukämie
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Eppstein-Barr Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
Engl.	Englisch
EPK	Eukaryotische Proteinkinasen, eukaryotic protein kinases
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GFP	Green fluorescent protein
GTP	Guanosintriphosphat
HTS	High throughput screening
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITC	Isothermal titration calorimetry
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
MST	Microscale Thermophoresis
MW	Molecular weight, Molekulargewicht
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nPAGE	native Polyacrylamid Gelelektrophorese
NTA	Nitrilotriessigsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDB	Protein data base
Pin1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid

Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma kinase
RFP	Red fluorescent protein
Rpm	Revolutions per minute
SDS	Sodium dodecylsulfate
SEM	Standard error of the mean
SPR	Surface plasmon resonance
TBS	Tris bufferd saline

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur der CK2 α	3
Abbildung 2: CK2 Holoenzym.....	5
Abbildung 3: Strukturen von ATP-kompetitiven CK2-Hemmstoffen	11
Abbildung 4: Hemmstoffe der CK2 α / β -Interaktion. Pc, W16 und CAM187.....	12
Abbildung 5: CK2-Inhibitoren mit verschiedenen Wirkungsweisen	13
Abbildung 6: ITC Messung der CK2 α / β -Interaktion	16
Abbildung 7: MST-Datenerhebung	20
Abbildung 8: Typischer Kapillarenskan einer MST-Messung	21
Abbildung 9: Anregungs- und Emissionsspektren verschiedener Fluorophore	23
Abbildung 10: Coomassiegefärbte SDS-PAGE der aufgereinigten Proteine	29
Abbildung 11: Herstellung der fluoreszenten Proteine	30
Abbildung 12: Chromatogramm der Aufreinigung von mCherry mit Strep-Tactin-Affinitätschromatographie	31
Abbildung 13: Aufreinigung von mCherry	31
Abbildung 14: Gelfiltration von mCherry	32
Abbildung 15: Aufreinigung von mCherry-CK2 β ¹⁻¹⁹³	33
Abbildung 16: Aufreinigung von EGFP mit Strep-Tactin-Affinitätschromatographie.....	34
Abbildung 17: Aufreinigung von EGFP-CK2 α ¹⁻³³⁵	34
Abbildung 18: MST-Messung der CK2 α / β Interaktion ohne und mit dem Hemmstoff WMS66-12.....	35
Abbildung 19: Strukturen der Podophyllotoxin-Indol-Analoga WMS66-08, WMS66-10 bis -20, -36, -37, -40 und -41	36
Abbildung 20: Strukturen der Podophyllotoxin-Indol-Analoga WMS66-21 bis -33	37
Abbildung 21: Strukturen der Podophyllotoxin-Indol-Analoga WMS66-34, -35, -38, -39 und -42	37
Abbildung 22: Darstellung von Proteininteraktionen mittels coomassie-gefärbter nativer PAGE.....	40
Abbildung 23: Quantifizierung der Bindung zwischen EGFP-CK2 α ¹⁻³³⁵ und bzw. CK2 α ¹⁻³³⁵ mit mCherry-CK2 β ¹⁻¹⁹³ mittels nativer PAGE	41
Abbildung 24: Messung der Interaktion von EGFP-CK2 α ¹⁻³³⁵ und EGFP mit CK2 β ¹⁻¹⁹³ mittels MST	42
Abbildung 25: Fluoreszenzspektren von 20 nM EGFP-CK2 α ¹⁻³³⁵ mit steigenden Konzentrationen von mCherry-CK2 β ¹⁻¹⁹³	43
Abbildung 26: Bestimmung des K_D -Wertesbestimmung für die Interaktion von EGFP-CK2 α ¹⁻³³⁵ und mCherry-CK2 β ¹⁻¹⁹³ mit dem FRET-Assay.....	43
Abbildung 27: IC ₅₀ Bestimmung für die Hemmung der Interaktion zwischen EGFP-CK2 α ¹⁻³³⁵ und mCherry-CK2 β ¹⁻¹⁹³ durch unmarkierte CK2 β ¹⁻¹⁹³ und den Peptidinhibitor I-Pc, analysiert mit dem FRET-Assay.....	44
Abbildung 28: IC ₅₀ Bestimmung für die Hemmung der Interaktion zwischen EGFP-CK2 α ¹⁻³³⁵ und mCherry-CK2 β ¹⁻¹⁹³ durch ARC3140 mit dem FRET-Assay	45

Abbildung 29: Cyanin3–CK2 β^{1-193} –Fluoreszenz bei Zugabe von CK2 α^{1-335}	45
Abbildung 30: Strukturformeln der Fluoreszenten Farbstoffe	46
Abbildung 31: MST– und Fluoreszenzmessungen mit Fluorescein–Markierter CK2 β^{1-193} mit CK2 α^{1-335}	46
Abbildung 32: Messung der Fluoreszenzintensität von 20 nM Cyanin3–CK2 β^{1-193}	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inhibitionsmessungen der Podophyllotoxin-Indol-Analoga der WMS-Reihe	38
Tabelle 2: Verwendete Testsubstanzen	57
Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen.	57
Tabelle 4: Verwendete Geräte	58
Tabelle 5: Verwendete Software	58
Tabelle 6: Verwendete Plasmide zur Proteinexpression	59
Tabelle 7: Rezept zur Herstellung von SDS-Acrylamid Gelen	62
Tabelle 8: Antikörper, verwendet die für die Visualisierung von Western Blots	63
Tabelle 9: Parameter zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen.....	63
Tabelle 10: Rezept zur Herstellung von nativen Acrylamid-Gelen.....	64
Tabelle 11: Kanäle und Wellenlängen der FRET-Punktmessungen	66
Tabelle 12: Dissoziationskonstanten K_D , K_D' und K_i für die Podophyllotoxin-Indol-Analoga	103

Zusammenfassung

Die Proteinkinase CK2 ist für die Entwicklung und das Überleben aller Eukaryoten von großer Bedeutung und spielt außerdem in verschiedenen Krankheitsbildern, insbesondere in verschiedenen Tumoren, eine entscheidende Rolle. Ein wichtiger Aspekt ihrer Aktivität ist das Zusammenspiel ihrer Untereinheiten: Die katalytischen Untereinheiten CK2 α und CK2 α' können für sich oder an die regulative CK2 β gebunden vorkommen und verändern je nach Bindungszustand ihre Substratspezifität und andere Eigenschaften, wie Thermostabilität und die Fähigkeit, Membranen zu penetrieren. CK2 β kann darüber hinaus auch an einige andere Proteinkinasen binden.

Aufgrund ihrer Bedeutung im onkologischen Bereich gibt es reges Interesse an der Entwicklung von CK2-Hemmstoffen. Dabei ist die Entwicklung von Hemmstoffen für die CK2 α/β -Interaktion ein vielversprechender Ansatz, da diese Hemmstoffe das Potential haben, sehr spezifisch CK2 zu hemmen. Dies ist sowohl für die Erforschung der CK2 α/β -Interaktion von Vorteil als auch in der klinischen Anwendung, wo solche Hemmstoffe potenziell weniger unerwünschte Effekte durch die Hemmung anderer Proteinkinasen entwickeln. Es gibt bereits eine Reihe CK2 α/β -Interaktionshemmer auf peptidischer Basis, andererseits sind nur wenige kleine, nichtpeptidische Moleküle bekannt, die diese Interaktion hemmen.

Für die Erforschung von Hemmstoffen, also auch CK2 α/β -Interaktionsinhibitoren, sind Hochdurchsatz-Screenings mit vielen tausenden Substanzen von großer Bedeutung. Um solche Screenings durchführen zu können, werden geeignete Methoden benötigt; diese müssen in Mikrotiterplatten-Formaten durchführbar sein und sind idealerweise weitgehend automatisierbar. Für die CK2 α/β -Interaktion gibt es bisher nur einen solchen Assay. Dieser Fluoreszenzanisotropie-basierte Assay bildet jedoch nicht die gesamte CK2 α/β -Bindungsstelle ab und hat daher nur begrenzte Aussagekraft für die Aktivität von Hemmstoffen in der Praxis.

In dieser Arbeit wurde eine Reihe von Hemmstoffen der CK2 α/β -Interaktion auf ihre Aktivität untersucht mit der Absicht, diese durch die Feststellung von Struktur-Aktivitätsbeziehungen zu optimieren. Mittels *Microscale Thermophoresis* (MST) wurde für sämtliche Substanzen der WMS66-Reihe untersucht, inwieweit sie die CK2 α/β -Interaktion hemmen. Dazu wurde die Dissoziationskonstante K_D der CK2 α/β -Interaktion in An- und Abwesenheit der Substanzen ermittelt und bei den Substanzen, in denen diese Werte sich statistisch signifikant unterschieden, wurde die Inhibitionskonstante K_i berechnet. Es ist gelungen, die Ausgangssubstanz W16 ($K_i = 31 \pm 14 \mu\text{M}$) bezüglich ihrer Hemmung der CK2 α/β -Interaktion zu optimieren, so hat die aktivste dieser Substanzreihe, WMS66-22, einen K_i von $1,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$. Es ist gelungen, einige Strukturmerkmale zu bestimmen, die die Inhibitorwirkung dieser Substanzreihe beeinflussen; klare globale Struktur-Aktivitätsbeziehungen ließen sich allerdings nicht feststellen, was möglicherweise auf ein komplexeres Bindungsverhalten dieser Substanzen hinweist, das sich je nach Verbindung unterscheidet.

Weiterhin wurde ein hochdurchsatzfähiger Assay zur Messung der CK2 α / β -Interaktion entwickelt, der auf Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) beruht und zur Erforschung von Hemmstoffen dieser Interaktion geeignet ist. Dazu wurden die für diese Methode entworfenen rekombinanten Fusionsproteine, EGFP-CK2 α^{1-335} und mCherryCK2 β^{1-193} in *Escherichia coli* (*E. coli*) exprimiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Zuerst wurde mit nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nPAGE) und MST festgestellt, dass die rekombinanten Proteine wie die natürlichen CK2-Untereinheiten miteinander interagieren. Dann wurde FRET gemessen und mithilfe von Korrekturfaktoren der FRET-Index FRET_c berechnet. Hiermit wurde eine Dissoziationskonstante für die Interaktion von EGFP-CK2 α^{1-335} und mCherry-CK2 β^{1-193} von $6,7 \pm 1,7$ nM ermittelt, die gut mit den durch andere Methoden ermittelten K_D -Werten für die CK2 α / β -Interaktion übereinstimmt. Außerdem wurde gezeigt, dass sowohl unmarkierte CK2 β^{1-193} als auch die bereits bekannten kompetitiven CK2 α / β -Interaktionshemmer, I-Pc und ARC-3140, die Interaktion von EGFP-CK2 α^{1-335} und mCherry-CK2 β^{1-193} inhibieren, wobei die Inhibitionskonstanten für die Hemmung mit früheren Ergebnissen übereinstimmen. Interessanterweise stellte sich die Inhibitionskurve von ARC-3140 als biphasische Hemmkurve dar, was möglicherweise die verschiedenen Bindungsmechanismen des Moleküls an seine Bindungsstellen an CK2 α abbildet.

Abstract

Protein kinase CK2 is essential for the development and survival of all eukaryotes and also plays a crucial role in various pathologies, especially in various tumors. An important aspect of its activity is the interplay of its subunits: The catalytic subunits CK2 α and CK2 α' can occur on their own or bound to the regulatory CK2 β . Depending on the binding state their substrate specificity and other properties, such as thermostability and the ability to penetrate membranes, change. In addition, CK2 β can also bind to other protein kinases.

Because of its importance in the oncology field, there is active interest in the development of CK2 inhibitors. In this regard, the development of inhibitors for the CK2 α/β interaction is a promising approach, as these inhibitors have the potential to inhibit CK2 with high specificity. This is advantageous both for the study of the CK2 α/β interaction and in clinical applications, where such inhibitors potentially develop fewer adverse effects by inhibiting other protein kinases. A number of peptide-based CK2 α/β interaction inhibitors already exist; however, only a few small, nonpeptide molecules are known to inhibit this interaction.

High-throughput screens involving thousands of compounds are of great importance for the study of inhibitors, including CK2 α/β -interaction inhibitors. Appropriate methods are needed to perform such screenings; these must be feasible in microplate formats and ideally can be largely automated. For the CK2 α/β interaction, only one such assay exists to date. However, this fluorescence anisotropy-based assay does not represent the entire CK2 α/β binding site and therefore has limited predictive power for inhibitor activity in the field.

In this work, a series of inhibitors of the CK2 α/β interaction were screened for activity with the intention of optimizing them by establishing structure-activity relationships. Microscale thermophoresis (MST) was used to investigate the extent to which all compounds in the WMS66 series inhibit the CK2 α/β interaction. For this purpose, the dissociation constant K_D of the CK2 α/β interaction was determined in the presence and absence of the substances, and for the substances for which these values showed a statistically significant difference, the inhibition constant K_i was calculated. It was possible to optimize the initial substance W16 ($K_i = 31 \pm 14 \mu\text{M}$) with respect to its inhibition of the CK2 α/β interaction, so that the most active of this series of substances, WMS66-22, has a K_i of $1.9 \pm 0.8 \mu\text{M}$. It was possible to determine some structural features affecting the inhibitory activity of this series of compounds; however, clear global structure-activity relationships could not be established, possibly indicating a more complex binding behavior of these compounds that differs depending on the compound.

Furthermore, a high-throughput assay for measuring the CK2 α/β interaction based on Förster resonance energy transfer (FRET) was developed and is suitable for exploring inhibitors of this interaction. To this end, the recombinant fusion proteins designed for this method, EGFP-CK2 α^{1-335} and mCherry-CK2 β^{1-193} were expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*) and purified by affinity chromatography. First, native polyacrylamide gel electrophoresis (nPAGE) and MST were used to confirm that the recombinant proteins interacted like the natural CK2 subunits. Then FRET was measured and FRET index FRET_c was calculated using correction factors. This

resulted in a dissociation constant for the interaction of EGFP-CK2 α^{1-335} and mCherry-CK2 β^{1-193} of 6.7 ± 1.7 nM, which agrees well with K_D values for the CK2 α/β interaction determined by other methods. In addition, unlabeled CK2 β^{1-193} as well as the previously reported competitive CK2 α/β interaction inhibitors, I-Pc and ARC-3140, were shown to inhibit the interaction between EGFP-CK2 α^{1-335} and mCherry-CK2 β^{1-193} , with inhibition constants consistent with previous results. Interestingly, the inhibition curve of ARC-3140 presented as a biphasic inhibition curve, possibly mapping the different binding mechanisms of the molecule to its binding sites on CK2 α .

Inhalt

Danksagung	i
Abkürzungsverzeichnis	ii
Abbildungsverzeichnis.....	iv
Tabellenverzeichnis	vi
Zusammenfassung.....	vii
Abstract.....	ix
Inhalt	xi
1 Einleitung	1
1.1 Die Bedeutung der Proteinkinase CK2.....	1
1.1.1 Proteinkinasen regulieren zelluläre Abläufe.....	1
1.1.2 CK2: Eine außergewöhnliche Proteinkinase.....	2
1.2 Struktur der CK2.....	2
1.2.1 CK2 α : Die katalytische Untereinheit	3
1.2.2 CK2 β : Die regulative Untereinheit.....	4
1.2.3 Das Holoenzym	5
1.3 Die Rolle der CK2 in Zelle und Körper.....	6
1.3.1 Funktionen der CK2	7
1.3.2 Regulierung von CK2	7
1.3.3 CK2 in Krankheiten.....	8
1.4 CK2-Inhibitoren	10
1.4.1 Hemmstoffe an der ATP-Bindungsstelle	10
1.4.2 Hemmstoffe der CK2 α / β -Interaktion	11
1.4.3 Hemmstoffe der Substratbindung.....	13
1.4.4 Allosterische Hemmstoffe.....	13
1.4.5 Bisubstrat-Inhibitoren	14
1.5 Methoden zur Messung von PPI der CK2.....	14
1.5.1 Grundsätzliche Überlegungen zur PPI-Messung	14
1.5.2 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	15
1.5.3 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR).....	16
1.5.4 Fluoreszenzanisotropie (FA)	17

1.5.5	Radiometrischer Assay	17
1.5.6	Microscale Thermophoresis (MST)	18
1.5.7	FRET	22
2	Zielsetzung	28
3	Ergebnisse.....	29
3.1	Herstellung der Proteine	29
3.1.1	CK2 α^{1-335} und CK2 β^{1-193}	29
3.1.2	Fluoreszenzmarkierte Proteine für den FRET-Assay.....	29
3.2	Struktur-Wirkungsbeziehungen der Podophyllotoxin-Indol-Analoga	35
3.3	Entwicklung eines FRET-Assays für die CK2 α/β Interaktion	40
3.3.1	Bindung zwischen mCherry-CK2 β^{1-193} und EGFP-CK2 α^{1-335} auf nativer PAGE.	40
3.3.2	Bindung zwischen CK2 β^{1-193} und EGFP-CK2 α^{1-335} in der MST	42
3.3.3	Messung von Fluoreszenzspektren	42
3.3.4	K_D -Wert der Interaktion von EGFP-CK2 α^{1-335} mit mCherry-CK2 β^{1-193}	43
3.3.5	Validierung des FRET-Assays mit Referenzinhibitoren.....	43
3.3.6	Fluoreszenzintensitätsassay	45
4	Diskussion	48
4.1	Proteinherstellung	48
4.2	Wirkung der Podophyllotoxin-Indol-Analoga	49
4.3	Entwicklung eines FRET-Assays	51
4.3.1	Bindungsfähigkeit der genutzten Proteine	51
4.3.2	Entwicklung des Bindungsassays	52
4.3.3	Fluoreszenzintensitätsassay	54
5	Ausblick	57
6	Material und Methoden	58
6.1	Verwendete Materialien	58
6.1.1	Chemikalien	58
6.1.2	Testsubstanzen	58
6.1.3	Verwendete Puffer und Lösungen	58
6.1.4	Verwendete Geräte	59
6.1.5	Verwendete Software	59
6.2	Proteinexpression.....	60

6.2.1	Verwendete Plasmide.....	60
6.2.2	Herstellung von chemisch kompetenten <i>E. coli</i>	60
6.2.3	Transformation von <i>E. coli</i>	61
6.2.4	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	61
6.3	Proteinaufreinigung und Analyse.....	61
6.3.1	Lyse von Bakterien zur Aufreinigung von Proteinen.....	61
6.3.2	Aufreinigung von CK2 α^{1-335} mittels Affinitätschromatografie.....	61
6.3.3	Aufreinigung von CK2 β^{1-193} mittels Ionenaustauschchromatografie.....	62
6.3.4	Aufreinigung von mCherry, mCherry-CK2 β^{1-193} , EGFP und EGFP-CK2 α^{1-335} mittels Affinitätschromatografie.....	62
6.3.5	Aufreinigung vom mCherry mittels Gelfiltration.....	62
6.3.6	Aufreinigung von mCherry-CK2 β^{1-193} mittels Ionenaustauschchromatografie.....	63
6.3.7	Aufreinigung von EGFP-CK2 α^{1-335} mittels Affinitätschromatografie.....	63
6.3.8	Proteinanalyse mittels SDS-PAGE.....	63
6.3.9	Proteinanalyse via Western Blot.....	63
6.3.10	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	64
6.4	Visualisierung von PPI auf nativer PAGE.....	64
6.4.1	Native PAGE.....	64
6.4.2	Qualitative Visualisierung von PPI.....	65
6.4.3	Quantitative Analyse von PPI.....	65
6.5	Microscale Thermophoresis.....	65
6.5.1	Markierung von CK2 β^{1-193} mit dem NT RED-NHS Kit.....	65
6.5.2	Messung von PPIs via MST.....	66
6.5.3	Berechnung der Dissoziationskonstante K_D	66
6.5.4	Berechnung der Inhibitionskonstante K_i für die Podophyllotoxin-Indol-Analoga.....	67
6.6	FRET Assay.....	67
6.6.1	Messung von Fluoreszenzspektren.....	67
6.6.2	FRET-Punktmessungen.....	67
6.6.3	Berechnung von FRETc.....	68
6.6.4	Bestimmung des K_D -Werts der CK2 α/β -Interaktion mit dem FRET Assay.....	68
6.6.5	Inhibitortestung zur Validierung des FRET Assays.....	69

6.7	Fluoreszenzintensitätsassay	70
6.7.1	Markierung von CK2 β^{1-193} mit Cyanin3	70
6.7.2	Messung der Fluoreszenzintensität im 96-Well Format	70
6.7.3	Markierung von CK2 β^{1-193} mit NHS-Fluorescein	71
6.7.4	MST-Messungen mit Fluorescein-CK2 β^{1-193}	71
6.7.5	Inhibitortestung mit Cyanin3-CK2 β^{1-193} Fluoreszenzintensität	71
7	Literaturverzeichnis	73
8	Anhang	93
8.1	Erklärung zur Dissertation	93
8.2	Nucleotidsequenzen der exprimierten Proteine	94
8.2.1	CK2 β^{1-193}	94
8.2.2	CK2 α^{1-335}	94
8.2.3	EGFP	94
8.2.4	EGFP-CK2 α^{1-335}	95
8.2.5	mCherry	96
8.2.6	mCherry-CK2 β^{1-193}	96
8.3	Daten aus Einzelmessungen für die Podophyllotoxin-Indol-Analoga	98
8.4	Inhibitionskonstanten der Podophyllotoxin-Indol-Analoga: Vergleich mit <i>Kröger et al.</i>	103
8.5	Vereinbarungen zu Bildrechten	104

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung der Proteinkinase CK2

1.1.1 Proteinkinasen regulieren zelluläre Abläufe

Das menschliche Genom enthält über 500 Gene für Proteinkinasen, deren Aufgabe es ist, Phosphatgruppen auf Proteine zu übertragen.⁵ Phosphorylierungen sind die häufigste Art der posttranslationalen Modifikation von Proteinen und sind von fundamentaler Bedeutung für die Regulierung von Proteinaktivitäten.⁶ Viele Enzyme werden von Kinasen durch Phosphorylierung aktiviert, wie zum Beispiel die Glykogen-Phosphorylase.⁷ Oft aktivieren Kinasen durch Phosphorylierung aber auch andere Kinasen, wodurch sich Kaskaden von Kinasen bilden, die untereinander vernetzt sind und so auf komplexe Weise zentrale zelluläre Prozesse steuern. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die MAPK-Kaskade (Engl.: mitogen-activated protein kinase): Nach der Bindung extrazellulärer Wachstumsfaktoren werden die Raf-Kinasen (Engl.: rapidly accelerated fibrosarcoma kinase) aktiviert, die dann MEK Kinasen (MAPK/ERK Kinase) phosphorylieren.⁸ MEK phosphorylieren dann die eigentlichen MAP-kinasen, was im Zellkern durch weitere Phosphorylierung von Transkriptionselementen die Zellvermehrung antreibt. Die Organisation von Signalwegen in solchen Kaskaden bietet den Vorteil, dass so schwächere Signale verstärkt werden, während „Hintergrundrauschen“ ausgeblendet werden kann.⁹ Allerdings ist die Organisation dieser Signalwege in Wirklichkeit deutlich komplexer, da die Kaskaden oft Abzweigungen haben und untereinander vernetzt sind, wodurch redundante und alternative Aktivierungsmechanismen für die entsprechenden Prozesse entstehen.¹⁰

Kinasen können andere Proteine durch Phosphorylierungen auch inaktivieren oder ihre Interaktionen befördern oder verhindern, was bei verschiedenen zellulären Prozessen eine Rolle spielt, zum Beispiel bei der Chromatinorganisation.¹¹⁻¹³

Wegen ihrer zentralen Funktion in der Regulierung zellulärer Prozesse können defekte oder deregulierte Proteinkinasen den Zellhaushalt empfindlich stören. So werden Mutationen und Störungen von Proteinkinasen mit verschiedenen Krebsarten, neurodegenerativen Erkrankungen und Entzündungspathologien in Verbindung gebracht.¹⁴⁻¹⁶

Da einige dieser Krankheiten durch zu aktive Kinasen ausgelöst werden, ist die Suche nach Hemmstoffen für Proteinkinasen eine wichtige Strategie, um neue Medikamente zu entwickeln.¹⁷ 2001 wurde der erste Kinase-Hemmer, Imatinib, für die Behandlung von chronischer myeloischer Leukämie (CML) zugelassen. Diese Krankheit wird fast immer durch eine Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 verursacht (Philadelphia-Chromosom), wodurch ein Fusionsgen aus BCR (Breakpoint cluster region) und ABL (Abelson murine leukemia) entsteht. Das Produkt aus diesem Fusionsgen ist eine dauerhaft aktive Kinase, die die Krankheit auslöst. Seit der Einführung der gezielten Hemmstoffe für diese Kinase haben sich die Überlebenschancen von CML-Patienten dramatisch verbessert, sodass

sie jetzt fast eine normale Lebenserwartung haben.^{18,19} In den letzten 20 Jahren wurden vor allem im onkologischen Bereich viele weitere Kinase-Hemmstoffe als Medikamente zugelassen.²⁰

1.1.2 CK2: Eine außergewöhnliche Proteinkinase

Die Proteinkinase CK2 wurde 1954 als eine der ersten humanen Kinasen überhaupt entdeckt und ist seitdem Gegenstand der Forschung.²¹ Der Name CK2 steht für Casein Kinase 2 und erklärt sich dadurch, dass viele frühe *in vitro* Experimente mit CK2 an Casein durchgeführt wurden, auch wenn dieses kein physiologisches Substrat der CK2 ist.²² Eine weitere Kinase, die Casein phosphorylieren kann, wurde CK1 benannt, wobei diese Kinasenfamilie nicht näher mit der CK2 verwandt ist.^{22,23} Obwohl die CK2 schon früh beschrieben wurde, ist ihre physiologische Rolle bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Denn während in der Anfangszeit der CK2-Forschung lange kein einziges physiologisches Substrat der CK2 bekannt war, so sind bis heute über 300 solcher Substrate bekannt.^{24,25} Sequenzanalysen von Phosphorylierungsstellen deuten darauf hin, dass bis zu 20 % der in Datenbanken hinterlegten Phosphorylierungsstellen von CK2 phosphoryliert werden könnten, wohingegen andere Studien nahelegen, dass längst nicht alle Proteine mit der benötigten Erkennungssequenz in Zellen auch tatsächlich von CK2 phosphoryliert werden.^{26,27} Dies erschwert es, der CK2 eine genaue Funktion zuzuweisen, weil die Substrate der CK2 in einer Vielzahl zellulärer Prozesse involviert sind. Ein weiterer Faktor, der es schwer macht, eine genaue Rolle für die CK2 zu finden, ist die Tatsache, dass CK2 ständig und in allen menschlichen Geweben aktiv ist, wodurch sie sich von vielen anderen Kinasen unterscheidet und nicht in das gewohnte Schema der Kinasen-Signalwege fällt.²⁸⁻³⁰ Dennoch ist klar, dass CK2 essenziell für die Physiologie eukaryotischer Organismen ist.^{29,31,32}

Auf Grund ihrer Verwicklung in diverse zelluläre Prozesse überrascht es nicht, dass die CK2 auch in mehreren Krankheiten eine Rolle spielt.³³ So wird eine Deregulierung der CK2 mit verschiedenen Störungen in Verbindung gebracht, unter anderem mit neurodegenerativen Erkrankungen, Infektionskrankheiten und vor allem mit verschiedenen Krebsarten.³⁴⁻³⁹ Da gerade bei Krebs oft eine erhöhte CK2-Aktivität festgestellt wird, wird seit einigen Jahren aktiv nach Hemmstoffen für diese Kinase gesucht.^{40,41}

Obwohl die Proteinkinase CK2 in Eukaryoten stark konserviert ist, und man davon ausgeht, dass sie in allen eukaryotischen Organismen vorkommt, befasst sich diese Arbeit hauptsächlich mit humaner CK2.^{32,42}

1.2 Struktur der CK2

Die CK2 besteht aus verschiedenen Untereinheiten: CK2 α oder CK2 α' sind die katalytisch aktiven Untereinheiten, während CK2 β eine regulierende Funktion einnimmt. Für die komplexe Regulierung der CK2 ist das Zusammenspiel zwischen diesen Untereinheiten von besonderer Bedeutung.⁴³

1.2.1 CK2 α : Die katalytische Untereinheit

CK2 α ist die katalytische Untereinheit der CK2 und sie ist in ihrer Aminosäuresequenz und Struktur mit anderen eukaryotischen Proteinkinasen (EPK) verwandt, einer Superfamilie von Proteinkinasen die sich durch bestimmte homologe Strukturen auszeichnet.⁴⁴ So bestehen EPK typischerweise aus zwei Domänen, einer von einem β -Faltblatt geprägten N-terminalen Domäne und einer C-terminalen, von α -Helices geprägten, Domäne. Dazwischen liegt das katalytische Zentrum mit Bindungsstelle des Cosubstrats ATP.⁴⁵ Außerdem zeichnen sich EPK durch eine bestimmte räumliche Aneinanderreihung von hydrophoben Aminosäuren aus, die für ihre katalytische Aktivität korrekt formiert sein müssen. Diese Anordnung in der aktiven EPK findet in zwei sogenannten „Spines“ statt, der regulativen R-Spine und der katalytischen C-Spine, die erst mit der Bindung von ATP vervollständigt wird.^{45,46}

Die N-terminale Domäne hat bei der CK2 α , wie bei anderen EPKs, zwei zentrale Elemente: ein β -Faltblatt mit fünf Strängen und die α C-Helix.^{47,48} Funktional gesehen ist in dieser Domäne eine glyzinreiche Schleife von großer Bedeutung, die zwischen den Strängen β 1 und β 2 des β -Faltblatts liegt. Sie ist Teil der ATP-Bindungsstelle und stabilisiert die Bindung zwischen CK2 α und ATP, bzw. GTP, indem sie mit dem Triphosphatrest dieser Bindungspartner interagiert.^{47,49} Ein weiteres wichtiges Element dieser Domäne ist die Bindungsstelle für CK2 β auf der konkaven Außenseite des β -Faltblatts (s. 1.2.3).³ Die Innenseite dieses β -Faltblatts ist dagegen ein weiterer Teil der Bindungstasche für ATP, wobei hier sowohl das Triphosphat des ATP als auch der aromatische Kern von ATP gebunden werden. Diese Interaktion wird von zwei koordinierenden Magnesiumionen und der α C-Helix unterstützt.^{47,50} Einzelne basische Aminosäuren dieser Helix sind auch für die Substratbindung wichtig, da sie mit den sauren Aminosäuren rund um die Phosphorylierungsstelle des Substrats interagieren.^{51,52} Da CK2 eine acidophile Kinase ist, ist die Umgebung der Phosphorylierungsstelle am Substrat von negativ geladenen Aminosäuren geprägt; ihre Konsensussequenz ist S/T-x-x-E/D/pS.⁵³

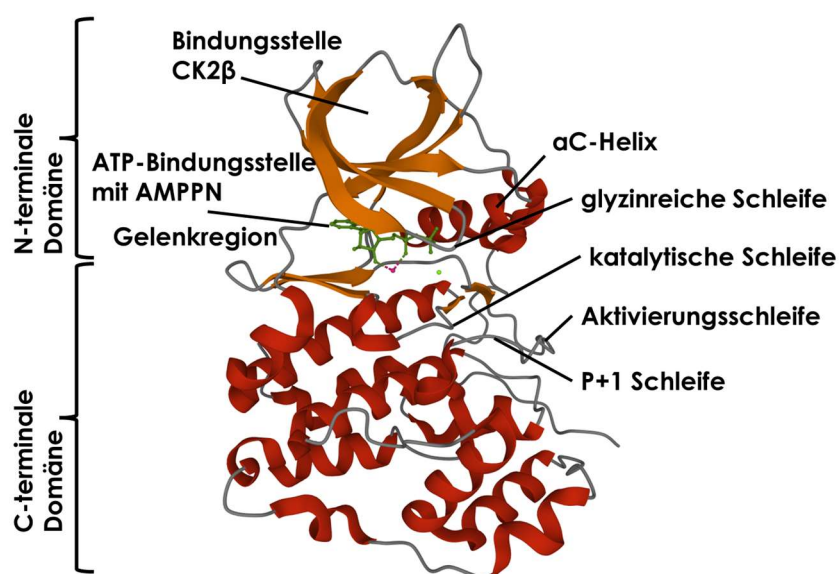


Abbildung 1: Struktur der CK2 α . PDB-ID: 3NSZ1

Die C-terminale Domäne besteht vor allem aus α -helikalen Strukturen, was ebenfalls typisch für eine EPK ist. Ein wichtiges Element dieser Domäne ist die katalytische Schleife, die bei der Katalyse den Phosphatdonor und -akzeptor koordiniert.^{47,54} Außerdem befindet sich hier die Aktivierungsschleife, die ein besonderes Merkmal der CK2 enthält: CK2 hat anstelle des konservierten DFG-Motivs, das bei anderen Kinasen entweder in aktiver Konformation (DFG-in) oder in inaktiver Form (DFG-out) vorliegen kann, die Aminosäuren DWG. Dieses Motiv ist eines der strukturellen Merkmale, die zur konstitutiven Aktivität der CK2 α beitragen.⁴⁸ Ein weiteres interessantes Element ist die P+1-Schleife, die mit ihren basischen Aminosäuren Teil der Substratbindungsstelle ist.^{51,52}

Die Gelenkregion der CK2 α verbindet die zwei Domänen und ist für die Funktion der CK2 von besonderer Bedeutung, weil sie an der Cosubstratbindung beteiligt ist. Interessanterweise kann sie in der CK2 α sowohl eine geschlossene als auch eine offene Form annehmen, während sie bei anderen EPK nur in geschlossener Form beobachtet wurde. Das könnte erklären, warum CK2 α neben ATP auch GTP als Phosphatdonor verwenden kann, da in der offenen Form auch GTP in diese Bindungsstelle passt.⁴⁹

CK2 α' ist ein Isoenzym der CK2 α , das in einem separaten Gen codiert wird. Sie ist in ihrer Sequenz und Struktur der CK2 α sehr ähnlich.^{55,56} Strukturell besteht der Hauptunterschied zwischen den beiden Enzymen im C-Terminus, der bei CK2 α' kürzer ist als bei CK2 α und bei dem außerdem einige Phosphorylierungsstellen fehlen.⁵⁵

1.2.2 CK2 β : Die regulative Untereinheit

Die regulative Untereinheit der CK2, CK2 β , wird vom Gen CSNK2B kodiert, welches in Säugetieren keine starke Homologie mit anderen Proteinen aufzeigt und daher strukturell ein einzigartiges Protein ist.⁵⁷ CK2 β wird in einen N-terminalen CK2 β -Körper und einen C-terminalen Schwanz eingeteilt. Der N-terminale Teil des Körpers besteht hauptsächlich aus α -Helices. Ein wichtiges Element ist die „saure Schleife“, die von konservierten negativ geladenen Aminosäuren geprägt ist und für die Bindung einiger Bindungspartner (z.B. Spermin) verantwortlich ist.⁵⁸ Die Mutation dieser Aminosäuren erhöht insgesamt die CK2-Aktivität, was auf eine hemmende Wirkung dieses Proteinsegments auf die Enzymaktivität hindeutet, möglicherweise über sekundäre Interaktionen mit der Substratbindungsstelle der CK2 α (siehe unten).^{59,60} Der C-terminale Teil der CK2 β -Körpers ist dagegen von β -Faltblättern geprägt und enthält ein Zinkfingermotiv. Dieses ist für die Dimerisierung von CK2 β verantwortlich, die für die Stabilität von CK2 β notwendig ist.^{61,62} Der CK2 β -Schwanz ist weniger klar strukturiert und ist an der Bindung der zweiten CK2 β -Untereinheit und der CK2 α beteiligt.³ CK2 β tritt stets als Dimer auf und die Bindung der CK2 β -Untereinheiten aneinander wird über verschiedene Interaktionen verstärkt: Zum einen formt das Zinkfingermotiv mit seinem gebundenem Zn²⁺ einen Teil der Bindungsstelle, zum anderen gibt es eine Reihe von hydrophoben Kontakten und einige Salzbrücken, die die Bindung verstärken.^{3,61}

Neben ihrer Funktion als Teil des CK2-Enzyms bindet CK2 β auch einige andere Proteine, unter anderem Chk1 und Mos. Bei einigen dieser Enzyme konnte gezeigt werden, dass CK2 β die

enzymatische Aktivität beeinflusst und man geht davon aus, dass CK2 β auch physiologisch an ihrer Regulierung beteiligt sein könnte.^{63–67}

1.2.3 Das Holoenzym

Die CK2 α/β -Interaktion

Das CK2-Holoenzym besteht aus einem zentralen CK2 β -Dimer, an das zwei CK2 α -Untereinheiten gebunden sind, wobei auch CK2 α' eine oder beide α -Untereinheiten ersetzen kann. Am Kontakt zwischen den Untereinheiten sind dabei jeweils drei Proteinketten beteiligt, beide β -Untereinheiten und die CK2 α -Untereinheit. Die Bindung wird durch die Interaktion einer Reihe hydrophober Aminosäuren beider Untereinheiten gebildet: Auf der Seite von CK2 α spielen Leu41, Glu52, Phe54, Val67, Ile69, und Ala110 eine Rolle; von CK2 β sind von der ersten Untereinheit Leu89, Met166 und Met169 beteiligt (α/β -body Kontakt), während die zweite CK2 β Einheit sich mit Leu187, Tyr188, Phe190 und Ile192 an der Bindung beteiligt (α/β -tail Kontakt).^{3,68,69}

Zwischen CK2 α und CK2 β besteht eine hohe Affinität, die je nach Messmethode und Umgebungsbedingungen mit einer Dissoziationskonstante von 5,4 nM (Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie, engl. Surface Plasmon Resonance, SPR),⁷⁰ 3,69 nM (Isotherme Titrationskalorimetrie, engl. isothermal titration calorimetry, ITC)⁷¹ oder 12 nM (MST) gemessen wird.⁷²

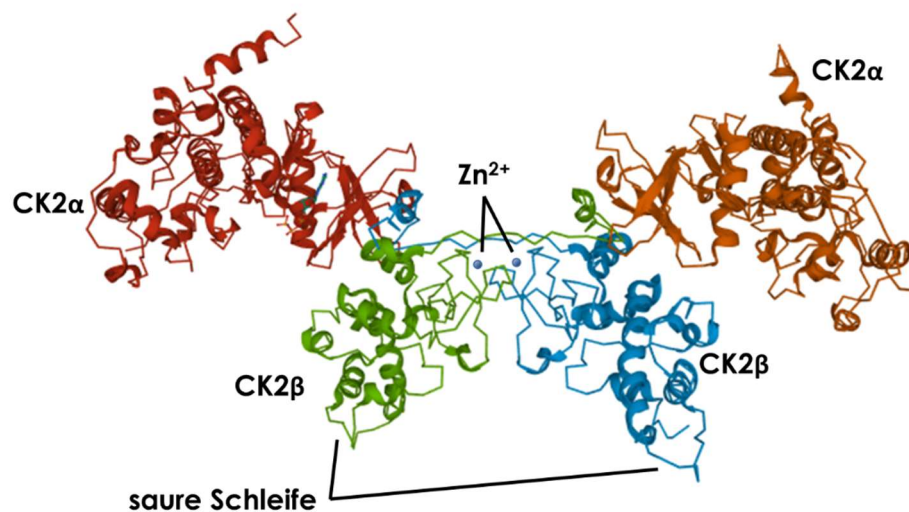


Abbildung 2: CK2 Holoenzym mit zentralem CK2 β -Dimer und zwei CK2 α -Untereinheiten. Erstellt nach der Struktur 1JWH³ mit dem PDB 3D-Viewer.

Aggregation

Mehrere CK2-Holoenzyme können sich in Lösungen mit niedriger Salzkonzentration zu reversiblen Aggregaten zusammenfügen, bei denen die saure Schleife der CK2 β mit der Substratbindungsstelle der CK2 α interagiert.^{59,73–75} Diese Aggregate können verschiedene

Formen annehmen, ringförmige und lineare Oligomere. Bei der ersten Form fügen sich je drei Holoenzyme zu einem Ring zusammen.^{59,69,75} Durch die Interaktion zwischen den Holoenzymen wird jede zweite Substratbindungsstelle der CK2 α -Einheiten blockiert, was zu einer Reduzierung der CK2-Aktivität führt.⁵⁹ Diese Ringe können weiterhin stapelähnliche Filamente bilden, wobei hier die CK2-Aktivität durch sterische Blockade der Aktivitätszentren weiter gesenkt wird.⁶⁹ Alternativ können sich mehrere Holoenzyme auch zu linearen Aggregaten zusammenfinden, wobei die sauren Schleifen der CK2 β ebenfalls die aktiven Zentren der CK2 α verdecken.⁷⁶

Die Bildung von Aggregaten ist unter anderem von Bedeutung, weil sie für die Autophosphorylierung von CK2 β notwendig ist.⁷⁷

Funktion der Protein-Protein-Interaktionen innerhalb der CK2

Die Rolle der verschiedenen Erscheinungsformen der CK2 ist bis heute nicht vollkommen aufgeklärt.⁴³ Wie oben bereits erwähnt, bewegen sich die Untereinheiten unabhängig voneinander in der Zelle, was darauf hindeutet, dass sie auch *in vivo* nicht ausschließlich als Holoenzym vorliegen.^{78–80} Außerdem ändert die Bindung von CK2 β die Substratspezifität der CK2 α , daher unterscheidet man zwischen drei Substratklassen der CK2: Substrate der Klasse I können sowohl vom Holoenzym als auch von der isolierten CK2 α phosphoryliert werden (z.B. Inhibitor-2)⁸¹; Klasse II Substrate (z.B. Calmodulin) werden ausschließlich von isolierter CK2 α phosphoryliert, während Klasse III Substrate (z.B. eIF2 β)⁸² nur durch das Holoenzym phosphoryliert werden.⁸³ Es gibt Hinweise darauf, dass die verschiedenen Substratklassen auch in lebenden Zellen unterschiedlich phosphoryliert werden, die strukturellen Mechanismen, die dieses Verhalten erklären, sind aber kaum aufgeklärt.^{27,43} Neben der Substratspezifität werden durch die Bindung der CK2-Untereinheiten aneinander auch weitere Eigenschaften der CK2 beeinflusst: So erhöht die Bindung der CK2 β die Thermostabilität der CK2 α ⁴ und auch für den Membrantransport der CK2 werden beide Untereinheiten benötigt.^{84,85}

Man nimmt an, dass CK2 β für viele CK2-Substrate eine Andockstelle ist und so ihre Phosphorylierung ermöglicht oder vereinfacht und die Bildung des Holoenzym so die Substratspezifität der CK2 reguliert.⁶⁷ Die oben beschriebenen Aggregate sind vermutlich ein weiterer Regulierungsmechanismus der CK2, der die Aktivität steuert. CK2-Aggregation wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet.^{59,76,80,86}

1.3 Die Rolle der CK2 in Zelle und Körper

CK2 ist ein Enzym, das in einer Vielzahl von Prozessen und in unterschiedlichen physiologischen Kontexten eine Rolle spielt. Alle bisher bekannten Prozesse mit Beteiligung der CK2 aufzuzählen, würde den Rahmen dieser Arbeit überschreiten, daher folgt hier lediglich eine kurze Übersicht über ihre wichtigsten Funktionen.

1.3.1 Funktionen der CK2

CK2 ist für die embryonale Entwicklung von Säugetieren essenziell.⁸⁷ So führen sowohl CK2 α - als auch CK2 β -Knockouts in Mäusen zum Tod des Embryos. CK2 α -Knockout-Mäuse überleben, bei ihnen ist aber die Spermatogenese gestört.⁸⁸⁻⁹² Während der embryonalen Entwicklung spielt CK2 in verschiedenen Geweben eine Rolle: CK2 beeinflusst die Entwicklung von Synapsen⁹³ und die Differenzierung von neuronalen Stammzellen⁹⁴⁻⁹⁶, sie ist notwendig für die Entstehung von Adipozyten aus mesenchymalen Stammzellen^{97,98} und ist an der Entwicklung von Muskel- und Knochengewebe^{99,100} sowie der Differenzierung von T- und B-Zellen des Immunsystems beteiligt.^{101,102}

Außerdem ist CK2 in verschiedene Prozesse involviert, die den Zellzyklus steuern.³³ Während des Übergangs von G1- in die S-Phase beeinflusst CK2 die Aktivität des Tumorsuppressors p53, der unter anderem für die Überwachung der DNA-Integrität verantwortlich ist.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Auch am G2/M-Übergang ist CK2 beteiligt, zum Beispiel durch die Interaktion von CK2 β mit Chk1.^{64,106} Insgesamt trägt CK2 zum Überleben von Zellen und dem Abwenden des Zelltods durch Apoptose bei und verhindert das Eintreten von Zellen in die Seneszenz.¹⁰⁷⁻¹¹¹

CK2 ist darüber hinaus an der Steuerung von Angiogenese, der Reparatur von DNA-Schäden und dem Kohlenhydratstoffwechsel beteiligt.¹¹²⁻¹¹⁴ Sie ist für die korrekte Funktion von Neuronen notwendig und hat Einfluss auf den zellulären Ionenhaushalt.^{34,115} Weiterhin beeinflusst CK2 die circadiane Rhythmik.¹¹⁶ In diesen Prozessen spielt CK2 über verschiedene Mechanismen eine Rolle. So führt die Phosphorylierung durch CK2 in einigen Fällen direkt zu erhöhter Aktivität eines anderen Enzyms, wie zum Beispiel beim Transporter MRP1.¹¹⁷ In anderen Prozessen aktiviert CK2 einen Transkriptionsfaktor, z. B. NF- κ B, oder sie beeinflusst die Aktivität anderer Proteine durch die Bindung der regulatorischen CK2 β -Untereinheit.^{64,118,119} Möglicherweise kann CK2 auch die Aggregation bestimmter Proteine steuern.¹²⁰

1.3.2 Regulierung von CK2

Die Vielzahl an Funktionen ist eine Besonderheit der CK2 und stellt in der Kombination mit ihrer allgegenwärtigen ständigen Aktivität ein scheinbares Paradox dar: Wie kann ein Enzym so viele Prozesse regulieren, wenn es überall ständig aktiv ist?⁴³ Tatsächlich ist die Regulierung der CK2 sehr komplex und noch nicht vollständig ergründet. Es sind aber dennoch einige Mechanismen bekannt, die die Aktivität der CK2 lenken: Zum einen wird die Expression der CK2 Untereinheiten in verschiedenen Zelltypen und bei bestimmten Stimuli erhöht oder abgesenkt und so die vorhandene Menge an CK2 geregelt. So variiert die CK2-Expression zum Beispiel während der embryonalen Entwicklung.⁸⁷ Die CK2-Untereinheiten können sich innerhalb der Zelle in verschiedenen Kompartimenten bewegen, wodurch ihre Aktivität räumlich geregelt wird;^{78,80} auch ein Export aus der Zelle in den extrazellulären Raum ist belegt.¹²¹ CK2 wird des Weiteren durch Phosphorylierung kontrolliert: Bei der Autophosphorylierung, die sowohl an der katalytischen CK2 α als auch an der CK2 β vorkommt, wird die Aktivität und der Abbau des Enzyms beeinflusst.¹²²⁻¹²⁴ CK2 wird allerdings auch von

anderen Kinasen phosphoryliert, zum Beispiel von AKT.¹²⁵ Ein weiterer Regelmechanismus ist die Interaktion der Untereinheiten miteinander. Auch wenn CK2 α unabhängig von CK2 β aktiv ist, verändert die Bindung von CK2 β die Aktivität und die Substratspezifität der Kinase.^{83,126} Außerdem kann CK2 Oligomere aus mehreren Holoenzymen bilden, was die enzymatische Aktivität der CK2 hemmt und so zu ihrer Regulierung beitragen könnte (s.o.).^{59,69,73,75,76,127} CK2 interagiert auch mit anderen Proteinen, was sich auf die Enzymaktivität auswirkt: Zum Beispiel führt die Bindung von FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2) zu erhöhter Phosphorylierung von Nucleolin durch CK2, während die Bindung von Pin1 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1) eine hemmende Wirkung auf die Phosphorylierung von Topoisomerase II α durch CK2 hat.^{128,129} Zudem können auch andere endogene Moleküle die CK2-Aktivität beeinflussen: Polyamine, wie Spermin, stimulieren CK2.¹³⁰ In einigen Fällen wird die CK2-Aktivität auch über das Substrat geregelt. Da CK2 eine acidophile Kinase ist, braucht sie für die Phosphorylierung ihrer Substrate einige negativ geladene Aminosäuren rund um die Phosphorylierungsstelle des Substrats. Diese negative Ladung kann allerdings auch durch Phosphorylierung hergestellt werden. So ist es bei manchen Substraten der CK2 nötig, dass sie erst von einer anderen Kinase in der Nähe der CK2-Phosphorylierungsstelle phosphoryliert werden, damit CK2 sie erkennen kann.¹³¹

Insgesamt sind sowohl die genauen Funktionen der CK2 als auch ihre Regulierungsmechanismen noch unvollständig aufgeklärt. Allerdings ist nicht zu bestreiten, dass CK2 einen wichtigen Platz in der komplexen Regulierung verschiedenster zellulärer Funktionen einnimmt.

1.3.3 CK2 in Krankheiten

Da CK2 in so viele zelluläre Prozesse eingebunden ist, ist sie auch in eine Vielzahl von Krankheiten involviert. Dabei spielt CK2 je nach Kontext sehr unterschiedliche Rollen.¹³²

Okur-Chung Syndrom und Poirier-Bienvenu Syndrom

In den letzten Jahren gibt es mehr und mehr Aufmerksamkeit für zwei Syndrome, die mit verschiedenen CK2-Mutationen in Verbindung gebracht werden. Beides sind seltene Störungen der neuronalen Entwicklung und wurden erst kürzlich durch Gensequenzierung entdeckt.^{133,134}

Beim Okur-Chung Syndrom treten verschiedene Mutationen im Gen CSNK2A1 auf, das CK2 α kodiert. Mittlerweile sind einige Mutationen im Zusammenhang mit diesem Syndrom beschrieben, wobei die Mutationen R47Q in der ATP-Bindungsschleife und K198R im Aktivierungssegment am häufigsten beobachtet werden.¹³⁵ Diese und einige andere auftretende Mutationen zeichnen sich durch eine geringere enzymatische Aktivität aus.¹³⁶ Patienten mit dem Okur-Chung Syndrom haben oft neuronale Entwicklungsstörungen, Krampfanfälle, geistige Behinderungen, eine Autismus-Spektrum-Störung, Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörungen (ADHS), motorische Störungen, Verhaltensstörungen sowie Dysmorphien im Gesichtsbereich. Dabei kann die Stärke dieser

Abweichungen sehr unterschiedlich sein; nicht alle Störungen sind bei allen Patienten vorhanden.^{135,137}

Das Poirier–Bienvenu Syndrom ist dagegen mit Mutationen des Gens CSNK2B, das CK2 β kodiert, assoziiert.^{134,138} Auch hier sind mehrere Mutationen bekannt. Das Syndrom zeichnet sich unter anderem durch neuronale Entwicklungsstörungen und geistige Behinderung sowie Sprachstörungen, epileptische Krampfanfälle und Autismus–Spektrum–Störungen aus, wobei die Schwere der Symptome zwischen den einzelnen Patienten stark variiert.¹³⁹

Neurodegenerative Erkrankungen

CK2 wird mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht.³⁴ So phosphoryliert CK2 zum Beispiel α –Synuclein, ein Protein, dessen Hyperphosphorylierung zur Entstehung der für die Parkinson–Krankheit typischen Proteinaggregate, den Lewy–Bodies, beiträgt.^{140–143} Außerdem wird CK2–Aktivität mit der Entstehung von Morbus Alzheimer assoziiert, wobei hier unter anderem der Einfluss von CK2 auf den axonalen Transport eine Rolle spielt.^{144,145}

Infektionskrankheiten

Da CK2 ständig und überall aktiv ist, nutzen viele Viren CK2 zur Phosphorylierung ihrer Proteine oder zur Unterstützung ihres Lebenszyklus,³³ darunter das Epstein–Barr Virus (EBV),³⁵ humane Papillomaviren¹⁴⁶, Herpes Simplex Typ 1,¹⁴⁷ Hepatitis C¹⁴⁸ und SARS–Cov–2.¹⁴⁹

Maligne Neoplasien – Krebs

Sehr viel Aufmerksamkeit in der CK2 Forschung richtet sich auf ihre Rolle in diversen malignen Neoplasien.^{39,40,150} CK2 trägt zur malignen Transformation bei, indem sie über verschiedene Signalwege die Apoptose hemmt und das Überleben der Zellen fördert.^{107,109} Maligne Transformation bezeichnet den Prozess, bei dem sich aus einer gesunden Zelle eine Krebszelle entwickelt, die sich unkontrolliert teilen und deren Nachkommen sich im Körper verteilen und dort Metastasen bilden können. Dazu müssen in der Zelle eine Reihe von Kontrollmechanismen außer Kraft gesetzt werden, die diese Veränderung normalerweise verhindern.^{14,151} Zusätzlich kann CK2 aber auch die Resistenz von Krebszellen gegen verschiedene Medikamente erhöhen.¹⁵²

Es ist schon länger bekannt, dass CK2 in Tumorzellen überexprimiert und/oder verstärkt aktiv ist.^{153–158} Dabei sind vor allem CK2 α – und CK2 β –mRNA oft überexprimiert, während das Bild bei CK2 α' –mRNA weniger eindeutig ist.^{37,40} Interessanterweise wird in einigen Neoplasien CK2 α P als Genprodukt eines Pseudogens exprimiert, dessen Sequenz der CK2 α sehr ähnlich ist; dieses Protein wird in gesunden Zellen normalerweise nicht exprimiert.^{40,159,160} CK2 α –Überexpression ist in vielen Krebsarten, z. B. beim kolorektalen Karzinom und Brustkrebs, ein Marker für einen schlechteren Krankheitsverlauf, allerdings zeigt sich in einigen Neoplasien kein oder sogar ein umgekehrter Effekt.^{37,40,161,162} Für verschiedene maligne Zellen konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der CK2 zu einem verringerten Zellwachstum bzw. zum

Zelltod führt. Da dieser Effekt in gesunden Zellen weit weniger ausgeprägt ist, gilt CK2 als ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung von klinisch einsetzbaren Hemmstoffen für die Krebstherapie, wobei die Anwendung von CK2-Hemmstoffen auch in Kombination mit anderen Wirkstoffen untersucht wird^{163–168}. Tatsächlich gab, bzw. gibt es bereits klinische Studien mit den CK2-Inhibitoren CX-4945 und CIGB-300.^{169–172} Die Ergebnisse einer Studie in Phase Ib/II legen nahe, dass insbesondere die Kombination von CX-4945 mit Gemcitabin und Cisplatin, einem bereits klinisch verwendeten Zytostatikum, in Patienten mit metastasiertem Gallengangskarzinom effektiv sein könnte.¹⁷⁰ Zukünftig könnte die Hemmung von CK2 als Baustein einer personalisierten Medizin in der Krebstherapie angewandt werden.^{173–175} Auf die verschiedenen bisher bekannten Hemmstoffe wird in Kapitel 1.4 näher eingegangen.

1.4 CK2-Inhibitoren

Aufgrund der Assoziation von zu hoher CK2-Aktivität mit onkologischen Erkrankungen besteht seit langem reges Interesse an der Entdeckung und Entwicklung von CK2-Inhibitoren. Die inzwischen zahlreichen Hemmstoffe kann man nach der Art ihrer Bindung an die CK2 unterscheiden.^{41,176}

1.4.1 Hemmstoffe an der ATP-Bindungsstelle

Die meisten CK2-Inhibitoren nutzen zur Bindung die ATP-Bindungstasche der CK2 α . Diese Bindungstasche bietet für die Entwicklung von Hemmstoffen einige Vorteile: Zum einen ist sie gut erforscht und kristallographisch abgebildet, außerdem wurde eine Wirkung von ATP-kompetitiven Hemmstoffen auf die CK2-Aktivität vielfach bestätigt.^{3,177–184} Allerdings haben diese Inhibitoren auch einige Nachteile, insbesondere wenn sie als Medikament eingesetzt werden sollen: Da die ATP-Bindungsstellen verschiedener Proteinkinasen untereinander sehr ähnlich aufgebaut sind, sind solche Hemmstoffe oft nicht selektiv, sondern hemmen weitere Kinasen. Dies könnte beim Einsatz in Patienten zu geringer Verträglichkeit aufgrund vermehrter unerwünschter Arzneimittelwirkungen führen.^{185,186} Ein weiterer Nachteil dieser Bindungsstelle ist, dass die Hemmstoffe in der Zelle mit der zellinternen ATP-Konzentration von 1–10 mM konkurrieren müssen.⁴⁷

Es sind bereits zahlreiche ATP-kompetitive Hemmstoffe der CK2 beschrieben, die sich in ihren Strukturen durchaus unterscheiden.^{181,187,188} Einige der wichtigsten Substanzgruppen und ihre Vertreter werden hier beschrieben:

Viele der früh entwickelten CK2-Hemmstoffe zeichnen sich durch ein halogeniertes Ringsystem aus.¹⁸⁸ Beispiel hierfür ist DRB (5,6-Dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazol, s. Abbildung 3), ein Nukleosidanalogue, dessen biologische Aktivität bereits 1954 entdeckt wurde.¹⁸⁹ Die hemmende Wirkung von DRB auf CK2 wurde 1984 beschrieben, allerdings inhibiert DRB auch andere Kinasen.^{190–192} Darüber hinaus bindet DRB an der CK2 α/β -Bindungsstelle.¹⁹³ Die Verbindung 4,5,6,7-Tetrabromo-1-H-benzotriazol (TBB, s. Abbildung 3) ist eine Weiterentwicklung von DRB, dessen Struktur durch das Weglassen des

Ribose-Rests vereinfacht wurde.¹⁹⁴ TBB ist aktiver gegen CK2 und hat eine höhere, wenn auch nicht absolute, Selektivität gegenüber anderen Kinasen.^{194,195}

Polyphenole bilden eine weitere Gruppe CK2-Inhibitoren, von der Emodin ein prominenter Vertreter ist. Emodin hemmt einige Proteinkinasen, CK2 aber besonders stark.¹⁹⁶ Für Emodin sind neben seiner Aktivität als Kinase-Hemmstoff allerdings viele weitere pharmakologische Effekte bekannt.¹⁹⁷ Ein weiterer Vertreter dieser Gruppe, Chinalizarin, wurde durch ein *in silico* Screening entdeckt und ist ein relativ selektiver ATP-kompetitiver Hemmstoff der CK2.¹⁹⁸

Einige andere Inhibitoren wurden durch Struktur-Aktivitätsbeziehungen optimiert und gehören zu den Pyrazolo-triazinen^{199,200} oder den Pyrazolo-pyrimidinen.^{201–204} Aus der letzten dieser Gruppen wurde die Substanz SGC-CK2-1 mit bemerkenswerter Selektivität für CK2 entwickelt, wobei allerdings überraschenderweise fast jegliche Hemmung von Krebszellenwachstum verloren ging; dies hat zu Zweifeln an der Strategie der CK2-Hemmung als potentieller Antikrebstherapie geführt.^{202,205,206}

Silmitasertib, oder CX-4945, ist ein ATP-kompetitiver Hemmstoff, der vor allem auf Grund seiner erfolgversprechenden klinischen Studien (s. Abschnitt Maligne Neoplasien – Krebs) oft genannt wird.^{165,169–171,207} Dabei hat Silmitasertib eine hohe Aktivität ($K_i = 0.38$ nM), ist aber nicht so selektiv für CK2, wie zuerst angenommen wurde, sondern hemmt auch einige andere Kinasen.^{165,179,208,209}

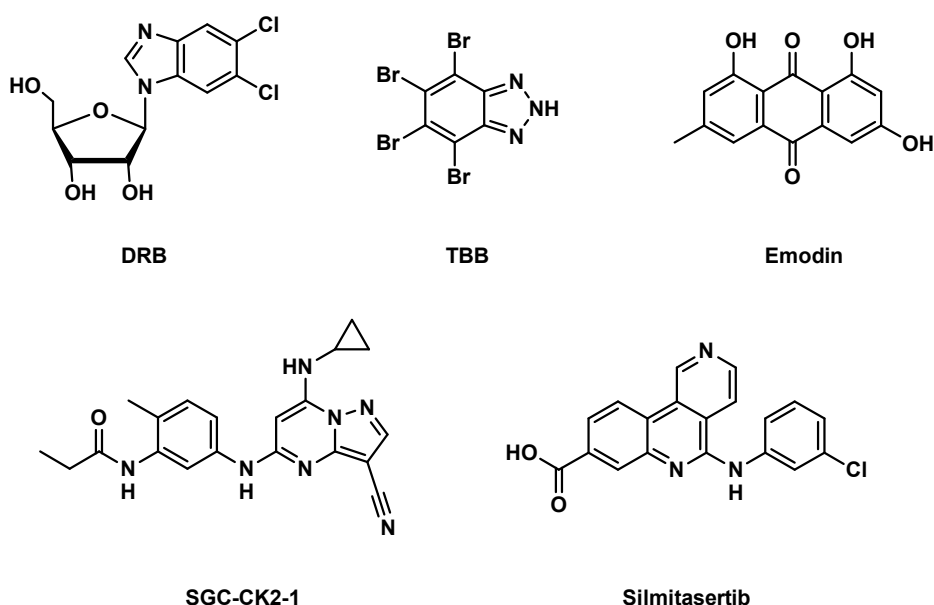


Abbildung 3: Strukturen von ATP-kompetitiven CK2-Hemmstoffen. 5,6-Dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB), 4,5,6,7-Tetrabromo-1H-benzotriazol (TBB), Emodin, SGC-CK2-1 und Silmitasertib

1.4.2 Hemmstoffe der CK2 α / β -Interaktion

Eine weitere Strategie, um die Aktivität von CK2 zu modulieren ist die Hemmung der CK2 α / β -Interaktion. Hemmstoffe an dieser Bindungsstelle haben den Vorteil, dass sie vermutlich spezifischer für CK2 sind, da sie nicht an der zwischen verschiedenen Kinasen stark

konservierten ATP-Bindungsstelle binden. Ein Maß für diese Selektivität ist der Gini-Koeffizient, der anhand von Inhibitionstests mit einem Panel von Kinasen bestimmt wird.²¹⁰ Nach diesem Maßstab gehört ein CK2 α / β -Interaktionshemmer, compound 1, zu den selektivsten heute bekannten CK2-Inhibitoren.²¹¹ Allerdings ist es deutlich schwieriger, starke Hemmstoffe für diese Bindungsstelle zu entwickeln, da sie keine tiefe Bindungstasche mit vielen Kontaktmöglichkeiten bildet, sondern eher eine Oberfläche. Ein weiterer Nachteil dieses Inhibitionsmechanismus ist, dass die Aktivität von CK2 nur bezüglich der Klasse III-Substrate gehemmt wird, für deren Phosphorylierung das Holoenzym notwendig ist.^{41,176} Dennoch hat sich gezeigt, dass die Hemmung der CK2 α / β -Interaktion zu reduziertem Krebszellenwachstum führt, wodurch diese Strategie für die Entwicklung von klinisch einsetzbaren Wirkstoffen interessant ist.^{167,211,212}

Viele bisher beschriebene Hemmstoffe dieser Protein-Protein-Interaktionen (PPI) sind Peptide: So entwickelten Laudet et al. das zyklische Peptid Pc, dessen Sequenz auf einem Teil der CK2 β beruht, der an der Bindung an CK2 α beteiligt ist und das daher die CK2 α / β -Interaktion hemmt.⁶⁸ Dieses Peptid wurde später für die Verwendung in einem Fluoreszenzanisotropie-basierten Bindungsassay weiterentwickelt (s.1.5.4).²¹³ Außerdem wurde die Stabilität des Peptids optimiert und es wurden Derivate hergestellt, die Zellen penetrieren können und so für die Erforschung der CK2 α / β -Interaktion *in cellulo* von Bedeutung sind.^{167,212,214,215}

Neben den Peptidinhibitoren gibt es auch einige kleine Moleküle, die die CK2 α / β -Interaktion hemmen. DRB (s. auch 1.4.1) bindet neben der ATP-Bindungsstelle auch die CK2 α / β -Bindungsstelle und hemmt diese Interaktion.¹⁹³ Ein weiterer niedermolekularer Hemmstoff dieser PPI ist W16, das bei einem Screening von Podophyllotoxin-Analoga entdeckt wurde.²¹⁶ Im Gegensatz zu DRB liegt von dieser Interaktion bisher keine Kristallstruktur vor, daher ist ihre genaue Bindungsstelle unbekannt. W16 hemmt die CK2 α / β -Interaktion mit einem IC₅₀-Wert von ca. 40 μ M ist der Ausgangspunkt für Optimierungsansätze, unter anderem in dieser Arbeit.²¹⁶⁻²¹⁸ Brear et al. haben ebenfalls einen niedermolekularen Inhibitor der CK2 α / β -Interaktion, CAM187, entdeckt und optimiert.²¹⁹ Außerdem haben Kufareva et al. mit ihrer Substanzreihe um die oben bereits erwähnte compound 1 zur Gruppe der CK2 α / β -

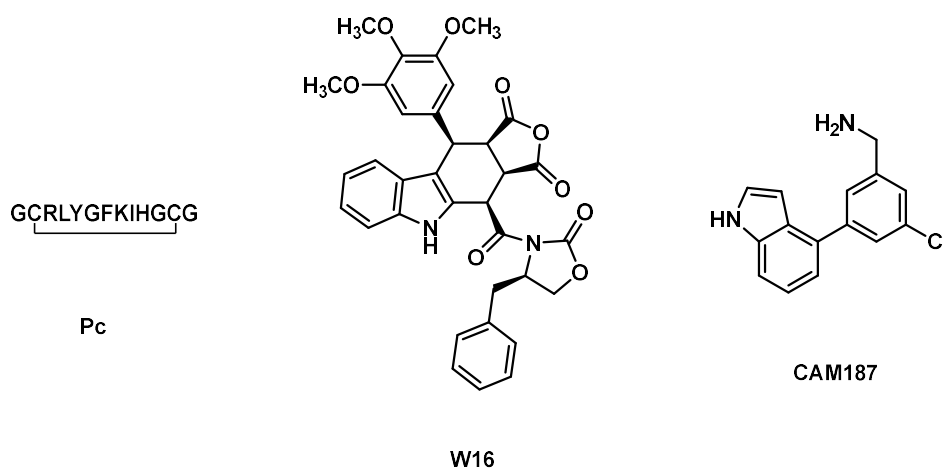


Abbildung 4: Hemmstoffe der CK2 α / β -Interaktion. Pc, W16 und CAM187.

Interaktionshemmer beigetragen. Daneben blockieren einige Hemmstoffe der ARC-Reihe (ARC-1502 und ARC-3140) die Bindung zwischen CK2 α und CK2 β (s. auch 1.4.5 Bisubstrat-Inhibitoren).⁷²

1.4.3 Hemmstoffe der Substratbindung

Einige Hemmstoffe der CK2 blockieren die acidophile Substratbindestelle der CK2 α ;^{51,52} hierzu gehört Heparin, ein negativ geladenes Polysaccharid.^{220,221} Die meisten Inhibitoren an der Substratbindestelle sind aber Peptide, z.B. Polyglutamylpeptide wie (Glu)₇₀.²²²

Einige cyclische Peptide, wie P15 und seine Derivate, hemmen die enzymatische Aktivität der CK2, indem sie an die Phosphoakzeptorstelle des Substrats und CK2 α binden.^{222,223} P15 wurde modifiziert, um es zellpermeabel zu machen, und ist unter dem Namen CIGB-325 (auch CIGB-300) erfolgreich in Zellen, Mausmodellen und ersten klinischen Studien an Krebspatient*innen (u.a. Gebärmutterhalskrebs) getestet worden.^{166,172,223–231} Außerdem wurde CIGB-325 auch zur Behandlung von COVID-19 untersucht, wo es möglicherweise zu einer Verringerung von Lungenläsionen bei Patient*innen mit Lungenentzündung beiträgt.²³²

1.4.4 Allosterische Hemmstoffe

Es gibt immer wieder Anstrengungen, weitere Bindungsstellen für CK2-Hemmstoffe zu finden, die über einen allosterischen Mechanismus wirken.²³³ Die vielversprechendste Bindungsstelle für solche Inhibitoren ist die α D-Tasche, die sich in der Nähe der ATP-Bindungsstelle befindet und in einigen Kristallstrukturen von Phe121 besetzt ist.^{234,235} Diese Bindungsstelle ist ein interessanter Ansatzpunkt für die Inhibitorentwicklung, da sie vermutlich spezifisch für die

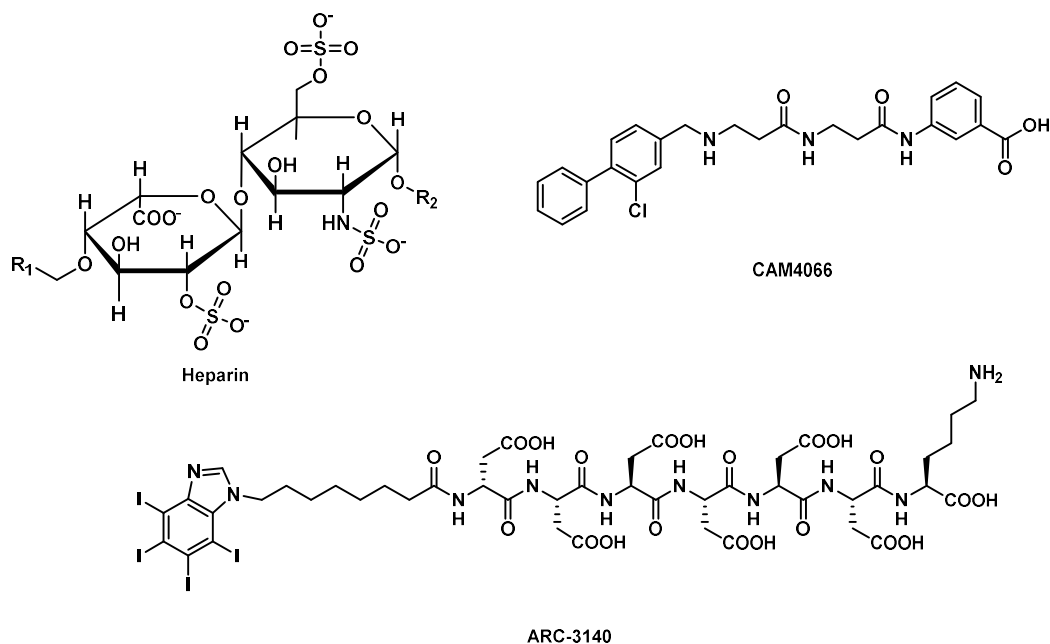


Abbildung 5: CK2-Inhibitoren mit verschiedenen Wirkungsweisen. Heparin bindet die Substratbindungsstelle, CAM4066 bindet die α D-Stelle und die ATP-Bindungsstelle, ARC-3140 bindet gleichzeitig die ATP- und Substratbindungsstellen und zusätzlich die CK2 α / β -Interaktionsstelle.

CK2 ist und gleichzeitig eine wohldefinierte Bindungstasche bietet.^{41,234,235} Der erste Hemmstoff an dieser Bindungsstelle war CAM4066, dessen hemmende Wirkung allerdings auf der Blockade der ATP-Bindungsstelle beruht, was auch bei weiteren α D-Hemmstoffen der Fall ist.^{235,236} Eine direkte Reduktion der Enzymaktivität durch die Bindung eines Liganden an der α D-Tasche ist bisher nicht belegt, auch wenn es Hemmstoffe gibt, für die dieser Mechanismus vermutet wird.^{41,237} Trotzdem ist diese Bindungsstelle für die Hemmstoffentwicklung von Interesse, weil sie als zusätzliche Bindungsstelle für Hemmstoffe an der ATP-Tasche dienen kann und so ihre Affinität und Spezifität erhöhen kann.^{219,236} Diese Strategie war auch bei der Entwicklung von KN2 erfolgreich; diese Substanz bindet sowohl die α D-Stelle als auch die ATP-Bindungsstelle und zeichnet sich durch hohe Affinität und Spezifität aus.²³⁸ Eine weiter postulierte allosterische Bindungsstelle für CK2-Inhibitoren, site A, wurde durch weitere Experimente ebenfalls in Zweifel gezogen: Die an dieser Stelle bindenden Substanzen wirken wohl eher durch einen ATP-kompetitiven Mechanismus.^{177,239,240}

1.4.5 Bisubstrat-Inhibitoren

Eine Möglichkeit, die Affinität und Spezifität von CK2-Hemmstoffen zu steigern, ist die Entwicklung von Bisubstrat-Inhibitoren, also Hemmstoffen, die an zwei Bindungsstellen gleichzeitig ansetzen.⁴¹ Ein Beispiel hierfür sind die Substanzen ARC-1502 und seine nahen Verwandten. Bei diesen Stoffen ist ein ATP-kompetitiver Inhibitor, der von TBBi abgeleitet ist, über ein Verbindungsstück an ein Oligoaspartat gekoppelt, das an die Substratbindungsstelle bindet. ARC-1502 kommt dabei mit einem $K_i = 0,5$ nM auf eine extrem hohe Affinität für CK2 α .²⁴¹ Für ARC-1502 und ARC-3140 konnte außerdem gezeigt werden, dass sie zusätzlich an die CK2 α/β -Bindungsstelle binden und so die Bildung des Holoenzym hemmen. Dabei wurde je nach Messtechnik ein K_i von $6,4 \pm 1,5$ μ M oder $9,5 \pm 1,8$ μ M für ARC-1502 und $4,8 \pm 0,7$ μ M, bzw. $5,2 \pm 0,8$ μ M für ARC-3140 gemessen (s. auch Abschnitt 3.3.5).⁷² Der gleiche Ansatz wurde für den ATP-kompetitiven Inhibitor CX4945 (Similtasertib) erfolgreich umgesetzt,²⁴² während Cozza et al. ebenfalls einen tetrabromierten Hemmstoff, N1-(4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol-2-yl)-propan-1,3-diamin (K137) an der ATP-Bindungsstelle mit Oligoaspartat oder Oligoglutamat zu wirksamen Bisubstrat-Inhibitoren kombinierten.²⁴³

1.5 Methoden zur Messung von PPI der CK2

1.5.1 Grundsätzliche Überlegungen zur PPI-Messung

Es gibt verschiedene Herangehensweisen, um PPI zu erforschen. Die hier besprochenen Methoden beziehen sich auf die quantitative Messung der Interaktionsstärke in Form der Bindungskonstante, bzw. der Dissoziationskonstante K_D . Diese Messungen erfolgen hier *in vitro* an isolierten Proteinen bzw. Liganden, um den Einfluss von schwer kontrollierbaren Umwelteinflüssen zu verringern, die im lebenden Organismus und auch in Zellsystemen stets vorhanden sind: So interagieren Proteine in Zellen mit zahlreichen anderen Proteinen und sonstigen Molekülen, deren Konzentration schwer zu kontrollieren und zu messen sind.

Um PPI quantitativ untersuchen zu können, ist eine Methode nötig, die zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand unterscheidet. Bei der Entwicklung und Wahl der richtigen Messmethode gibt es sowohl theoretische als auch praktische Stärken und Schwächen verschiedener Methoden, die man beachten muss. Unter anderem:

- Beschaffenheit der Proteinkonstrukte: Für viele Assays werden Proteine entweder fluoreszenzmarkiert, immobilisiert, oder es wird nur ein Teil des Proteins verwendet. All diese Modifikationen können mit einer PPI interferieren, was zu ungenauen oder verfälschten Messergebnissen führen kann. Dies gilt auch für posttranslationale Modifikationen, die normalerweise bei der Herstellung des Proteins von der Zelle hinzugefügt werden. Wird das Protein rekombinant hergestellt, so können diese fehlen oder verändert sein. Bei der Etablierung einer neuen Methode für die PPI-Messung muss daher gewährleistet werden, dass die genutzten Proteinkonstrukte die PPI akkurat abbilden können.
- Eignung zum Hochdurchsatzscreening (engl. high-throughput screening, kurz HTS): Wenn eine PPI-Messmethode auch zur Erforschung von Hemmstoffen dieser Interaktion dienen soll, ist es von Vorteil, wenn sie HTS-geeignet ist. Bei diesen Screenings werden tausende verschiedene Substanzen auf ihre Wirkung getestet. Daher muss eine geeignete Messmethode automatisierbar sein, indem sie z. B. in Mikrotiterplatten oder anderen für maschinelles Auslesen standardisierten Gefäßen gemessen wird. Außerdem sollte auch die Vorbereitung, also das Pipettieren der Reagenzien, möglichst von einem Roboter übernommen werden können.
- Genauigkeit: Bei jeder Methode ist Genauigkeit, aber auch die Robustheit der gemessenen Ergebnisse von großer Bedeutung dafür, wie aussagekräftig die gemessenen Werte sind.
- Materialverbrauch: Für die praktische Arbeit ist oft entscheidend, wie viel Material eine Methode verbraucht, da damit meist Kosten verbunden sind. Dies beinhaltet die Proteinkonstrukte, die in der Herstellung aufwändig und in der Beschaffung teuer sind, aber auch Verbrauchsmaterialien und Reagenzien, die für jede Messung benötigt werden.

Dies sind nur einige der Eigenschaften von Messmethoden, die für die PPI-Messung wichtig sind. Praktisch gesehen muss oft zwischen verschiedenen Eigenschaften abgewogen werden: So ist ein kleines Messvolumen für den Materialverbrauch und auch für die Automatisierbarkeit oft ein Vorteil, ist dabei aber schwieriger genau zu pipettieren, was zu größeren Ungenauigkeiten führen kann.²⁴⁴

1.5.2 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Messprinzip der ITC

Bei der Messung von PPI mittels ITC wird von der Tatsache Gebrauch gemacht, dass bei der Interaktion von zwei Proteinen Energie in Form von Wärme aufgenommen oder abgegeben wird. Die Messung findet in Lösung in einer Zelle des ITC-Geräts statt, deren Temperatur über

eine Kopplung mit einer Referenzzelle konstant gehalten wird. Während der Messung wird schrittweise der Ligand in die Zelle injiziert, in der sich bereits der andere Bindungspartner der Interaktion befindet. Wenn eine Bindung stattfindet, muss das Gerät die resultierende Temperaturveränderung ausgleichen. Die hierzu benötigte Energie in Form von elektrischem Strom wird gemessen und stellt das Signal dar. Wenn man die Temperaturveränderung pro Mol zugefügtem Liganden in Abhängigkeit des Konzentrationsverhältnisses der beiden Bindungspartner aufträgt, kann man aus dieser Bindungskurve die Dissoziationskonstante K_D , die Stöchiometrie, sowie die Reaktionsenthalpie der Bindung ablesen (s. Abbildung 6).^{245–247}

Anwendung der ITC in der CK2-Forschung

Die CK2 α / β -Interaktion wurde 2008 von Raaf et al. mit ITC vermessen.⁴ Die Methode wurde weiter genutzt, um mit Mutationsexperimenten die Bindungsoberfläche zwischen CK2 α und CK2 β genauer zu untersuchen.⁷¹ Auch für die Charakterisierung des CK2 α / β -Interaktionshemmers, Pc, wurde ITC eingesetzt und hat dabei untereinander vergleichbare Ergebnisse erzeugt.^{4,248}

ITC hat für die Erforschung von Proteininteraktionen einige Vorteile: Sie kommt ohne zusätzliche Markierung der Proteine aus, wodurch ein naturnahes Protein eingesetzt werden kann. Außerdem gibt sie nicht nur Auskunft über die Dissoziationskonstante der Bindung, sondern erlaubt zusätzlich die Bestimmung der thermodynamischen Parameter einer Bindungsreaktion.^{245,247} Wichtige Nachteile der Technik sind die große Menge an Material, also der zu untersuchenden Moleküle, das für die Messung benötigt wird und ihre geringe Eignung für HTS.^{4,249}

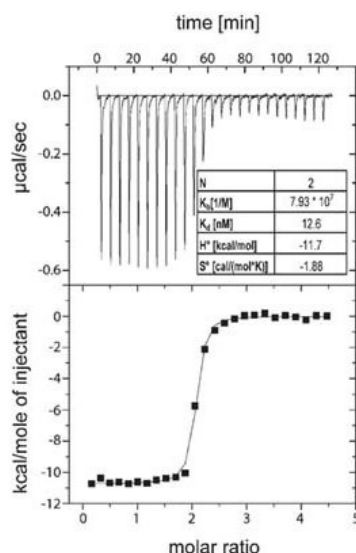


Abbildung 6: ITC Messung der CK2 α / β -Interaktion.

Oben: Temperaturveränderung pro Sekunde über die Zeit eines Experiments.

Unten: Temperaturveränderung pro mol injizierter CK2 α aufgetragen gegen das molare Verhältnis der beiden Bindungspartner. Die Bindungsparameter in der eingefügten Tabelle wurden als Durchschnitt aus drei Replikaten des Experiments bestimmt.

Mit Erlaubnis des Verlags übernommen aus Raaf et al. Protein Sci Vol. 17; 2180-2186 (2008).⁴

1.5.3 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR)

Bei der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (Engl.: Surface plasmon resonance, kurz SPR) wird ein Bindungspartner auf einem dünnen Metallchip immobilisiert. Dann wird der andere Bindungspartner (Ligand) in Lösung über diesen Metallchip gespült. Bindung dieses Liganden an den immobilisierten Bindungspartner verändert den Brechungsindex der

Metallschicht des Chips. Licht, das auf der Rückseite des Sensors reflektiert wird, wird in einem bestimmten Einfallswinkel absorbiert und löst Oberflächenplasmonresonanz aus. Dieser Winkel ändert sich durch einen veränderten Brechungsindex der Metallschicht und diese Winkelveränderung ist das Signal, was im SPR-Experiment ausgelesen wird.²⁵⁰

In der CK2-Forschung wurde SPR genutzt, um die Bindung von Polylysinen an CK2 zu messen, aber auch zur Erforschung der CK2 α / β -Interaktion und deren Hemmstoffe.^{68,211,251}

Für diese Technik müssen Proteine immobilisiert werden. Dies kann auf verschiedene Arten geschehen und geht manchmal mit Veränderungen des Ursprungsproteins einher, zum Beispiel wenn ein Hexahistidin zur Fixierung auf einem Ni-NTA-Chip (Nickel-Nitrilotriessigsäure) verwendet wird; es gibt aber auch unmarkierte Fixierungsmöglichkeiten.²⁵² SPR ist eine sehr genaue Technik und ist mit geeignetem Messgerät HTS-fähig.¹⁶² Ein großer Vorteil der Technik liegt in der Möglichkeit, Reaktionen in Echtzeit zu beobachten, wodurch kinetische Messungen von Bindungen möglich sind.²⁵³ Da für SPR-Messungen Goldchips zur Fixierung verwendet werden, ist es eine eher kostspielige Methode.

1.5.4 Fluoreszenzanisotropie (FA)

Ein weiterer Assay zur Erforschung der CK2-Interaktion basiert auf der Messung von Fluoreszenzanisotropie: Wird ein Fluorophor mit polarisiertem Licht bestrahlt, dann ist das emittierte Licht ebenfalls polarisiert. Wenn das Fluorophor sich allerdings in einer Lösung frei bewegt und dabei rotiert, dann wird das ausgesendete Licht durch diese Bewegung depolarisiert. Anisotropie ist ein Maß für diese Polarisierung und man kann sie für die Messung von Bindungen ausnutzen, wenn ein Bindungspartner (hier der Ligand) eine deutlich geringere Masse hat als der andere Bindungspartner. In diesem Fall kann man den kleineren Liganden fluoreszenzmarkieren. In Lösung wird der Ligand stark rotieren und eine geringe Anisotropie aufweisen; an ein größeres Molekül gebunden ist die Anisotropie dagegen größer, da größere Komplexe weniger stark rotieren.^{254,255}

Im Fall von CK2 wurde ein Assay entwickelt, bei dem das zyklische Peptid Pc, welches auf der CK2 α -Bindungsstelle der CK2 β beruht, mit 5,6-Carboxyfluorescein fluoreszenzmarkiert wird. Durch die Messung der Fluoreszenzanisotropie kann man so die Bindung an CK2 α feststellen.²¹³ Dieser Assay ist zuverlässig und hochdurchsatzfähig; er wurde bereits für die Untersuchung von CK2-Hemmstoffen verwendet. Der Materialverbrauch hält sich durch das Mikrotiterplattenformat in Grenzen, allerdings muss für die Anwendung Pc hergestellt und markiert werden. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass das verwendete Peptid nur einen Teil der CK2 α / β -Interaktion abbilden kann.^{72,167,213}

1.5.5 Radiometrischer Assay

Laudet et al. entwickelten 2008 einen radiometrischen Assay für die CK2 α / β -Interaktion, der ebenfalls hochdurchsatzgeeignet ist. Hierzu wurde biotinylierte CK2 β immobilisiert und dann mit CK2 α inkubiert, die mit ³⁵S-Methionin markiert war. Die Bindung der CK2 α an CK2 β konnte

dann durch die von ^{35}S verursachte radioaktive Strahlung gemessen werden.²¹⁶ Bei diesem Assay wird nur ein Protein mit einem Radioisotop markiert, was vermutlich keinen Einfluss auf die Bindungsreaktion hat. Allerdings ist die Verwendung von Radioisotopen mit Aufwand verbunden und kann so auch als Nachteil gesehen werden. Die Methode ist HTS-fähig, wegen ihrer seltenen Anwendung lässt sich über Zuverlässigkeit und Genauigkeit keine Aussage treffen.

1.5.6 Microscale Thermophoresis (MST)

Die CK2 α / β -Interaktion lässt sich auch mit MST messen. Hierzu wurde von Dr. Michaela Steinkrüger ein Assay entwickelt, der auch für diese Arbeit verwendet wurde.^{72,217,218}

Prinzipien der MST

Das Phänomen der Thermophorese wurde schon 1856 beschrieben, als beobachtet wurde, dass Stoffe in Lösung sich entlang eines Temperaturgradienten bewegen.²⁵⁶ Bis heute sind die genauen physikalischen Grundlagen für dieses Verhalten nicht völlig aufgeklärt. Bekannt ist jedoch, dass die Kontaktoberfläche zwischen gelöstem Molekül, bzw. Partikel, und dem umgebenden Medium das thermophoretische Verhalten entscheidend prägt.²⁵⁷ Auf die Eigenschaften dieser Kontaktoberfläche haben verschiedenste Faktoren einen Einfluss, zum Beispiel der Salzgehalt und der pH der Lösung sowie die Ladungen auf der Oberfläche des Moleküls. Auch die Anwesenheit von Detergenzien sowie die absolute Temperatur spielen eine wichtige Rolle.^{257,258}

Ein weiterer Faktor, der die Eigenschaften der Interaktionsoberfläche zwischen gelöstem Molekül und Lösungsmedium beeinflusst und damit das Thermophoreseverhalten des Moleküls verändert ist die Bindung von Liganden. Deshalb kann man sich die Thermophorese zunutze machen, um diese Bindung von Liganden nachzuweisen und zu quantifizieren.²⁵⁹

Mathematisch lässt sich Thermophorese wie folgt beschreiben:²⁶⁰⁻²⁶²

Der Partikelfluss (j) wird zum einen durch den thermophoretischen Molekülfluss (j_{TD}) und zum anderen durch die Diffusion (j_D) von Molekülen entlang des durch die Thermophorese verursachten Konzentrationsgradienten bestimmt.

Gleichung 1

$$j = j_{TD} + j_D$$

Dabei ist der thermophoretische Molekülfluss abhängig von der Konzentration c , der thermalen Diffusionskonstante D_T und dem Temperaturgradienten ∇T .

Gleichung 2

$$j_{TD} = -cD_T\nabla T$$

Die Diffusion ist abhängig von Diffusionskonstante D und dem Konzentrationsgradienten ∇c .

Gleichung 3

$$j_D = -D\nabla c$$

Ist ein Gleichgewichtszustand erreicht, so ist $j=0$. Daraus ergibt sich für geringe Temperaturunterschiede:

Gleichung 4

$$\frac{dc}{c} = -S_T dT$$

Wobei $S_T = D/D_T$ der Soret-Koeffizient ist. Durch Integration kommt man zu folgender Gleichung:

Gleichung 5

$$\frac{c}{c_0} = e^{-S_T \Delta T}$$

Da S_T durch Moleküleigenschaften wie unter anderem Größe, Ladung und Hydrophobizität abhängt, von denen sich bei Bindungsreaktionen praktisch immer mindestens ein Faktor verändert, kann Thermophorese zur Beobachtung von Bindungen verwendet werden.^{261,262}

Anwendung der MST in PPI-Assays

MST wurde zuerst in Bindungsassays für die Bindung von DNA-Aptameren an Proteine verwendet und dann für die Interaktion von Proteinen weiterentwickelt.^{259,262}

Der Temperaturgradient wird für diese Messungen durch einen Infrarot (IR)-Laser erzeugt. Die Diffusion des zu untersuchenden Moleküls wird über Fluoreszenz gemessen, daher ist es meist nötig, dieses Protein mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. So wird mit einem optischen Aufbau gleichzeitig der Temperaturgradient durch den IR-Laser erzeugt und die Fluoreszenz, und damit die Anwesenheit, des Proteins gemessen. Da Thermophorese auftritt, diffundiert das Zielprotein je nach seinen Eigenschaften entweder hin zu oder weg von dem vom IR-Laser erzeugten Temperaturmaximum, was sich daran zeigt, dass die gemessene Fluoreszenz entweder steigt oder sinkt, sobald der IR-Laser angeschaltet wird. Weil sich durch Bindung eines Liganden das Thermophoreseverhalten des Proteins verändert, verändert sich auch dieser Unterschied in der gemessenen Fluoreszenz, da diese direkt von der Konzentration des markierten Proteins abhängt (s. Abbildung 7).^{261,262}

MST hat für die Messung von PPI den entscheidenden Vorteil, dass durch das kleine Reaktionsvolumen (20 µL je Messpunkt) nur geringe Mengen Protein benötigt werden. Die meist nötige Fluoreszenzmarkierung kann auf verschiedene Weise erfolgen, wobei jede Methode ihre Vor- und Nachteile hat. Nachteilig ist bei der MST, dass sie nicht HTS-fähig ist. Die Methode wird in der Literatur als genau und robust gelobt, allerdings treten je nach Anwendung Schwankungen auf, die sich nicht einfach erklären lassen (s.u.).²⁶³

MST-Datenerhebung mit dem Monolith NT.115

Für die Messung mit dem Monolith NT.115 wird eine konstante Menge eines fluoreszenzmarkierten Zielproteins mit 16 aufsteigenden Konzentrationen eines Liganden vermischt und in Glaskapillaren auf einem Schlitten fixiert, der dann in das Gerät gefahren wird.^{261,264}

Gemessen wird die Fluoreszenzintensität über einen Zeitverlauf, während dem der IR-Laser ein- und wieder ausgeschaltet wird. Die dabei entstehende Fluoreszenzspur (engl. Trace) ist in Abbildung 7 dargestellt und lässt sich typischerweise in folgende Abschnitte unterteilen: Zuerst wird die anfängliche Fluoreszenz gemessen, ohne IR-Laser und Thermophorese. Direkt nach dem Einschalten des IR-Lasers folgt der T-Jump, dabei verändert sich die Fluoreszenz sehr schnell. Diese Veränderung lässt sich unter anderem durch die Reaktion des Fluorophors auf die Temperaturveränderung erklären. Danach findet die eigentliche Thermophorese statt, bei der das Zielprotein diffundiert und dann ein Gleichgewicht erreicht. Wenn der IR-Laser wieder abgeschaltet wird, folgt ein weiterer T-Jump in die andere Richtung und das markierte Protein diffundiert wieder zurück.^{261,264}

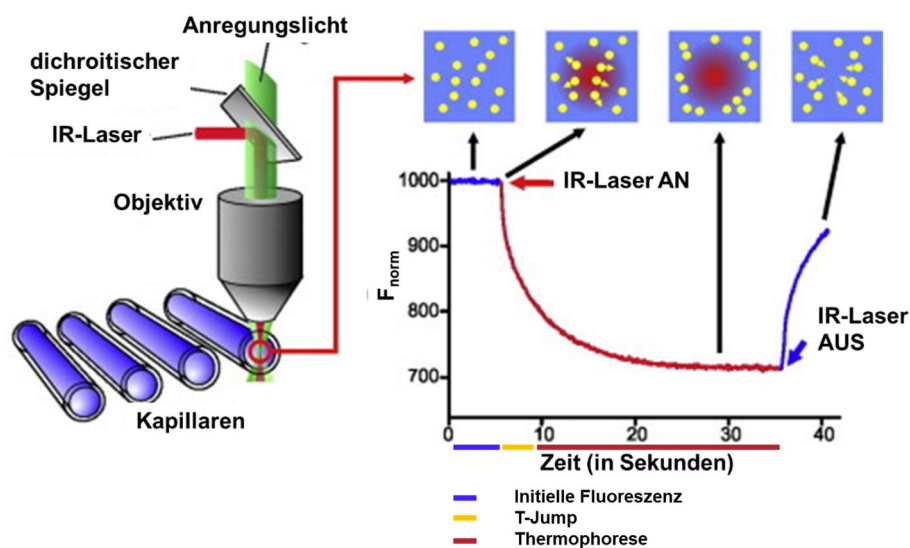


Abbildung 7: MST-Datenerhebung. Schematische Darstellung des Aufbaus eines MST-Geräts (links) und einer typischen MST-Spur (rechts). Abgewandelt aus Jerabek-Willemsen et al.²⁶⁴ (creative commons-Lizenz).

Für die Datenauswertung werden lediglich kleine Bereiche der MST-Spur verwendet (s. Abschnitt Datenauswertung). Die gesamte Spur wird allerdings für die Qualitätskontrolle benötigt. Außerdem wird vor und nach jeder Messung ein Kapillarenskan durchgeföhrt (s. Abbildung 8). Hierzu wird die Fluoreszenz gemessen, während alle Kapillaren unter der Messoptik hindurchgeföhrt werden. Dieser Scan dient ebenfalls der Qualitätskontrolle.

Um eine Affinitätsmessung durchzuführen, wird zum fluoreszenzmarkierten Zielprotein ein Ligand titriert. Dazu wird eine Verdünnungsreihe des Liganden hergestellt und die verschiedenen Konzentrationen werden mit dem Zielprotein vermischt. Für 16 verschiedene Verdünnungsschritte wird dann eine MST-Messung durchgeföhrt. In der Regel vergleicht man zur Auswertung die Initialfluoreszenz und die Fluoreszenz nach Thermophorese.^{261,265,266}

Qualitätskontrolle der MST-Daten

Es gibt mehrere Möglichkeiten, vor der Auswertung die Qualität einer MST-Messung zu beurteilen. Der Kapillarenskan vor der Messung gibt Aufschluss darüber, ob das fluoreszenzmarkierte Protein sich an den Wänden der Kapillaren absetzt, was die Messung beeinflussen würde. Eine solche Proteinadhäsion ist an der Form der Intensitätskurve des Kapillarenskans

zu sehen, die im Normalfall mittig einen höchsten Punkt erreicht (s. Abbildung 8); wenn das fluoreszenzmarkierte Protein an den Seitenwänden haftet, entstehen zwei Spitzen in der Kurve.^{261,265} Außerdem kann man in diesem Schritt sehen, ob der Ligand einen Einfluss auf die Fluoreszenz des markierten Zielproteins hat. Ist dies der Fall, kann man dieses Signal direkt als Bindungsassay auswerten, sofern bestimmte Artefakte (Eigenfluoreszenz des Liganden, Quenching durch den Liganden, ligandinduzierte Aggregation oder Adsorption an eines der genutzten Gefäße) ausgeschlossen werden können.^{267,268}

Die Form der MST-Spur ist ebenfalls wichtig für die Qualitätskontrolle: Vor dem Einschalten des IR-Lasers nimmt die gemessene Fluoreszenz oft durch Bleichen des Fluorophors ab. Auch dieses Phänomen kann durch Bindung eines Liganden oder andere Interaktionen mit dem zugefügten Liganden (z. B. Oxidationsreaktionen) beeinflusst werden und sollte, wenn es abhängig von der Ligandenkonzentration auftritt, untersucht werden.²⁶⁷ Weiterhin verändert sich der Verlauf der MST-Spur stark, wenn das Zielprotein aggregiert: Dann bekommt die MST-Spur ungleichmäßige Verformungen, die unterschiedlich stark ausgeprägt sein können. Diese Aggregation des Zielproteins kann in manchen Fällen durch eine Veränderung des Puffers verhindert werden, kann aber auch durch den Liganden ausgelöst werden.^{265,266}

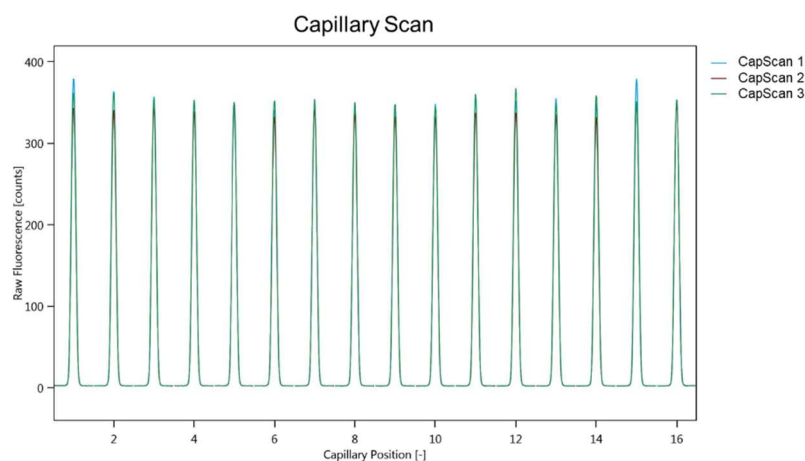


Abbildung 8: Typischer Kapillarscan einer MST-Messung. Der Scan stammt von drei MST-Messungen der CK2 α / β -Interaktion mit 1% DMSO.

Datenauswertung

Zur Auswertung wird zunächst aus jeder MST-Spur ein F_{norm} -Wert gebildet. Dazu werden zwei Zeiträume in der MST-Spur ausgewählt: Typischerweise wird die Fluoreszenz vor Einschalten des IR-Lasers (F_{cold}) und die Fluoreszenz nach Thermophorese (F_{hot}) genutzt. F_{cold} und F_{hot} sind Mittelwerte der Fluoreszenz über die ausgewählten Zeiträume. Zum Beispiel kann F_{cold} über den Zeitraum von einer Sekunde vor Einschalten des IR-Lasers gemessen werden und F_{hot} während einer Sekunde 19 Sekunden nach Einschalten des IR-Lasers.²⁶⁴ F_{norm} wird dann folgendermaßen berechnet:

Gleichung 6

$$F_{norm} = \frac{F_{hot}}{F_{cold}}$$

Die F_{norm} -Werte der verschiedenen MST-Spuren werden dann gegen die Ligandenkonzentration zu einer Dosis-Effekt-Kurve aufgetragen und es wird eine nichtlineare Regression mit folgender Gleichung durchgeführt:²⁶⁹

Gleichung 7

$$F_{norm} = r_{free} + (r_{bound} - r_{free}) \frac{([L] + [P] + K_D) - \sqrt{([L] + [P] + K_D)^2 - 4 [L][P]}}{2 [P]}$$

Dabei stehen r_{free} und r_{bound} jeweils für den F_{norm} -Wert im ungebundenen bzw. gebundenen Zustand, $[P]$ ist die Konzentration des markierten Zielproteins und $[L]$ steht für die Konzentration des unmarkierten Liganden. K_D ist die Dissoziationskonstante der gemessenen Bindung.

Zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener Dosis-Effekt-Kurven können diese auf den berechneten F_{norm} -Wert des ungebundenen Zustands normalisiert werden. Dazu werden die F_{norm} -Werte für die verschiedenen Ligandenkonzentrationen vom Wert r_{free} abgezogen. Diese Werte werden dann als ΔF_{norm} bezeichnet.²⁶¹

1.5.7 FRET

Physikalische Grundlagen

Fluoreszenz ist ein Phänomen, bei dem ein Elektron durch elektromagnetische Strahlung angeregt wird und sich in einen höheren energetischen Zustand begibt. Nach wenigen Nanosekunden fällt das angeregte Elektron zurück in seinen ursprünglichen Zustand und sendet dabei ein Photon aus. Diese ausgehende Strahlung hat eine höhere Wellenlänge als die anregende Strahlung. Ein fluoreszierendes Molekül oder Fluorophor hat dabei ein spezifisches Anregungs- und Emissionsspektrum mit jeweils einer optimalen Anregungs- und Emissionswellenlänge, λ_{ex} und λ_{em} . Das heißt, dass nur Licht innerhalb eines gewissen Wellenlängenbereichs ein bestimmtes Fluorophor anregen kann, und dass dieses Fluorophor nur Photonen mit bestimmten Wellenlängen aussendet (s. Abbildung 9).²⁵⁴

Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) tritt zwischen zwei Fluorophoren auf, wenn sie sich in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander befinden (etwa bis zu 80 Å) und das Emissionsspektrum des einen Fluorophors mit dem Anregungsspektrum des anderen überlappt.ⁱ Wenn das Fluorophor mit der geringeren Anregungswellenlänge, das Donorfluorophor, angeregt wird, wird die Energie des angeregten Elektrons über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen den Fluorophoren auf das zweite Fluorophor (Akzeptorfluorophor) übertragen. Dieses zweite Fluorophor gibt diese Energie dann in Form

ⁱFRET kann auch zwischen nicht-fluoreszenten Stoffen stattfinden, was für diese Arbeit aber nicht weiter von Bedeutung ist. S. 254 Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3 edn, (Springer, Boston, MA, 2006).

von Licht ab, wobei die Wellenlänge des Lichtes der charakteristischen Emissionswellenlänge des Akzeptorfluorophors entspricht. Zwei Fluorophore, deren Anregungs- und Ausstrahlungsspektren so überlappen, dass FRET stattfinden kann, bezeichnet man als FRET-Paar, wie zum Beispiel EGFP (Engl. enhanced green fluorescent protein) und mCherry (s. Abbildung 9).^{254,270}

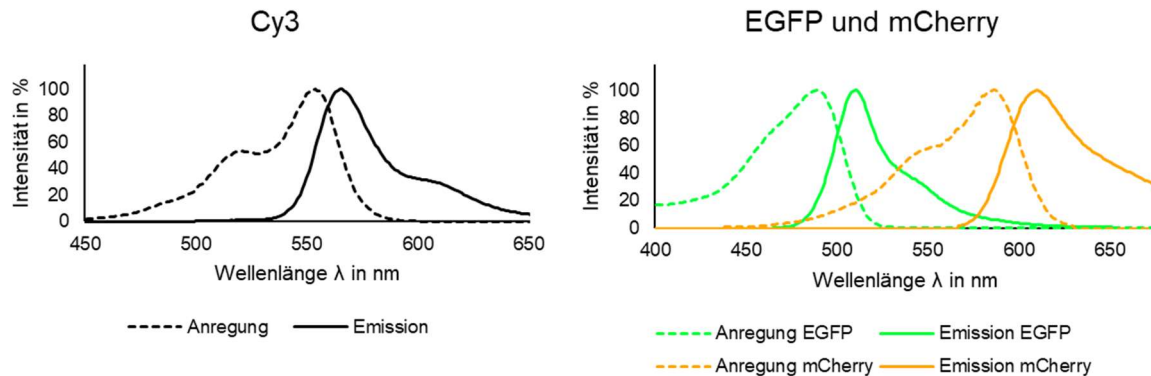


Abbildung 9: Anregungs- und Emissionsspektren verschiedener Fluorophore. Links: Cy3, rechts: EGFP und mCherry ²

Der Energietransfer bei FRET wird durch die FRET-rate k_T beschrieben:

Gleichung 8

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$

Wobei τ_D die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfluorophors ist, R_0 ist der Förster-Radius und r ist der Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor. Der Förster-Radius ist der Abstand zwischen den Fluorophoren, bei dem 50% der Anregungsenergie des Donor-Fluorophors durch FRET auf das Akzeptorfluorophor übergeht. Dieser hängt von verschiedenen Faktoren ab, der Quantenausbeute des Donorfluorophors in der Abwesenheit des Akzeptorfluorophors, der räumlichen Orientierung der Dipole zueinander, dem Brechungsindex des Mediums und dem Integral der überlappenden Fluoreszenzspektren der beteiligten Fluorophore.²⁵⁴

Praktisch wird FRET meistens als FRET-Effizienz E ausgedrückt, also dem Anteil der Anregungsenergie des Donors, der durch FRET übertragen wird. In Situationen, in denen der Abstand der Fluorophore zueinander konstant ist, ist die gleich dem Verhältnis der Donorfluoreszenz in An- und Abwesenheit des Akzeptorfluorophors:

Gleichung 9

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D}$$

F_{DA} und F_D sind die Fluoreszenzintensität des Donorfluorophors, jeweils in An- und Abwesenheit des Akzeptors.²⁵⁴

Anwendung von FRET zur Detektion von PPI

Da FRET nur auftritt, wenn zwei Fluorophore sich sehr nahe sind, kann man dieses Phänomen nutzen, um Interaktionen zu messen. Wenn man zwei Bindungspartner mit je einem kompatiblen Fluorophor koppelt, kann man ihre Bindung durch FRET sichtbar machen und messen. Durch Titrationsexperimente ist es so möglich, eine Dissoziationskonstante für die Bindung zu bestimmen oder die Hemmung der Interaktion durch Inhibitoren zu messen.^{271–273}

Wahl der Fluorophore

Um eine PPI quantitativ zu analysieren, müssen die beiden Proteine jeweils mit einem Fluorophor eines FRET-Paares konjugiert werden. Es gibt verschiedene Arten für Fluorophore, die je nach Art der Anwendung geeignet sein können. Bei der Auswahl müssen verschiedene Faktoren beachtet werden, unter anderem die Folgenden:

Spektrale Eigenschaften

Eine Voraussetzung für das Auftreten von FRET ist das Überlappen des Emissionsspektrums des FRET-Donors mit dem Anregungsspektrum des FRET-Akzeptors. Gleichzeitig sollten die Anregungs- und Emissionsmaxima nicht zu nah beieinander liegen, damit sich die Fluorophore getrennt voneinander anregen lassen und die ausgegebenen Signale der beiden Fluorophore unterschieden werden können.²⁷⁴

Größe und Markierungsstelle

Wenn Proteine zur Messung von PPI markiert werden, muss sichergestellt werden, dass die gebundenen Fluorophore nicht mit der zu messenden Interaktion interferieren. Je nach PPI kann es daher günstig sein, kleinere Fluorophore zu wählen. Außerdem ist entscheidend, an welcher Stelle des Proteins das Label angebracht ist. Bei einigen Markierungsmethoden, z. B. der Markierung mit *N*-Hydroxysuccinimidestern (NHS-Ester) werden primäre Amine markiert, wovon es in der Regel mehrere in einem Protein gibt.²⁷⁵ Daher ist meist nicht vorherzusagen, wo das Fluoreszenz-Label angebracht wird. Andere Methoden, z. B. die Verwendung von fluoreszenten Proteinen, ermöglichen es, die Markierungsstelle zu wählen. Auch hier muss darauf geachtet werden, dass das Label die zu messende Interaktion nicht stört; um dies zu gewährleisten, sollten geeignete Kontrollexperimente durchgeführt werden. Gleichzeitig müssen die an FRET beteiligten Fluorophore während der PPI in räumlicher Nähe zueinander sein, da sonst kein FRET auftreten kann.²⁵⁴

Markierungsmöglichkeit

Die Signalstärke bei PPI-Messungen mit FRET hängt von der Anzahl markierter Bindungspartner ab. Bei chemischen Markierungsverfahren wie der oben genannten NHS-Ester-Markierung wird meist nur ein Teil der Moleküle auch tatsächlich markiert. Im Gegensatz dazu werden Proteinlabel über das genetische Material eingefügt und sind so bereits bei der Synthese des Proteins vorhanden. Außerdem ist es bei der Proteinaufreinigung durch chromatographische Verfahren ohne großen Aufwand möglich, unmarkiertes Protein von markiertem zu trennen.

In dieser Arbeit wurden zwei fluoreszente Proteine als Fluorophor genutzt: Das von GFP (Engl. green fluorescent protein) aus der Qualle *Aequorea victoria* der abgeleitete EGFP und mCherry, dessen Vorläufer RFP (Engl. red fluorescent protein) aus einer Scheibenanemone der Gattung *Discosoma* isoliert wurde. Theis-Feuvre et al. haben bereits 2005 gezeigt, dass eine N-terminale Markierung der CK2-Untereinheiten mit GFP-Derivaten die CK2 α / β -Interaktion nicht stört und das eine Messung von FRET zwischen so markierten CK2 α - und CK2 β -Untereinheiten möglich ist.⁸⁰

FRET-Messmethoden

Es gibt verschiedene Methoden, wie FRET gemessen werden kann. Die einfachste Art ist die Messung der Fluoreszenzintensität, wobei entweder die Fluoreszenz des Donor- oder Akzeptorfluorophors gemessen werden kann, da beide sich durch FRET verändern. Andererseits beeinflusst FRET auch die Fluoreszenzlebensdauer daher kann auch diese als Maß für FRET verwendet werden. Dazu werden oft spezielle Fluorophore mit einer langen Fluoreszenzhalbwertszeit genutzt z. B. Lanthanide.²⁷⁶

Auswertung von FRET-Signalen

Theoretisch ist es für die Berechnung der FRET-Effizienz lediglich nötig, die Fluoreszenz des Donorfluorophors in An- und Abwesenheit des Akzeptorfluorophors zu messen (s. Gleichung 9). Je nach experimentellem Aufbau ist es aber nicht möglich, diese Fluoreszenzintensitäten direkt zu messen, oder die gemessene Fluoreszenz wird durch andere Signale verfälscht. Daher wurden eine Reihe sogenannter FRET-Indizes entwickelt. Diese können, je nach Index, zwar das Auftreten von FRET abbilden, lassen sich aber in der Regel nicht in absolute FRET-Effizienz umrechnen und können daher als absolute Werte zwischen unterschiedlich durchgeführten Experimenten nicht verglichen werden.²⁷⁷

Eines der wichtigsten Störsignale in FRET-Experimenten ist das Phänomen des Bleed-through: Fluorophore werden zwar nur in ihrem spezifischen Anregungsbereich angeregt und emittieren nur in ihrem Emissionsbereich, diese Bereiche decken aber oft eine größere Bandbreite an Wellenlängen ab (s. Abbildung 9), wodurch zum Beispiel beim Anregen des Donorfluorophors das Akzeptorfluorophor teilweise ebenfalls angeregt wird und durch seine direkte Emission das FRET-Signal verfälscht. Umgekehrt kann auch das Donorfluorophor im üblichen Emissionsbereich des Akzeptorfluorophors ein Signal hervorrufen, was ebenfalls das FRET-Signal verfälscht. Die verschiedenen FRET-Indizes haben unterschiedliche Ansätze, wie Bleed-through rechnerisch ausgeglichen werden kann.²⁷⁷

In dieser Arbeit wurde die Dreikanalmethode und der daraus resultierende FRET-Index FRET_c oder F_c genutzt, da bei ihr jede relevante Art des Bleed-through Beachtung findet. Die Methode ist nach den drei Messkanälen benannt, von denen Gebrauch gemacht wird. Ein Messkanal ist eine Konfiguration von charakteristischen Anregungs- und Emissionswellenlängen, die für eine Messung verwendet werden: Beim Donorkanal D wird mit den Anregungs- und Emissionswellenlängen des Donors gemessen, im Akzeptorkanal A mit den Anregungs- und Emissionswellenlängen des Akzeptors und im FRET-Kanal mit der Anregungswellenlänge des

Donors und der Emissionswellenlänge des Akzeptors. Um das Bleed-through zu messen werden bei jedem Experiment Kontrollen mitgeführt, in denen die im Experiment genutzten Konzentrationen des Donorfluorophors und des Akzeptorfluorophors separat voneinander vorhanden sind. Anhand dieser Kontrollen wird gemessen, wie stark die Fluorophore durch die Anregungswellenlänge des jeweils anderen Fluorophors angeregt werden und wie stark das Emissionssignal im Emissionsbereich des jeweils anderen Fluorophors ist. Dabei hängt es sehr von der genutzten technischen Ausstattung ab, wie genau eine bestimmte Wellenlänge beim Anregen und Aufnehmen gefiltert werden kann. Daher ist es unerlässlich, diese Kontrollen bei jedem Experiment aufs Neue zu messen.^{278,279}

Berechnung von FRET_c

Zuerst wird von allen gemessenen Signalen in der Regel eine „Pufferkontrolle“, also eine Kontrollmessung des genutzten Puffers, als Hintergrundsignal abgezogen. Durch diesen Schritt können bei geringen Signalen durch zufälliges Grundrauschen negative Werte entstehen, die in den folgenden Schritten durch Multiplikation zu unsinnigen Ergebnissen führen können. Daher werden negative Werte bei dieser Methode durch 0 ersetzt, sofern sie im Bereich des Grundrauschens einer Messung liegen.^{278,279}

Wie oben beschrieben müssen zur Berechnung von FRET_c außerdem Kontrollen mit den im Experiment genutzten Konzentrationen der jeweiligen Fluorophore mitgemessen werden. Aus diesen Kontrollen werden dann die Korrekturfaktoren S1–S4 berechnet. Hierbei stehen D_d, F_d und A_d jeweils für die Donor-, FRET- und Akzeptorkanalsignale für die Donorkontrolle; D_a, F_a und A_a die jeweiligen Signale der Akzeptorkontrolle.

Gleichung 10

$$S1 = \frac{F_d}{D_d}$$

Gleichung 11

$$S2 = \frac{F_a}{A_a}$$

Gleichung 12

$$S3 = \frac{A_d}{D_d}$$

Gleichung 13

$$S4 = \frac{D_a}{A_a}$$

Faktoren S1 und S3 stellen dar, wie viel Signal das Donorfluorophor in den „fremden“ Kanälen, also den FRET- und Akzeptorkanälen, verursacht, jeweils im Verhältnis zum „eigenen“ Kanal, dem Donorkanal, in dem das stärkste Donorsignal zu erwarten ist. Die Faktoren S2 und S4 tun das gleiche für das Akzeptorfluorophor.

Mithilfe der Mittelwerte dieser Korrekturfaktoren werden dann nach Gleichung 14 und Gleichung 15 das Donor- und Akzeptorsignal der Messungen korrigiert. Dabei stehen D^c_{da} und

A_{da}^c jeweils für das korrigierte Donor- und Akzeptorsignal der Proben und D_{da} und A_{da} je für die entsprechenden unkorrigierten Signale.

Gleichung 14

$$D_{da}^c = \frac{(D_{da} - S4 * A_{da})}{(1 - S3 * S4)}$$

Gleichung 15

$$A_{da}^c = \frac{(A_{da} - S3 * D_{da})}{(1 - S3 * S4)}$$

Aus diesen korrigierten Werten und den gemessenen FRET-Signalen (F_{da}) wir dann mit Gleichung 16 FRETc (F_c) berechnet:

Gleichung 16

$$F_c = F_{da} - D_{da}^c * S1 - A_{da}^c * S2$$

2 Zielsetzung

Diese Arbeit befasst sich mit der Interaktion der Proteine CK2 α und CK2 β , den beiden Untereinheiten der Proteinkinase CK2. Dabei werden zwei Ziele verfolgt:

1. Optimierung von CK2 α / β -Interaktionshemmern:

Eine Reihe von Substanzen, deren Struktur auf dem CK2 α / β -Interaktionshemmer W16 basiert, wird auf ihre Fähigkeit untersucht, die CK2 α / β -Interaktion zu inhibieren. Dazu wird die Substanzreihe ausgehend von W16 erweitert: es werden verschiedene Strukturelemente der Verbindungen variiert und miteinander kombiniert (die Synthese erfolgt durch Dr. Lukas Kröger im Rahmen seiner Promotion). Die Substanzen werden mittels MST auf ihre Aktivität als CK2 α / β -Interaktionshemmstoff untersucht. Ziel ist es, auf Basis dieser Daten Struktur-Wirkungsbeziehungen zu untersuchen, die zum einen zu einer Optimierung der Substanzreihe als CK2 α / β -Interaktionshemmer genutzt werden. Zum anderen sollen Struktur-Wirkungsbeziehungen Aufschluss über die Natur der CK2 α / β -Interaktionsfläche und deren Interaktion mit Hemmstoffen geben.

2. Es wird eine neue Methode entwickelt, um die Interaktion zwischen CK2 α und CK2 β zu messen:

Die neue Methode nutzt das Prinzip des FRET (Förster-Resonanzenergietransfer), bei dem die räumliche Nähe zweier Fluorophore ein FRET-Signal erzeugt. Dazu werden die CK2-Untereinheiten mit geeigneten fluoreszenten Proteinen als Fusionsproteine exprimiert und aufgereinigt. Die neue Methode ist darauf ausgelegt, im Mikrotiterplattenformat ausgeführt zu werden und soll dazu geeignet sein, CK2 α / β -Interaktionshemmer zu detektieren und ihre Hemmwirkung zu quantifizieren. Um dies sicherzustellen, wird zuerst die CK2 α / β -Interaktion ohne Hemmstoffe quantifiziert und mit anderen Methoden verglichen. Außerdem werden bereits bekannte Hemmstoffe dieser Interaktion genutzt, um die Methode zu validieren. Ziel ist eine Methode, die im Hochdurchsatz-Screening eingesetzt werden kann, um Hemmstoffe für die CK2 α / β -Interaktion zu entdecken.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung der Proteine

3.1.1 CK2 α^{1-335} und CK2 β^{1-193}

Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden in *E. coli* exprimiert, über verschiedene Chromatografieverfahren gereinigt und auf SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate Polyacrylamid-Gelelektrophorese) analysiert, um die Reinheit der Proteine sicherzustellen (Abbildung 10).

Für beide CK2-Untereinheiten ist je eine Bande mit dem zu erwartenden Molekulargewicht zu sehen: Die Bande für CK2 α^{1-335} liegt etwas oberhalb des 35 kDa Markers, die der CK2 β^{1-193} ist zwischen der 15 kDa und 25 kDa Markierung zu sehen. Bei CK2 β^{1-193} ist zusätzlich eine Bande von etwa 40 kDa zu sehen, was ungefähr dem Molekulargewicht eines CK2 β -Dimers entspricht.

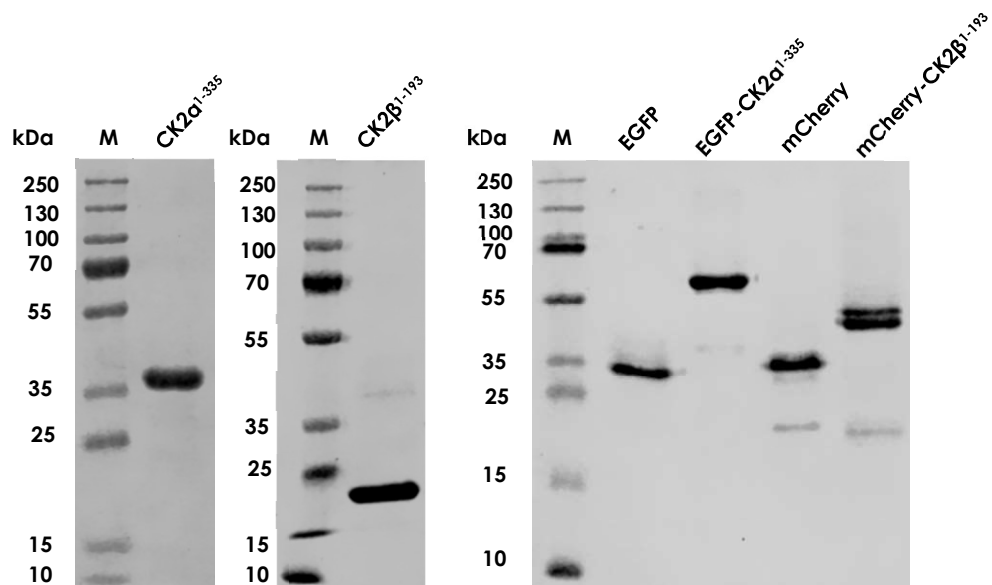


Abbildung 10: Coomassiegefärbte SDS-PAGE der aufgereinigten Proteine. Links: CK2 α^{1-335} (40,0 kDa). Mitte: CK2 β^{1-193} (22,5 kDa). Rechts: EGFP (27,1 kDa), EGFP-CK2 α^{1-335} (67,7 kDa), mCherry (26,8 kDa) und mCherry-CK2 β^{1-193} (49,9 kDa). Die Molekulargewichte wurden auf Basis der Aminosäuresequenzen der Proteine berechnet.

3.1.2 Fluoreszenzmarkierte Proteine für den FRET-Assay

Proteinexpression

Die Expression der fluoreszierenden Produkte (EGFP, EGFP-CK2 α^{1-335} , mCherry und mCherry-CK2 β^{1-193}) unter Standardbedingungen in kleinem Maßstab verlief erfolgreich, was bereits bei der Betrachtung der Kulturen sichtbar war und durch SDS-PAGE und Western-Blot bestätigt wurde (s. Abbildung 11). Interessanterweise wurden die Proteine hier bereits vor der Induktion mit IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) von den Bakterien hergestellt, was allerdings

bei einigen Proteinen bei der Kultur in größerem Maßstab in geringerem Umfang zu beobachten war (vgl. Abbildung 13).

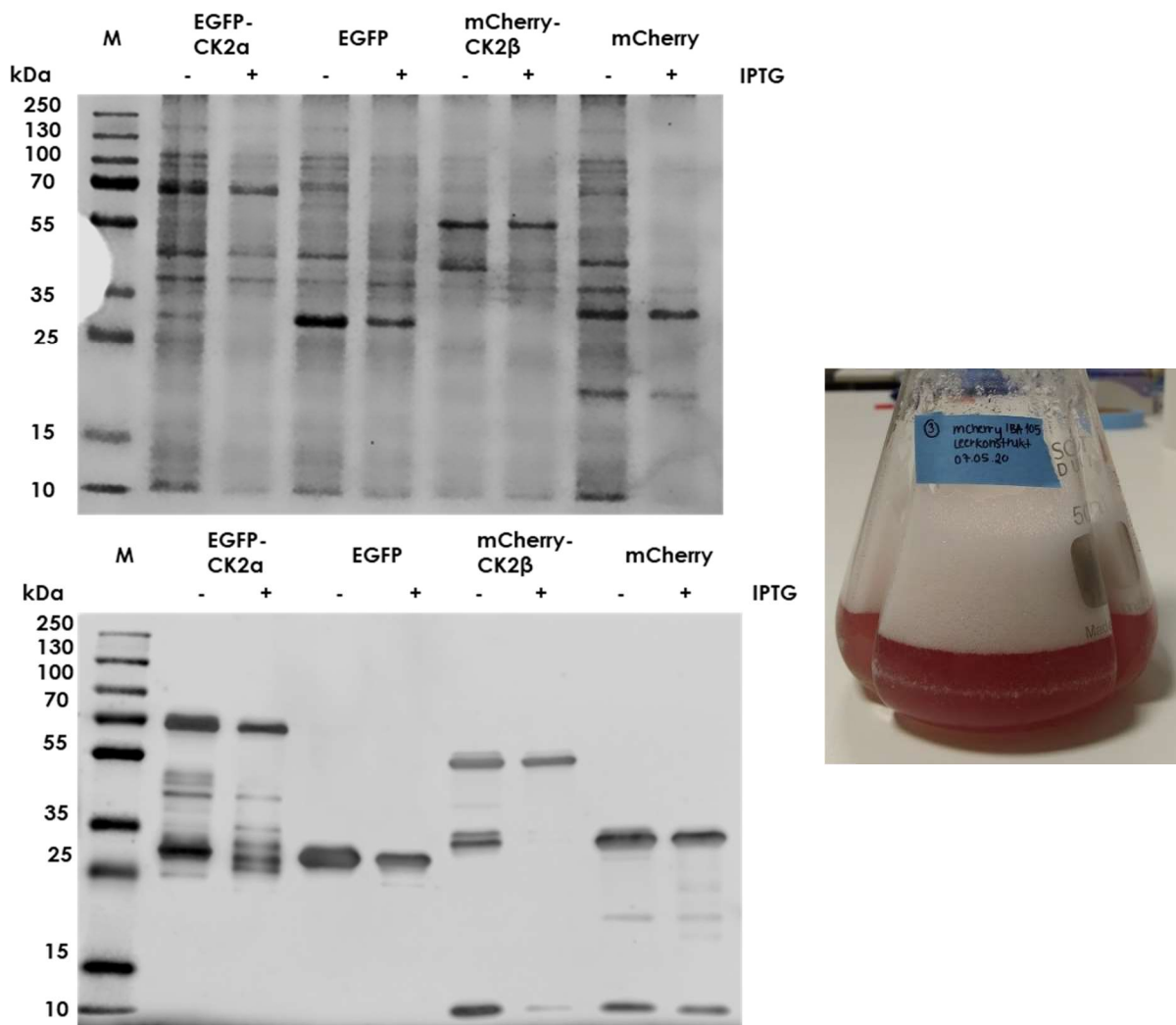


Abbildung 11: Herstellung der fluoreszenten Proteine. Links: Coomassie gefärbte SDS-PAGE (oben) und α -Strep Western Blot (unten) der Testkulturen für die Expression der fluoreszenten FRET-Konstrukte vor (-) und nach (+) der Zugabe von IPTG zur Induktion der Proteinexpression. Die Molekulargewichte sind 68 kDa für EGFP-CK2 α^{1-335} , 27 kDa für EGFP, 50 kDa für mCherry-CK2 β^{1-193} und 27 kDa für mCherry. Rechts: Testkultur für die Expression von mCherry. Durch die starke Farbe der Bakterienkultur wird die erfolgreiche Expression bestätigt.

Aufreinigung von mCherry

Die Aufreinigung von mCherry über die Strep-Tactin-Affinitätschromatographie war insgesamt erfolgreich. Das gewünschte Protein konnte von der Säule eluiert werden (s. Abbildung 12), auch wenn auf der SDS-PAGE zusätzlich zur erwarteten mCherry-Bande bei 27 kDa weitere Proteinbanden mit geringerem Molekulargewicht zu sehen sind (s. Abbildung 13). Da diese auch im Western-Blot, der mit Strep-tag II-spezifischem Antikörper inkubiert wurde, visualisiert werden, handelt es sich vermutlich um Abbauprodukte von mCherry.

Um dieses Abbauprodukt zu entfernen, wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Diese führte aber nicht zu dem gewünschten Ergebnis, da das Protein in einem Peak von der Säule eluiert wurde, in dem sich sowohl mCherry als auch das Abbauprodukt befanden (s. Abbildung 14). Es zeigte sich aber, dass die Nebenbande durch ein Abbauprodukt von mCherry verursacht wurde, da sie auf dem Western Blot auch ohne Verwendung eines Antikörpers in der charakteristischen Farbe von mCherry zu sehen ist (s. Abbildung 14).

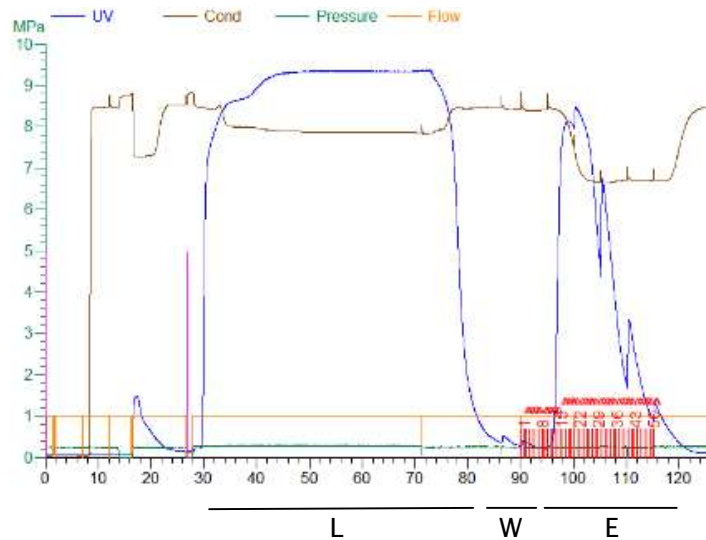


Abbildung 12: Chromatogramm der Aufreinigung von mCherry mit Strep-Tactin-Affinitätschromatographie. Es sind UV-Absorbanz bei 280 nm (blau), Konduktivität (braun), Druck in MPa (grün) und Durchflussrate (orange) über das durchgeflossene Volumen in mL angegeben. L ist die Ladephase, in der das geklärte Bakterienlysat auf die Säule aufgetragen wird, W ist der Waschschrift, in dem überschüssiges Protein von der Säule entfernt wird und E bezeichnet die Elutionsphase, in der das aufgereinigte Protein von der Säule gespült wird. Die roten Striche bezeichnen hier die Fraktionen, in denen das eluierte Protein aufgefangen wurde.

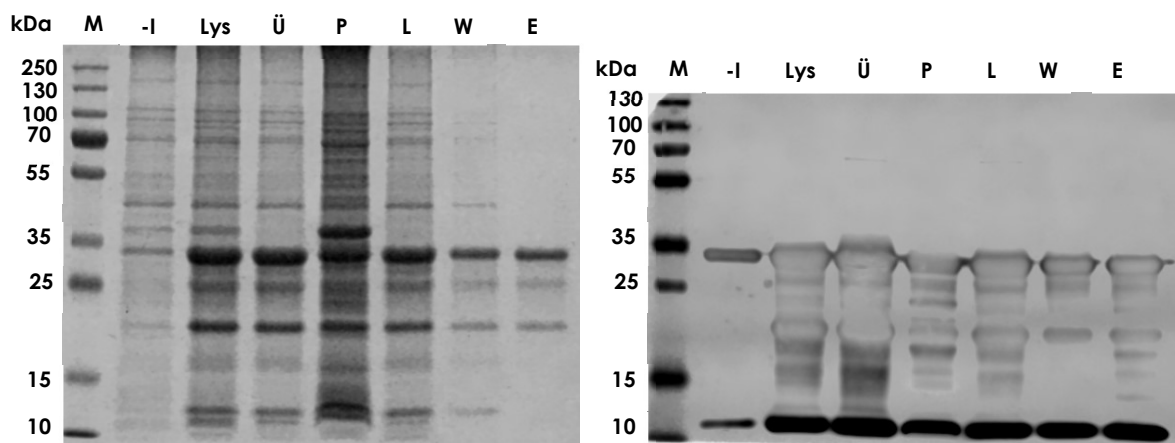


Abbildung 13: Aufreinigung von mCherry. Coomassie-gefärbte SDS-PAGE (links) und α -Strep Western Blot (rechts) der verschiedenen Schritte der Aufreinigung von mCherry (27 kDa) mit Strep-Tactin-Affinitätschromatographie. Von links nach rechts sind Marker (M), Lysat vor der Induktion mit IPTG (-I), Lysat (Lys), Überstand nach Zentrifugation des Lysats (Ü), Pellet nach Zentrifugation (P), Durchfluss des Ladeschritts (L), Durchfluss des Waschschrifts (W) und das aufkonzentrierte eluierte Protein (E) aufgetragen.

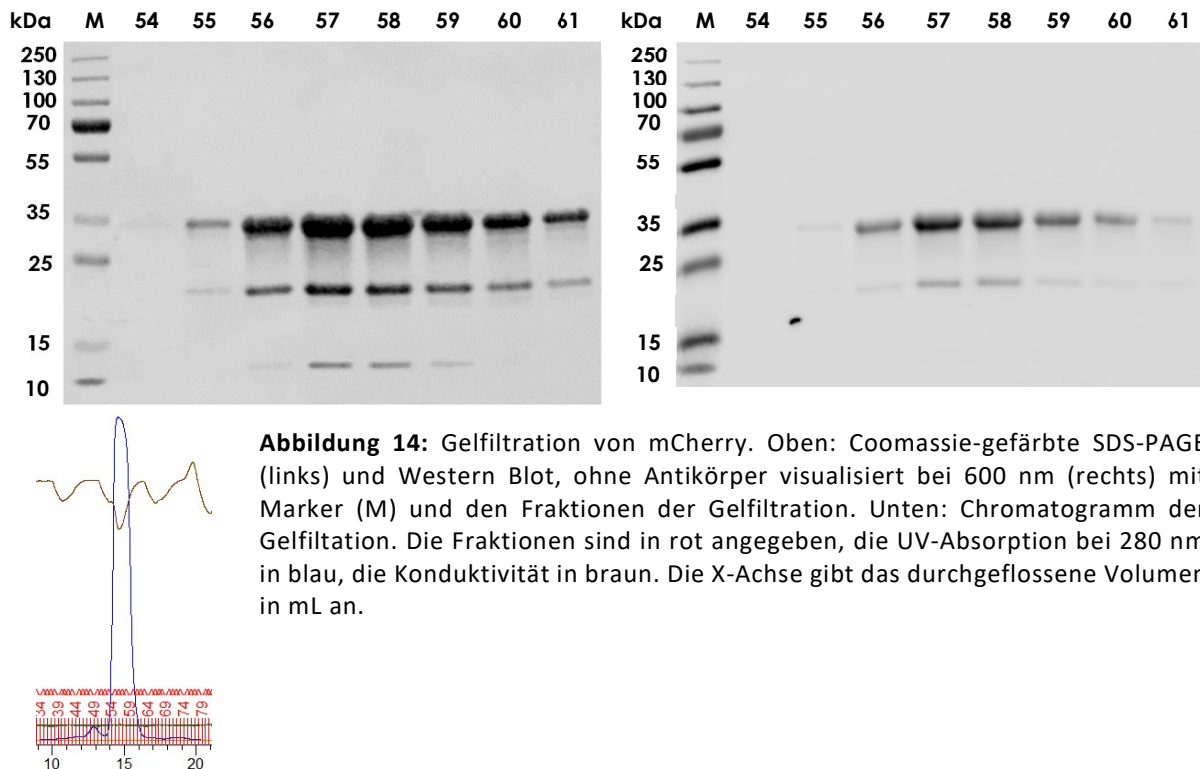


Abbildung 14: Gelfiltration von mCherry. Oben: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE (links) und Western Blot, ohne Antikörper visualisiert bei 600 nm (rechts) mit Marker (M) und den Fraktionen der Gelfiltration. Unten: Chromatogramm der Gelfiltration. Die Fraktionen sind in rot angegeben, die UV-Absorption bei 280 nm in blau, die Konduktivität in braun. Die X-Achse gibt das durchgeflossene Volumen in mL an.

Da mCherry nicht zur Quantifizierung von Proteininteraktionen verwendet werden sollte, sondern nur als qualitative Kontrolle diente, wurde dieses Abbauprodukt bei den weiteren Experimenten in Kauf genommen.

Bei der Aufreinigung ging ein Teil des exprimierten Proteins im unlöslichen Teil der Bakterienlysats, im Durchfluss beim Laden der Säule und beim Waschschrift verloren (s. Abbildung 13)

Aufreinigung von mCherry-CK2 β^{1-193}

Die Aufreinigung von mCherry-CK2 β^{1-193} über Strep-Tactin Affinitätschromatografie war zunächst nicht ausreichend, auf der entsprechenden SDS-PAGE sind noch mehrere Banden zu sehen, die auf Verunreinigungen schließen lassen. Daher wurde als zweiter Reinigungsschritt eine Ionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose eingesetzt. Danach findet man noch stets einige Banden auf der SDS-PAGE. Der Western-Blot mit CK2 β -spezifischem Antikörper zeigt dabei, dass es sich vermutlich um Abbauprodukte des Proteins handelt (s. Abbildung 15). Später stellte sich heraus, dass zumindest das niedermolekulare Nebenprodukt mindestens teilweise bei der Probenvorbereitung zur SDS-PAGE entsteht: Bei einer schonenden Aufbereitung der Proben (Inkubation der Proben bei Raumtemperatur anstelle von 95 °C) für das Gel in Abbildung 10 und bei der nativen PAGE (Abbildung 22) tritt mCherry-CK2 β^{1-193} zwar als Doppelbande auf, das niedermolekulare Produkt ist dort aber kaum zu erkennen. Bei beiden Aufreinigungsmethoden konnte jeweils nicht das gesamte Protein auf der Säule gebunden werden, im Durchfluss des Ladeschritts ging jeweils Protein verloren.

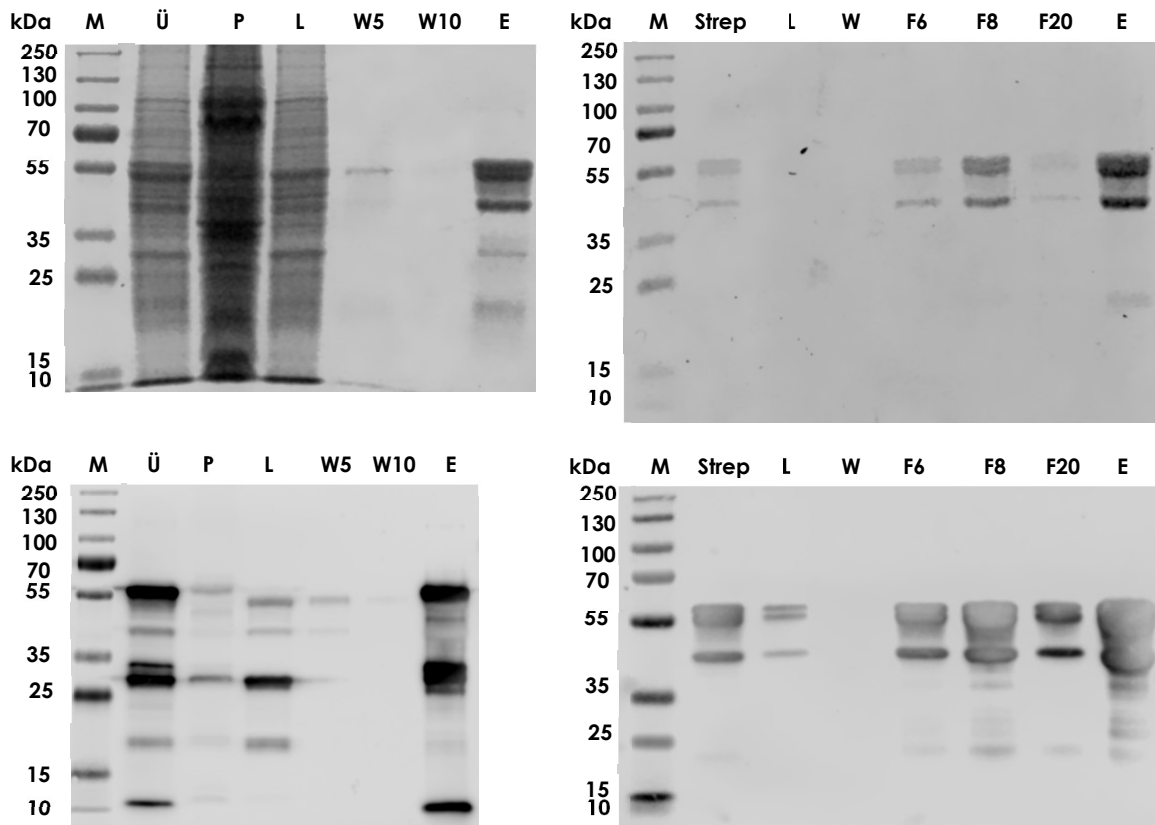


Abbildung 15: Aufreinigung von mCherry-CK2 β^{1-193} (50 kDa). Links: SDS-PAGE (oben) und α -Strep Western Blot (unten) der Aufreinigungsschritte für die Aufreinigung mit Strep-Tactin Affinitätschromatografie. Marker (M), Überstand der Zentrifugation (Ü), Pellet der Zentrifugation (P), Durchfluss des Ladeschritts (L) und des Waschschruttes (W5 und W10) und aufkonzentriertes Protein (E). Rechts: SDS-PAGE (oben) und α -CK2 β Western Blot (unten) der Aufreinigungsschritte für die Aufreinigung mit Q-Sepharose. Marker (M), Material nach Strep-Tactin Chromatographie (Strep) Durchfluss des Ladeschritts (L) und des Waschschruttes (W), Fraktionen der Elution (F6, F8 und F20) und aufkonzentriertes Protein (E).

Aufreinigung von EGFP

Auch bei der Aufreinigung von EGFP ging ein Teil des Proteins im Pellet mit den unlöslichen Teilen des Lysats verloren. Trotzdem konnte das Protein mit nur wenigen Verunreinigungen aufgereinigt werden (s. Abbildung 16).

Aufreinigung von EGFP-CK2 α^{1-335}

EGFP-CK2 α^{1-335} wurde zunächst über Strep-Tactin Affinitätschromatografie aufgereinigt, wobei allerdings nicht alle Unreinheiten beseitigt werden konnten. Auch hier ging ein Teil des Proteins in der unlöslichen Fraktion des Lysats verloren. Um das Protein weiter aufzureinigen wurde eine Affinitätschromatografie an Heparin-Sepharose angeschlossen. Hierdurch konnten die ungewünschten Unreinheiten entfernt werden (s. Abbildung 17).

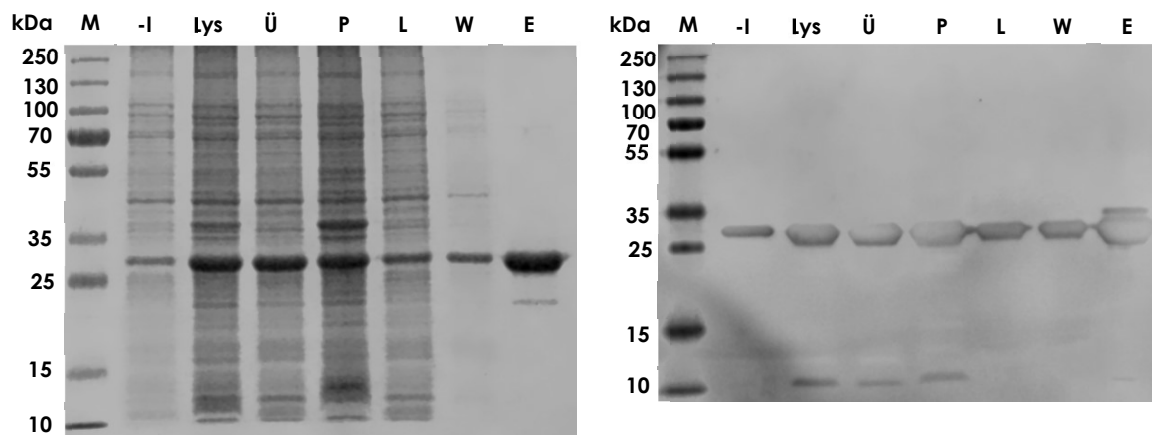


Abbildung 16: Aufreinigung von EGFP (27 kDa) mit Strep-Tactin-Affinitätschromatographie. SDS-PAGE (links) und α-Strep Western Blot (rechts) der Aufreinigungsschritte von EGFP: Von links nach rechts sind Marker (M), Lysat vor der Induktion mit IPTG (-I), Lysat (Lys), Überstand (Ü) und Pellet (P) nach Zentrifugation des Lysats, Durchfluss des Ladeschritts (L), Durchfluss des Waschschriffs (W) und das aufkonzentrierte eluierte Protein (E) aufgetragen.

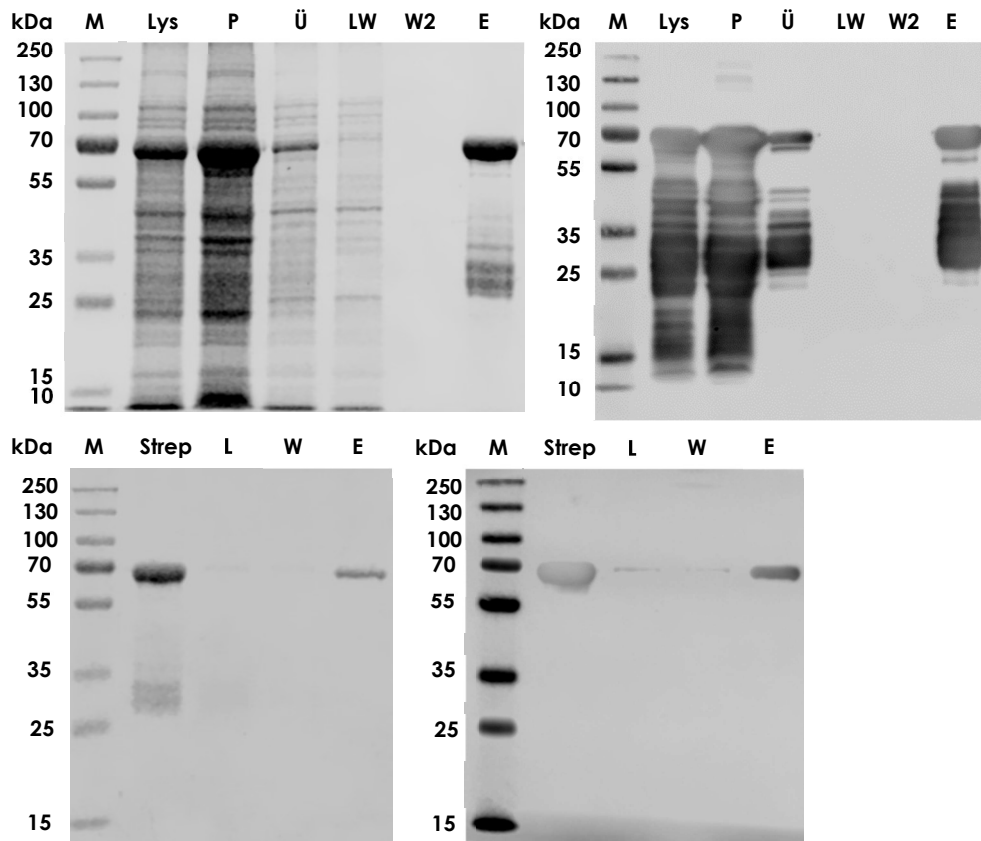


Abbildung 17: Aufreinigung von EGFP-CK2α¹⁻³³⁵ (68 kDa). Oben: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE (links) und α-Strep Western Blot (rechts) mit den verschiedenen Schritten der Strep-Tactin Chromatografie. Von links nach rechts sind Marker (M), Lysat (Lys), Pellet (P) und Überstand (Ü) nach Zentrifugation des Lysats, Durchfluss des Ladeschritts und dem ersten Teil des Waschschriffs (LW), restlicher Durchfluss des Waschschriffs (W) und das aufkonzentrierte eluierte Protein (E) aufgetragen. Unten: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE (links) und α-CK2α Western Blot (rechts) mit den verschiedenen Schritten der Aufreinigung über Heparin-Sepharose. Marker (M), Produkt der Strep-Tactin-Aufreinigung (Strep), Durchfluss des Ladeschritts (L) und des Waschschriffs (W) und aufkonzentriertes eluiertes Protein (E).

3.2 Struktur–Wirkungsbeziehungen der Podophyllotoxin–Indol–Analoga

Die Ergebnisse der Inhibitionsstudien für die CK2 α / β -Interaktion mit den Substanzen der WMS66-Reihe sind Tabelle 1 zusammengefasst. Dazu wurde der K_D -Wert für die CK2 α / β -Interaktion in An- und Abwesenheit des Inhibitors gemessen (s. z.B. Abbildung 18). Bei den Messungen ohne Inhibitor war zur besseren Vergleichbarkeit DMSO zugesetzt, sodass in allen Experimenten eine finale DMSO-Konzentration von 1 % vorlag. Für die Substanzen, bei denen sich die Dissoziationskonstante K_D zwischen diesen Messungen mit und ohne Inhibitor signifikant voneinander unterschied, wurden dann mit einem „Global Fit“ die Inhibitionskonstanten K_i für diese Substanzen bestimmt. Der „Global Fit“ ist eine Methode, bei der für eine Reihe von Messungen in einem Schritt ein Curve Fit durchgeführt wird. Dabei werden die Gleichungen, die die Beziehung zwischen den mit MST bestimmten ΔF_{norm} -Werten, K_D , und K_i ausdrücken (Gleichung 19 und Gleichung 20) für jeden Inhibitor angepasst; das besondere gegenüber der Ausgleichung einzelner Messungen ist aber, dass bestimmte Parameter für alle Gleichungen gleichgesetzt werden können. In diesem Fall war das die Dissoziationskonstante in Abwesenheit der Hemmstoffe (s. 6.5.4).

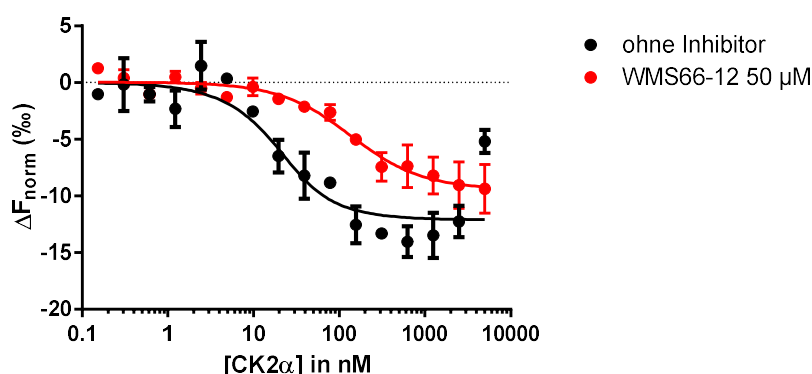


Abbildung 18: MST-Messung der CK2 α / β Interaktion ohne (schwarz) und mit (rot) dem Hemmstoff WMS66-12 (50 μ M). Ohne Inhibitor beträgt der $K_D = 10 \pm 7$ nM (Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 4$), gemessen von Dr. Michaela Steinkrüger, mit Inhibitor ist $K_D = 127 \pm 48$ nM (Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 3$)

Die Kurven und Dissoziationskonstanten in Anwesenheit der Inhibitoren sind im Anhang (8.3 und 8.4) aufgelistet. Signifikante Hemmung der CK2 α / β -Interaktion konnte nur bei Inhibitorkonzentrationen von mindestens 50 μ M erzielt werden, die zweite Messreihe bei Konzentrationen von 10–20 μ M zeigte keine statistisch signifikante Hemmung. Gleichzeitig traten bei einigen Verbindungen Löslichkeitsprobleme auf, sodass die Substanzen bei Verdünnung in Puffer präzipitierten (in Tabelle 1 mit präz. bezeichnet). Einige dieser Ergebnisse wurden bereits publiziert;^{217,280} da für diese Arbeit Messungen von weiteren Substanzen im „Global Fit“ (vgl. 6.5.4) berücksichtigt werden, weichen die aufgelisteten K_i -Werte leicht von den publizierten Werten ab. Das erklärt sich dadurch, dass im „Global Fit“ alle einfließenden Messungen die Ausgleichung gegenseitig beeinflussen, da bestimmte Parameter auf alle Messungen angepasst werden. Dadurch unterscheiden sich auch die aus

dem „Global Fit“ entnommenen Parameter, zum Beispiel der K_i der getesteten Substanzen. Aus dem gleichen Grund stimmt der K_D -Wert aus der in Abbildung 18 gezeigten Bindungskurve von CK2 α^{1-335} und CK2 β^{1-193} ohne zugefügten Inhibitor auch nicht mit dem in Tabelle 1 aufgeführten Wert überein: Die Kurven in Abbildung 18 wurden individuell angeglichen.

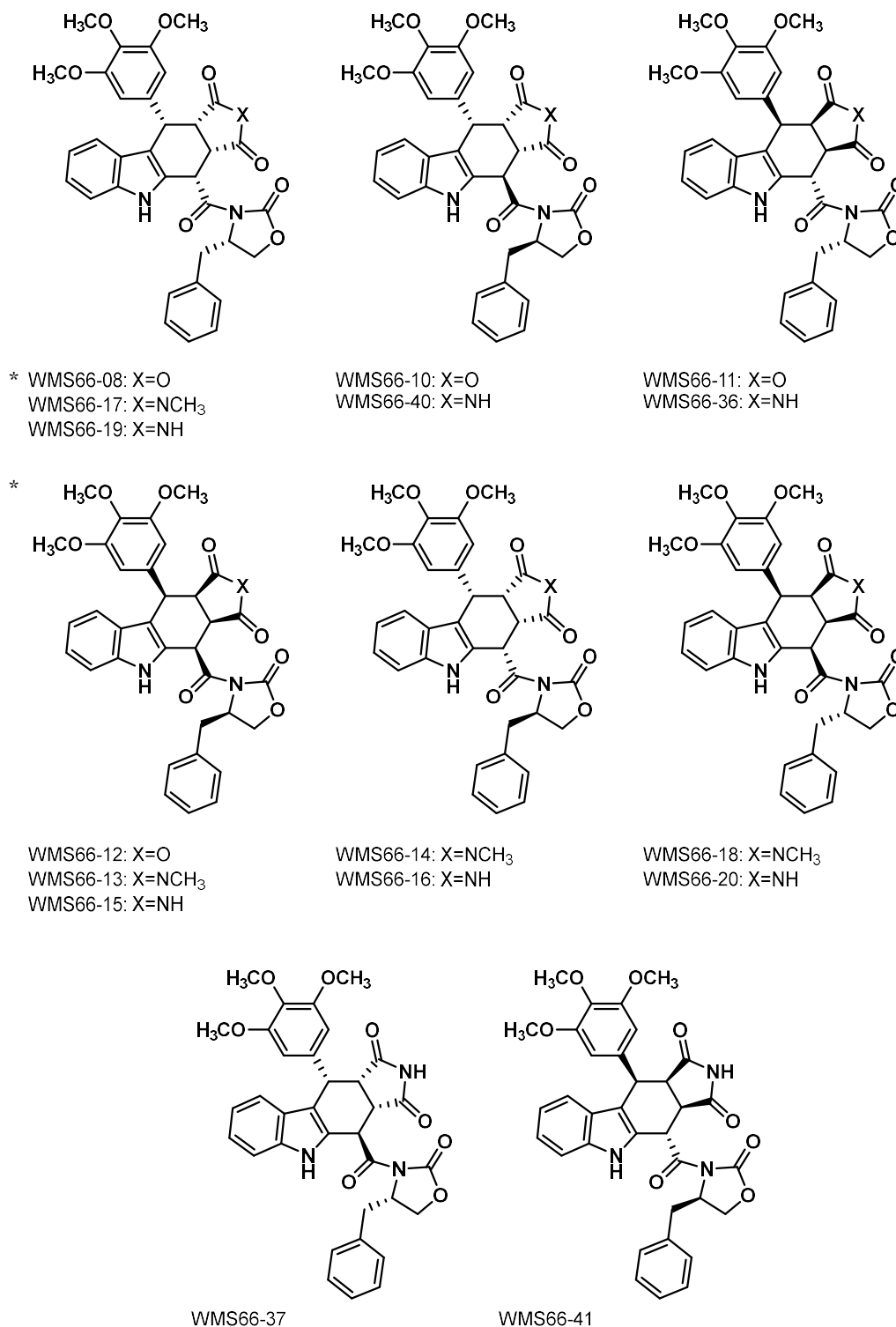


Abbildung 19: Strukturen der Podophyllotoxin-Indol-Analoga WMS66-08, WMS66-10 bis -20, -36, -37, -40 und -41. * WMS66-08 entspricht der Ursprungssubstanz der Reihe, W16.

Einige Messungen wurden von Dr. Michaela Steinkrüger durchgeführt und sind in Tabelle 1 blau hinterlegt.

Ziel der Experimente mit dieser Substanzreihe war es, einen Zusammenhang zwischen bestimmten Strukturelementen und der Aktivität der Substanzen als Interaktionshemmstoff der CK2 α/β zu erkennen. Dazu wurden verschiedene Strukturelemente der Ausgangssubstanz W16 bzw. WMS66-08 variiert (s. Abbildung 19, Abbildung 20 und Abbildung 21).

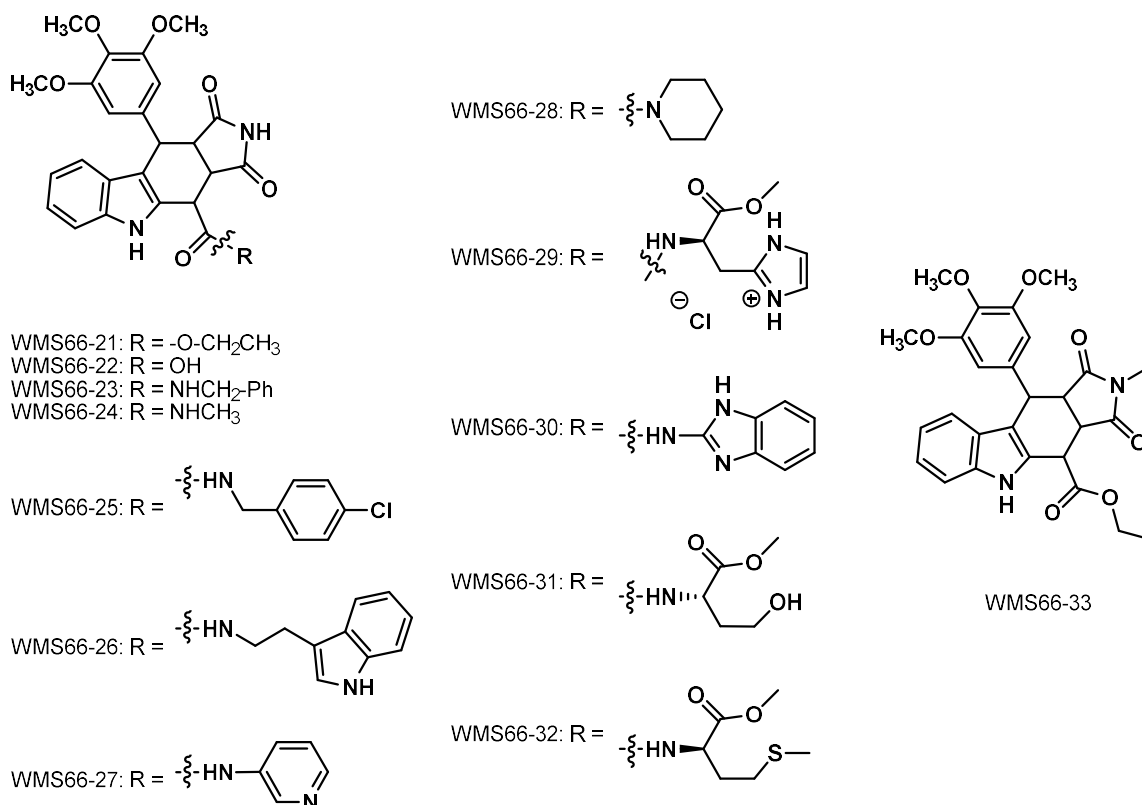


Abbildung 21: Strukturen der Podophyllotoxin-Indol-Analoga WMS66-21 bis -33.

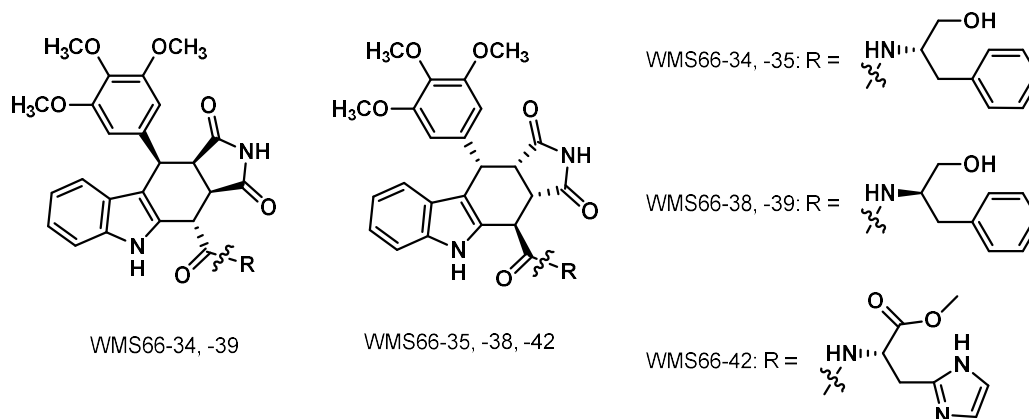


Abbildung 20: Strukturen der Podophyllotoxin-Indol-Analoga WMS66-34, -35, -38, -39 und -42

Tabelle 1: Inhibitionsmessungen der Podophyllotoxin-Indol-Analoga der WMS-Reihe. Zur Bestimmung des K_i -Werts wurden MST-Messungen in An- und Abwesenheit der Hemmstoffe durchgeführt und K_D -Werte bestimmt. Unterschieden sich die K_D -Werte in An- und Abwesenheit einer Substanz signifikant, so wurde der K_i -Wert mittels global fit bestimmt. Die In blau hinterlegten Messungen wurden von Dr. Michaela Steinkrüger durchgeführt. Substanzen, die mit *präz.* Bezeichnet sind, präzipitierten während der Messung, *n.s.* = nicht signifikant.

Ohne Inhibitor	$K_D \pm \text{SEM}$					
	n	(nM)				
	4	11 ± 7				
Substanz	Messreihe 1		Messreihe 2			
	[Substanz] (µM)	n	$K_i \pm \text{SEM}$ (µM)	[Substanz] (µM)	n	$K_i \pm \text{SEM}$ (µM)
WMS66-08	100	3	31 ± 14			
WMS66-10	präz.		n.s.			
WMS66-11	100	3	43 ± 6			
WMS66-12	50	4	4,9 ± 1,8	20	3	n.s.
WMS66-13	100	4	8,6 ± 2,9	präz.		
WMS66-14	100	4	7,2 ± 1,5	20	5	n.s.
WMS66-15	100	3	3,6 ± 0,6			
WMS66-16	100	4	4,9 ± 0,8	20	3	n.s.
WMS66-17	100	4	2,8 ± 0,9	20	3	n.s.
WMS66-18	100	3	3,8 ± 0,7	20	3	n.s.
WMS66-19	50	5	n.s.	10-20	4	n.s.
WMS66-20	100	3	4,4 ± 0,3	20	4	n.s.
WMS66-21	100	2	32 ± 17	20	2	n.s.
WMS66-22	100	2	1,9 ± 0,8	20	3	n.s.
WMS66-23	50	3	14 ± 5	10	3	n.s.
WMS66-24	50	3	6,0 ± 2,2	20	3	n.s.
WMS66-25	50	2	n.s.	10-20	4	n.s.
WMS66-26	50	2	3,8 ± 0,4	20	3	n.s.
WMS66-27	50	3	7,4 ± 1,2	20	3	n.s.
WMS66-28	50	3	9,7 ± 1,6	10	3	n.s.
WMS66-29	50	2	6,1 ± 0,2	10	3	n.s.
WMS66-30	50	3	7,1 ± 1,3	20	3	n.s.
WMS66-31	50	3	9,1 ± 0,4	20	3	n.s.
WMS66-32	50	3	7,7 ± 1,8	20	3	n.s.
WMS66-33				20	4	n.s.
WMS66-34				20	3	n.s.
WMS66-35				20	3	n.s.
WMS66-36				20	4	n.s.
WMS66-37				präz.		
WMS66-38				20	3	n.s.
WMS66-39				20	3	n.s.
WMS66-40				20	3	n.s.
WMS66-41				präz.		
WMS66-42				20	3	n.s.

Zum einen wurde die Säureanhydridgruppe von WMS66-08 mit einer Imidgruppe ersetzt, der entweder eine Methylgruppe oder ein Wasserstoff angehängt wurde (Abbildung 19). Im direkten Vergleich von Verbindungen, die sich nur in dieser Struktur unterscheiden, lässt sich

kein eindeutiger Vorteil einer dieser Gruppen feststellen: Während WMS66-08 die CK2 α / β -Interaktion zwar stärker hemmt als WMS66-19, aber etwa elfmal schwächer als WMS66-17, sind die Unterschiede in der Wirkung zwischen WMS66-12, WMS66-15 und WMS66-13 eher gering. Die wirksamste Substanz dieser Reihe, WMS66-22 hat an dieser Stelle die NH-Gruppe. Ein weiteres interessantes Strukturelement ist die Konfiguration Tetracyclus und seiner Substituenten (Abbildung 19 und Abbildung 21). Hier sieht man für die Substanzen mit einer Säureanhydridgruppe, dass bei WMS66-12 eine spiegelbildliche Konfiguration dieser Bindungen verglichen mit seinem Enantiomer WMS66-08 zu einer besseren Hemmung führt. Interessanterweise ist das für das Diastereomer, WMS66-11, nicht der Fall. Für die Imide ist dieser Effekt nicht klar zu sehen, so haben die Imidverbindungen mit Methylgruppe (WMS66-13, -14, -17 und -18) alle K_i -Werte im einstelligen mikromolaren Bereich unabhängig von der Konfiguration der zentralen Bindungen. Bei den Imiden ohne Methylgruppe ist diese Konfiguration dagegen möglicherweise entscheidend, denn während WMS66-15 und -16 die CK2 α / β -Interaktion effizient hemmen, ist das für WMS66-40 und -41 nicht der Fall. Das letzte untersuchte Strukturelement ist der Substituent an Position 4 des Tetrazyklus (s. Abbildung 20). Hier ist auffällig, dass einige der stärksten Hemmstoffe sehr unterschiedliche Substituenten besitzen. So besteht diese bei WMS66-22 nur aus einer Hydroxygruppe, während Substanzen mit ähnlichem K_i -Wert weitaus komplexere Substituenten haben, wie z.B. der Tryptaminrest von WMS66-26.

3.3 Entwicklung eines FRET-Assays für die CK2 α / β Interaktion

3.3.1 Bindung zwischen mCherry-CK2 β ¹⁻¹⁹³ und EGFP-CK2 α ¹⁻³³⁵ auf nativer PAGE

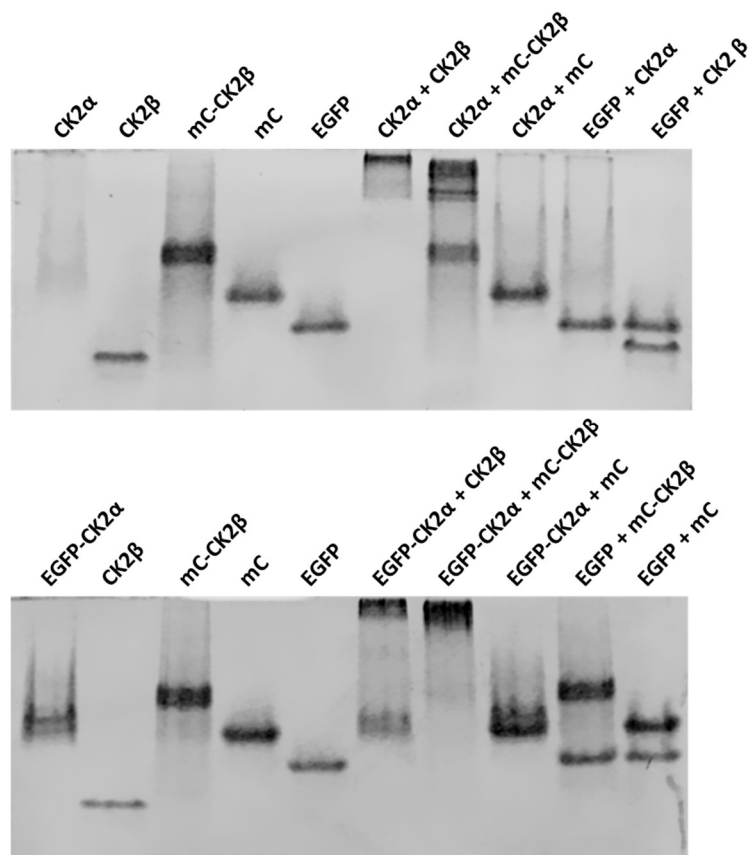


Abbildung 22: Darstellung von Proteininteraktionen mittels coomassie-gefärbter nativer PAGE. Die Proteine wurden einzeln (Spalten 1-5) oder in verschiedenen Kombinationen (Spalten 6-10) in einem molaren Verhältnis von 1:1 auf native Gele geladen. Wenn zwei kombinierte Proteine einander binden, entsteht eine Bande, die höher erscheint als die Banden der individuellen Proteine. Dies ist zu sehen für die Kombination von sowohl CK2 α ¹⁻³³⁵ als auch EGFP-CK2 α ¹⁻³³⁵ mit CK2 β ¹⁻¹⁹³ und mCherry-CK2 β ¹⁻¹⁹³. Für die anderen Kombinationen sieht man lediglich die Banden der einzelnen Proteine und keinen Komplex.

Um sicherzugehen, dass die fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine wie ihre unmarkierten Gegenstücke miteinander agieren, wurde ihre Bindung zuerst auf nativer PAGE visualisiert. Einen Proteinkomplex kann man in der nativen PAGE daran erkennen, dass er als Bande mit geringerer relativer Laufweite auftritt als die beiden beteiligten Proteine einzeln. In Abbildung 22 ist zu sehen, dass sowohl EGFP-CK2 α ¹⁻³³⁵ als auch CK2 α ¹⁻³³⁵ jeweils mit mCherry-CK2 β ¹⁻¹⁹³ und CK2 β ¹⁻¹⁹³ einen Komplex bilden, wodurch eine höhere Bande erscheint. Dagegen sind weder EGFP noch mCherry fähig, eines der anderen Proteine zu binden, bei ihren Kombinationen erscheinen lediglich die Banden der einzelnen Proteine. Bei den Kombinationen CK2 α ¹⁻³³⁵ + mCherry-CK2 β ¹⁻¹⁹³ und EGFP-CK2 α ¹⁻³³⁵ + CK2 β ¹⁻¹⁹³ ist zusätzlich eine etwas weiter laufende Bande erkennbar, die in ihrer Laufhöhe mit mCherry-CK2 β ¹⁻¹⁹³ bzw. EGFP-

CK2 α^{1-335} übereinstimmt. Dies deutet darauf hin, dass ein Teil des geladenen Proteins nicht im gebundenen Komplex vorliegt.

In Abbildung 23 ist die Bindung von mCherry-CK2 β^{1-193} mit CK2 α^{1-335} und EGFP-CK2 α^{1-335} quantitativ dargestellt. Hierzu wurde das Fluoreszenzsignal von mCherry-CK2 β^{1-193} im Komplex mit der jeweiligen CK2 α -Einheit (jeweils die höchsten Banden auf dem Gel) bei ansteigender Konzentration von CK2 α^{1-335} bzw. EGFP-CK2 α^{1-335} gemessen. Für CK2 α^{1-335} ist zu sehen, dass bei höheren Konzentrationen mCherry-CK2 β^{1-193} vollständig gebunden wird und nur noch als Komplex vorliegt. Bei EGFP-CK2 α^{1-335} bleibt dagegen eine schwächere Bande des ungebundenen mCherry-CK2 β^{1-193} sichtbar. Hier erscheint auch eine niedrigere Bande, die auf ungebundene EGFP-CK2 α^{1-335} zurückzuführen ist. Obwohl EGFP nicht primär bei 600 nm fluoresziert, ist es bei höheren Konzentrationen sichtbar. Die Quantifizierung des Signals zeigt, dass für beide CK2 α -Untereinheiten die Komplexbildung bei einer Konzentration von mehr als 100 nM stark zunimmt. Bei CK2 α^{1-335} wird bei Konzentration von 1000 nM und mehr ein Plateau erreicht, während das Signal von EGFP-CK2 α^{1-335} weiter ansteigt.

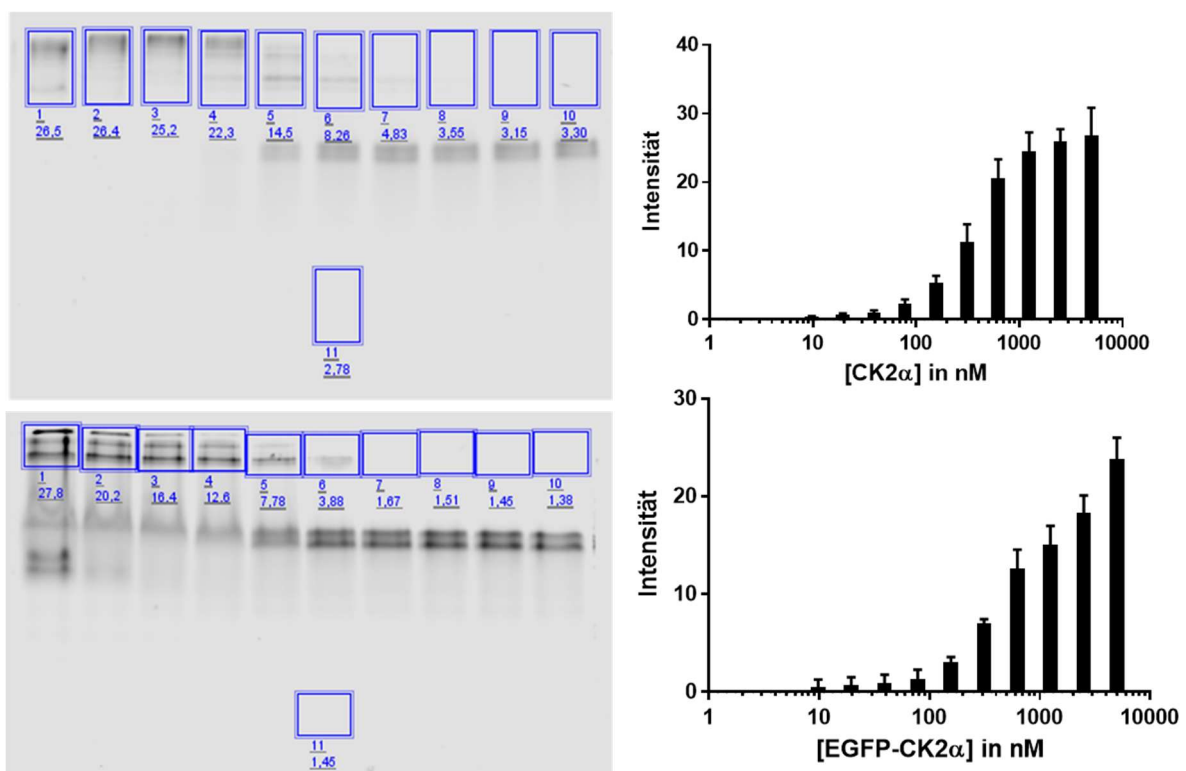


Abbildung 23: Quantifizierung der Bindung zwischen EGFP-CK2 α^{1-335} und bzw. CK2 α^{1-335} mit mCherry-CK2 β^{1-193} mittels nativer PAGE. Links: Repräsentative native Gele für die Darstellung der Proteininteraktionen von CK2 α^{1-335} (oben) und EGFP-CK2 α^{1-335} (unten). Eine 1:1 Verdünnungsreihe der α -Untereinheit wurde hergestellt und jeweils mit mCherry-CK2 β^{1-193} vermischt. Die finalen Konzentrationen betrugen 5000-9,7 nM für die CK2 α -Untereinheiten (von links nach rechts auf dem Gel) und 400 nM für mCherry-CK2 β^{1-193} . Die Proben wurden mit nativem Probenpuffer versehen und auf 10 % native PAGE-Gele aufgetragen. Die Gele wurden ungefärbt bei 600 nm aufgenommen und das Signal mit der Software Image Studio (LI-COR, USA) Software quantifiziert. Rechts: Nach Abzug des Hintergrundsignals (gleichgroße Fläche im Gel, in dem kein Signal zu sehen ist) wurde die Signalintensität (Mittelwert $\pm$ SEM, n = 3) gegen die Konzentration von CK2 α^{1-335} (oben) und EGFP-CK2 α^{1-335} (unten) aufgetragen.

3.3.2 Bindung zwischen CK2 β^{1-193} und EGFP-CK2 α^{1-335} in der MST

Die Bindung von fluoreszenzmarkierter CK2 β^{1-193} mit EGFP-CK2 α^{1-335} und EGFP wurde mit MST untersucht (s. Abbildung 24). Dabei wurde für die Bindung von CK2 β^{1-193} mit EGFP-CK2 α^{1-335} ein K_D von 41 ± 7 nM (Mittelwert $\pm$ SEM; $n = 3$) bestimmt. Für EGFP ließ sich keine Bindung an CK2 β^{1-193} feststellen.

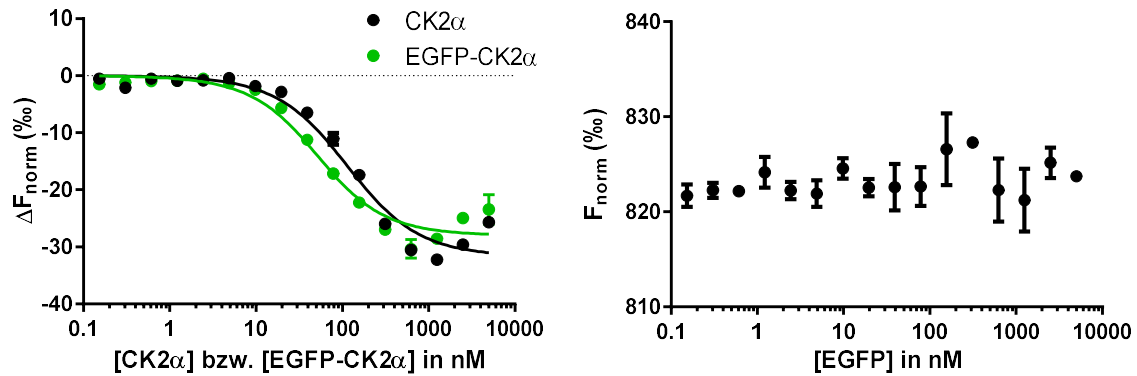


Abbildung 24: Messung der Interaktion von EGFP-CK2 α^{1-335} und EGFP mit CK2 β^{1-193} mittels MST. CK2 β^{1-193} wurde hierzu mit NT NHS-red fluoreszenzmarkiert. Links: EGFP-CK2 α^{1-335} (grün) bindet CK2 β^{1-193} mit $K_D = 42 \pm 7$ nM (Mittelwert $\pm$ SEM; $n = 3$), für CK2 α^{1-335} ist der $K_D = 105 \pm 15$ nM (Mittelwert $\pm$ SEM; $n = 3$). Rechts: EGFP bindet nicht an CK2 β^{1-193} . Gezeigt sind F_{norm} -Werte bei steigenden EGFP-CK2 α^{1-335} -Konzentrationen (Mittelwert $\pm$ SEM; $n = 3$).

3.3.3 Messung von Fluoreszenzspektren

Um die Bedingungen für den geplanten FRET-Assay zu optimieren, wurden zunächst Fluoreszenzspektren bei einer EGFP-CK2 α^{1-335} -Konzentration von 20 nM und ansteigenden mCherry-CK2 β^{1-193} -Konzentrationen aufgenommen (s. Abbildung 25). Die Proteine wurden entweder bei 487 nm, der optimalen Anregungswellenlänge von EGFP, oder bei 442 nm angeregt. In beiden Spektren sind zwei Emissionspeaks zu sehen, einmal bei 507 nm, der maximalen Emissionswellenlänge von EGFP, und bei 607 nm, was dem Emissionsmaximum von mCherry entspricht. Dabei schwankt in den gemessenen Spektren die Emission bei 507 nm, ohne dass man einen klaren Zusammenhang zur mCherry-CK2 β^{1-193} -Konzentration erkennen kann. Die Emission bei 607 nm steigt dagegen klar mit der Konzentration von mCherry-CK2 β^{1-193} . Bei FRET tritt sowohl eine Abnahme der Donor-Fluoreszenz, hier also der EGFP-Emission, als auch eine Zunahme der Akzeptor-Fluoreszenz ein, was hier der Emission von mCherry bei 607 nm entspricht. Da bei den gemessenen Spektren die Zunahme der Akzeptor-Fluoreszenz weitaus größer ist als die Abnahme der Donor-Fluoreszenz, handelt es sich vermutlich um Bleed-through, also Fluoreszenz des Akzeptor-Fluorophors, das von der ursprünglichen Anregungsbestrahlung verursacht wird, d.h. bei Wellenlängen von 487 nm bzw. 442 nm. In den folgenden Experimenten wurden daher Korrekturfaktoren genutzt, um das FRET-Signal ohne Bleed-through zu errechnen.

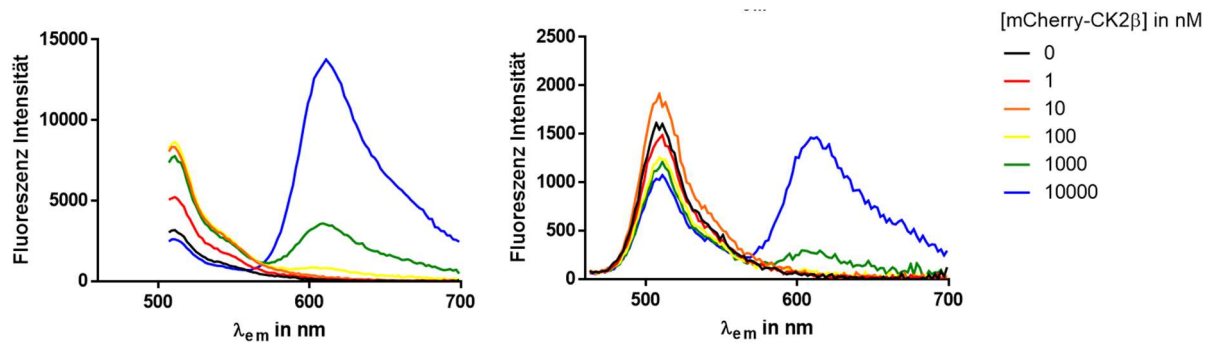


Abbildung 25: Fluoreszenzspektren von 20 nM EGFP-CK2 α^{1-335} mit steigenden Konzentrationen von mCherry-CK2 β^{1-193} . Die Anregung erfolgte bei 487 nm (links) und 442 nm (rechts). Bei steigender [Cherry-CK2 β^{1-193}]-Konzentration erkennt man eine Zunahme der Emission beim Emissionsmaximum von mCherry (607 nm), aber keine konzentrationsabhängige Abnahme der Emission im Emissionsmaximum von EGFP (507 nm). Das weist darauf hin, dass mCherry direkt angeregt wird (Bleed-through) und die mCherry-Emission nicht (nur) auf FRET zurückzuführen ist.

3.3.4 K_D -Wert der Interaktion von EGFP-CK2 α^{1-335} mit mCherry-CK2 β^{1-193}

Um den K_D -Wert für die Interaktion von EGFP-CK2 α^{1-335} und mCherry-CK2 β^{1-193} zu bestimmen, wurde die Fluoreszenz in drei Kanälen gemessen (Donor- FRET- und Akzeptorkanal) und aus diesen Werten wurde FRETc berechnet (s. 6.6.3). Dazu wurde eine feste Konzentration an EGFP-CK2 α^{1-335} (30 nM) und steigende mCherry-CK2 β^{1-193} -Konzentrationen (2,3–300 nM) eingesetzt. Die FRETc-Werte für die verschiedenen mCherry-CK2 β^{1-193} -Konzentrationen wurden mit einer nichtlinearen Regression ausgewertet, die einen K_D -Wert von 6,7 nM ergibt (s. Abbildung 26).

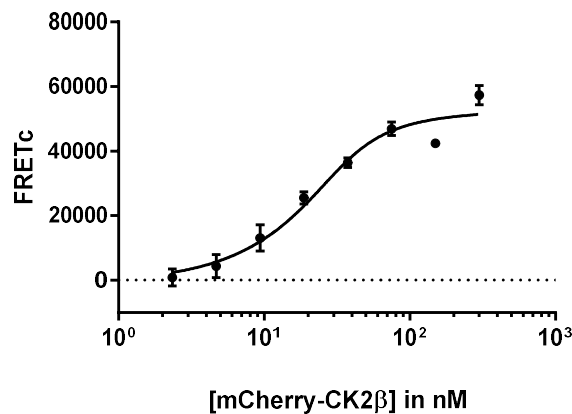


Abbildung 26: Bestimmung des K_D -Wertes für die Interaktion von EGFP-CK2 α^{1-335} und mCherry-CK2 β^{1-193} mit dem FRET-Assay. $K_D = 6,7 \pm 1,7$ nM (Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 3$); [EGFP-CK2 α^{1-335}] = 30 nM.

3.3.5 Validierung des FRET-Assays mit Referenzinhibitoren

Um zu untersuchen, ob der FRET Assay geeignet ist Hemmstoffe der CK2 α/β -Interaktion zu charakterisieren, wurde zunächst gezeigt, dass die Bindung von EGFP-CK2 α^{1-335} und mCherry-CK2 β^{1-193} durch unmarkierte CK2 β^{1-193} gehemmt wird (Abbildung 27). Dazu wurden zu 30 nM EGFP-CK2 α^{1-335} und 50 nM mCherry-CK2 β^{1-193} steigende Konzentrationen an

CK2 β^{1-193} hinzugefügt und wie oben beschrieben aus den gemessenen Fluoreszenzwerten der Parameter FRET_c berechnet. Aus der resultierenden Konzentrations–Wirkungskurve wurde ein IC₅₀–Wert von 25,3 nM ermittelt, was einem K_i–Wert von 1,23 nM entspricht.

Ein vergleichbares Experiment wurde mit I–Pc, einem literaturbekannten, peptidischen Inhibitor der CK2 α/β –Interaktion, durchgeführt (s. Abbildung 27). Hier wurde ein IC₅₀–Wert von 1627 nM errechnet, was einem K_i–Wert von 212 nM entspricht.

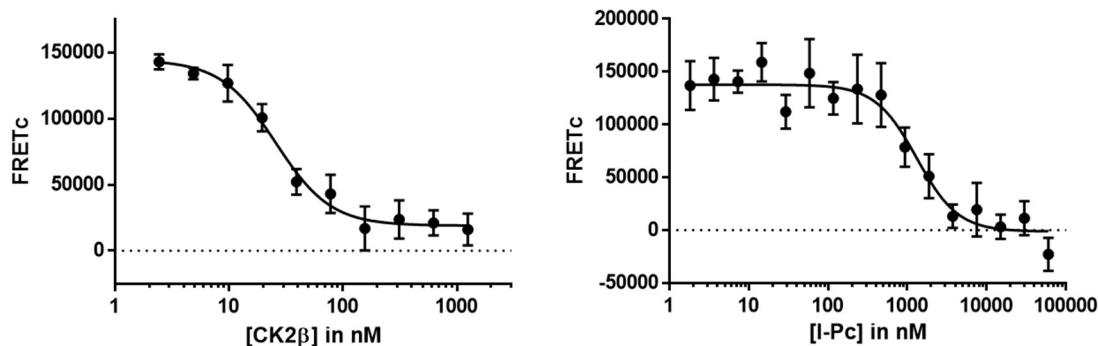


Abbildung 27: IC₅₀ Bestimmung für die Hemmung der Interaktion zwischen EGFP-CK2 α^{1-335} und mCherry-CK2 β^{1-193} durch unmarkierte CK2 β^{1-193} (links) und den Peptidinhibitor I-Pc (rechts), analysiert mit dem FRET-Assay. Die IC₅₀-Werte betragen von $25,3 \pm 0,3$ nM für (CK2 β^{1-193}) bzw. 1627 ± 436 nM (I-Pc), was einem K_i-Wert von $1,23 \pm 0,04$ nM für CK2 β^{1-193} entspricht, und einem K_i von 212 ± 7 nM für I-Pc. (jeweils Mittelwert $\pm$ SEM, n = 3).

Um zu bestätigen, dass der FRET–Assay auch für die Charakterisierung von kleineren Molekülen als CK2–Interaktionshemmer geeignet ist, wurde das Inhibitionsexperiment mit ARC–3140 durchgeführt (s. Abbildung 28). Hier zeigte sich ein Kurvenverlauf, der nicht einer klassischen sigmoidalen Hemmkurve entspricht, sondern eher einer biphasischen Hemmung. Da ARC–3140 an zwei Stellen an CK2 α bindet⁷², ist ein biphasischer Effekt auf die PPI möglich. Da der niedrigere IC₅₀–Wert, IC_{50,1}, sehr niedrig ist, wurde für die nichtlineare Regression ein Messpunkt ohne Inhibitor (linker Punkt vor der Achsenteilung in Abbildung 28) einbezogen, um das Plateau am unteren Konzentrationsbereich des Inhibitors abzubilden. Dieses Plateau ist für eine akkurate Regression notwendig. Aus dem biphasischen Fit ergeben sich IC_{50,1} = 0,7 nM und IC_{50,2} = 7300 nM.

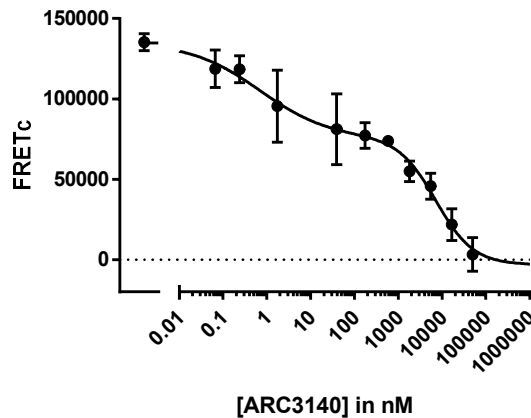


Abbildung 28: IC_{50} Bestimmung für die Hemmung der Interaktion zwischen EGFP-CK2 α^{1-335} und mCherry-CK2 β^{1-193} durch ARC3140 mit dem FRET-Assay. Da ARC3140 an zwei unterschiedlichen Stellen an CK α bindet, wurde ein biphasischer Fit ausgeführt. Dazu wurde der Messpunkt ohne Zugabe des Inhibitors mit einbezogen (im Graphen links). $IC_{50_1} = 0,7 \pm 1,3$ nM, $IC_{50_2} = 7300 \pm 4400$ nM (Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 3$)

3.3.6 Fluoreszenzintensitätsassay

Da in den zuerst aufgenommenen Fluoreszenzspektren in den Versuchen zum FRET-Assay mit EGFP-CK2 α^{1-335} und mCherry-CK2 β^{1-193} (Abbildung 25) ein starker Bleed-through zu erkennen war, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, dieses Problem durch die Wahl eines anderen Akzeptorfluorophors zu umgehen. Hierzu wurde Cyanin3 ausgewählt und wie in 6.7.1 beschrieben an CK2 β^{1-193} gekoppelt. Bei ersten Messungen fiel allerdings auf, dass sich die Cyanin3-Fluoreszenz in Anwesenheit von unmarkierter CK2 α^{1-335} erhöhte (Abbildung 29). Aufgetragen gegen die CK2 α^{1-335} -Konzentration gleicht dieses Signal optisch einer Bindungskurve und die daraus resultierende Dissoziationskonstante hat einen Wert von $K_D = 12,6$ nM. Um zu untersuchen, ob diese Intensitätszunahme eine Bindungsreaktion darstellt, und damit als Bindungsassay genutzt werden kann, wurden mehrere Folgeexperimente durchgeführt. Zum einen wurde untersucht, ob andere Farbstoffe (NHS-Fluorescein, Nanotemper NHS Red), die auf dieselbe Art mit CK2 β^{1-193} verbunden werden, dieses Verhalten ebenfalls an den Tag legen. Es wurde auch untersucht, ob der CK2 α/β -

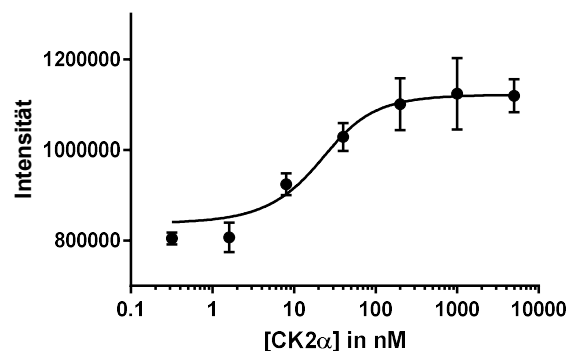


Abbildung 29: Cyanin3-CK2 β^{1-193} -Fluoreszenz bei Zugabe von CK2 α^{1-335} . Ergebnisse aus drei Messungen im Triplikat. $K_D = 12,6 \pm 4,1$ nM (Mittelwert $\pm$ SEM).

Interaktionshemmstoff Pc durch das Hemmen der Bindung auch das Fluoreszenzsignal wieder zu seinem niedrigen Wert zurückbringt.

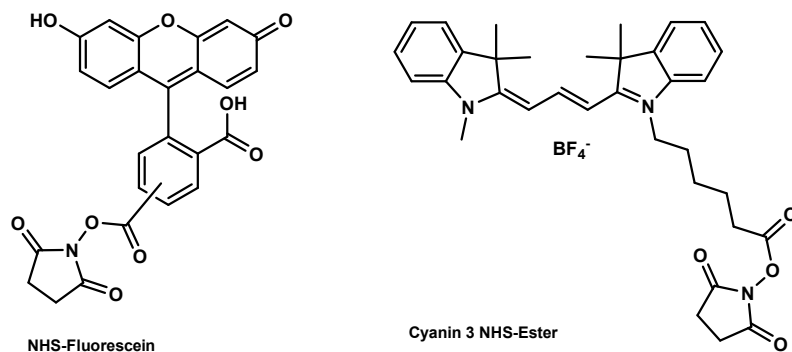


Abbildung 30: Strukturformeln der Fluoreszenten Farbstoffe NHS-Fluorescein (5/6-Carboxyfluorescein-Succinimidylester) und Cyanin3 als NHS-Ester.

Zuerst wurde untersucht, ob bei Markierung der CK2 β ¹⁻¹⁹³ mit Fluorescein ein ähnlicher Effekt auftrat. Fluorescein wird, genau wie Cyanin3, über einen NHS-Ester an CK2 β ¹⁻¹⁹³ gekoppelt, hat aber verglichen mit Cyanin3 einen kürzeren Linker, der das Fluorophor mit dem Protein verbindet (s. Abbildung 30). Mittels MST wurde festgestellt, dass Fluorescein-CK2 β ¹⁻¹⁹³ an CK2 α ¹⁻³³⁵ bindet, wenn auch mit einem für die CK2 α / β -Interaktion hohen K_D von 178 ± 17 nM (Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 3$). Die Fluoreszenzintensität, gemessen im Nanotemper Monolith als initiale Fluoreszenz, zeigt aber keine deutliche Zunahme bei Bindung (s. Abbildung 31).

Um festzustellen, ob die Cyanin3-CK2 β ¹⁻¹⁹³ Intensität als Maß für die CK2 α / β -Interaktion nutzbar ist, wurde versucht, die Interaktion durch die Zugabe von unmarkierter CK2 β ¹⁻¹⁹³ bzw. von Pc zu hemmen (Abbildung 32). Wenn die Intensitätszunahme bei Zugabe von CK2 α ¹⁻³³⁵ tatsächlich durch eine Bindungsreaktion hervorgerufen wurde, müsste sich die Fluoreszenzintensität durch die Zugabe eines kompetitiven Hemmstoffes wieder absenken lassen. Bei der Zugabe von unmarkierter CK2 β ¹⁻¹⁹³ ließ sich auch tatsächlich eine Absenkung der Intensität beobachten, allerdings erreichte diese auch bei sehr hohen CK2 β ¹⁻¹⁹³-Konzentrationen kein stabiles Plateau und die Regression ergab einen IC₅₀-Wert von

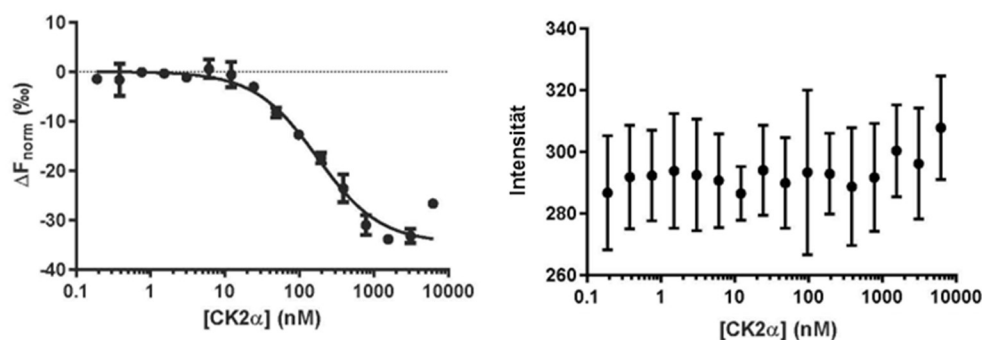


Abbildung 31: MST- und Fluoreszenzmessungen mit Fluorescein-Markierter CK2 β ¹⁻¹⁹³ mit CK2 α ¹⁻³³⁵. Links: MST-Messung ($n = 3$) mit CK2 α ¹⁻³³⁵. $K_D = 178 \pm 17$ nM (Mittelwert $\pm$ SEM). Rechts: Fluoreszenzintensität vor der MST-Messung. Mittelwert $\pm$ SEM ($n = 3$).

413 ± 147 nM (Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 3$), was mit dem K_i -Calculator einem $K_i = 79 \pm 31$ nM entsprach. Mit der Zugabe von Pc sah man dagegen keine Abnahme der Fluoreszenzintensität. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Veränderung der Fluoreszenzintensität von Cyanin3-CK2 β^{1-193} bei Zugabe von CK2 α^{1-335} nicht einfach die Bindung der Proteine abbildet und diese Messung daher als PPI-Assay ungeeignet ist.

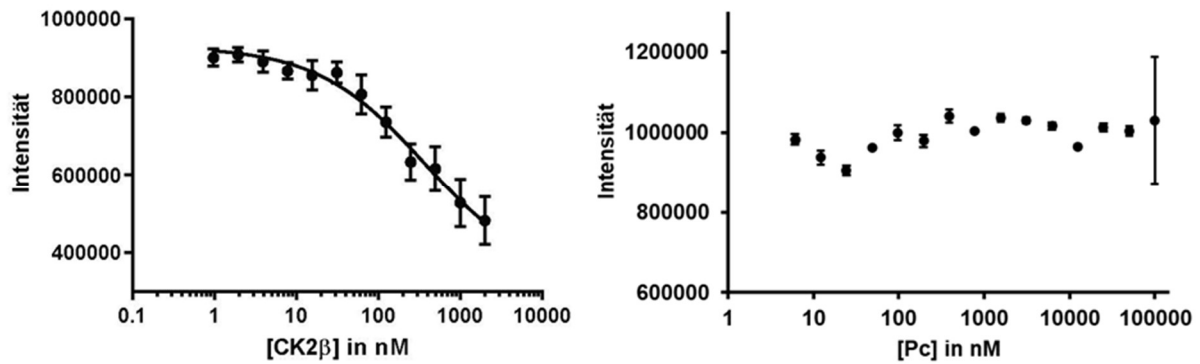


Abbildung 32: Messung der Fluoreszenzintensität von 20 nM Cyanin3-CK2 β^{1-193} mit 50 nM CK2 α^{1-335} bei der Zugabe von unmarkierter CK2 β^{1-193} (links, $n=3$) und Pc (rechts, $n=1$). Für die Hemmung durch CK2 β^{1-193} wurde ein IC_{50} Wert von 413 ± 147 nM (Mittelwert $\pm$ SEM) berechnet.

4 Diskussion

4.1 Proteinherstellung

Um zuverlässige Ergebnisse in *in vitro*-Experimenten mit isolierten Proteinen zu garantieren, ist es notwendig, die Proteine in hoher Reinheit herzustellen. Für die in dieser Arbeit verwendeten Proteine ist das insbesondere für CK2 α^{1-335} und CK2 β^{1-193} gelungen; auf der SDS-PAGE sind keine unerwarteten Banden zu sehen (Abbildung 10). Zwar sieht man im Gel mit CK2 β^{1-193} eine zweite Bande, allerdings entspricht deren Molekulargewicht demjenigen des CK2 β -Dimers (45 kDa). Zudem wurde eine solche Bande auch bei früheren Aufreinigungen in unserem Labor beobachtet.

Bei EGFP und EGFP-CK2 α^{1-335} sind nur sehr leichte Verunreinigungen zu sehen. Solche Verunreinigungen können entweder durch unzureichende Aufreinigung entstehen oder bestehen aus Abbauprodukten des aufgereinigten Proteins. Solche Abbauprodukte entstehen oft durch Proteasen, die im Zelllysate enthalten sind, daher werden bei der Aufreinigung Protease-Inhibitoren zugefügt (s. 6.3.1). Falls es sich hier um Abbauprodukte handeln sollte, wäre eine Optimierung des Protease-Inhibitor-Cocktails eine Möglichkeit, diese zu minimieren.²⁸¹ Die verbleibenden Unreinheiten wurden für diese Arbeit als unproblematisch eingeschätzt.

Für mCherry und mCherry-CK2 β^{1-193} sind mehrere Banden zu sehen. Diese bestehen aus Abbauprodukten der Proteine, was an der stark pinken Farbe der Banden im ungefärbten Gel zu sehen war und sich auch zum Beispiel in Abbildung 23 erkennen lässt, wo mCherry-CK2 β^{1-193} bei Messung des für mCherry charakteristischen Farbsignals bei 600 nm als Doppelbande zu sehen ist. Das niedermolekulare Abbauprodukt ist interessanterweise in der nativen PAGE nicht zu sehen (Abbildung 22, Abbildung 23). Ein möglicher Grund ist, dass dieses Fragment nicht negativ geladen ist, wodurch es in nativer PAGE nicht in das Gel migriert. Andererseits kann es auch vorkommen, dass bei der Probenvorbereitung für die SDS-PAGE diese Proteinfragmente entstehen, bei Vorbereitung für die native PAGE aber nicht. Die beiden Methoden unterscheiden sich in der Probenpuffer-Zusammenstellung (s. Tabelle 3), aber auch in der Inkubationszeit vor dem Laden auf das Gel; vor SDS-PAGE werden Proteine oft für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt, was aber gelegentlich zu Proteolyse führen kann.²⁸² Insgesamt wäre es wünschenswert, die Proteine in einer Form aufzureinigen, in der nur das volle Protein vorliegt. Allerdings war dies mit den zur Verfügung stehenden Techniken nicht möglich. Da es sich bei den Verunreinigungen höchstwahrscheinlich um Abbauprodukte und nicht um fremde Proteine handelt, ist es unwahrscheinlich, dass die Ergebnisse im PPI-Assay zu stark beeinflusst werden. Es ist möglich, dass durch eine geringere Bindungsfähigkeit der abgebauten mCherry-CK2 β^{1-193} geringere Affinitäten im Assay gemessen werden. Da die gemessene Dissoziationskonstante gut mit den Literaturwerten übereinstimmt, scheint hier aber keine schwere Beeinträchtigung des Assays vorzuliegen (s. 4.3.2). Da mCherry nur als qualitative Kontrolle benötigt wurde, um zu bestätigen, dass es nicht an EGFP, CK2 α^{1-335} oder

EGFP-CK2 α ¹⁻³³⁵ bindet (s. Abbildung 22), ist eine geringe Verunreinigung in diesem Fall unproblematisch.

4.2 Wirkung der Podophyllotoxin-Indol-Analoga

Ziel dieser Experimente war es, den bereits beschriebenen Hemmstoff der CK2 α / β -Interaktion, W16 (WMS66-08)²¹⁶ weiterzuentwickeln und dabei Struktur-Wirkungsbeziehungen für die verschiedenen Strukturelemente der Substanzen zu erkennen. Tatsächlich ist es gelungen, Hemmstoffe zu identifizieren, die diese Bindung etwa 10-fach stärker inhibieren als die Ausgangssubstanz. Bei den Struktur-Wirkungsbeziehungen fällt allerdings auf, dass es nicht möglich ist, einzelnen Strukturelementen eine eindeutige Verbesserung oder Verschlechterung der Hemmung zuzuschreiben. So ist die Konfiguration des Tetrazyklus nur für die Substanzen mit Säureanhydrid-Gruppe im 5-Ring entscheidend, die chemischen Eigenschaften des Substituenten an Position 4 des Tetrazyklus spielt bei den meisten Stoffen keine Rolle, dagegen hat die Orientierung der Benzengruppe dieses Substituenten bei einigen Substanzen einen wichtigen Einfluss auf deren Hemmwirkung. Das alles deutet darauf hin, dass die Substanzen dieser Gruppe wahrscheinlich nicht alle auf die exakt gleiche Weise an der CK2 α / β -Interaktionsfläche binden.

Bei der ursprünglichen Auswahl von W16 und einigen verwandten Substanzen für die Testung als CK2 α / β -Interaktionshemmer wurden Stoffe mit einem Tetrahydrocarbazol-Kern, gewählt.²¹⁶ Diese Auswahl wurde getroffen, weil man aus der Erfahrung mit der CK2 α / β -Interaktion und der Interaktion von Peptiden mit CK2 α weiß, dass einige aromatische Aminosäuren der CK2 β , i. e. Y188 und F190, essenziell für die Bindung an CK2 α sind. Es bestand die Hoffnung, dass die aromatischen Reste der kleinen Moleküle diese Reste von CK2 β bei der Bindung an CK2 α imitieren würden, ähnlich wie es beim bereits bestehenden peptidischen Inhibitor Pc geschieht.⁶⁸ Pc wurde so entwickelt, dass es den Kontakt zwischen CK2 α und CK2 β am C-terminalen Kontaktpunkt (α / β -tail Kontakt) der CK2 β stört (α / β -tail Kontakt), indem es eben diesen Bereich der CK2 β nachbildet.⁶⁸

Es ist aber auch möglich, die CK2 α / β -Interaktion an anderer Stelle zu stören: ARC-3140, ein nicht-peptidischer Hemmstoff der CK2 α / β -Interaktion, deckt in der Kristallstruktur im Komplex mit CK2 α (PDB: 6SPW) nicht nur diesen α / β -tail Kontakt ab, sondern ist auch an der Stelle an CK2 α gebunden, wo diese normalerweise mit dem „Körper“ der zweiten CK2 β -Untereinheit interagiert (α / β -body Kontakt). Hier spielen auf der Seite der CK2 β zwei Methionine, M166 und M169, eine Rolle.^{3,72} Die Interaktionsfläche der CK2-Untereinheiten bietet also genügend Raum für verschiedene Bindungsflächen, an denen die W16-Derivate andocken könnten.

Um Sicherheit über die Natur der Interaktion der Podophyllotoxin-Indol-Analoga mit der CK2 α zu erlangen, wäre es nötig, Kristallstrukturen im Komplex anzufertigen, was allerdings bisher nicht erfolgreich geschehen ist.

Außer durch eine klassische Hemmung durch das Blockieren der Bindungsstelle wäre es auch denkbar, dass die festgestellte Hemmung durch Aggregation des Inhibitors verursacht wird.

Das ist ein Verhalten einiger Substanzen, die kleine Aggregate formen, welche dann relativ unspezifisch an Proteine binden und so auch Interaktionen hemmen können.²⁸³ Allerdings wurde bei allen Messungen der Substanzen 0,05% Tween-20, welches als Tensid der sowohl der Aggregatbildung als auch der Interaktion zwischen Inhibitoraggregaten und Proteinen entgegenwirkt.^{284–286} Während der Experimente bildeten einige Podophyllotoxin-Indol-Analoga Aggregate, präzipitierten (s. Tabelle 1) und wurden daher nicht vermessen. Bei den übrigen Substanzen wurde vor und nach den Experimenten darauf geachtet, dass keine Trübung der Substanzlösung auftrat; die Substanzen wurden schrittweise im Puffer verdünnt und zwischenzeitlich mit Ultraschall behandelt. Vor den Messungen wurde das CK2 β -Inhibitor-Gemisch zentrifugiert und optisch kontrolliert, ob sich Aggregate absetzten. Außerdem fallen größere Aggregate, die auch das markierte Protein beinhalten, bei der MST-Messung auf, da sie dort oft einen unregelmäßigen Kurvenverlauf verursachen.²⁸⁷ Diese Messungen werden nicht für die Auswertung verwendet.

Während in dieser Arbeit lediglich die hemmende Wirkung der Podophyllotoxin-Indol-Analoga auf die CK2 α/β -Interaktion untersucht wurde, wurden an einige Substanzen auch ihre aktivitätshemmende Wirkung auf das CK2-Holenzym und auf CK2 α untersucht. Diese Daten stimmen nur begrenzt mit den gemessenen bindungshemmenden Aktivitäten überein und einige Substanzen inhibieren die CK2 α -Aktivität in Abwesenheit von CK2 β , wobei hier ein Klasse I Substrat untersucht wurde.²¹⁷ Es ist auch von W16 eine Hemmung der CK α -Aktivität unabhängig von CK2 β bekannt.²¹⁶ All dies weist auf einen komplexen Bindungs- und Hemmmechanismus, der mit den bisherigen Experimenten nicht aufgeklärt werden kann.²¹⁷

Die Berechnung der Dissoziationskonstanten in diesem Abschnitt erfolgten über einen sogenannten „Global Fit“, bei dem die Dissoziationskonstante der CK2 α/β -Interaktion ohne Inhibitor, K_D , sowie alle Dissoziationskonstanten der CK2 α/β -Interaktion in Anwesenheit der Hemmstoffe, K_D' , einbezogen wurden. Dieses Verfahren wurde auch bei der erstmaligen Publikation eines Teils der Daten im Jahr 2020 verwendet.^{217,280} Da damals allerdings nicht alle hier eingeschlossenen Daten genutzt wurden, wurde der Fit in dieser Arbeit erneut durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die K_i -Werte für diejenigen Substanzen, die bereits 2020 untersucht wurden, in dieser Arbeit kaum von den damals publizierten Werten abweichen, was für die Verlässlichkeit der Berechnungsmethode spricht. Ein Vergleich der Werte ist im Anhang unter 8.4 zu finden.

Insgesamt ist es gelungen, die WMS-Inhibitorreihe zu erweitern und einige Hemmstoffe zu entwickeln, die die CK2 α/β -PPI effektiv hemmen. Damit sind die Podophyllotoxin-Indol-Analoga eine der wenigen Klassen kleiner Moleküle, die als CK2 α/β -Interaktionshemmer fungieren.

4.3 Entwicklung eines FRET-Assays

4.3.1 Bindungsfähigkeit der genutzten Proteine

Um sicherzugehen, dass der Assay die CK2 α / β -Interaktion zuverlässig abbildet, wurde zuerst gezeigt, dass die genutzten Proteinkonstrukte sich in ihrem Bindungsverhalten wie der Wildtyp verhalten. Für FRET werden fluoreszenzmarkierte Proteine benötigt. Während die hier genutzten Proteinfluorophore den Vorteil bieten, dass sie bereits bei der Proteinherstellung an ihren Zielproteinen gebunden sind, haben sie den Nachteil, dass sie durch ihre Größe ein sterisches Hindernis für die Bindung darstellen können. Außerdem könnten die Proteinlabel auch miteinander oder mit dem jeweils anderen Protein interagieren, was einen Interaktionsassay ebenfalls stören würde. Es musste also zuerst sichergestellt werden, dass CK2 α und CK2 β auch gekoppelt mit den fluoreszierenden Proteinen noch wie gewohnt interagieren. Da bereits rekombinante CK2-Untereinheiten gekoppelt mit GFP-Derivaten beschrieben sind, bei denen die CK2 α / β -Interaktion weiterhin stattfindet, wurde angenommen, dass die N-terminale Markierung der CK2-Untereinheiten mit dem GFP verwandten EGFP die Interaktion nicht stört.⁸⁰ Da mCherry etwa gleich groß ist wie EGFP, ist auch hier keine Störung zu erwarten. Dies wurde mittels nativer PAGE bestätigt (s. Abbildung 22).²⁸⁸ Hier wurde gezeigt, dass EGFP-CK2 α^{1-335} und mCherry-CK2 β^{1-193} einander binden. Dass diese Bindung auf der CK2 α / β -Interaktion beruht ist daran zu sehen, dass weder EGFP-CK2 α^{1-335} an mCherry, mCherry-CK2 β^{1-193} an EGFP noch EGFP an mCherry bindet. Auch sonst traten keine unerwarteten Bindungen zwischen den verschiedenen Proteinen auf.

Die geringen Rückstände an ungebundenem Protein bei den Kombinationen CK2 α^{1-335} + mCherry-CK2 β^{1-193} und EGFP-CK2 α^{1-335} + CK2 β^{1-193} könnten auf unvollständige Bindung dieser Proteinkombinationen hindeuten; allerdings ist in beiden Fällen nur eine Bande für eines der beiden Proteine im ungebundenem Zustand zu sehen. Außerdem binden alle beteiligten Proteine in anderer Kombination ohne sichtbare Rückstände. Das Experiment war allerdings auch nicht auf eine quantitative Untersuchung der Bindung ausgelegt, sondern sollte nur qualitativ zeigen, welche Proteinkonstrukte aneinander binden.

Weiterhin konnte mit nativer PAGE gezeigt werden, dass sich CK2 α^{1-335} und EGFP-CK2 α^{1-335} in ihrem Bindungsverhalten an mCherry-CK2 β^{1-193} ähnlich verhalten (s. Abbildung 23): Die Intensität der Bande, die den Proteinkomplex abbildet, nimmt im selben Konzentrationsbereich von CK2 α^{1-335} und EGFP-CK2 α^{1-335} zu. Der einzige Unterschied zwischen den Intensitätssignalen ist, dass bei EGFP-CK2 α^{1-335} die Intensität der oberen Bande bei hohen EGFP-CK2 α^{1-335} -Konzentrationen nicht abflacht, wie man es bei einer gesättigten Bindung erwarten würde, sondern weiter steigt. Dies ist vermutlich auf das Fluoreszenzsignal von EGFP zurückzuführen, das zwar normalerweise bei der Anregungswellenlänge von 600 nm nicht ins Gewicht fällt, bei hohen Konzentrationen tritt allerdings genug Bleed-through auf, um das Protein im Gel sichtbar zu machen. Es gibt Versuche, in quantitativer nativer PAGE Dissoziationskonstanten zu berechnen.²⁸⁹ Hier wurde davon abgesehen, weil die Situation im

Gel sich in der Pufferzusammenstellung und auch anderen Faktoren, wie beispielsweise der Temperatur, stark von andere experimentellen Situationen unterscheidet, und ein so ermitteltes Ergebnis nicht mit anderen Methoden vergleichbar wäre. Außerdem sollte für die Bestimmung eines K_D -Wertes durch einen Curve fit die Konzentration des Bindungspartners, der in konstanter Konzentration vorliegt (hier mCherry-CK2 β^{1-193}) im gleichen Bereich wie der zu erwartende K_D -Wert der Interaktion (hier: etwa 5 nM, s. 4.3.2). Da mCherry-CK2 β^{1-193} mit einer Konzentration von 400 nM weit darüber lag, war hier keine Bestimmung der Dissoziationskonstante möglich.²⁹⁰

Um quantitativ zu belegen, dass die genutzten Proteinkonstrukte die CK2 α/β -Interaktion so gut wie möglich abbilden, wurden MST-Messungen mit EGFP-CK2 α^{1-335} und CK2 α^{1-335} durchgeführt (s. Abbildung 24). Hier war der gemessene K_D -Wert für CK2 α^{1-335} deutlich erhöht zu den üblichen Werten; solche Schwankungen treten bei MST-Messungen gelegentlich auf, zum Beispiel bei der Verwendung von unterschiedlichen Proteinchargen oder durch Unterschiede in der Proteinmarkierung. Daher sollten nur K_D -Werte einer markierten Proteincharge miteinander verglichen werden. Hier lag der K_D -Wert für EGFP-CK2 α^{1-335} sogar noch unter dem von CK2 α^{1-335} , während bei EGFP keinerlei Bindung an die markierte CK2 β^{1-193} zu erkennen war. Hieraus folgt, dass zumindest EGFP-CK2 α^{1-335} ungestört an CK2 β^{1-193} binden kann, und bestätigt daher die mit nativer PAGE erreichten Ergebnisse.

4.3.2 Entwicklung des Bindungsassays

Um einen Überblick über die FRET-Signale zu bekommen, wurden zunächst Emissionsspektren des FRET-Paares bei der Anregungswellenlänge des Donorfluorophors EGFP-CK2 α^{1-335} gemessen, wobei das Donorfluorophor in konstanter Konzentration vorlag und das Akzeptorfluorophor mCherry-CK2 β^{1-193} in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt wurde (s. Abbildung 25). Hier fällt auf, dass jegliches FRET-Signal im Bleed-through von mCherry-CK2 β^{1-193} Emissionen untergeht: Zwar steigt die Emission des Akzeptorfluorophors bei höheren Konzentrationen an, allerdings geht dies nicht mit einer Reduktion der Donoremission einher, was für FRET nötig wäre. Dieses Phänomen trat auch bei Messungen mit geringerer Anregungswellenlänge (442 nm) auf. Bleed-through entsteht, weil Fluorophore auch abseits ihrer typischen Anregungswellenlänge mit geringerer Effizienz angeregt werden und kann auf verschiedene Weisen rechnerisch korrigiert werden (s. in 1.5.7 Auswertung von FRET-Signalen). Hier wurde FRETc gewählt, ein FRET-Index bei dem Bleed-through in verschiedene Richtungen korrigiert wird. Diese Methode wurde ursprünglich für die Anwendung in der Mikroskopie entwickelt.²⁷⁹

Mit dieser Methode konnte bei Bindungsexperimenten mit konstanter EGFP-CK2 α^{1-335} -Konzentration und ansteigenden mCherry-CK2 β^{1-193} -Konzentrationen ein ansteigender FRETc beobachtet werden. Der Kurvenverlauf (s. Abbildung 26) entspricht dem charakteristischen sigmoidalen Verlauf einer Bindungskurve und auch der daraus bestimmte K_D -Wert von $6,7 \pm 1,7$ nM (Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 3$) liegt nahe den durch MST gemessenen Werten von 10 ± 7 nM und 11 ± 7 nM (aus Abbildung 18 und Tabelle 1, jeweils Mittelwert $\pm$ SEM,

n = 3–4), den mit ITC ermittelten Wert von $3,69 \pm 1,65$ nM (Mittelwert $\pm$ SD)⁷¹ und 12,6 nM (Mittelwert, n = 3)⁴ sowie dem Wert von 5,4 nM aus SPR-Experimenten.⁷⁰

Um sicherzugehen, dass die Bindungskurve und der berechnete K_D -Wert auch wirklich die CK2 α/β -Interaktion abbilden, wurden Messungen mit drei verschiedenen kompetitiven Inhibitoren der Interaktion durchgeführt. Zuerst wurde festgestellt, dass unmarkierte CK2 β^{1-193} die mit FRET gemessene Interaktion hemmen kann, wobei der K_i -Wert von $1,23 \pm 0,04$ nM wie erwartet im gleichen Bereich wie der K_D -Wert der CK2 α/β -Interaktion liegt. Dies ist ein klarer Hinweis, dass die mit FRET gemessene Interaktion sich durch CK2 β^{1-193} hemmen lässt und dass das FRET-Signal diese Interaktion zuverlässig abbildet.

Beim zweiten getesteten Inhibitor, dem zyklischen Peptid I-Pc, wurde ein K_i -Wert von 212 ± 7 nM gemessen, was mit Werten aus früheren FA-basierten Studien übereinstimmt ($K_i = 0,158 \pm 0,051$ μ M).¹⁶⁷

Zuletzt wurde der CK2 α/β -Interaktionshemmer ARC-3140 (Struktur: s. Abbildung 5) getestet (Abbildung 28). Hier zeigte sich überraschenderweise in der Bindungskurve eine Hemmung der Interaktion in zwei Phasen, was vermutlich auf verschiedene Bindungsarten von ARC-3140 zurückzuführen ist. Dieser Hemmstoff wurde als Bisubstratinhibitor entwickelt, der sowohl an die ATP-Bindungsstelle als auch an die Substratbindungsstelle von CK2 α binden sollte. Zusätzlich wurde allerdings festgestellt, dass ARC-3140 auch an der CK2 α/β -Interaktionsfläche bindet und diese PPI hemmt.⁷² Tatsächlich stimmen die aus der im FRET-Assay gemessenen IC_{50} -Werte von $IC_{50,1} = 0,7 \pm 1,3$ nM und $IC_{50,2} = 7,3 \pm 4,4$ μ M (Mittelwert $\pm$ SEM, n = 3) ungefähr mit den K_i -Werten aus früheren Studien überein: Mit einem FA-Assay für die ATP-Bindungsstelle wurde ein K_i von $0,73 \pm 0,14$ nM gemessen, während mit MST ein K_i von 4.8 ± 0.7 μ M für die Hemmung der CK2 α/β -Interaktion gemessen wurde.⁷² Ein direkter Vergleich von IC_{50} und K_i ist zwar nicht korrekt, da der IC_{50} von der Proteinkonzentration abhängt und generell etwas höher ist, als ein K_i ; allerdings liegen die Werte für die zwei Bindungsstellen in einem ähnlichen Verhältnis zueinander: $IC_{50,1}/IC_{50,2} = 9,6 \cdot 10^{-5}$ und $K_{i1}/K_{i2} = 15,2 \cdot 10^{-5}$. In diesem Fall war es auf Grund des geringen $IC_{50,1}$ nicht möglich, K_i -Werte für dieses Experiment zu ermitteln.²⁹¹ Da dieses Experiment auf die Messung der Wirkung von ARC-3140 auf die CK2 α/β -Interaktion ausgelegt war, ist die gewählte Konzentrationsspanne von ARC-3140 nicht optimal auf die Messung des sehr niedrigen $IC_{50,1}$ zugeschnitten; um $IC_{50,1}$ abzubilden wären mehr Messpunkte bei niedrigeren Inhibitorkonzentrationen wünschenswert. Eine Wiederholung des Experiments war aus logistischen Gründen nicht möglich, da dazu neuer Inhibitor nötig gewesen wäre. Daher wurde der Messpunkt ohne Inhibitor für die Hemmkurve und die IC_{50} -Bestimmung herangezogen: Ohne diesen Messpunkt erreicht die Hemmkurve nicht ihr oberes Plateau im vollständig ungehemmten Zustand. Es bleibt allerdings die Frage, warum die Bindung von ARC-3140 an der ATP-Bindungsstelle eine Veränderung der CK2 α/β -Interaktion zur Folge hat. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass eine Bindung an der ATP-Bindungsstelle eine subtile Veränderung im Protein CK2 α auslöst, wodurch das Bindungsverhalten an CK2 β verändert

wird. Dafür finden sich in der Co-Kristallstruktur von CK2 α und ARC-3140 (PDB: 6SPW) allerdings keine klaren Hinweise.⁷²

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der entwickelte FRET-Assay für die Messung der CK2 α / β -Interaktion Ergebnisse liefert, die mit anderen Methoden vergleichbar sind. Damit füllt dieser Assay eine Lücke in den bisher genutzten Methoden zur Untersuchung der CK2 α / β -PPI: Er ist hochdurchsatzfähig und kann mit relativ weit verbreiteter Laborausstattung (Mikrotiterplatten-Lesegeräte mit 50/50-Spiegel zur Fluoreszenzmessung) gemessen werden, was für MST, SPR und der ITC nicht der Fall ist. Im Gegensatz zum radiometrischen Hochdurchsatzassay für diese Interaktion wird auch kein radioaktives Material benötigt, was das Handling im Labor erleichtert.²¹⁶ Ein weiterer Hochdurchsatzassay für die Erforschung von CK2 α / β -Interaktionsinhibitoren beruht auf der Fluoreszenzanisotropie, deckt aber anders als die hier entwickelte Methode nicht die gesamte CK2 α / β -Interaktionsfläche ab, da sie als Ligand an der CK2 α ein fluoreszenzmarkiertes Peptid (CF-Ahx-Pc) nutzt, das auf der CK2 α -Bindungsstelle von CK2 β beruht.²¹³ Für den FRET-Assay sind keine besonderen Materialien oder aufwändige Markierungsschritte notwendig: Die Herstellung und Aufreinigung der rekombinanten fluoreszierenden Proteinkonstrukte aus *E. coli* ist effizient und kann mit relativ einfachen Mitteln erfolgreich durchgeführt werden. Die Vorbereitungsschritte für die Messung sind simpel und können mit passendem Gerät durchaus automatisiert werden.

All dies macht den neu entwickelten FRET-Assay zu einem nützlichen Werkzeug in der Erforschung von CK2 α / β -Interaktionshemmern.

4.3.3 Fluoreszenzintensitätsassay

Eine weitere Strategie, um Bleed-through wie in Abbildung 25 zu vermeiden, ist die Wahl eines anderen Fluorophors. Daher wurden Experimente mit Cyanin3-markierter CK2 β ¹⁻¹⁹³ gemacht. Allerdings fiel auf, dass Cyanin3-markierte CK2 β ¹⁻¹⁹³ ihre Fluoreszenzintensität bei Zugabe von unmarkierter CK2 α ¹⁻³³⁵ veränderte (s. Abbildung 29). Da diese Veränderung in der Fluoreszenzintensität den Verlauf einer Bindungskurve annahm, wurde eine nichtlineare Regression durchgeführt und ein K_D von $12,6 \pm 4,1$ nM ermittelt, was in etwa mit der Dissoziationskonstante für die CK2 α / β -Interaktion übereinstimmt (vgl. 4.3.2). Deshalb wurde untersucht, ob diese Methode ebenfalls als CK2 α / β -Interaktionsassay genutzt werden kann.

Eine mögliche Erklärung für die Fluoreszenzintensitätsveränderung bei der Bindung von CK2 α ¹⁻³³⁵ an Cyanin3-CK2 β ¹⁻¹⁹³ liegt in der Art der Markierung: Cyanin3 wird über eine NHS-Ester-Markierung an CK2 β ¹⁻¹⁹³ gekoppelt. Bei dieser Art der Markierung werden primäre Amine markiert, die im Protein in der Aminosäure Lysin und als terminale Aminogruppe vorliegen.²⁹² In der Aminosäuresequenz von CK2 β kommen mehrere Lysine vor; eines davon (Lys191) liegt dabei sehr nah an der Interaktionsstelle mit CK2 α .³ Es ist darum durchaus denkbar, dass ein an dieses Lysin gebundenes Fluorophor durch die Bindung an CK2 α in seiner Fluoreszenz beeinflusst wird. Fluorophore sind oft anfällig für lokale Veränderung, daher scheint es plausibel, dass eine PPI in der unmittelbaren Nähe des Cyanin3 einen Einfluss auf seine Fluoreszenz nehmen könnte.²⁵⁴

Um zu untersuchen, ob sich Cyanin3-markierte CK2 β^{1-193} zur Erforschung der CK2 α/β -Interaktion eignet, wurde CK2 β^{1-193} mit Fluorescein markiert. Diese Markierung erfolgte ebenfalls über die NHS-Ester Methode; der Unterschied zu Cyanin3 liegt einerseits in der Struktur des Fluorophors, aber auch in der Länge des Verbindungsstücks zwischen Fluorophor und der reaktiven Gruppe, die an das Protein gekoppelt wird (s. Abbildung 30). Das hier genutzte Fluorescein hat ein deutlich kürzeres Verbindungsstück, daher könnten lokale Effekte im Protein möglicherweise stärkere Auswirkungen auf das Fluorophor haben. Diese Hypothese bestätigte sich allerdings nicht: Obwohl Fluorescein-CK2 β^{1-193} an CK2 α^{1-335} bindet, beeinflusst diese Bindung die Fluoreszenzintensität nicht (s. Abbildung 31). Auch der in den MST-Messungen genutzte Farbstoff der Firma Nanotemper wird über eine NHS-Ester Markierung an CK2 β^{1-193} gekoppelt; auch hier sieht man keinen Einfluss von CK2 α^{1-335} auf die Fluoreszenzintensität, was bei jeder Messung im Kapillarenskan festgestellt wird (s. Abbildung 8).

Da eine Liganden-induzierte Fluoreszenzveränderung auch durch unspezifische Effekte (z.B. Ligand-induzierte Aggregation, Bindung am Fluorophor)²⁹³ verursacht werden kann, wurde durch Experimente mit Inhibitoren der CK2 α/β -Interaktion untersucht, ob diese durch die Hemmung der Bindung auch die Änderung in der Fluoreszenz inhibieren. Bei der Zugabe von unmarkierter CK2 β^{1-193} zeigte sich auch tatsächlich eine Abnahme der Fluoreszenzintensität, allerdings lag der K_i bei 79 nM deutlich über dem erwarteten Wert von etwa 13 nM, dem gemessenen K_D der CK2 α/β -Interaktion. Auch bei sehr hohen CK2 β^{1-193} -Konzentrationen über 1000 nM sinkt die Fluoreszenzintensität nicht auf ihr unteres Plateau ab (s. Abbildung 32), wie man es bei einem Interaktionsassay erwarten würde (vgl. Abbildung 27). Bei einer Messung mit dem peptidischen Inhibitor Pc war dagegen keine Veränderung der Fluoreszenzintensität zu beobachten (s. Abbildung 32). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der Veränderung der Fluoreszenzintensität bei der Zugabe von CK2 α^{1-335} zu Cyanin3-CK2 β^{1-193} nicht um eine Messung der Bindung zwischen den beiden Proteinen handelt. Gründe für die Fluoreszenzintensitätsänderung können vielfältig sein, da die Fluoreszenzintensität eines Fluorophors durch Interaktionen mit Reaktionsgefäßen oder anderen Molekülen in Lösung verändert werden kann. Da diese Interaktion sich durch die Zugabe von CK2 α/β -Interaktionshemmern nicht bzw. nur eingeschränkt hemmen lässt, ist die Fluoreszenzintensität allerdings keine Messmethode für die CK2 α/β -Interaktion.

Die Möglichkeit zur Entwicklung eines CK2 α/β -Interaktionsassays der auf Fluoreszenzintensität basiert, ist aus verschiedenen Gründen interessant: Ein solcher Assay wäre sehr einfach durchzuführen und mit relativ einfachen Mitteln messbar. Er wäre leicht automatisierbar und könnte damit, wie in 4.3.2 für den FRET-Assay besprochen, eine Lücke im Angebot der CK2 α/β -Interaktionsassays füllen. Daher wurde nach der ersten Beobachtung der Intensitätsveränderung untersucht, ob diese als Assay nutzbar ist, was sich nicht bestätigt hat. Erstaunlich ist, dass die erste erstellte „Bindungskurve“ (s. Abbildung 29) von einer echten Bindungskurve optisch nicht zu unterscheiden ist und dass der daraus berechnete K_D -Wert dem der echten CK2 α/β -Interaktion sehr nahe ist; sie kann als Erinnerung dienen, dass auch

vielversprechende Ergebnisse mit Skepsis zu betrachten sind und durch andere Experimente bestätigt werden müssen.

5 Ausblick

Im Hinblick auf die Weiterentwicklung der WMS-Substanzreihe ist es gelungen, Substanzen zu entwickeln, die die CK2 α / β -Interaktion effektiv hemmen. Dabei wurde die Bedeutung einzelner Strukturelemente herausgestellt, es konnten aber keine globalen Struktur-Wirkungsbeziehungen festgestellt werden, die für alle Substanzen der Reihe gelten. Ein mögliches Anwendungsgebiet für diese Inhibitorreihe liegt in der *in vitro* CK2-Forschung, wo sie noch stets eine der wenigen Klassen niedermolekularer Hemmstoffe der CK2 α / β -Interaktion bildet. Da diese Substanzreihe für die Untersuchung der CK2 α / β -Interaktion entwickelt wurde, ist sie an die Anwendung in Modellorganismen oder als Medikament angepasst: Sie überschreiten zum Beispiel Lipinskis Regel, die unter anderem besagt, dass ein Wirkstoff ein Molekulargewicht unter 500 Da haben sollte.²⁹⁴ Außerdem neigen sie in wässriger Lösung zur Präzipitation. Eine weitere Erforschung der Substanzreihe ist vor allem zum besseren Verständnis der CK2 α / β -Bindungsstelle und ihrer Bindungsmöglichkeiten für kleine Moleküle interessant. Hier wären insbesondere Kristallstrukturen der CK2-Untereinheiten mit gebundenem Inhibitor aufschlussreich.

Bei der Entwicklung des FRET-Assays ist es gelungen, eine Messmethode zu entwickeln, die die CK2 α / β -Interaktion zuverlässig abbildet und geeignet ist, Hemmstoffe für diese Interaktion zu identifizieren und zu untersuchen. Als hochdurchsatzfähige Methode, die ohne aufwendige Technik auskommt, und die sich außerdem automatisieren lässt, füllt dieser Assay eine Lücke in den bisher bestehenden Methoden zur CK2 α / β -Interaktionsmessung. Im Rahmen der Masterarbeit von Esra Seymen (Identification and Characterization of novel Ligands of Protein Kinase CK2 Interfering with the CK2 α / β Subunit Interaction) wurde bereits gezeigt, dass dieser Assay sich für die Anwendung im 384-Well Format eignet: In dieser Arbeit wurde der Assay an dieses Format angepasst für die Untersuchung von 11 CK2 α / β -Interaktionshemmern verwendet, wobei erfolgreich einige neue Hemmstoffe der CK2 α / β -Interaktion identifiziert wurden. Eine weitere denkbare Anwendungsmöglichkeit für diesen Assay ist die Anpassung auf ein *in cellulo* System, bei dem die fluoreszierenden Proteine in Zellen rekombinant hergestellt werden könnten, um dort zur Untersuchung von Hemmstoffen eingesetzt zu werden. Einen Mikroskopie-basierten FRET-Assay für die Beobachtung der CK2 α / β -Interaktion existiert bereits, allerdings erleichtert die Anwendung im Mikrotiterplattenformat die Anwendung im Hochdurchsatzscreening.^{80,295} Der FRET-Assay kann so in Zukunft sicher einen Beitrag zur Erforschung von CK2 α / β -Interaktionshemmern liefern.

6 Material und Methoden

6.1 Verwendete Materialien

6.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden bei den Herstellern Abcam, Applichem, Carl Roth, Honeywell Fluka und Merck in höchster Reinheit gekauft.

6.1.2 Testsubstanzen

Tabelle 2: Verwendete Testsubstanzen

Substanzname oder Reihename	Hersteller
WMS-66 Substanzen	Synthese durch Lukas Kröger ^{217,280}
Pc und I-Pc	Synthese durch Dirk Lindenblatt ^{167,213}
ARC-3140	Synthese durch Kaido Viht et al. ⁷²

6.1.3 Verwendete Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung/ Hersteller
LB-Agar	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, 15 g/L Agar
LB-Medium	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl
SOC-Medium	2 % (m/V) Trypton, 0,5 % (m/V) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose; pH = 7,0
LB-Miller GM	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, 4 g/L Glukose, 0,5 g/L MgSO ₄ , 5,4 g/L KH ₂ PO ₄ , 10,5 g/L K ₂ HPO ₄ ; pH = 7,0
T300	25 mM Tris, 300 mM NaCl; pH = 8,5
Puffer W	100 mM Tris, 150 mM NaCl; pH = 8,0
T1000	25 mM Tris, 1000 mM NaCl; pH = 8,5
T0	25 mM Tris; pH = 8,5
T400	25 mM Tris, 400 mM NaCl; pH = 8,5
T150	25 mM Tris, 150 mM NaCl; pH = 8,5
T500	25 mM Tris, 500 mM NaCl; pH = 8,5
BXT	Iba lifesciences
SDS-Puffer	50 mM Tris, 2 mM EDTA; 150 mM NaCl, 0,5 % (m/V) SDS
4xLaemmli	40 % (V/V) Glycerol, 8 % (m/V) SDS, 1,24 M Tris, 0,08 % (m/V) Bromphenolblau, 2 % 2-Mercaptoethanol (V/V); pH = 6,8
Trenngelpuffer	3 M Tris; pH = 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris; pH = 6,8
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 0,2 M Glycin, 0,5 % (m/V) SDS; pH = 8,3
Coomassie-Färbelösung	0,2 g/L Coomassie G250, 50 g/L Al ₂ (SO ₄) ₃ , 10 % (V/V) EtOH, 2,04 % (V/V) H ₃ PO ₄
Entfärbelösung	9,6 % EtOH (V/V), 2 % (V/V) H ₃ PO ₄
TBS	100 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, pH = 7,5

Bezeichnung	Zusammensetzung/ Hersteller
Nativer Probenpuffer	62,5 mM Tris, 25 % (V/V) Glycerol, 0,01 % (m/V) Bromphenolblau; pH = 6,8
Nativer Laufpuffer	25 mM Tris, 0,2 M Glycin; pH = 8,3
NT Labeling buffer	Nanotemper
T500-Tween	25 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,1 % (V/V) Tween-20; pH = 8,5
Phosphatpuffer	100 mM K ₂ HPO ₄ , 500 mM NaCl; pH = 8,0

6.1.4 Verwendete Geräte

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
ÄKTA Purifier	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland
Distriman Stepper	Gilson Inc., Middleton, UK
Elektrophoresekammer und Blotting Modul Mini-PROTEAN Tetra	BIO RAD, USA
Eppendorf Pipetten "Research plus"	Eppendorf, Hamburg Deutschland
Metrohm 827 pH lab pH-Meter	Metrohm, Herisau, Schweiz
NanoDrop 2000c spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, St. Leon Rot, Deutschland
Nanotemper Monolith NT.115	Nanotemper, München, Deutschland
Odyssey Imager FC Model 2800	LI-COR, USA
Platereader Synergy H4/HT	BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Rollenmischgerät RM5	Hecht Assistent, Deutschland
SC 2 Feinwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
KERN 770 Analysenwaage	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
Schüttelinkubator MaxQ 6000	Thermo Scientific, USA
Synergy 2 multimode microplate reader	BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Deutschland
Ultra-Pure Water System Milli-Q Plus	Merck, Deutschland
Ultraschallbad Ultrasonic Cleaner USC-T	VWR, USA
Variklav Typ 400, Dampfsterilisator	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge 5430R	Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge Mini Star	VWR, USA
Zentrifuge RC 5B Plus	Sorvall, Newton, CT, USA

6.1.5 Verwendete Software

Tabelle 5: Verwendete Software

Software	Hersteller
Chemdraw20.1.1	PerkinElmer, Inc., USA

ExPASy ProtParam online tool	SIB, Schweiz
Gen5 Microplate Reader and Imager Software	BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland
GraphPad Prism 6 for Windows	GraphPad Software Inc. La Jolla, USA
Image Studio	LI-COR, USA
MO.Affinity Analysis	Nanotemper, München, Deutschland
MO.Control	Nanotemper, München, Deutschland
MS Office 2016	Microsoft, USA
Unicorn 5.31	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland

6.2 Proteinexpression

6.2.1 Verwendete Plasmide

Tabelle 6: Verwendete Plasmide zur Proteinexpression. Alle genutzten Plasmide sind zur Selektion mit einer Ampicillin-Resistenz ausgestattet. Die Sequenzen der Inserts sind im Anhang unter 8.2 gegeben.

Protein	Plasmid	Insert
CK2 α ¹⁻³³⁵	pET-22b(+)	CK2 α ¹⁻³³⁵
CK2 β ¹⁻¹⁹³	PT7-7	CK2 β ¹⁻¹⁹³
EGFP	pPSG-iba-105	Strep-EGFP
EGFP- CK2 α ¹⁻³³⁵	pPSG-iba-105	Strep-EGFP-CK2 α ¹⁻³³⁵
mCherry	pPSG-iba-105	Strep-mCherry
mCherry- CK2 β ¹⁻¹⁹³	pPSG-iba-105	Strep-mCherry-CK2 β ¹⁻¹⁹³

6.2.2 Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*

E. coli BL21(De3) wurden auf LB-Agar Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert (Schüttelinkubator MaxQ 6000). Eine Kolonie wurde in einen Schikanekolben mit 250 mL LB-Medium übertragen und über Nacht 37 °C bei geschüttelt (Schüttelinkubator MaxQ 6000). Der Kolben wurde dann 10 Minuten auf Eis gekühlt bevor die Bakterien durch Zentrifugieren (5 Min, 6000 revolutions per minute (rpm), Zentrifuge 5430R) geerntet und mit 10 mL eiskaltem 0,1 M CaCl resuspendiert wurden. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen wie oben beschrieben zentrifugiert und das Zellpellet mit 5 mL eiskaltem 0,1 M CaCl mit 15 % (V/V) Glycerol resuspendiert. Die Bakterien wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

6.2.3 Transformation von *E. coli*

Frisch aufgetaute kompetente *E. coli* BL21(DE3) wurden mit 100 ng des gewünschten Plasmids versehen und 30 min auf Eis inkubiert, danach für 90 s bei 42 °C erhitzt (Thermomixer comfort) und 2 min auf Eis abgekühlt. 250 µL SOC-Medium wurde zugefügt und die Zellen wurden für 1 h bei 37 °C geschüttelt (Thermomixer comfort). Danach wurden 100 µL der Kultur auf LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert (Schüttelinkubator MaxQ 6000).

6.2.4 Proteinexpression in *E. coli*

Bakterien wurden mit dem entsprechenden Plasmid transformiert. Eine Kolonie wurde in 200 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert (Schüttelinkubator MaxQ 6000). Die Kultur wurde 1:50 in 4x1 L LB-Miller GM (bzw. für die Testkultur in 200 ml LB-Medium) verdünnt und bei gleichen Bedingungen bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (bestimmt mit dem NanoDrop 2000c spectrophotometer) von 0,4–0,8 wachsen gelassen. Dann wurde die Proteinexpression mithilfe von 0,5 mM IPTG induziert und die Temperatur auf 20 °C reduziert. Die Kultur wurde über Nacht inkubiert (Schüttelinkubator MaxQ 6000), dann durch Zentrifugieren (5 Min, 6000 revolutions per minute (rpm), Zentrifuge 5430R) geerntet und das Bakterienpellet bei –80 °C eingefroren.

6.3 Proteinaufreinigung und Analyse

6.3.1 Lyse von Bakterien zur Aufreinigung von Proteinen

Gefrorene Zellpellets wurden bei 4 °C aufgetaut und in Puffer T300 (für CK2 α ^{1–335} und CK2 β ^{1–193}) oder Puffer W (für mCherry, mCherry– CK2 β ^{1–193}, EGFP und EGFP– CK2 α ^{1–335}) resuspendiert. Die Lyse wurde über mindestens 1 h mit 1 mg/mL Lysozym, 0,174 mg/mL PMSF, 0,1 mg/mL DNaseI und 25 mg/mL MgSO₄ durchgeführt. Bei der Expression der mCherry– und EGFP–markierten Proteine wurde zusätzlich Protease-Inhibitor-Cocktail (EDTA-frei) zugefügt. Während der Lyse wurden die Zellen auf dem Rollenmischgerät bei 4 °C inkubiert und danach bei –80 °C eingefroren.

6.3.2 Aufreinigung von CK2 α ^{1–335} mittels Affinitätschromatografie

Das Bakterienlysate wurde auf Eis aufgetaut und durch Zentrifugation (15 000 rpm, 30 min, Zentrifuge RC 5B Plus) von unlöslichen Zellbestandteilen getrennt. Das geklärte Lysat wurde mit etwa 20 mL aktivierter P11–Phosphocelluloseⁱⁱ für eine Stunde inkubiert, danach im Batch-Verfahren 3x mit Puffer T300 gewaschen und mit Puffer T1000 eluiert. Beim Batch-Verfahren

ⁱⁱ P11–Phosphocellulose wird für die Aufreinigung von CK2 α als affinitätschromatografisches Material genutzt, während es bei der CK2 β –Aufreinigung als Kationenaustauscher wirkt. S. 59 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. *Molecular and cellular biochemistry* **274**, 3–14 (2005).

wird das P11-Puffer-Gemisch 30 min bei 4 °C ruhen gelassen, wobei das P11-Material absinkt. Dann wurde der Überstand abgegossen.

Das P11-Eluat wurde mit T0-Puffer auf eine NaCl-Konzentration von 400 mM verdünnt und weiter mit dem FPLC-System Äkta Purifier UPC-10 aufgereinigt (Fast Protein Liquid Chromatography). Die Proteinlösung wurde auf die mit dem Puffer T400 equilibrierte Heparin-Sepharose-Säule (Cytvia HiTrap Heparin HP, 1 mL) geladen, mit demselben Puffer gewaschen und dann mit einem Salzgradienten zu Puffer T1000 eluiert. Das aufgereinigte Protein wurde mit 30 kDa MW-Filtern (Molekulargewicht-Filter, Merck Amicon Ultra-15) in Puffer T500 umgepuffert und aufkonzentriert, anschließend wurde es in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

6.3.3 Aufreinigung von CK2 β ¹⁻¹⁹³ mittels Ionenaustauschchromatografie

Das Bakterienlysat wurde wie in 6.3.2 beschrieben geklärt und mit P11-Phosphozellulose aufgereinigt. Das Eluat wurde dann mit Puffer T0 auf eine NaCl-Konzentration von 150 mM verdünnt und mittels FPLC-System Äkta Purifier UPC-10 auf eine Q-Sepharose Säule (Cytvia HiTrap Q FF, 1 mL) geladen, mit dem Puffer T150 gewaschen und mit einem Salzgradienten zum Puffer T1000 eluiert. Alternativ wurde das geklärte Lysat direkt auf die oben genannte Q-Sepharose Säule geladen und ein zweiter Aufreinigungsschritt mit einer weiteren Q-Sepharosesäule (Cytvia HiTrap Q XL 1mL) mit den gleichen Puffern und Arbeitsschritten angeschlossen. Das aufgereinigte Protein wurde wie in 6.3.2 beschrieben umgepuffert, aufkonzentriertⁱⁱⁱ und gelagert.

6.3.4 Aufreinigung von mCherry, mCherry-CK2 β ¹⁻¹⁹³, EGFP und EGFP-CK2 α ¹⁻³³⁵ mittels Affinitätschromatografie

Das Bakterienlysat wurde wie in 6.3.2 geklärt und über das Äkta FPLC-System Äkta Purifier UPC-10 auf eine Strep-Tactin Säule (iba lifesciences Strep-Tactin XT Superflow, 5 mL) aufgetragen. Nach einem Waschschrift mit Puffer W wurde das Protein mit BXT-Puffer eluiert, wobei die Elution mehrmals unterbrochen wurde, um den Elutionspuffer einwirken zu lassen. Das Produkt wurde in Fraktionen aufgefangen und wie in 6.3.2 aufkonzentriert und gelagert mit dem einzigen Unterschied, dass für das Aufkonzentrieren von mCherry und EGFP 15 kDa MW Filter von Merck Amicon genutzt wurden.

6.3.5 Aufreinigung vom mCherry mittels Gelfiltration

Die Superdex 200 Increase 10/300 GL-Säule (GE Healthcare, Schweden) wurde im FPLC-System Äkta Purifier UPC-10 zunächst mit 50 mL entgastem Reinstwasser und dann mit 50 mL Phosphatpuffer (s. Tabelle 3) equilibriert. Die mCherry-enthaltende Proteinlösung wurde in einem Volumen von 500 μ L auf die Säule aufgetragen und mit 32 mL Phosphatpuffer eluiert und in Fraktionen von 250 μ L aufgefangen. Dies wurde dreimal wiederholt, bis die gesamte

ⁱⁱⁱ CK2 β ¹⁻¹⁹³ kann man trotz seines Molekulargewichts von 22,5 kDa mit 30 kDa MW Filtern aufkonzentrieren, da dieses Protein als Dimer vorliegt.

Menge an mCherry aus der vorhergegangenen Aufreinigung verbraucht war. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

6.3.6 Aufreinigung von mCherry-CK2 β^{1-193} mittels Ionenaustauschchromatografie

Der zweite Reinigungsschritt für mCherry-CK2 β^{1-193} verlief analog zur Aufreinigung von CK2 β^{1-193} : Das Protein wurde mit 30 kDa MW-Filtern (Molekulargewicht-Filter, Merck Amicon Ultra-15) in Puffer T150 umgepuffert und wie in 6.3.3 beschrieben aufgereinigt.

6.3.7 Aufreinigung von EGFP-CK2 α^{1-335} mittels Affinitätschromatografie

Der zweite Reinigungsschritt für EGFP-CK2 α^{1-335} verläuft analog zur CK2 α^{1-335} -Aufreinigung: Das Protein wurde mit 30 kDa MW-Filtern (Molekulargewicht-Filter, Merck Amicon Ultra-15) in Puffer T400 umgepuffert und dann wie in 6.3.2 beschrieben über Heparin-Sepharose aufgereinigt.

6.3.8 Proteinanalyse mittels SDS-PAGE

Zur Expressionskontrolle und zur Analyse der Reinheit von aufgereinigten Proteinen wurden Proben mit SDS-Puffer und 4x Laemmli verdünnt, 5 Minuten bei Raumtemperatur oder 95 °C inkubiert und auf 10% oder 15% SDS-Gele (s. Tabelle 7) geladen. Die Gele wurden bei 120 V etwa 1 h 20 min laufen gelassen und anschließend mit Coomassie-Färbelösung über Nacht gefärbt. Danach wurden die Gele mit Wasser gewaschen und dann mit Entfärbelösung inkubiert, bis der Hintergrund ausreichend entfärbt war, und mithilfe des Odyssey Imager FC Model 2800 eingescannt.

Tabelle 7: Rezept zur Herstellung von SDS-Acrylamid Gelen. Das Rezept ist für je zwei Gele.

Komponente	4 % Sammelgel	10 % Trenngel	15 % Trenngel
dH ₂ O	2,05 mL	4,9 mL	3,65 mL
40 % Acrylamid (Rotiphorese Gel 40)	325 μ L	2,5 mL	3,75 mL
Trenngelpuffer	-	2,5 mL	2,5 mL
Sammelgelpuffer	850 μ L	-	-
10 % SDS	32,5 μ L	100 μ L	100 μ L
TEMED	3,25 μ L	10 μ L	10 μ L
10 % APS	32,5 μ L	100 μ L	

6.3.9 Proteinanalyse via Western Blot

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine vom Gel auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid-Membran, Amersham Hybond) geblottet (bei 300 mA für 1 Stunde oder 100 mA für 5 Stunden bei 4 °C). Die Membran drei Mal wurde mit TBS (Tris buffered Saline, s. Tabelle 3) gewaschen und in 5 % Magermilchpulver in TBS geblockt (1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C), wieder drei Mal mit TBS gewaschen und mit primärem Antikörper

(s. Tabelle 8) für 1 Stunde behandelt. Nach einem weiteren Waschschrift (drei Mal Waschen mit TBS) wurde der sekundäre Antikörper 1 Stunde aufgetragen. Der Blot wurde wieder drei Mal mit TBS gewaschen, mit Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, USA) versehen und im Odyssey Imager FC Model 2800 aufgenommen.

Tabelle 8: Antikörper, verwendet die für die Visualisierung von Western Blots.

Antikörper	Hersteller
Casein Kinase II α (1AD9): sc-12738	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
Casein Kinase II β (6D5): sc-12739	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
Mouse anti-Strep-tag II antibody	Iba Lifesciences, Deutschland
Polyclonal rabbit anti-mouse IgG antibody coupled to horseradish peroxidase	Dako Denmark A/S, Denmark

6.3.10 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden für alle Proteine mit dem Nanodrop Spektrophotometer gemessen. Hierzu wurde das Programm zur Absorptionsmessung bei $\lambda = 280$ nm genutzt und die mit dem Expsy ProtParam-Werkzeug (<https://web.expasy.org/protparam/>) berechneten Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten verwendet (s. Tabelle 9).

Tabelle 9: Parameter zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen über die A280-Funktion des Nanodrop-Spektrophotometers. Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten wurden mit Expsy ProtParam berechnet.

Protein	Molekulargewicht (kDa)	Extinktionskoeffizient ($1000 \cdot M^{-1} \text{cm}^{-1}$)
CK2 α ¹⁻³³⁵	40,0	61,8
CK2 β ¹⁻¹⁹³	22,5	28,9
EGFP	27,1	21,9
EGFP-CK2 α ¹⁻³³⁵	67,7	83,7
mCherry	26,8	34,4
mCherry-CK2 β ¹⁻¹⁹³	49,9	63,3

6.4 Visualisierung von PPI auf nativer PAGE

6.4.1 Native PAGE

Zur Analyse von Proteininteraktionen mit Hilfe der nativen PAGE wurden 10% native Gele hergestellt (s. Tabelle 10). Die Proben wurden 1:3 mit nativem Probenpuffer versehen und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben auf die Gele geladen und mit nativem Laufpuffer bei 80 V, 30 mA für etwa 3 h laufen gelassen. Schließlich wurden sie entweder wie in 6.3.8 beschrieben gefärbt und analysiert oder ohne weitere Behandlung mit dem Imager bei $\lambda = 600$ nm analysiert.

Tabelle 10: Rezept zur Herstellung von nativen Acrylamid-Gelen. Das Rezept ist für 2 Gele.

Komponente	4 % Sammelgel	10 % Trenngel
dH ₂ O	1950 µL	7,5 mL
40 % Acrylamid (Rotiphorese Gel 40)	300 µL	3 mL
Trenngelpuffer	-	1,5 mL
Sammelgelpuffer	750 µL	-
TEMED	3 µL	12 µL
10 % APS	30 µL	120 µL

6.4.2 Qualitative Visualisierung von PPI

Die Proteine wurden so in T500 mit 1:3 nativem Probenpuffer verdünnt, dass sie in einer finalen Konzentration von 20 µM je Protein vorlagen. Davon wurden 5 µL Probe pro Tasche auf dem Gel verwendet. Pro Gel wurden die Proteine jeweils einzeln und in den zu untersuchenden Kombinationen aufgetragen.

6.4.3 Quantitative Analyse von PPI

Eine 1:1 Verdünnungsreihe von CK2α¹⁻³³⁵ oder EGFP-CK2α¹⁻³³⁵ wurde hergestellt und jeweils mit mCherry-CK2β¹⁻¹⁹³ vermischt. Die finalen Konzentrationen betrugen 5000–9,7 nM für die CK2α-Untereinheiten und 400 nM für mCherry-CK2β¹⁻¹⁹³. Die Proben wurden wie in 6.4.1 beschrieben behandelt und die Gele wurden ungefärbt bei 600 nm aufgenommen. Das Signal wurde mit der Image Studio Software quantifiziert, indem um jede Bande und um eine leere Stelle auf dem Gel ein Kästchen mit jeweils gleicher Fläche gezogen wurde. Dann wurde in MS Excel das Signal des leeren Kästchens als Hintergrund abgezogen und der Mittelwert der korrigierten Signale von jeweils drei gleich geladenen Gelen gebildet.

6.5 Microscale Thermophoresis

6.5.1 Markierung von CK2β¹⁻¹⁹³ mit dem NT RED-NHS Kit

CK2β¹⁻¹⁹³ wurde nach dem Herstellerprotokoll der Firma Nanotemper mit dem Monolith NT Protein Labeling Kit RED-NHS markiert. Dazu wurde das Protein zuerst in einen Tris-freien NT Labeling buffer umgepuffert, auf eine Konzentration von 20 µM verdünnt und mit 70,5 µM nach Herstellerangaben in DMSO gelösten Farbstoff NT-647-NHS 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde überschüssiger Farbstoff mithilfe der im Kit enthaltenen Entsalzungssäule entfernt und das Protein in T500-Puffer umgepuffert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde durch Photospektrometrie die Absorption bei λ=280 nm und λ=650 nm gemessen (NanoDrop 2000c spectrophotometer) und mit Gleichung 17 die Proteinkonzentration berechnet. Dabei sind A₂₈₀ und A₆₅₀ die bei den jeweiligen Wellenlängen gemessenen Absorptionen und ε der Extinktionskoeffizient von CK2β¹⁻¹⁹³ (s. Tabelle 9).

Gleichung 17:

$$c = \frac{A_{280} - 0,028 * A_{650}}{\epsilon}$$

Das markierte Protein wurde in Aliquots von 5–10 µL in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

6.5.2 Messung von PPIs via MST

Die fluoreszenzmarkierte CK2β^{1–193} wurde in T500–Tween Puffer mit 2 % DMSO (Dimethylsulfoxid) oder mit in 2 % DMSO gelösten Inhibitor zu einer Konzentration von 40 nM in 200 µL verdünnt. Um das Ausfallen der Testsubstanzen zu vermeiden, wurden diese erst in 100 % DMSO gelöst und dann schrittweise mit T500–Tween verdünnt, bis die DMSO–Konzentration bei 2 % lag. Zwischen den Verdünnungsschritten wurden die Substanzen je 5 min im Ultraschallbad behandelt. Die Mischung aus Inhibitor und markierter CK2β^{1–193} wurde dann 5 min in einer Mini–Zentrifuge (VWR) zentrifugiert.

CK2α^{1–335}, EGFP–CK2α^{1–335} oder EGFP wurde in je 10 µL als 1:1 Verdünnungsreihe mit einer Höchstkonzentration von 10 µM in 16 Schritten in T500–Puffer verdünnt. 10 µL der Verdünnungsreihe wurden dann mit jeweils 10 µL der verdünnten CK2β^{1–193} (40 µM) gemischt, sodass bei der Messung CK2β^{1–193} in einer Konzentration von 20 µM vorlag. Diese Lösung wurde in MST–Kapillaren (Nanotemper Monolith NT.155 Capillaries) aufgezogen und mithilfe des Nanotemper Monolith NT.115 wurden, bei automatisch eingestellter MST–Power und Infrarot–Laser, MST Traces aufgenommen.

6.5.3 Berechnung der Dissoziationskonstante K_D

Die MST–Kurven wurden zuerst optisch auf Aggregatbildung untersucht (s. Qualitätskontrolle der MST–Daten in Kapitel 1) und die entsprechenden Messpunkte wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Zur Auswertung wurde die initiale Fluoreszenz und die Fluoreszenz nach 20 s genutzt. Der ΔF_{norm} –Wert wurde dafür in MO.Affinity Analysis gebildet und für die weitere Bearbeitung als Tabelle exportiert.

In GraphPad Prism wurden die ΔF_{norm} –Werte gegen die verschiedenen Konzentrationen an CK2α^{1–335}, EGFP–CK2α^{1–335} oder EGFP aufgetragen und eine nichtlineare Regression mit Gleichung 18 wurde durchgeführt. Dabei steht r für den gemessenen ΔF_{norm} –Wert, r_{free} und r_{bound} stehen jeweils für den ΔF_{norm} –Wert bei ungebundener bzw. maximal gebundener markierter CK2β^{1–193}, $[E]$ steht für die Konzentration an CK2α^{1–335}, EGFP–CK2α^{1–335} oder EGFP und $[L]$ ist die Konzentration an markierter CK2β^{1–193}.

Gleichung 18

$$r = r_{\text{free}} + (r_{\text{bound}} - r_{\text{free}}) \frac{([E] + [L] + K_D) - \sqrt{([E] + [L] + K_D)^2 - 4 [E][L]}}{2 [L]}$$

6.5.4 Berechnung der Inhibitionskonstante K_i für die Podophyllotoxin–Indol–Analoge

Nachdem die K_D' -Werte für die CK2 α / β -Interaktion in Anwesenheit der Substanzen berechnet wurden, wurde in GraphPad Prism ein t-test durchgeführt, um zu bestimmen, ob sich der K_D' -Wert in Anwesenheit der jeweiligen Substanz signifikant von dem K_D -Wert der ungehemmten CK2 α / β -Interaktion unterscheidet. Für diejenigen Substanzen, für die ein signifikant erhöhter K_D' -Wert festgestellt wurde, wurde ein „Global Fit“ durchgeführt. Dazu wurden die ΔF_{norm} -Werte der ungehemmten CK2 α / β -Interaktion und aller signifikant hemmenden Substanzen gemeinsam mit Gleichung 19 und Gleichung 20 beschrieben. Dabei steht K_D' für die Dissoziationskonstante der CK2 α / β -Interaktion in Anwesenheit des Inhibitors, K_D ist die Dissoziationskonstante der CK2 α / β -Interaktion ohne Inhibitor, $[I]$ steht für die Inhibitorkonzentration und K_i ist die Dissoziationskonstante des Inhibitors. Die anderen Variablen sind wie in Gleichung 18. K_D wurde dabei als gemeinsame Konstante für alle Inhibitoren genutzt.

Gleichung 19

$$K_D' = K_D \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

Gleichung 20

$$r = r_{\text{free}} + (r_{\text{bound}} - r_{\text{free}}) \frac{([E] + [L] + K_D') - \sqrt{([E] + [L] + K_D')^2 - 4 [E][L]}}{2 [L]}$$

6.6 FRET Assay

6.6.1 Messung von Fluoreszenzspektren

Für die Messung der Fluoreszenzspektren wurde eine 1:9-Verdünnungsreihe von mCherry–CK2 β ^{1–193} mit einer konstanten Konzentration von EGFP–CK2 α ^{1–335} in T500-Puffer vermischt mit finalen Konzentrationen von 1–10000 nM für mCherry–CK2 β ^{1–193} und 20 nM für EGFP–CK2 α ^{1–335}. Die Proben wurden in schwarzen BRANDplates–pureGrade–96–Well–Mikrotiterplatten mit F-Boden im Synergy H4/HT Platereader mit einem Monochromator bei $\lambda = 487$ nm oder $\lambda = 442$ nm angeregt und ein Emissionsspektrum bis $\lambda = 700$ nm wurde aufgenommen. Die Spektren wurden mit GraphPad Prism visualisiert.

6.6.2 FRET-Punktmessungen

Tabelle 11: Kanäle und Wellenlängen der FRET-Punktmessungen.

Kanal	Anregungswellenlänge λ_{ex} (nm)	Emissionswellenlänge λ_{em} (nm)
Donor (D)	485/25	528/20
FRET (F)	485/25	620/40
Akzeptor (A)	540/25	620/40

Die FRET-Punktmessungen für die K_D -Bestimmung und die Inhibitortestung wurden im Synergy 2 Platerader mit dem 50% Spiegel durchgeführt. Dazu wurden die Anregungsfilter 485/25 nm und 540/25 nm und die Emissionsfiltern 528/20 nm und 620/40 nm genutzt. Die Proben wurden jeweils im Duplikat oder Triplikat in 96-Well Platten pipettiert und es wurden je drei Messungen durchgeführt, die in dieser Arbeit auch als Kanäle bezeichnet werden. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen dazu sind in Tabelle 11 aufgelistet. Das Assayvolumen betrug 100 μ L.

6.6.3 Berechnung von FRETc

Als erster Schritt wurde von allen Messungen das Hintergrundsignal der Pufferkontrollen bzw. der Kontrollen mit der entsprechenden Konzentration an CK2 β^{1-193} oder I-Pc abgezogen. Hierzu wurde der Mittelwert der Kontrollen genutzt. Wo immer im Laufe der FRETc-Berechnung negative Signale errechnet wurden, wurden diese durch den Wert „0“ ersetzt.

Um das Bleed-through der Fluorophore rechnerisch zu korrigieren, wurden auf jeder gemessenen Platte Kontrollen mit jeweils nur einem der Fluorophore mitgeführt und gemessen. Daraus wurden wie in Auswertung von FRET-Signalen im Kapitel FRET beschrieben mit den Gleichungen Gleichung 10 – Gleichung 20 die Korrekturfaktoren S1–S4 berechnet. Dabei bestand die Donorkontrolle aus Proben, in denen nur das Donorfluorophor EGFP–CK2 α^{1-335} enthalten war und die Akzeptorkontrolle aus Proben mit dem Akzeptorfluorophor mCherry–CK2 β^{1-193} .

Aus den Korrekturfaktoren wurden Mittelwerte gebildet mit denen dann nach Gleichung 14 und Gleichung 15 Donor- und Akzeptorsignale der übrigen Messungen korrigiert wurden. Mit Gleichung 16 wurde dann FRETc berechnet.

6.6.4 Bestimmung des K_D -Werts der CK2 α/β -Interaktion mit dem FRET Assay

Es wurde eine 1:1 Verdünnungsreihe von mCherry–CK2 β^{1-193} mit einer konstanten Konzentration EGFP–CK2 α^{1-335} vermischt, wobei von der gleichen mCherry–CK2 β^{1-193} Verdünnungsreihe ebenfalls Kontrollen ohne EGFP–CK2 α^{1-335} hergestellt wurden. Die Messung wurde im Triplikat durchgeführt und die finalen Konzentrationen waren 2,3–300 nM für mCherry–CK2 β^{1-193} und 30 nM für EGFP–CK2 α^{1-335} . Wie in Kapitel 1.5.7 beschrieben wurde die Fluoreszenz in drei Kanälen gemessen und daraus FRETc berechnet (s. 6.6.3). FRETc von drei Experimenten wurde gegen die mCherry–CK2 β^{1-193} Konzentration aufgetragen und eine nichtlineare Regression wurde mit Gleichung 18 wie in 6.5.3 beschrieben in GraphPad Prism durchgeführt. Der Parameter r steht hierbei für den FRETc-Wert, r_{free} und r_{bound} stehen jeweils für den FRETc-Wert bei ungebundener bzw. maximal gebundener markierter EGFP–CK2 α^{1-335} , $[E]$ steht für die Konzentration an mCherry–CK2 β^{1-193} und $[L]$ ist die Konzentration an EGFP–CK2 α^{1-335} .

Der Curve-Fit wurde für jede der drei Messungen separat durchgeführt. Aus den sich ergebenden K_D -Werten wurde dann der Mittelwert gebildet.

6.6.5 Inhibitortesting zur Validierung des FRET Assays

CK2 β^{1-193} als Hemmstoff der Interaktion zwischen EGFP-CK2 α^{1-335} und mCherry-CK2 β^{1-193}

Um zu zeigen, dass es sich bei der gemessenen Interaktion zwischen EGFP-CK α^{1-335} und mCherry-CK2 β^{1-193} um eine CK2 α/β -Interaktion handelt, wurde unmarkierte CK2 β^{1-193} als kompetitiver Hemmstoff dieser Interaktion eingesetzt. Dazu wurde eine 1:1 Verdünnungsreihe von CK2 β^{1-193} hergestellt und T500-Puffer vermischt, sodass die finalen Konzentrationen für EGFP-CK α^{1-335} 30 nM und für mCherry-CK2 β^{1-193} 50 nM mCherry-CK2 β^{1-193} betrugen. Dieselbe Verdünnungsreihe wurde zusätzlich auch als Kontrolle ohne die fluoreszierenden Konstrukte in die Platte gegeben, um die Eigenfluoreszenz der CK2 β^{1-193} zu bestimmen und diese als Hintergrund von den FRET-Messungen abzuziehen. Die finalen Konzentrationen von unmarkierter CK2 β^{1-193} lagen zwischen 2,4 und 1250 nM. Die Messungen wurden im Triplikat durchgeführt und FRET_c wurde berechnet (s. 6.6.3). Dann wurde FRET_c gegen die CK2 β^{1-193} -Konzentration aufgetragen und eine nichtlineare Regression nach Gleichung 21 (angepasst von Referenz ²⁹⁶) durchgeführt, um den IC₅₀-Wert zu bestimmen. Dabei steht F_c für das gemessene FRET_c-Signal, F_{bound} und F_{free} je für den FRET_c-Wert bei vollständig gebundenen oder ungebundenen Bindungspartnern, was in einer sigmoidalen Bindungskurve mit dem oberen und unteren Plateau der Kurve übereinstimmt, $[I]$ steht für die Inhibitorkonzentration, IC₅₀ ist die Inhibitorkonzentration, bei der die Bindung um 50 % gehemmt ist und n steht für den Hill-Koeffizienten.

Gleichung 21

$$F_c = \frac{F_{bound} - F_{free}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^n} + F_{free}$$

Um den K_i zu bestimmen wurden das Programm *K_i-calculator* ²⁹¹ verwendet (http://www.umich.edu/~shaomengwanglab/software/calc_ki/calc_ki.xlsx).

I-Pc

Das Experiment wurde wie für CK2 β^{1-193} beschrieben in Form von drei separaten Messungen im Duplikat durchgeführt. Die I-Pc-Konzentrationen variierte dabei im Bereich 1,8–60000 nM.

ARC-3140

Für die Messung wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe von ARC-3140 mit finalen Konzentrationen von 2,5–50000 nM verwendet. Da ARC-3140, anders als das Protein CK2 β^{1-193} und das Peptid I-Pc keine Eigenfluoreszenz aufweist, wurde auf die Kontrollreihe verzichtet. Allerdings wurde eine Positivkontrolle mitgeführt, die eine vollständige Hemmung der Interaktion darstellt; dazu wurde CK2 β^{1-193} in einer finalen Konzentration von 500 nM (mit der entsprechenden Hintergrundkontrolle) genutzt. Die Messung wurde mit 30 nM EGFP-CK2 α^{1-335} und 50 nM mCherry-CK2 β^{1-193} in T500-Puffer im Duplikat durchgeführt.

Beim Auftragen der FRET_c-Werte gegen die InhibitorKonzentration zeigte sich ein Kurvenverlauf, der zu einer biphasischen Hemmung passt; daher wurde hier die Gleichung 22 (angepasst von Referenz ²⁹⁷) angewandt. Diese Gleichung beschreibt die Hemmkurve in zwei aufeinander folgenden Segmenten. F_c steht für den gemessenen Wert an FRET_c, F_{bound} ist der FRET_c-Wert ohne Inhibitor, F_i ist der FRET_c-Wert am Plateau der Hemmkurve zwischen dem ersten und dem zweiten Inhibitionsschritt, F_{free} der FRET_c-Wert bei vollständiger Hemmung der PPI, welcher in diesem Fall anhand der Positivkontrolle (Hemmung der Interaktion durch 500 nM CK2 β^{1-193}) bestimmt wurde, $[I]$ ist die InhibitorKonzentration, $IC_{50,1}$ und $IC_{50,2}$ sind die IC_{50} -Werte und n_1 und n_2 die Hill-Koeffizienten der beiden Inhibitionsschritte .

Gleichung 22

$$F_c = \frac{F_{bound} - F_i}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50,1}}\right)^{n_1}} + \frac{F_i - F_{free}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50,2}}\right)^{n_2}} + F_{free}$$

6.7 Fluoreszenzintensitätsassay

6.7.1 Markierung von CK2 β^{1-193} mit Cyanin3

Etwa 0,1 mg Cyanin 3 (Lumiprobe GmbH, DE) wurde in DMSO gelöst und mit 0,4 mg CK2 β^{1-193} in Phosphatpuffer (mit 10% DMSO im finalen Gemisch bei einem Volumen von 100 μ L) über Nacht bei 4 °C inkubiert und am folgenden Tag mithilfe einer Cytavia PD-10 Gravity-flow Chromatographiesäule gereinigt und mit T500-Puffer eluiert. Proteinkonzentrationen wurden mithilfe des Nanodrop-Spektrophotometers gemessen, wobei für die Berechnung der Proteinkonzentration die folgende Gleichung 23 verwendet wurde:

Gleichung 23

$$c = \frac{A_{280} - 0,09 * A_{555}}{\epsilon}$$

Dabei steht c für die Proteinkonzentration, A₂₈₀ und A₅₅₅ stehen für die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bzw. 555 nm und ϵ ist der Extinktionskoeffizient des markierten Proteins.²⁹²

6.7.2 Messung der Fluoreszenzintensität im 96-Well Format

Es wurde eine 1:4 Verdünnungsreihe mit CK2 α^{1-335} in T500-Puffer hergestellt und mit Cyanin3-CK2 β^{1-193} vermischt, sodass die finalen Konzentrationen von CK2 α^{1-335} bei 0,32–5000 nM und die von Cyanin3-CK2 β^{1-193} bei 20 nM lagen. Die Messung wurde im Triplikat in einem Volumen von 200 μ L in schwarzen BRANDplates-pureGrade-96-Well-Mikrotiterplatten mit F-Boden im Synergy 2 Platereader mit einer Anregungswellenlänge von 528 nm und einer Emissionswellenlänge von 620 nm durchgeführt. Als Kontrolle wurde eine Pufferkontrolle und eine Kontrolle ohne CK2 α^{1-335} mitgeführt, sowie die gleiche Verdünnungsreihe wie oben ohne Cyanin3-CK2 β^{1-193} , alle jeweils im Triplikat. Das Experiment wurde drei Mal durchgeführt.

Zur Auswertung wurde von allen Kontrollen der Mittelwert gebildet und dann von den Messpunkten mit der jeweils gleichen CK2 α^{1-335} -Konzentration abgezogen. Die resultierenden Intensitäten wurden in GraphPad Prism gegen die CK2 α^{1-335} -Konzentration aufgetragen und mit Gleichung 18 wurde eine nichtlineare Regression durchgeführt. Dabei ist r die Fluoreszenzintensität, r_{free} und r_{bound} stehen jeweils für die Fluoreszenzintensität bei ungebundener bzw. maximal gebundener markierter CK2 β^{1-193} , $[E]$ steht für die Konzentration an CK2 α^{1-335} und $[L]$ ist die Konzentration an markierter CK2 β^{1-193} .

6.7.3 Markierung von CK2 β^{1-193} mit NHS-Fluorescein

Eine Menge von 0,175 mg NHS-Fluorescein (5/6-Carboxyfluoresceinsuccinimidylester, Thermo Fisher Scientific, USA) wurde in 17,49 μL DMSO gelöst und mit 160 μL 154 μM CK2 β^{1-193} in Phosphatpuffer vermischt. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde das Protein auf einer Cytavia PD-10 Gravity-flow Chromatografiesäule gereinigt und mit T500-Puffer eluiert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Nanodrop-Spektrophotometer über die Absorption mit Hilfe der folgenden Gleichung 24 bestimmt:

Gleichung 24

$$c = \frac{A_{280} - 0,3 * A_{493}}{\epsilon}$$

Dabei steht c für die Proteinkonzentration, A_{280} und A_{493} stehen für die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bzw. 493 nm und ϵ ist der Extinktionskoeffizient des markierten Proteins.

6.7.4 MST-Messungen mit Fluorescein-CK2 β^{1-193}

Die MST-Messungen wurden wie in 6.5 beschrieben durchgeführt und ausgewertet. Für die Auswertung der Fluoreszenzintensität wurde das Signal der initialen Fluoreszenz der Messungen genutzt und gegen die CK2 α^{1-335} -Konzentration aufgetragen.

6.7.5 Inhibitortestung mit Cyanin3-CK2 β^{1-193} Fluoreszenzintensität

Um festzustellen, ob die gemessene Cyanin3-CK2 β^{1-193} -Intensitätsveränderung ein Maß für die CK2 α/β -Interaktion ist, wurde eine 1:1 Verdünnungsreihe von CK2 β^{1-193} bzw. Pc hergestellt, sodass die finalen Konzentrationsspannen im Assay 0,98–2000 nM, bzw. 6–100000 nM waren. Die Verdünnungsreihe wurde einmal (im Triplikat) als Kontrolle gemessen, einmal wurden dazu Cyanin3-CK2 β^{1-193} und CK2 α^{1-335} gegeben mit finalen Konzentrationen von 20 und 50 nM, ebenfalls im Triplikat. Die Messungen erfolgten in T500 Puffer bei einem Gesamtvolumen von 200 μL , wie in 6.7.2 beschrieben durchgeführt.

Nach Abzug der Kontrollen wurde die Fluoreszenzintensität gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen und eine nichtlineare Regression nach Gleichung 25 (angepasst von ²⁹⁶) durchgeführt, um den IC_{50} -Wert zu bestimmen. Dabei steht F_c für die Fluoreszenzintensität, F_{bound} und F_{free} für die Intensität bei vollständig gebundenen bzw. ungebundenen Bindungspartnern, $[I]$ steht für die Inhibitorkonzentration, IC_{50} ist die Inhibitorkonzentration, bei der die Bindung zu 50% gehemmt ist und n steht für den Hill-Koeffizienten.

Gleichung 25

$$F_c = \frac{F_{bound} - F_{free}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC50}\right)^n} + F_{free}$$

Um den K_i zu bestimmen wurden das Werkzeug *K_i-calculator* ²⁹¹ verwendet (http://www.umich.edu/~shaomengwanglab/software/calc_ki/calc_ki.xlsx).

7 Literaturverzeichnis

- 1 Ferguson, A. D. *et al.* Structural basis of CX-4945 binding to human protein kinase CK2. *FEBS Lett* **585**, 104–110 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.11.019>
- 2 Scientific, T. *Fluorescence SpectraViewer*, <https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer#!/>
- 3 Niefind, K. *et al.* Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J* **20**, 5320–5331 (2001). <https://doi.org/10.1093/emboj/20.19.5320>
- 4 Raaf, J. *et al.* The interaction of CK2 α and CK2 β , the subunits of protein kinase CK2, requires CK2 β in a preformed conformation and is enthalpically driven. *Protein Sci* **17**, 2180–2186 (2008). <http://dx.doi.org/10.1110/ps.037770.108>
- 5 Manning, G. *et al.* The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912–1934 (2002). <https://doi.org/10.1126/science.1075762>
- 6 Virág, D. *et al.* Current Trends in the Analysis of Post-translational Modifications. *Chromatographia* **83**, 1–10 (2019). <https://doi.org/doi:10.1007/s10337-019-03796-9>
- 7 Müller-Esterl, W. *Biochemie*. 3. Aufl. (Springer Spektrum, 2018).
- 8 Braicu, C. *et al.* A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers* **11** (2019). <https://doi.org/10.3390/cancers11101618>
- 9 Blüthgen, N. *et al.* Effects of sequestration on signal transduction cascades. *FEBS J* **273**, 895–906. (2006). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05105.x>
- 10 Plotnikov, A. *et al.* The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *BBA Mol Cell Res* **1813**, 1619–1633 (2011). [https://doi.org:https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.012](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.012)
- 11 Fang, X. *et al.* Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *PNAS* **97**, 11960 (2000). <https://doi.org/10.1073/pnas.220413597>
- 12 Lavoie, H. & Therrien M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 281–298 (2015). <https://doi.org/10.1038/nrm3979>
- 13 Banerjee, T & Chakravarti D. A peek into the complex realm of histone phosphorylation. *Mol Cell Biol* **31:24**, 4858–4873 (2011). <https://doi.org/10.1128/MCB.05631-11>
- 14 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011). <https://doi.org:https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- 15 Mehdi, S. J. *et al.* Protein Kinases and Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* **17**, 1585 (2016). <https://doi.org/10.3390/ijms17091585>
- 16 Barnes, P. J. Kinases as Novel Therapeutic Targets in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pharmacol Rev* **68**, 788 (2016). <https://doi.org/10.1124/pr.116.012518>
- 17 Cohen, P. *et al.* Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress and future directions. *Nat Rev Drug Discov* **20**, 551–569 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00195-4>
- 18 Kantarjian, H. *et al.* Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience. *Blood* **119**, 1981–1987 (2012). <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-358135>

- 19 Bower, H. *et al.* Life Expectancy of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Approaches the Life Expectancy of the General Population. *J Clin Oncol* **34**, 2851–2857 (2016). <https://doi.org/10.1200/jco.2015.66.2866>
- 20 Rask-Andersen, M. *et al.* Advances in kinase targeting: current clinical use and clinical trials. *Trends Pharmacol Sci* **35**, 604–620 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.09.007>
- 21 Burnett, G. & Kennedy, E. P. The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem* **211**, 969–980 (1954).
- 22 Niefind, K. *50 Jahre Proteinkinase CK2 ein Beitrag zur Strukturbiochemie eukaryontischer Proteinkinasen*, (2004).
- 23 Fulcher, L. J. & Sapkota, G. P. Functions and regulation of the serine/threonine protein kinase CK1 family: moving beyond promiscuity. *Biochem J* **477**, 4603–4621 (2020). <https://doi.org/10.1042/bcj20200506>
- 24 Franchin, C. *et al.* Exploring the CK2 Paradox: Restless, Dangerous, Dispensable. *Pharmaceuticals (Basel)* **10**, 11 (2017). <https://doi.org/10.3390/ph10010011>
- 25 Meggio, F. & Pinna, L. A. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J* **17**, 349–368 (2003). <https://doi.org/10.1096/fj.02-0473rev>
- 26 Salvi, M. *et al.* Extraordinary pleiotropy of protein kinase CK2 revealed by weblogo phosphoproteome analysis. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 847–859 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.01.013>
- 27 Franchin, C. *et al.* Re-evaluation of protein kinase CK2 pleiotropy: new insights provided by a phosphoproteomics analysis of CK2 knockout cells. *Cell Mol Life Sci* **75**, 2011–2026 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2705-8>
- 28 Grankowski, N., *et al.* Isolation and characterization of recombinant human casein kinase II subunits alpha and beta from bacteria. *Eur J Biochem* **198**, 25–30 (1991). <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb15982.x>
- 29 Pinna, L. A. The raison d'etre of constitutively active protein kinases: the lesson of CK2. *Acc Chem Res* **36**, 378–384 (2003). <https://doi.org/10.1021/ar020164f>
- 30 Roffey, S. E. & Litchfield, D. W. CK2 Regulation: Perspectives in 2021. *Biomedicines* **9**, 1361 (2021). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101361>
- 31 Filhol, O. & Cochet, C. Protein kinase CK2 in health and disease: Cellular functions of protein kinase CK2: a dynamic affair. *Cell Mol Life Sci* **66**, 1830–9 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00018-009-9151-1>
- 32 Dotan, I. *et al.* Functional Conservation between the Human, Nematode, and Yeast CK2 Cell Cycle Genes. *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 603–609 (2001). <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5804>
- 33 St-Denis, N. A. & Litchfield, D. W. Protein kinase CK2 in health and disease: From birth to death: the role of protein kinase CK2 in the regulation of cell proliferation and survival. *Cell Mol Life Sci* **66**, 1817–1829 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00018-009-9150-2>
- 34 Castello, J., *et al.* CK2—An Emerging Target for Neurological and Psychiatric Disorders. *Pharmaceuticals (Basel)* **10**, 7 (2017). <http://dx.doi.org/10.3390/ph10010007>

- 35 Sivachandran, N. *et al.* Epstein–Barr virus nuclear antigen 1 Hijacks the host kinase CK2 to disrupt PML nuclear bodies. *J virol* **84**, 11113–11123 (2010). <https://doi.org/10.1128/jvi.01183-10>
- 36 Buontempo, F. *et al.* Therapeutic targeting of CK2 in acute and chronic leukemias. *Leukemia* **32**, 1–10 (2018). <https://doi.org/10.1038/leu.2017.301>
- 37 Chua, M. M. J. *et al.* Cancer–type dependent expression of CK2 transcripts. *PLoS One* **12**, e0188854 (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188854>
- 38 Chua, M. M. J. *et al.* CK2 in Cancer: Cellular and Biochemical Mechanisms and Potential Therapeutic Target. *Pharmaceuticals (Basel)* **10**, 18 (2017). <https://doi.org/10.3390/ph10010018>
- 39 Trembley, J. H *et al.* CK2: A key player in cancer biology. *Cell Mol Life Sci* **66**, 1858–1867 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00018-009-9154-y>
- 40 Ortega, C. E. *et al.* Mining CK2 in cancer. *PLoS One* **9**, e115609 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115609>
- 41 Iegre, J. *et al.* Chemical probes targeting the kinase CK2: a journey outside the catalytic box. *Org Biomol Chem* **19**, 4380–4396 (2021). <https://doi.org/10.1039/D1OB00257K>
- 42 Dominguez, I. *et al.* Protein Kinase CK2 in Health and Disease. *Cell Mol Life Sci* **66**, 1850–1857 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00018-009-9153-z>
- 43 Borgo, C. *et al.* How can a traffic light properly work if it is always green? The paradox of CK2 signaling. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **56**, 321–359 (2021). <https://doi.org/10.1080/10409238.2021.1908951>
- 44 Hanks, S. K. & Hunter, T. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* **9**, 576–596 (1995). <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.8.7768349>
- 45 Kornev, A. P. & Taylor, S. S. Defining the conserved internal architecture of a protein kinase. *Biochim Biophys Acta* **1804**, 440–444 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.017>
- 46 Kornev, A. P. *et al.* A helix scaffold for the assembly of active protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14377 (2008). <https://doi.org/10.1073/pnas.0807988105>
- 47 Niefind, K. & Battistutta, R. in *Protein Kinase CK2*. 1. Aufl. 1–75 (Wiley–Blackwell, 2013).
- 48 Niefind, K. *et al.* Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays* at 2.1 Å resolution. *EMBO J* **17**, 2451–2462 (1998). <https://doi.org/10.1093/emboj/17.9.2451>
- 49 Niefind, K. *et al.* GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2. *Nat Struct Biol* **6**, 1100–1103 (1999). <https://doi.org/10.1038/70033>
- 50 Niefind, K. *et al.* Protein kinase CK2 in health and disease: Protein kinase CK2: from structures to insights. *Cell Mol Life Sci* **66** 1800–1816 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00018-009-9149-8>
- 51 Sarno, S. *et al.* 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). <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1024>

- 52 Sarno, S. *et al.* Protein Kinase CK2 Mutants Defective in Substrate Recognition: Purification and Kinetic Analysis. *J Biol Chem* **271**, 10595–10601 (1996). <https://doi.org/10.1074/jbc.271.18.10595>
- 53 Meggio, F. *et al.* Substrate specificity of protein kinase CK2. *Cell Mol Biol Res* **40**, 401–409 (1994).
- 54 Adams, J. A. Kinetic and Catalytic Mechanisms of Protein Kinases. *Chem Rev* **101**, 2271–2290 (2001). <https://doi.org/10.1021/cr000230w>
- 55 Bischoff, N. *et al.* Structure of the human protein kinase CK2 catalytic subunit CK2alpha' and interaction thermodynamics with the regulatory subunit CK2beta. *J Mol Biol* **407**, 1–12 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.01.020>
- 56 Nakaniwa, T. *et al.* Structure of human protein kinase CK2 alpha 2 with a potent indazole-derivative inhibitor. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **65**, 75–79 (2009). <https://doi.org/10.1107/S1744309108043194>
- 57 Jakobi, R. *et al.* Human phosvitin/casein kinase type II. Molecular cloning and sequencing of full-length cDNA encoding subunit beta. *Eur J Biochem* **183**, 227–233 (1989). <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb14917.x>
- 58 Leroy, D. *et al.* Direct Identification of a Polyamine Binding Domain on the Regulatory Subunit of the Protein Kinase Casein Kinase 2 by Photoaffinity Labeling. *J Biol Chem* **270**, 17400–17406 (1995). <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.270.29.17400>
- 59 Niefind, K. & Issinger, O. G. Primary and secondary interactions between CK2alpha and CK2beta lead to ring-like structures in the crystals of the CK2 holoenzyme. *Mol Cell Biochem* **274**, 3–14 (2005). <https://doi.org/10.1007/s11010-005-3114-0>
- 60 Meggio, F. *et al.* Casein kinase 2 down-regulation and activation by polybasic peptides are mediated by acidic residues in the 55–64 region of the beta-subunit. A study with calmodulin as phosphorylatable substrate. *Biochemistry* **33** 4336–4342 (1994). <https://doi.org/10.1021/bi00180a030>
- 61 Chantalat, L. *et al.* Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *EMBO J* **18**, 2930–2940 (1999). <https://doi.org/10.1093/emboj/18.11.2930>
- 62 Canton, D. A. *et al.* Assembly of protein kinase CK2: investigation of complex formation between catalytic and regulatory subunits using a zinc-finger-deficient mutant of CK2beta. *Biochem J* **358**, 87–94 (2001). <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3580087>
- 63 Lieberman, S. L. & Ruderman, J. V. CK2 beta, which inhibits Mos function, binds to a discrete domain in the N-terminus of Mos. *Dev Biol* **268**, 271–279 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.12.009>
- 64 Guerra, B., *et al.* Modulation of human checkpoint kinase Chk1 by the regulatory beta-subunit of protein kinase CK2. *Oncogene* **22** 4933–42 (2003). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206721>
- 65 Kusk, M. *et al.* Interactions of protein kinase CK2beta subunit within the holoenzyme and with other proteins. *Mol Cell Biochem* **191**, 51–58 (1999).
- 66 Hagemann, C. *et al.* The regulatory subunit of protein kinase CK2 is a specific A-Raf activator. *FEBS Lett* **403**, 200–202 (1997).

- 67 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 β . *Int J Biol Sci* **1**, 67–79 (2005). doi:10.7150/ijbs.1.67
- 68 Laudet, B. *et al.* Structure-based design of small peptide inhibitors of protein kinase CK2 subunit interaction. *Biochem J* **408**, 363–373 (2007).
<https://doi.org/10.1042/bj20070825>
- 69 Lolli, G. *et al.* Structural determinants of protein kinase CK2 regulation by autoinhibitory polymerization. *ACS Chem Biol* **7**, 1158–1163 (2012).
<https://doi.org/10.1021/cb300054n>
- 70 Martel, V. *et al.* 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).
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04648.x>
- 71 Raaf, J. *et al.* Interaction between CK2 α and CK2 β , the Subunits of Protein Kinase CK2: Thermodynamic Contributions of Key Residues on the CK2 α Surface. *Biochemistry* **50** 512–522 (2011). <https://doi.org/10.1021/bi1013563>
- 72 Pietsch, M. *et al.* Unexpected CK2beta-antagonistic functionality of bisubstrate inhibitors targeting protein kinase CK2. *Bioorg Chem* **96**, 103608 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103608>
- 73 Valero, E. *et al.* Quaternary structure of casein kinase 2. Characterization of multiple oligomeric states and relation with its catalytic activity. *J Biol Chem* **270** 8345–8352 (1995). <https://doi.org/10.1074/jbc.270.14.8345>
- 74 Glover, C. V. A filamentous form of Drosophila casein kinase II. *J Biol Chem* **261**, 14349–14354 (1986).
- 75 Seetoh, W. G. *et al.* Mass Spectrometry Reveals Protein Kinase CK2 High-Order Oligomerization via the Circular and Linear Assembly. *ACS Chem Biol* **11**, 1511–1517 (2016). <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00064>
- 76 Schnitzler, A. *et al.* The protein kinase CK2(Andante) holoenzyme structure supports proposed models of autoregulation and trans-autophosphorylation. *J Mol Biol* **426** 1871–1882 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.02.018>
- 77 Pagano, M. A. *et al.* Autophosphorylation at the regulatory beta subunit reflects the supramolecular organization of protein kinase CK2. *Mol Cell Biochem* **274**, 23–29 (2005). <https://doi.org/10.1007/s11010-005-3116-y>
- 78 Filhol, O. *et al.* Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual subunits. *Mol Cell Biol* **23** 975–987 (2003).
<https://doi.org/10.1128/mcb.23.3.975-987.2003>
- 79 Stigare, J. *et al.* A majority of casein kinase II alpha subunit is tightly bound to intranuclear components but not to the beta subunit. *Mol Cell Biochem* **129**, 77–85 (1993). <https://doi.org/10.1007/bf00926578>
- 80 Theis-Febvre, N. *et al.* Highlighting protein kinase CK2 movement in living cells. *Mol Cell Biochem* **274**, 15–22 (2005). <https://doi.org/10.1007/s11010-005-3115-z>
- 81 Marin, O. *et al.* Unique features of HIV-1 Rev protein phosphorylation by protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett* **481**, 63–67 (2000).
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01971-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01971-2)

- 82 Llorens, F. *et al.* Eukaryotic translation–initiation factor eIF2 β binds to protein kinase CK2: effects on CK2 α activity. *Biochem J* **375**, 623–631 (2003).
<https://doi.org/10.1042/bj20030915>
- 83 Pinna, L. A. Protein kinase CK2: a challenge to canons. *J Cell Sci* **115**, 3873–3878 (2002). <https://doi.org/10.1242/jcs.00074>
- 84 Rodríguez, F. *et al.* Protein kinase casein kinase 2 holoenzyme produced ectopically in human cells can be exported to the external side of the cellular membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4718–4723 (2005).
<https://doi.org/10.1073/pnas.0501074102>
- 85 Rodríguez, F. A. *et al.* Protein kinase CK2 as an ectokinase: the role of the regulatory CK2beta subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5693–5698 (2008).
<https://doi.org/10.1073/pnas.0802065105>
- 86 Hübner, G. M. *et al.* Evidence for aggregation of protein kinase CK2 in the cell: a novel strategy for studying CK2 holoenzyme interaction by BRET². *Mol Cell Biochem* **397**, 285–293 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2196-y>
- 87 Götz, C. & Montenarh, M. Protein kinase CK2 in development and differentiation. *Biomed Rep* **6**, 127–133 (2017). <https://doi.org/10.3892/br.2016.829>
- 88 Lou, D. Y. *et al.* The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development. *Mol Cell Biol* **28**, 131–139 (2008).
<https://doi.org/10.1128/mcb.01119-07>
- 89 Dominguez, I. *et al.* CK2 α is essential for embryonic morphogenesis. *Mol Cell Biochem* **356**, 209–216 (2011). <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0961-8>
- 90 Blond, O. *et al.* Knocking out the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice: gene dosage effects in ES cells and embryos. *Mol Cell Biochem* **274**, 31–37 (2005). <https://doi.org/10.1007/s11010-005-3117-x>
- 91 Buchou, T. *et al.* Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell–autonomous defect and early embryonic lethality. *Mol Cell Biol* **23**, 908–915 (2003). <https://doi.org/10.1128/MCB.23.3.908-915.2003>
- 92 Escalier, D. *et al.* Spermatogenesis of mice lacking CK2alpha': failure of germ cell survival and characteristic modifications of the spermatid nucleus. *Mol Reprod Dev* **66**, 190–201 (2003). <https://doi.org/10.1002/mrd.10346>
- 93 Sanz–Clemente, A. *et al.* Casein Kinase 2 Regulates the NR2 Subunit Composition of Synaptic NMDA Receptors. *Neuron* **67**, 984–996 (2010).
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.011>
- 94 Huillard, E. *et al.* Disruption of CK2beta in embryonic neural stem cells compromises proliferation and oligodendrogenesis in the mouse telencephalon. *Mol Cell Biol* **30**, 2737–2749 (2010). <https://doi.org/10.1128/MCB.01566-09>
- 95 Díaz–Nido, J. *et al.* Regulation of protein kinase CK2 isoform expression during rat brain development. *Cell Mol Biol Res* **40**, 581–585 (1994).
- 96 Bender, M. *et al.* Impact of protein kinase CK2 inhibitors on proliferation and differentiation of neural stem cells. *Heliyon* **3**, e00318 (2017).
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00318>
- 97 Schwind, L. *et al.* Protein kinase CK2 is necessary for the adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1853**, 2207–2216 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.05.023>

- 98 Wilhelm, N. *et al.* Protein kinase CK2 is implicated in early steps of the differentiation of pre-adipocytes into adipocytes. *Mol Cell Biochem* **365**, 37–45 (2012). <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1241-y>
- 99 Dietz, K. N. *et al.* Phosphorylation of serine 205 by the protein kinase CK2 persists on Pax3–FOXO1, but not Pax3, throughout early myogenic differentiation. *Biochemistry* **48**, 11786–11795 (2009). <https://doi.org/10.1021/bi9012947>
- 100 Bragdon, B. *et al.* Casein kinase 2 regulates in vivo bone formation through its interaction with bone morphogenetic protein receptor type Ia. *Bone* **49**, 944–954 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.06.037>
- 101 Ulges, A. *et al.* Protein kinase CK2 governs the molecular decision between encephalitogenic TH17 cell and Treg cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 10145–10150 (2016). <https://doi.org/10.1073/pnas.1523869113>
- 102 Wei, H. *et al.* Protein Kinase CK2 Regulates B Cell Development and Differentiation. *J Immunol* **207**, 799–808 (2021). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100059>
- 103 Keller, D. M. *et al.* A DNA Damage-Induced p53 Serine 392 Kinase Complex Contains CK2, hSpt16, and SSRP1. *Molecular Cell* **7**, 283–292 (2001). [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00176-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00176-9)
- 104 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). <https://doi.org/10.1074/jbc.M209820200>
- 105 Williams, A. B. & Schumacher, B. p53 in the DNA–Damage–Repair Process. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6** (2016). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026070>
- 106 Kreutzer, J. & Guerra, B. The regulatory beta-subunit of protein kinase CK2 accelerates the degradation of CDC25A phosphatase through the checkpoint kinase Chk1. *Int J Oncol* **31**, 1251–1259 (2007). <https://doi.org/10.3892/ijo.31.5.1251>
- 107 Ahmed, K. *et al.* Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol* **12**, 226–230 (2002). [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(02\)02279-1](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(02)02279-1)
- 108 Hessenauer, A *et al.* CK2 inhibition induces apoptosis via the ER stress response. *Cell Signal* **23**, 145–151 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.08.014>
- 109 Ahmad, K. A. *et al.* Protein kinase CK2—a key suppressor of apoptosis. *Adv Enzyme Regul* **48**, 179–187 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2008.04.002>
- 110 Park, J. W. *et al.* CK2 downregulation induces senescence-associated heterochromatic foci formation through activating SUV39h1 and inactivating G9a. *Biochem Biophys Res Commun* **505**, 67–73 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.099>
- 111 Park, J. W. & Bae, Y. S. Dephosphorylation of p53 Ser 392 Enhances Trimethylation of Histone H3 Lys 9 via SUV39h1 Stabilization in CK2 Downregulation-Mediated Senescence. *Mol Cells* **42**, 773–782 (2019). <https://doi.org/10.14348/molcells.2019.0018>
- 112 Montenarh, M. Protein kinase CK2 and angiogenesis. *Adv Clin Exp Med* **23**, 153–158 (2014). <https://doi.org/10.17219/acem/37040>
- 113 Montenarh, M. Protein kinase CK2 in DNA damage and repair. *Transl Cancer Res* **5**, 49–63 (2016). <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2016.01.09>

- 114 Al Quobaili, F. & Montenarh, M. CK2 and the regulation of the carbohydrate metabolism. *Metabolism* **61**, 1512–1517 (2012).
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.07.011>
- 115 Montenarh, M. & Götz, C. Protein kinase CK2 and ion channels (Review). *Biomed Rep* **13** (2020). <https://doi.org/10.3892/br.2020.1362>
- 116 Tsuchiya, Y. *et al.* Involvement of the Protein Kinase CK2 in the Regulation of Mammalian Circadian Rhythms. *Sci Signal* **2**, ra26–ra26 (2009).
<https://doi.org/10.1126/scisignal.2000305>
- 117 Stolarczyk, E. I. *et al.* Casein kinase 2 α regulates multidrug resistance-associated protein 1 function via phosphorylation of Thr249. *Mol Pharmacol* **82**, 488–499 (2012). <https://doi.org/10.1124/mol.112.078295>
- 118 Romieu-Mourez, R. *et al.* Roles of IKK kinases and protein kinase CK2 in activation of nuclear factor- κ B in breast cancer. *Cancer Res* **61**, 3810–3818 (2001).
- 119 Romieu-Mourez, R. *et al.* Protein kinase CK2 promotes aberrant activation of nuclear factor- κ B, transformed phenotype, and survival of breast cancer cells. *Cancer Res* **62**, 6770–6778 (2002).
- 120 Zhang, L. *et al.* Conserved Eukaryotic Kinase CK2 Chaperone Intrinsically Disordered Protein Interactions. *Appl Environ Microbiol* **86** e02191–19 (2020).
<https://doi.org/10.1128/AEM.02191-19>
- 121 Montenarh, M. & Götz, C. Ecto-protein kinase CK2, the neglected form of CK2. *Biomed Rep* **8**, 307–313 (2018). <https://doi.org/10.3892/br.2018.1069>
- 122 Donella-Deana, A. *et al.* Autocatalytic tyrosine-phosphorylation of protein kinase CK2 α and α' subunits: implication of Tyr182. *Biochem J* **357**, 563–567 (2001).
<https://doi.org/10.1042/bj3570563>
- 123 Boldyreff, B. *et al.* Ser2 is the autophosphorylation site in the β subunit from bicistronically expressed human casein kinase-2 and from native rat liver casein kinase-2 β . *Eur J Biochem* **218**, 515–521 (1993).
[https://doi.org:https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18404.x](https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18404.x)
- 124 Yoon, S. H. *et al.* Over-expression of phospholipase D isozymes down-regulates protein kinase CKII activity via proteasome-dependent CKII β degradation in NIH3T3 cells. *Mol Cells* **27**, 299–305 (2009). <https://doi.org/10.1007/s10059-009-0038-7>
- 125 Nguyen, L. X. T. & Mitchell, B. S. Akt activation enhances ribosomal RNA synthesis through casein kinase II and TIF-IA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 20681–20686 (2013). <https://doi.org/10.1073/pnas.1313097110>
- 126 Poletto, G. *et al.* The regulatory beta subunit of protein kinase CK2 contributes to the recognition of the substrate consensus sequence. A study with an eIF2 beta-derived peptide. *Biochemistry* **47**, 8317–8325 (2008). <https://doi.org/10.1021/bi800216d>
- 127 Lolli, G. *et al.* Characterization of the oligomeric states of the CK2 α 2 β 2 holoenzyme in solution. *Biochem J* **474**, 2405–2416 (2017).
<https://doi.org/10.1042/BCJ20170189>
- 128 Bonnet, H. *et al.* Fibroblast Growth Factor-2 Binds to the Regulatory β Subunit of CK2 and Directly Stimulates CK2 Activity toward Nucleolin. *J Biol Chem* **271**, 24781–24787 (1996). [https://doi.org:https://doi.org/10.1074/jbc.271.40.24781](https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.271.40.24781)

- 129 Messenger, M. M. *et al.* Interactions between Protein Kinase CK2 and Pin1: EVIDENCE FOR PHOSPHORYLATION-DEPENDENT INTERACTIONS. *J Biol Chem* **277**, 23054–23064 (2002). <https://doi.org/10.1074/jbc.M200111200>
- 130 Leroy, D. *et al.* Chemical Features of the Protein Kinase CK2 Polyamine Binding Site. *Biochemistry* **36**, 1242–1250 (1997). <https://doi.org/10.1021/bi961949u>
- 131 Top, D. *et al.* GSK-3 and CK2 Kinases Converge on Timeless to Regulate the Master Clock. *Cell Rep* **16**, 357–367 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.005>
- 132 Guerra, B. & Issinger, O. G. Protein kinase CK2 in human diseases. *Curr Med Chem* **15**, 1870–1886 (2008). <https://doi.org/10.2174/092986708785132933>
- 133 Okur, V. *et al.* De novo mutations in CSNK2A1 are associated with neurodevelopmental abnormalities and dysmorphic features. *Hum Genet* **135**, 699–705 (2016). <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1661-y>
- 134 Poirier, K. *et al.* CSNK2B splice site mutations in patients cause intellectual disability with or without myoclonic epilepsy. *Hum Mutat* **38**, 932–941 (2017). <https://doi.org/10.1002/humu.23270>
- 135 Wu, R. *et al.* Identification of novel CSNK2A1 variants and the genotype–phenotype relationship in patients with Okur–Chung neurodevelopmental syndrome: a case report and systematic literature review. *J Int Med Res* **49** (2021). <https://doi.org/10.1177/03000605211017063>
- 136 Dominguez, I. *et al.* Okur–Chung neurodevelopmental syndrome–linked CK2 α variants have reduced kinase activity. *Hum Genet* **140**, 1077–1096 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00439-021-02280-5>
- 137 Nakashima, M. *et al.* Identification of de novo CSNK2A1 and CSNK2B variants in cases of global developmental delay with seizures. *J Hum Genet* **64**, 313–322 (2019). <https://doi.org/10.1038/s10038-018-0559-z>
- 138 Li, J. *et al.* Germline *de novo* variants in *CSNK2B* in Chinese patients with epilepsy. *Sci Rep* **9**, 17909 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53484-9>
- 139 Ernst, M. E. *et al.* CSNK2B: A broad spectrum of neurodevelopmental disability and epilepsy severity. *Epilepsia* **62**, e103–e109 (2021). <https://doi.org/10.1111/epi.16931>
- 140 Ishii, A. *et al.* Casein kinase 2 is the major enzyme in brain that phosphorylates Ser129 of human alpha-synuclein: Implication for alpha-synucleinopathies. *FEBS Lett* **581**, 4711–4717 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.08.067>
- 141 Lee, G. *et al.* Casein kinase II-mediated phosphorylation regulates alpha-synuclein/synphilin-1 interaction and inclusion body formation. *J Biol Chem* **279**, 6834–6839 (2004). <https://doi.org/10.1074/jbc.M312760200>
- 142 Wu, W. *et al.* S-Nitrosylation of G protein-coupled receptor kinase 6 and Casein kinase 2 alpha modulates their kinase activity toward alpha-synuclein phosphorylation in an animal model of Parkinson's disease. *PLoS One* **15**, e0232019 (2020). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232019>
- 143 Okochi, M. *et al.* Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein. *J Biol Chem* **275**, 390–397 (2000). <https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.390>

- 144 Zamponi, E. & Pigino, G. F. Protein Misfolding, Signaling Abnormalities and Altered Fast Axonal Transport: Implications for Alzheimer and Prion Diseases. *Front Cell Neurosci* **13** (2019). <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00350>
- 145 Pigino, G. *et al.* Disruption of fast axonal transport is a pathogenic mechanism for intraneuronal amyloid beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 5907–5912 (2009). <https://doi.org/10.1073/pnas.0901229106>
- 146 Prabhakar A. T. *et al.* CK2 Phosphorylation of Human Papillomavirus 16 E2 on Serine 23 Promotes Interaction with TopBP1 and Is Critical for E2 Interaction with Mitotic Chromatin and the Viral Life Cycle. *mBio* **12**, e01163–01121 <https://doi.org/10.1128/mBio.01163-21>
- 147 Conner, J. The unique N terminus of herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase large subunit is phosphorylated by casein kinase 2, which may have a homologue in Escherichia coli. *J Gen Virol* **80**, 1471–1476 (1999). <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-6-1471>
- 148 Dal Pero, F. *et al.* Heterogeneity of CK2 phosphorylation sites in the NS5A protein of different hepatitis C virus genotypes. *J Hepatol* **47**, 768–776 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.07.020>
- 149 Bouhaddou, M. *et al.* The Global Phosphorylation Landscape of SARS-CoV-2 Infection. *Cell* **182**, 685–712.e619 (2020). [https://doi.org:https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.034](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.034)
- 150 Ruzzene, M. & Pinna, L. A. Addiction to protein kinase CK2: A common denominator of diverse cancer cells? *Biochim Biophys Acta* **1804**, 499–504 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.07.018>
- 151 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- 152 Borgo C. & Ruzzene M. Role of protein kinase CK2 in antitumor drug resistance. *J Exp Clin Cancer Res* **38**, 287 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1292-y>
- 153 Münstermann, U. *et al.* Casein kinase II is elevated in solid human tumours and rapidly proliferating non-neoplastic tissue. *Eur J Biochem* **189**, 251–257 (1990). <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15484.x>
- 154 Daya-Makin, M. *et al.* Activation of a tumor-associated protein kinase (p40TAK) and casein kinase 2 in human squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res* **54**, 2262–2268 (1994).
- 155 Ahmed, K. Significance of the casein kinase system in cell growth and proliferation with emphasis on studies of the androgenic regulation of the prostate. *Cell Mol Biol Res* **40**, 1–11 (1994).
- 156 Gapany, M. *et al.* Association of elevated protein kinase CK2 activity with aggressive behavior of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Mol Med* **1**, 659–666 (1995).
- 157 Gray G. *et al.* Therapeutic CK2 inhibition attenuates diverse prosurvival signaling cascades and decreases cell viability in human breast cancer cells. *Oncotarget* **5**, 6484–6496 (2014). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2248>
- 158 Seldin, D. C. & Leder, P. Casein kinase II alpha transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle. *Science* **267**, 894–897 (1995).

- 159 Wirkner, U. *et al.* Human casein kinase II subunit alpha: sequence of a processed (pseudo)gene and its localization on chromosome 11. *Biochim Biophys Acta* **1131**, 220–222 (1992).
- 160 Hung, M.-S. *et al.* Functional polymorphism of the CK2alpha intronless gene plays oncogenic roles in lung cancer. *PLoS one* **5** (2010).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011418>
- 161 Lin, K. Y. *et al.* Overexpression of nuclear protein kinase CK2 α catalytic subunit (CK2 α) as a poor prognosticator in human colorectal cancer. *PLoS One* **6**, e17193 (2011). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017193>
- 162 Williams, M. D. *et al.* Protein Kinase CK2 Expression Predicts Relapse Survival in ER α Dependent Breast Cancer, and Modulates ER α Expression in Vitro. *Int J Environ Res Public Health* **13**, ijerph13010036 (2015). <https://doi.org/10.3390/ijerph13010036>
- 163 Martins, L. R. *et al.* Targeting CK2 overexpression and hyperactivation as a novel therapeutic tool in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **116**, 2724–2731 (2010).
<https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-277947>
- 164 Martins, L. R. *et al.* Targeting chronic lymphocytic leukemia using CIGB–300, a clinical-stage CK2-specific cell-permeable peptide inhibitor. *Oncotarget* **5**, 258–263 (2014). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1513>
- 165 Siddiqui-Jain, A. *et al.* CX–4945, an orally bioavailable selective inhibitor of protein kinase CK2, inhibits prosurvival and angiogenic signaling and exhibits antitumor efficacy. *Cancer Res* **70**, 10288–10298 (2010). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-10-1893>
- 166 Perea, S.E. *et al.* CIGB–300, a novel proapoptotic peptide that impairs the CK2 phosphorylation and exhibits anticancer properties both in vitro and in vivo. *Mol Cell Biochem* **316**, 163–7 (2008). <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9814-5>
- 167 Lindenblatt, D. *et al.* Design of CK2beta-Mimicking Peptides as Tools To Study the CK2alpha/CK2beta Interaction in Cancer Cells. *ChemMedChem* **14**, 833–841 (2019).
<https://doi.org/10.1002/cmdc.201800786>
- 168 Buontempo, F. *et al.* Synergistic cytotoxic effects of bortezomib and CK2 inhibitor CX–4945 in acute lymphoblastic leukemia: turning off the prosurvival ER chaperone BIP/Grp78 and turning on the pro-apoptotic NF- κ B. *Oncotarget* **7**, 1323–1340 (2016). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6361>
- 169 Marschke, R. F. *et al.* Findings from the phase I clinical trials of CX-4945, an orally available inhibitor of CK2. *J Clin Oncol* **29**, 3087–3087 (2011).
http://dx.doi.org/10.1200/jco.2011.29.15_suppl.3087
- 170 Borad, M. J. *et al.* Silmitasertib (CX–4945) in combination with gemcitabine and cisplatin as first-line treatment for patients with locally advanced or metastatic cholangiocarcinoma: A phase Ib/II study. *J Clin Oncol* **39**, 312–312 (2021).
https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.3_suppl.312
- 171 Eroglu, Z. *et al.* A phase I study of CX–4945 administered orally twice daily to patients with advanced basal cell carcinoma. *J Clin Oncol* **38**, TPS10080–TPS10080 (2020). https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.TPS10080
- 172 Perea, S. E. *et al.* CIGB–300: A peptide-based drug that impairs the Protein Kinase CK2-mediated phosphorylation. *Semin Oncol* **45**, 58–67 (2018).
<https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2018.04.006>

- 173 Pucko, E. B. & Ostrowski, R. P. Inhibiting CK2 among Promising Therapeutic Strategies for Gliomas and Several Other Neoplasms. *Pharmaceutics* **14**, 331 (2022). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020331>
- 174 D'Amore C *et al.* Role of CK2 inhibitor CX-4945 in anti-cancer combination therapy – potential clinical relevance. *Cell Oncol (Dordr)* **43**, 1003–1016 (2020). <https://doi.org/10.1007/s13402-020-00566-w>
- 175 Borgo, C. *et al.* Protein kinase CK2: a potential therapeutic target for diverse human diseases. *Signal Transduct Target Ther* **6**, 183 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00567-7>
- 176 Prudent, R. & Cochet, C. New protein kinase CK2 inhibitors: jumping out of the catalytic box. *Chem Biol* **16**, 112–120 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.01.004>
- 177 Brear, P. *et al.* Proposed Allosteric Inhibitors Bind to the ATP Site of CK2 α . *J Med Chem* **63**, 12786–12798 (2020). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01173>
- 178 Battistutta, R. *et al.* The ATP-binding site of protein kinase CK2 holds a positive electrostatic area and conserved water molecules. *Chembiochem* **8**, 1804–1809 (2007). <https://doi.org/10.1002/cbic.200700307>
- 179 Battistutta, R. *et al.* Unprecedented selectivity and structural determinants of a new class of protein kinase CK2 inhibitors in clinical trials for the treatment of cancer. *Biochemistry* **50**, 8478–8488 (2011). <https://doi.org/10.1021/bi2008382>
- 180 Yde, C.W. *et al.* 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** (2005). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.01.003>
- 181 Sarno, S. *et al.* Features and potentials of ATP-site directed CK2 inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **1754**, 263–270 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.07.043>
- 182 Pierre, F. *et al.* Discovery and SAR of 5-(3-chlorophenylamino)benzo[c][2,6]naphthyridine-8-carboxylic acid (CX-4945), the first clinical stage inhibitor of protein kinase CK2 for the treatment of cancer. *J Med Chem* **54**, 635–654 (2011). <https://doi.org/10.1021/jm101251q>
- 183 Dalle Vedove, A. *et al.* A novel class of selective CK2 inhibitors targeting its open hinge conformation. *Eur J Med Chem* **195**, 112267 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112267>
- 184 Sarno, S. *et al.* Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett* **496** (2001). [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02404-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02404-8)
- 185 Karaman, M. W. *et al.* A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* **26**, 127–132 (2008). <https://doi.org/10.1038/nbt1358>
- 186 Huang, D. *et al.* Kinase selectivity potential for inhibitors targeting the ATP binding site: a network analysis. *Bioinformatics* **26**, 198–204 (2010). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp650>
- 187 Cozza, G. *et al.* Protein kinase CK2 inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* **22**, 1081–1097 (2012). <https://doi.org/10.1517/13543776.2012.717615>
- 188 Atkinson, E. L. *et al.* Downfalls of Chemical Probes Acting at the Kinase ATP-Site: CK2 as a Case Study. *Molecules* **26** (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26071977>

- 189 Tamm, I. *et al.* Inhibition of influenza virus multiplication by N-glycosides of benzimidazoles-N. *J Exp Med* **99**, 227–250 (1954).
<https://doi.org/10.1084/jem.99.3.227>
- 190 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). [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)42674-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)42674-3)
- 191 Zandomeni, R. *et al.* Casein kinase type II is involved in the inhibition by 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole of specific RNA polymerase II transcription. *J Biol Chem* **261**, 3414–3419 (1986).
- 192 Meggio, F. *et al.* Ribofuranosyl-benzimidazole derivatives as inhibitors of casein kinase-2 and casein kinase-1. *Eur J Biochem* **187**, 89–94 (1990).
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15280.x>
- 193 Raaf, J. *et al.* The CK2 alpha/CK2 beta interface of human protein kinase CK2 harbors a binding pocket for small molecules. *Chem Biol* **15**, 111–117 (2008).
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.12.012>
- 194 Szyszka, R. *et al.* Halogenated benzimidazoles and benzotriazoles as selective inhibitors of protein kinases CK I and CK II from *Saccharomyces cerevisiae* and other sources. *Biochem Biophys Res Commun* **208**, 418–424 (1995).
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1354>
- 195 Pagano, M. A. *et al.* The selectivity of inhibitors of protein kinase CK2: an update. *Biochem J* **415**, 353–365 (2008). <https://doi.org/10.1042/bj20080309>
- 196 Yim, H. *et al.* Emodin, an anthraquinone derivative isolated from the rhizomes of *Rheum palmatum*, selectively inhibits the activity of casein kinase II as a competitive inhibitor. *Planta medica* **65**, 9–13 (1999). <https://doi.org/10.1055/s-1999-13953>
- 197 Semwal, R. B. *et al.* Emodin – A natural anthraquinone derivative with diverse pharmacological activities. *Phytochemistry* **190**, 112854 (2021).
[https://doi.org:https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112854](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112854)
- 198 Cozza, G. *et al.* Quinalizarin as a potent, selective and cell-permeable inhibitor of protein kinase CK2. *Biochem J* **421**, 387–395 (2009).
<https://doi.org/10.1042/bj20090069>
- 199 Nie, Z. *et al.* Structure-based design, synthesis, and study of pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine derivatives as potent inhibitors of protein kinase CK2. *Bioorg Med Chem Lett* **17**, 4191–4195 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.05.041>
- 200 Nie, Z. *et al.* Structure-based design and synthesis of novel macrocyclic pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine compounds as potent inhibitors of protein kinase CK2 and their anticancer activities. *Bioorg Med Chem Lett* **18**, 619–623 (2008).
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.11.074>
- 201 Dowling, J. E. *et al.* Structure and Property Based Design of Pyrazolo[1,5-a]pyrimidine Inhibitors of CK2 Kinase with Activity in Vivo. *ACS Med Chem Lett* **4**, 800–805 (2013).
<https://doi.org/10.1021/ml400197u>
- 202 Wells, C. I. *et al.* Development of a potent and selective chemical probe for the pleiotropic kinase CK2. *Cell Chem Biol* **28**, 546–558.e510 (2021).
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.12.013>

- 203 Dowling, J. E. *et al.* Potent and Selective Inhibitors of CK2 Kinase Identified through Structure-Guided Hybridization. *ACS Med Chem Lett* **3**, 278–283 (2012).
<https://doi.org/10.1021/ml200257n>
- 204 Krämer, A. *et al.* Optimization of pyrazolo[1,5-a]pyrimidines lead to the identification of a highly selective casein kinase 2 inhibitor. *Eur J Med Chem* **208**, 112770 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112770>
- 205 Licciardello, M. P. & Workman, P. A New Chemical Probe Challenges the Broad Cancer Essentiality of CK2. *Trends Pharmacol Sci* **42**, 313–315 (2021).
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.02.002>
- 206 Salvi, M. *et al.* Targeting CK2 in cancer: a valuable strategy or a waste of time? *Cell Death Discov* **7**, 325 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00717-4>
- 207 Siddiqui-Jain, A. *et al.* CK2 inhibitor CX-4945 suppresses DNA repair response triggered by DNA-targeted anticancer drugs and augments efficacy: mechanistic rationale for drug combination therapy. *Mol Cancer Ther* **11**, 994–1005 (2012).
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-11-0613>
- 208 Kim, H. *et al.* Identification of a novel function of CX-4945 as a splicing regulator. *PLoS One* **9**, e94978 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094978>
- 209 Kim, H. *et al.* A chemical with proven clinical safety rescues Down-syndrome-related phenotypes in through DYRK1A inhibition. *Dis Model Mech* **9**, 839–848 (2016).
<https://doi.org/10.1242/dmm.025668>
- 210 Graczyk, P. P. Gini coefficient: a new way to express selectivity of kinase inhibitors against a family of kinases. *J Med Chem* **50**, 5773–5779 (2007).
<https://doi.org/10.1021/jm070562u>
- 211 Kufareva, I. *et al.* Discovery of holoenzyme-disrupting chemicals as substrate-selective CK2 inhibitors. *Sci Rep* **9**, 15893 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52141-5>
- 212 Iegre, J. *et al.* Efficient development of stable and highly functionalised peptides targeting the CK2 α /CK2 β protein-protein interaction. *Chem Sci* **10**, 5056–5063 (2019). <https://doi.org/10.1039/c9sc00798a>
- 213 Hochscherf, J. *et al.* Development of a high-throughput screening-compatible assay to identify inhibitors of the CK2 α /CK2 β interaction. *Anal Biochem* **468**, 4–14 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.09.003>
- 214 Bestgen, B. *et al.* In Search of Small Molecule Inhibitors Targeting the Flexible CK2 Subunit Interface. *Pharmaceuticals* **10**, 16 (2017).
<https://doi.org/10.3390/ph10010016>
- 215 Atkinson, E. L. *et al.* Development of small cyclic peptides targeting the CK2 α / β interface. *Chem Commun (Camb)* **58**, 4791–4794 (2022).
<https://doi.org/10.1039/d2cc00707j>
- 216 Laudet, B. *et al.* Identification of chemical inhibitors of protein-kinase CK2 subunit interaction. *Mol Cell Biochem* **316**, 63–69 (2008). <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9821-6>
- 217 Kröger, L. *et al.* Synthesis and SAR of Tetracyclic Inhibitors of Protein Kinase CK2 Derived from Furocarbazole W16. *ChemMedChem* **15**, 871–881 (2020).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cmdc.202000040>

- 218 Steinkrüger, M. *Beeinflussung der heterotetrameren Struktur der anti-apoptotischen Proteinkinase CK2 als potentielle pharmakologische Strategie* (2016).
- 219 Brear, P. *et al.* Novel non-ATP competitive small molecules targeting the CK2 alpha/beta interface. *Bioorg Med Chem* **26**, 3016–3020 (2018).
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.05.011>
- 220 Hathaway, G. M. *et al.* Inhibition of casein kinase II by heparin. *J Biol Chem* **255**, 8038–8041 (1980).
- 221 Schnitzler, A. & Niefind, K. Structural basis for the design of bisubstrate inhibitors of protein kinase CK2 provided by complex structures with the substrate-competitive inhibitor heparin. *Eur J Med Chem* **214** (2021).
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113223>
- 222 Meggio, F. *et al.* Polyglutamyl peptides: a new class of inhibitors of type-2 casein kinases. *FEBS Lett* **162**, 235–238 (1983). [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)80762-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80762-5)
- 223 Perea, S. E. *et al.* Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide that impairs the phosphorylation by the protein kinase 2 (casein kinase 2). *Cancer Res* **64**, 7127–7129 (2004). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-2086>
- 224 Perea, S. E. *et al.* CIGB-300, a synthetic peptide-based drug that targets the CK2 phosphoacceptor domain. Translational and clinical research. *Mol Cell Biochem* **356**, 45–50 (2011). <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0950-y>
- 225 Perera, Y. *et al.* Systemic administration of a peptide that impairs the protein kinase (CK2) phosphorylation reduces solid tumor growth in mice. *Int J Cancer* **122**, 57–62 (2008). <https://doi.org/10.1002/ijc.23013>
- 226 Perera, Y. *et al.* Anticancer peptide CIGB-300 binds to nucleophosmin/B23, impairs its CK2-mediated phosphorylation, and leads to apoptosis through its nucleolar disassembly activity. *Mol Cancer Ther* **8**, 1189–96 (2009).
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-1056>
- 227 Perera, Y. *et al.* Synergistic interactions of the anti-casein kinase 2 CIGB-300 peptide and chemotherapeutic agents in lung and cervical preclinical cancer models. *Mol Clin Oncol* **2**, 935–944 (2014). <https://doi.org/10.3892/mco.2014.338>
- 228 Perera, Y. *et al.* CIGB-300 anticancer peptide regulates the protein kinase CK2-dependent phosphoproteome. *Mol Cell Biochem* **470**, 63–75 (2020).
<https://doi.org/10.1007/s11010-020-03747-1>
- 229 Batista-Albuérne, N. *et al.* Phase I Study of CIGB-300 Administered Intravenously in Patients with Relapsed/Refractory Solid Tumors. *J Med Oncol* **1** (2018).
- 230 Solares, A. M. *et al.* Safety and preliminary efficacy data of a novel casein kinase 2 (CK2) peptide inhibitor administered intralesionally at four dose levels in patients with cervical malignancies. *BMC cancer* **9**, 146 (2009).
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-146>
- 231 Rosales, M. *et al.* Targeting of Protein Kinase CK2 in Acute Myeloid Leukemia Cells Using the Clinical-Grade Synthetic-Peptide CIGB-300. *Biomedicines* **9** (2021).
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9070766>
- 232 Cruz, L. R. *et al.* Treatment with an Anti-CK2 Synthetic Peptide Improves Clinical Response in COVID-19 Patients with Pneumonia. A Randomized and Controlled

- Clinical Trial. *ACS Pharmacol Transl Sci* **4**, 206–212 (2021).
<https://doi.org/10.1021/acsptsci.0c00175>
- 233 Chen, X. *et al.* Recent Advances in the Discovery of CK2 Allosteric Inhibitors: From Traditional Screening to Structure-Based Design. *Molecules* **25**, 870 (2020).
<https://doi.org/10.3390/molecules25040870>
- 234 De Fusco, C. *et al.* A fragment-based approach leading to the discovery of a novel binding site and the selective CK2 inhibitor CAM4066. *Bioorg Med Chem* **25**, 3471–3482 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.04.037>
- 235 Brear, P. *et al.* Specific inhibition of CK2 α from an anchor outside the active site. *Chem Sci* **7**, 6839–6845 (2016). <https://doi.org/10.1039/c6sc02335e>
- 236 Iegre, J. *et al.* Second-generation CK2 α inhibitors targeting the α D pocket. *Chem Sci* **9**, 3041–3049 (2018). <https://doi.org/10.1039/C7SC05122K>
- 237 Li, C. *et al.* Identification and Biological Evaluation of CK2 Allosteric Fragments through Structure-Based Virtual Screening. *Molecules* **25** (2020).
<https://doi.org/10.3390/molecules25010237>
- 238 Lindenblatt, D. *et al.* Molecular Plasticity of Crystalline CK2 α' Leads to KN2, a Bivalent Inhibitor of Protein Kinase CK2 with Extraordinary Selectivity. *J Med Chem* **65**, 1302–1312 (2022). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00063>
- 239 Bestgen, B. *et al.* 2-Aminothiazole Derivatives as Selective Allosteric Modulators of the Protein Kinase CK2. 1. Identification of an Allosteric Binding Site. *J Med Chem* **62**, 1803–1816 (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01766>
- 240 Lindenblatt D. *et al.* Structural and Mechanistic Basis of the Inhibitory Potency of Selected 2-Aminothiazole Compounds on Protein Kinase CK2. *J Med Chem* **63** (2020).
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00587>
- 241 Enkvist, E. *et al.* A subnanomolar fluorescent probe for protein kinase CK2 interaction studies. *Org Biomol Chem* **10**, 8645–8653 (2012).
<https://doi.org/10.1039/c2ob26022k>
- 242 Vahter, J. *et al.* Oligo-aspartic acid conjugates with benzo[c][2,6]naphthyridine-8-carboxylic acid scaffold as picomolar inhibitors of CK2. *Bioorg Med Chem* **25**, 2277–2284 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.055>
- 243 Cozza, G. *et al.* Design, validation and efficacy of bisubstrate inhibitors specifically affecting ecto-CK2 kinase activity. *Biochem J* **471**, 415–430 (2015).
<https://doi.org/10.1042/bj20141127>
- 244 Gul, S. & Hadian, K. Protein-protein interaction modulator drug discovery: past efforts and future opportunities using a rich source of low- and high-throughput screening assays. *Expert Opin Drug Discov* **9**, 1393–1404 (2014).
<https://doi.org/10.1517/17460441.2014.954544>
- 245 Praefcke, G. J. K. & Herrmann, C. Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) zur Charakterisierung biomolekularer Wechselwirkungen. *BIOspektrum* **1**, 44–47 (2005).
- 246 Freire, E. *et al.* Isothermal titration calorimetry. *Anal Chem* **62**, 950A–959A (1990).
<https://doi.org/10.1021/ac00217a002>
- 247 Leavitt, S. & Freire, E. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 560–566 (2001).
[https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(00\)00248-7](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(00)00248-7)

- 248 Raaf, J. *et al.* First structure of protein kinase CK2 catalytic subunit with an effective CK2beta-competitive ligand. *ACS Chem Biol* **8**, 901–907 (2013).
<https://doi.org/10.1021/cb3007133>
- 249 Uri, A. *et al.* Bisubstrate fluorescent probes and biosensors in binding assays for HTS of protein kinase inhibitors. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* **1804**, 541–546 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.019>
- 250 Drescher, D. G. *et al.* Analysis of Protein Interactions by Surface Plasmon Resonance. *Adv Protein chem Struct Biol* **110**, 1–30 (2018).
<https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2017.07.003>
- 251 Benítez, M. J. *et al.* A surface-plasmon-resonance analysis of polylysine interactions with a peptide substrate of protein kinase CK2 and with the enzyme. *Biochem J* **324**, 987–994 (1997). <https://doi.org/10.1042/bj3240987>
- 252 Nguyen, H. H. *et al.* Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications. *Sensors* **15**, 10481–10510 (2015).
<https://doi.org/10.3390/s150510481>
- 253 Wegner, G. J. *et al.* Real-time surface plasmon resonance imaging measurements for the multiplexed determination of protein adsorption/desorption kinetics and surface enzymatic reactions on peptide microarrays. *Anal Chem* **76**, 5677–5684 (2004).
<https://doi.org/10.1021/ac0494275>
- 254 Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3. Aufl, (Springer, 2006).
- 255 Jameson, D. M. & Ross, J. A. Fluorescence polarization/anisotropy in diagnostics and imaging. *Chem Rev* **110**, 2685–2708 (2010). <https://doi.org/10.1021/cr900267p>
- 256 Ludwig, C. *Diffusion zwischen ungleich erwärmten Orten gleich zusammengesetzter Lösung*. In *Sitzungsberichte der mathematisch-naturwissenschaftlichen Classe der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften Wien* (Aus der K.K. Hof- und Staatsdruckerei, 1856).
- 257 Piazza, R. Thermophoresis: moving particles with thermal gradients. *Soft Matter* **4**, 1740–1744 (2008). <https://doi.org/10.1039/B805888C>
- 258 Iacopini, S. *et al.* The "macromolecular tourist": universal temperature dependence of thermal diffusion in aqueous colloidal suspensions. *Eur Phys J E Soft Matter* **19**, 59–67 (2006). <https://doi.org/10.1140/epje/e2006-00012-9>
- 259 Baaske, P. *et al.* Optical thermophoresis for quantifying the buffer dependence of aptamer binding. *Angew Chem Int Ed* **49**, 2238–2241 (2010).
<https://doi.org/10.1002/anie.200903998>
- 260 Duhr, S. & Braun, D. Thermophoretic Depletion Follows Boltzmann Distribution. *Phys Rev Lett* **96**, 168301 (2006). <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.96.168301>
- 261 Jerabek-Willemsen, M. *et al.* Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay Drug Dev Technol* **9**, 342–353 (2011).
<https://doi.org/10.1089/adt.2011.0380>
- 262 Wienken C. J. *et al.* Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat commun* **1** (2010). <https://doi.org/10.1038/ncomms1093>
- 263 Magnez, R. *et al.* Microscale Thermophoresis as a Tool to Study Protein Interactions and Their Implication in Human Diseases. *Int J Mol Sci* **23**, 7672 (2022).
<https://doi.org/10.3390/ijms23147672>

- 264 Jerabek-Willemsen, M. *et al.* MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *J Mol Struct* **1077**, 101–113 (2014).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.03.009>
- 265 Sedivy, A. Standard operating procedure for NanoTemper Monolith measurements. *Eur Biophys J* **50**, 381–387 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00249-021-01534-4>
- 266 *User Manual for the Monolith NT.115*. (NanoTemper Technologies GmbH, 2013).
- 267 López-Méndez, B. *et al.* Microscale Thermophoresis and additional effects measured in NanoTemper Monolith instruments. *Eur Biophys J* **50**, 653–660 (2021).
<https://doi.org/10.1007/s00249-021-01529-1>
- 268 *Ligand-Induced Fluorescent Change – Definition and Relevance | Nanopedia*,
<https://nanotempertech.com/nanopedia/ligand-induced-fluorescence-change/>
(NanoTemper Technologies GmbH, 2022).
- 269 Qi, J. *et al.* A fluorescence polarization binding assay to identify inhibitors of flavin-dependent monooxygenases. *Anal Biochem* **425**, 80–87 (2012).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.03.002>
- 270 Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* **437**, 55–75 (1948).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/andp.19484370105>
- 271 Liao, J. *et al.* Quantitative FRET (qFRET) Technology for the Determination of Protein-Protein Interaction Affinity in Solution. *Molecules* **26**, 6339 (2021).
<https://doi.org/10.3390/molecules26216339>
- 272 Song, Y. *et al.* Development of FRET assay into quantitative and high-throughput screening technology platforms for protein-protein interactions. *Ann Biomed Eng* **39**, 1224–1234 (2011). <https://doi.org/10.1007/s10439-010-0225-x>
- 273 Song, Y. *et al.* Protein interaction affinity determination by quantitative FRET technology. *Biotechnol Bioeng* **109**, 2875–2883 (2012).
<https://doi.org/10.1002/bit.24564>
- 274 Pollok, B. A. & Heim, R. Using GFP in FRET-based applications. *Trends Cell Biol* **9**, 57–60 (1999). [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(98\)01434-2](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(98)01434-2)
- 275 Nanda, J. S. & Lorsch, J. R. Labeling a protein with fluorophores using NHS ester derivitization. *Methods Enzymol* **536**, 87–94 (2014). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420070-8.00008-8>
- 276 Berezin, M. Y. & Achilefu, S. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chem Rev* **110**, 2641–2684 (2010). <https://doi.org/10.1021/cr900343z>
- 277 Berney C. & Danuser G. FRET or no FRET: a quantitative comparison. *Biophys J* **84**, 3992–4010 (2003). [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75126-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75126-1)
- 278 Youvan, D. C. *et al.* Calibration of Fluorescence Resonance Energy Transfer in Microscopy Using Genetically Engineered GFP Derivatives on Nickel Chelating Beads. *Biotechnology et alia* (1997).
- 279 Hochreiter B. *et al.* Advanced FRET normalization allows quantitative analysis of protein interactions including stoichiometries and relative affinities in living cells. *Sci Rep* **9**, 8233 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44650-0>
- 280 Kröger, L. *Synthese von Furo- und Pyrrolocarbazol-Derivaten zur Hemmung der Assoziation der Untereinheiten und der Aktivität der Proteinkinase CK2*. (2018).

- 281 Ryan, B. J. & Henehan, G. T. Avoiding Proteolysis During Protein Purification. *Methods Mol Biol* **1485**, 53–69 (2017). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_4
- 282 Kurien, B. T. & Scofield, R. H. Common artifacts and mistakes made in electrophoresis. *Methods Mol Biol* **869**, 633–640 (2012). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_58
- 283 Auld, D. S. *et al.* *Assay Interference by Aggregation*. in *Assay Guidance* (Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2017).
- 284 Feng, B. Y. *et al.* A high-throughput screen for aggregation-based inhibition in a large compound library. *J Med Chem* **50**, 2385–2390 (2007). <https://doi.org/10.1021/jm061317y>
- 285 McGovern, S. L. *et al.* A specific mechanism of nonspecific inhibition. *J Med Chem* **46**, 4265–4272 (2003). <https://doi.org/10.1021/jm030266r>
- 286 Feng, B. Y. & Shoichet, B. K. A detergent-based assay for the detection of promiscuous inhibitors. *Nature Protocols* **1**, 550–553 (2006). <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.77>
- 287 Entzian, C. & Schubert, T. Studying small molecule–aptamer interactions using MicroScale Thermophoresis (MST). *Methods* **97**, 27–34 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.08.023>
- 288 Schagger, H. *et al.* Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis and Isolation of Membrane Protein Complexes by Two-Dimensional Native Electrophoresis. *Anal Biochem* **217**, 220–230 (1994). <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1112>
- 289 Wagstaff K. M. *et al.* Quantitative analysis of protein–protein interactions by native page/fluorimaging. *J Fluoresc* **15**, 469–73 (2005). <https://doi.org/10.1007/s10895-005-2819-5>
- 290 Jarmoskaite, I. *et al.* How to measure and evaluate binding affinities. *eLife* **9**, e57264 (2020). <https://doi.org/10.7554/eLife.57264>
- 291 Cer, R. Z. *et al.* IC50-to-Ki: a web-based tool for converting IC50 to Ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. *Nucleic Acids Res* **37**, W441–W445 (2009). <https://doi.org/10.1093/nar/gkp253>
- 292 *Protokoll: NHS-Ester-Markierung von Aminobiomolekülen* (Lumiprobe GmbH, 2022) <https://de.lumiprobe.com/protocols/nhs-ester-labeling>
- 293 López-Méndez, B. *et al.* Reproducibility and accuracy of microscale thermophoresis in the NanoTemper Monolith: a multi laboratory benchmark study. *Eur Biophys J* **50**, 411–427 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00249-021-01532-6>
- 294 Lipinski, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **46**, 3–26 (2001). [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)
- 295 Tian, H. *et al.* A high throughput drug screen based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) for anticancer activity of compounds from herbal medicine. *Br J Pharmacol* **150**, 321–334 (2007). <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706988>
- 296 Motulsky & J., H. *GraphPad Prism 9 Curve Fitting Guide – Equation: [Inhibitor] vs. response -- Variable slope*, https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/curve-fitting/reg_dr_inhibit_variable_2.htm (GraphPad Software, 2022)

- 297 Motulsky, H. J. *GraphPad Prism 9 Curve Fitting Guide – Equation: Biphasic dose-response*, https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/curve-fitting/reg_biphasic_dose_response_2.htm (GraphPad Software, 2022)

8 Anhang

8.1 Erklärung zur Dissertation

DocuSign Envelope ID: 9F997C7F-F347-4BA9-B040-97468560DD48

Erklärung zur Dissertation gemäß der Promotionsordnung vom 12. März 2020

Diese Erklärung muss in der Dissertation enthalten sein.
(This version must be included in the doctoral thesis)

„Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne die Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere an Eides statt, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen und eingebundenen Artikeln und Manuskripten - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine Veröffentlichung der Dissertation vor Abschluss der Promotion nicht ohne Genehmigung des Promotionsausschusses vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Ordnung sind mir bekannt. Darüber hinaus erkläre ich hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten der Universität zu Köln gelesen und sie bei der Durchführung der Dissertation zugrundeliegenden Arbeiten und der schriftlich verfassten Dissertation beachtet habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen. Ich versichere, dass die eingereichte elektronische Fassung der eingereichten Druckfassung vollständig entspricht.“

Teilpublikationen:

Kröger, L. et al. Synthesis and SAR of Tetracyclic Inhibitors of Protein Kinase CK2 Derived from Furocarbazole W16. ChemMedChem 15, 871-881 (2020).
<https://doi.org/10.1002/cmdc.202000040>

Datum, Name und Unterschrift

20.03.2023, Miriam Lauwers

DocuSigned by:

408A16D058D444F...

8.2 Nucleotidsequenzen der exprimierten Proteine

8.2.1 CK2 β ¹⁻¹⁹³

[Fett: Startcodon, unterstrichen: Stopcodon]

ATGAGCAGCTCAGAGGAGGTGTCCTGGATTTCCTGGTTCTGTGGGCTCCGTGGCAATGAATTCTTC
TGTGAAGTGGATGAAGACTACATCCAGGACAAATTTAATCTTACTGGACTCAATGAGCAGGTCCCT
CACTACCGACAAGCTCTAGACATGATCTTGGACCTGGAGCCTGATGAAGAACTGGAAGACAACCC
CAACCAGAGTGACCTGATTGAGCAGGCAGCCGAGATGCTTTATGGATTGATCCACGCCCGCTACAT
CCTTACCAACCGTGGCATCGCCCAGATGTTGGAAAAGTACCAGCAAGGAGACTTTGGTTACTGTCC
TCGTGTGTACTGTGAGAACCAGCCAATGCTTCCCATTGGCCTTTCAGACATCCCAGGTGAAGCCAT
GGTGAAGCTCTACTGCCCCAAGTGCATGGATGTGTACACACCCAAGTCATCAAGACACCATCACAC
GGATGGCGCCTACTTCGGCACTGGTTTCCCTCACATGCTCTTCATGGTGCATCCCGAGTACCGGCC
CAAGAGACCTGCCAACCAGTTTGTGCCCAGGCTCTACGGTTTCAAGATCCATTGA

8.2.2 CK2 α ¹⁻³³⁵

[Fett: Startcodon, unterstrichen: Stopcodon]

ATGTCGGGACCCGTGCCAAGCAGGGCCAGAGTTTACACAGATGTTAATACACACAGACCTCGAGA
ATACTGGGATTACGAGTCACATGTGGTGAATGGGGAAATCAAGATGACTACCAGCTGGTTCGAAA
ATTAGGCCGAGGTAAATACAGTGAAGTATTTGAAGCCATCAACATCACAAATAATGAAAAAGTTGT
TGTTAAAATTCTCAAGCCAGTAAAAAAGAAGAAAATTAAGCGTGAAATAAAGATTTTGGAGAATTT
GAGAGGAGGTCCCAACATCATCACACTGGCAGACATTGTAAAAGACCCTGTGTCACGAACCCCCG
CCTTGGTTTTTTGAACACGTAAACAACACAGACTTCAAGCAATTGTACCAGACGTTAACAGACTATG
ATATTCGATTTTACATGTATGAGATTCTGAAGGCCCTGGATTATTGTACAGCATGGGAATTATGC
ACAGAGATGTCAAGCCCCATAATGTCATGATTGATCATGAGCACAGAAAGCTACGACTAATAGACT
GGGGTTTGGCTGAGTTTTATCATCCTGGCCAAGAATATAATGTCCGAGTTGCTTCCCGATACTTCA
AAGGTCCTGAGCTACTTGTAGACTATCAGATGTACGATTATAGTTTGGATATGTGGAGTTTGGGTT
GTATGCTGGCAAGTATGATCTTTCGGAAGGAGCCATTTTCCATGGACATGACAATTATGATCAGT
TGGTGAGGATAGCCAAGTTCTGGGGACAGAAGATTTATATGACTATATTGACAAATACAACATTG
AATTAGATCCACGTTTCAATGATATCTTGGGCAGACACTCTCGAAAGCGATGGGAACGCTTTGTCC
ACAGTGAAAATCAGCACCTTGTGAGCCCTGAGGCCTTGGATTTCTGGACAAACTGCTGCGATATG
ACCACCAGTCACGGCTTACTGCAAGAGAGGCAATGGAGCACCCCTATTTCTACACTGTTGTGAAGG
ACCAGGCTCGAATGGGTTGA

8.2.3 EGFP

Blau hinterlegt: Vektorexpressionskassette iba-pPSG-105 (inkl. Strep-II-Tag)

Grün hinterlegt: EGFP

ATGGCTAGCGCATGGAGTCATCCTCAATTCGAGAAAGGTGGAGGTTCTGGCGGTGGATCGGG
AGGTT**CAGCGTGGAGCCACCCG**CAGTTCGAAAAATCCGGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
TGTT**CACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGT**CGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCA
GCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCA

CCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTG
CTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGG
CTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGT
GAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGG
ACGGCAACATCCTGGGGCACAAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGG
CCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCA
GCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCC
CGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCA
CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAA
GTAA

8.2.4 EGFP-CK2 α^{1-335}

Blau hinterlegt: Vektorexpressionskassette iba-pPSG-105 (inkl. Strep-II-Tag)

Grün hinterlegt: EGFP

Dunkelblau hinterlegt: Linker

Gelb hinterlegt: CK2 α^{1-335}

ATGGCTAGCGCATGGAGTCATCTCAATTCGAGAAAGGTGGAGGTTCTGGCGGTGGATCGGG
AGG TTCAGCGTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAATCCGGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
TGTTACACGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCA
GCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCA
CCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCACTG
CTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCAAGG
CTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGT
GAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGG
ACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAAC TACAACAGCCACAACGTCTATATCATGG
CCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAC TTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCA
GCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGGCAGGGCCCCGTGCTGCTGCC
CGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCA
CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAA
GATAGGTGGTGATGGTGGTGGTGGTGGTGAGCTCTCGGGACCAGTGCCAAGCAGGGCCAGAG
 TTTACACAGATGTTAATACACACAGACCTCGAGAATACTGGGATTACGAGTCACATGTGGTG
 GAATGGGGGAAATCAAGATGACTACCAGCTGGTTCGAAAATTAGGCCGAGGTAAATACAGTGA
 AGTATTTGAAGCCATCAACATCACAAATAATGAAAAAGTTGTTGTTAAATTTCTCAAGCCAG
 TAAAAAAGAAGAAAATTAAGCGTGAAATAAAGATTTTGGAGAATTTGAGAGGAGGTCCCAAC
 ATCATCACACTGGCAGACATTGTA AAAAGACCTGTGTCACGAACCCCCGCCTTGGTTTTTGAA
 CACGTAAACAACACAGACTTCAAGCAATTGTACCAGACGTTAACAGACTATGATATTCGATT
 TTACATGTATGAGATTCTGAAGGCCCTGGATTATTGTCACAGCATGGGAATTATGCACAGAG
 ATGTCAAGCCCCATAATGTCATGATTGATCATGAGCACAGAAAGCTACGACTAATAGACTGG
 GGTTTGGCTGAGTTTTATCATCCTGGCCAAGAATATAATGTCCGAGTTGCTTCCCGATACTTC
 AAAGGTCCTGAGCTACTTGTAGACTATCAGATGTACGATTATAGTTTGGATATGTGGAGTTT
 GGGTTGTATGCTGGCAAGTATGATCTTTCGGAAGGAGCCATTTTTCCATGGACATGACAATT
 ATGATCAGTTGGTGAGGATAGCCAAGGTTCTGGGGACAGAAGATTTATATGACTATATTGAC
 AAATACAACATTGAATTAGATCCACGTTTCAATGATATCTTGGGCAGACACTCTCGAAAAGCG

ATGGGAACGCTTTGTCCACAGTGAAAATCAGCACCTTGTGAGCCCTGAGGCCTTGGATTTCTT
GGACAAACTGCTGCGATATGACCACCAGTCACGGCTTACTGCAAGAGAGGCAATGGAGCACCC
CTATTTCTACACTGTTGTGAAGGACCAGGCTCGAATGGGTTAAGGATCCGGGAGCTAA

8.2.5 mCherry

Blau hinterlegt: Vektorexpressionskassette iba-pPSG-105 (inkl. Strep-II-Tag)

Rosa hinterlegt: mCherry

ATGGCTAGCGCATGGAGTCATCCTCAATTCGAGAAAGGTGGAGGTTCTGGCGGTGGATCGGGAGG
TTCAGCGTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAATCCGGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACA
TGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAG
TTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGT
GACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAA
GGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCA
AGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGTTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTG
CAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGT
AATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCC
TGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAG
ACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGA
CATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACT
CCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTTATGAGGATCCGGGAGCTAA

8.2.6 mCherry-CK2 β ¹⁻¹⁹³

Blau hinterlegt: Vektorexpressionskassette iba-pPSG-105 (inkl. Strep-II-Tag)

Rosa hinterlegt: mCherry

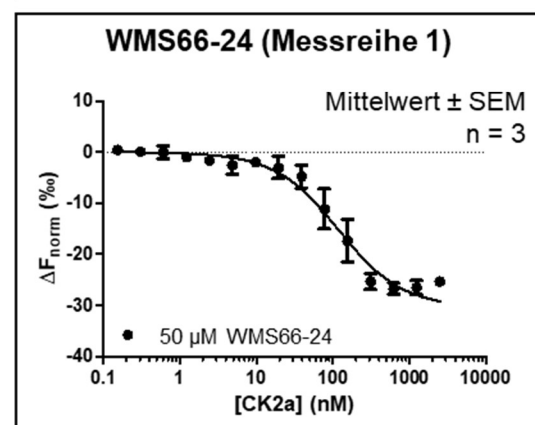
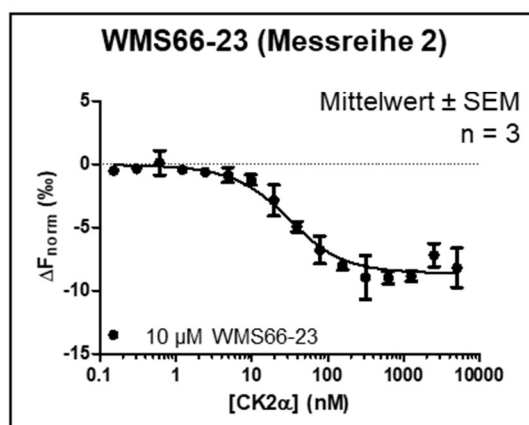
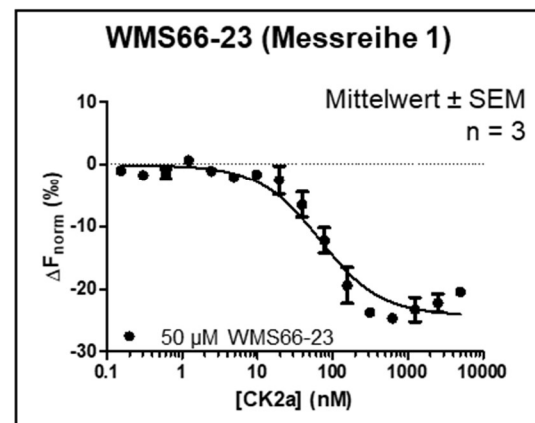
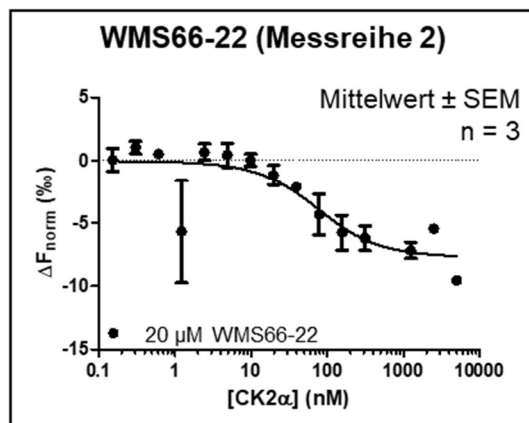
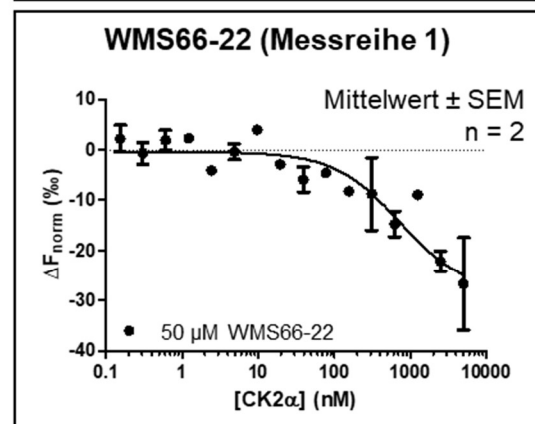
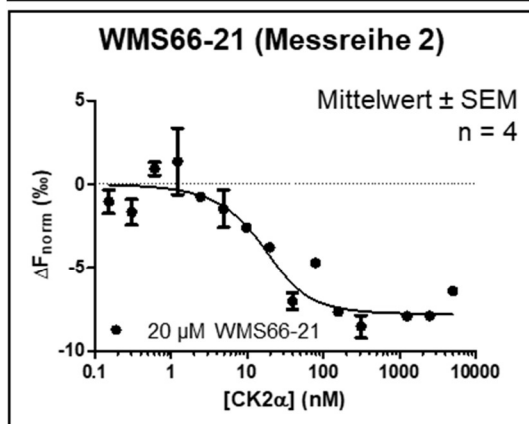
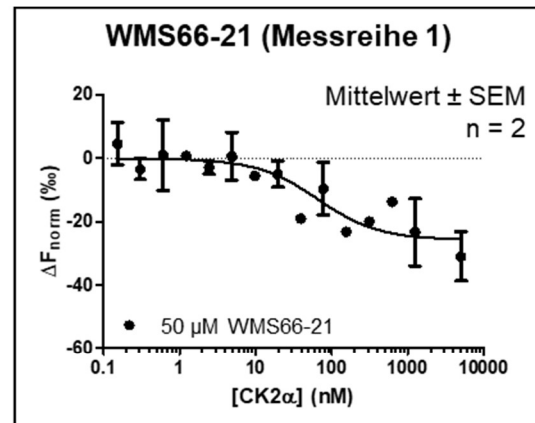
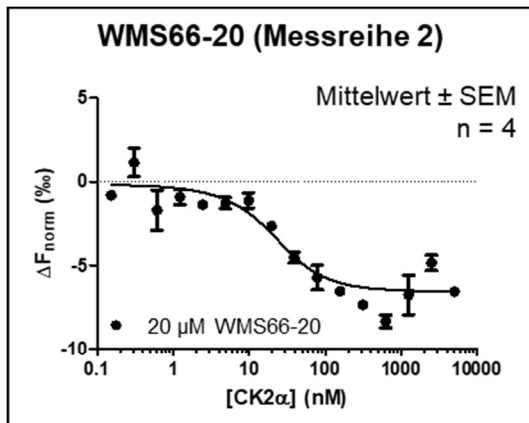
Dunkelblau hinterlegt: Linker

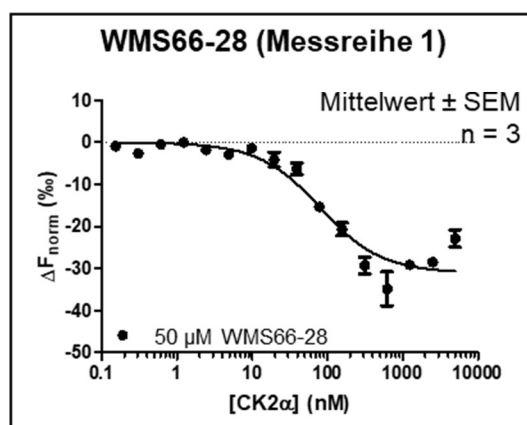
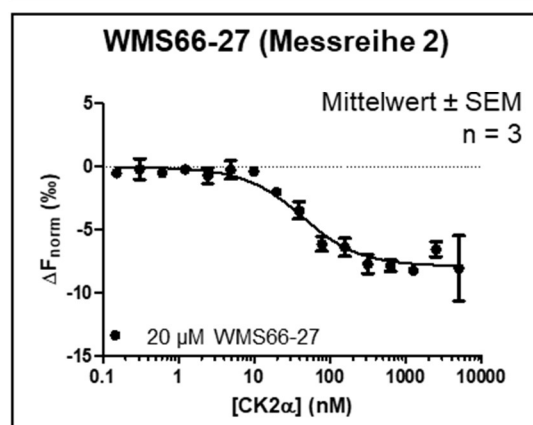
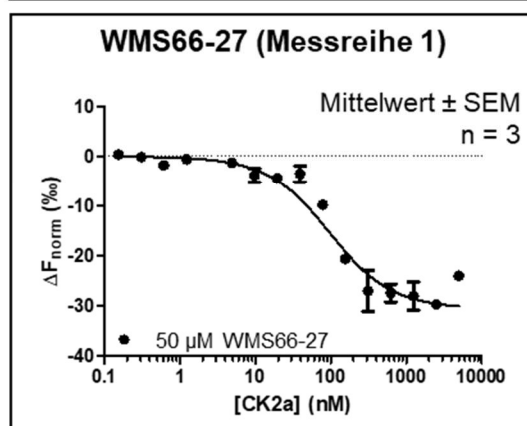
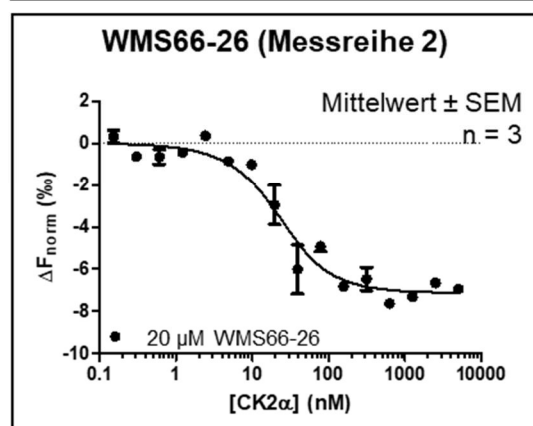
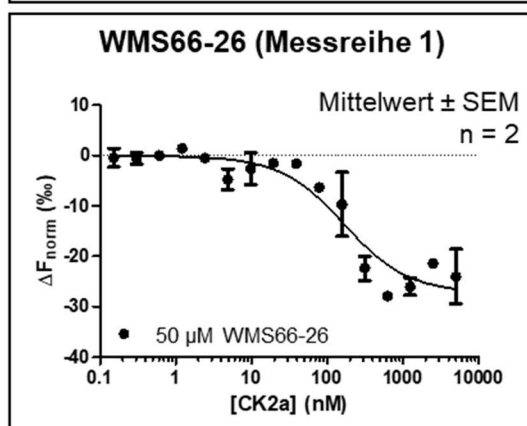
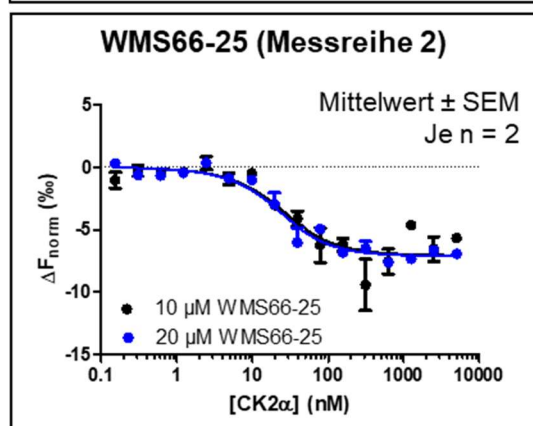
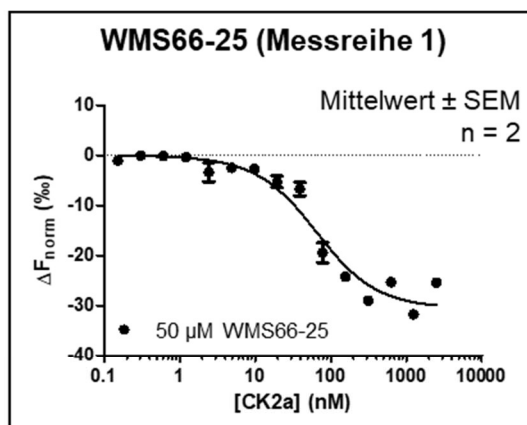
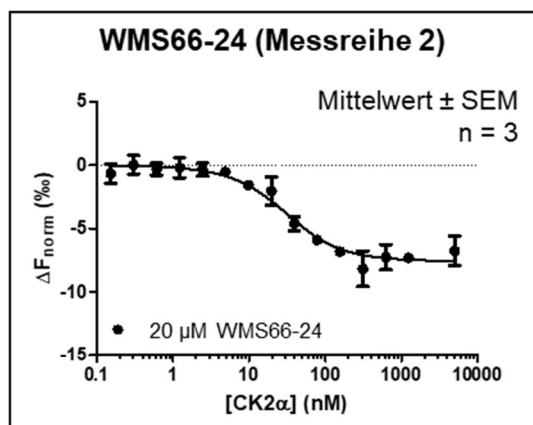
Rot hinterlegt: CK2 β ¹⁻¹⁹³

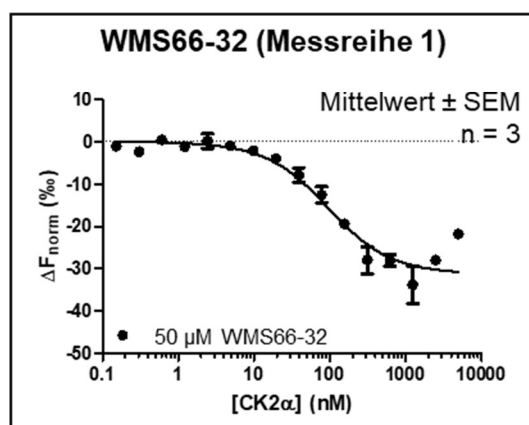
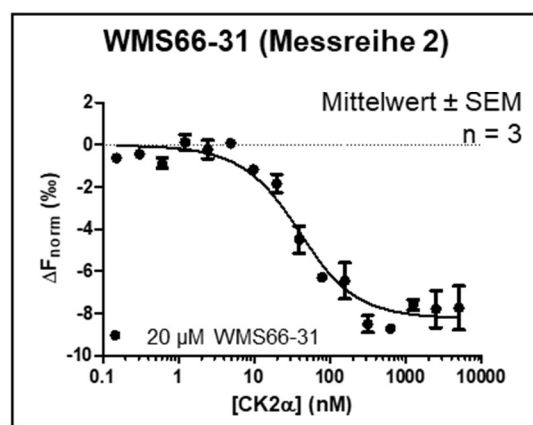
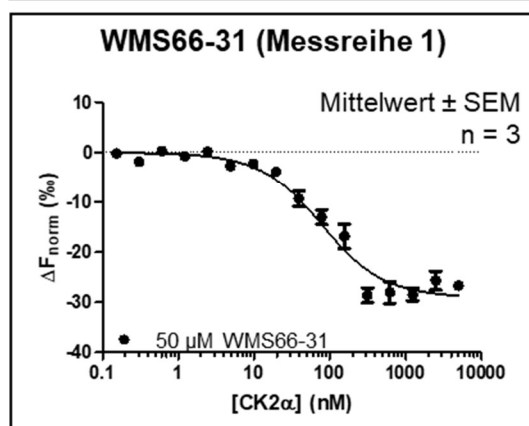
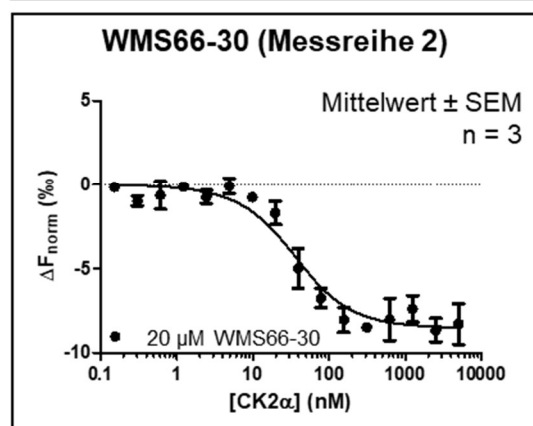
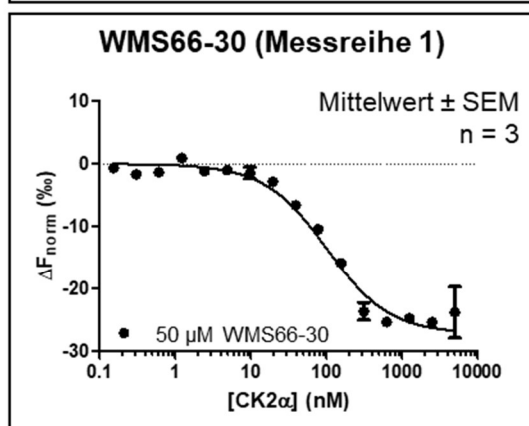
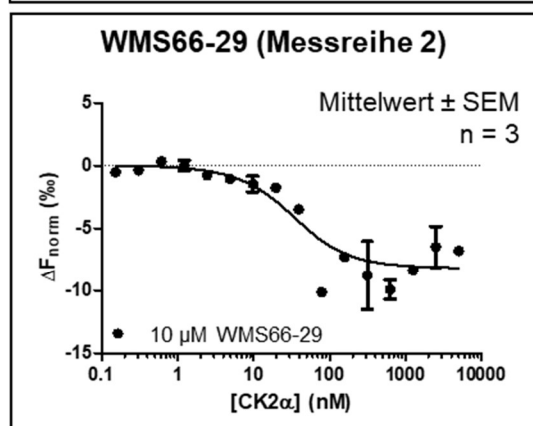
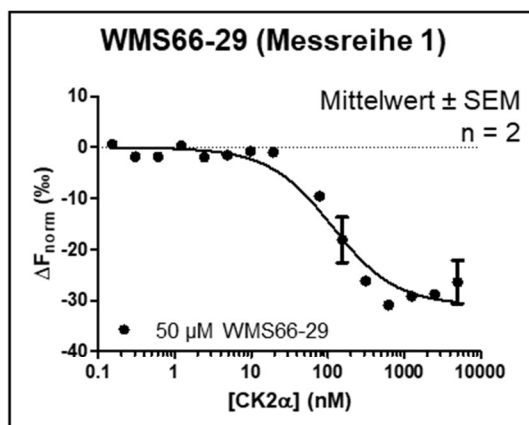
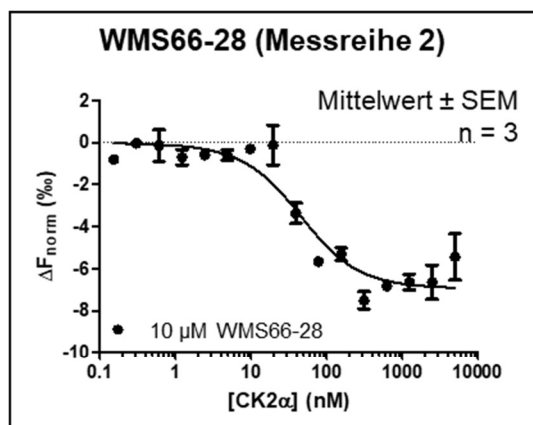
ATGGCTAGCGCATGGAGTCATCCTCAATTCGAGAAAGGTGGAGGTTCTGGCGGTGGATCGGGAGG
TTCAGCGTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAATCCGGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACA
TGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAG
TTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGT
GACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAA
GGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCA
AGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGTTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTG
CAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGT
AATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCC
TGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAG
ACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGA
CATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACT
CCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTTAGCTGGTGCTGGTGCTGGTGCTGGTGAGCTCAGC
AGCTCAGAGGAGGTGTCCTGGATTTCCTGGTTCTGTGGGCTCCGTGGCAATGAATTCTTCTGTGAA

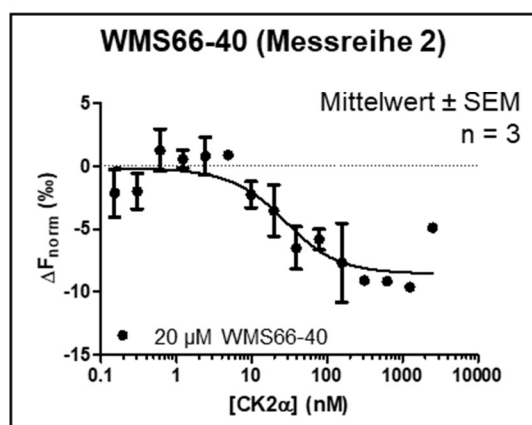
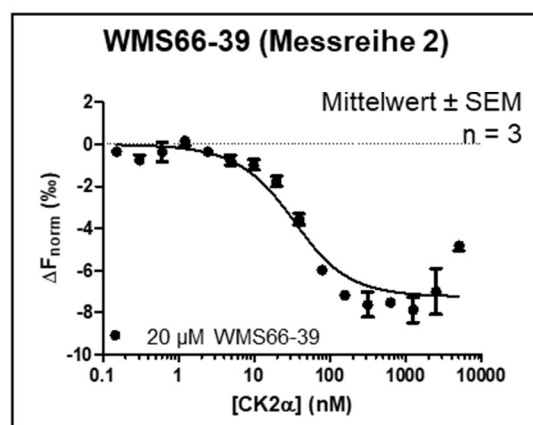
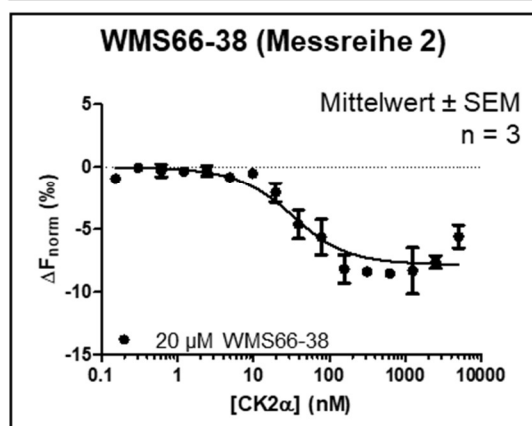
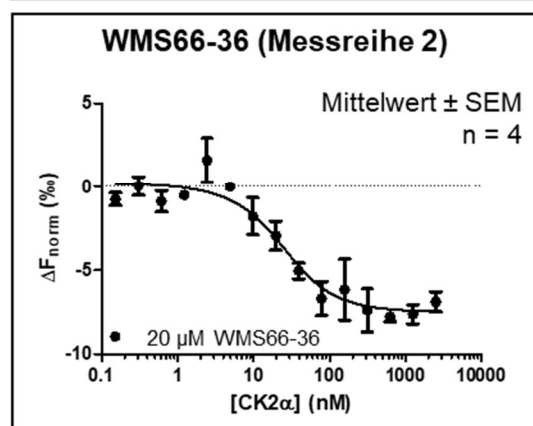
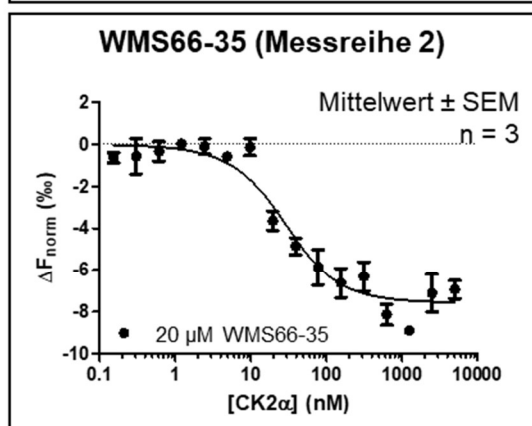
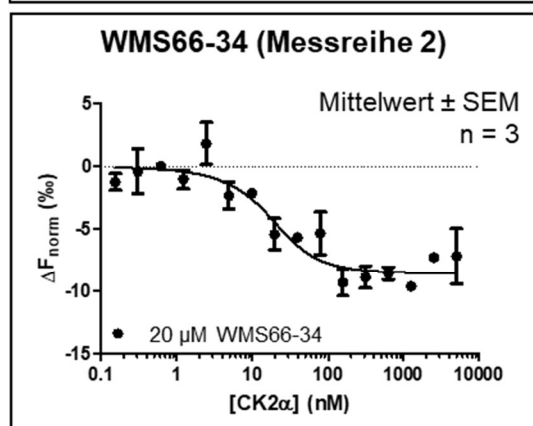
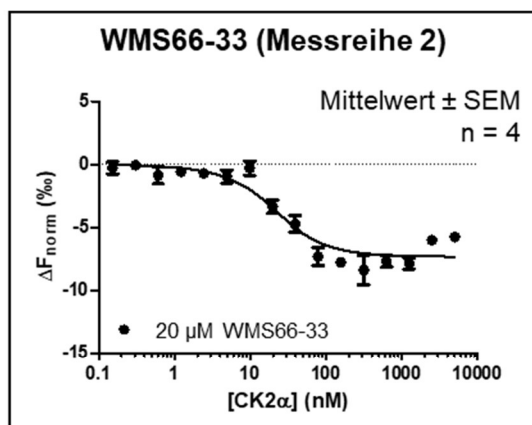
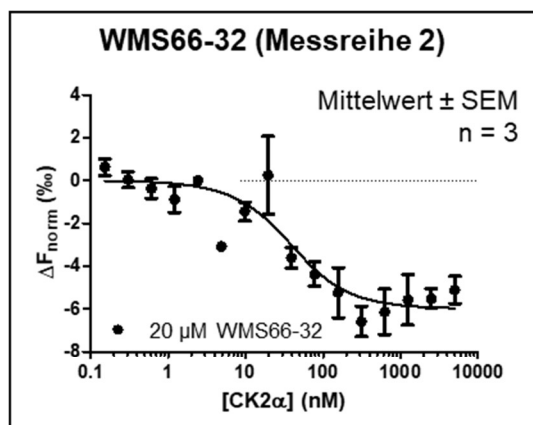
GTGGATGAAGACTACATCCAGGACAAATTTAATCTTACTGGACTCAATGAGCAGGTCCCTCACTAC
CGACAAGCTCTAGACATGATCTTGGACCTGGAGCCTGATGAAGAACTGGAAGACAACCCCAACCA
GAGTGACCTGATTGAGCAGGCAGCCGAGATGCTTTATGGATTGATCCACGCCCGCTACATCCTTAC
CAACCGTGGCATCGCCCAGATGTTGGAAAAGTACCAGCAAGGAGACTTTGGTTACTGTCCTCGTGT
GTACTGTGAGAACCAGCCAATGCTTCCCATTGGCCTTTCAGACATCCCAGGTGAAGCCATGGTGAA
GCTCTACTGCCCCAAGTGCATGGATGTGTACACACCCAAGTCATCAAGACACCATCACACGGATGG
CGCCTACTTCGGCACTGGTTTCCCTCACATGCTCTTCATGGTGCATCCCGAGTACCGGCCCAAGAG
ACCTGCCAACCAGTTTGTGCCCAGGCTCTACGGTTTCAAGATCCATTGAGGATCCGGGAGCTAA

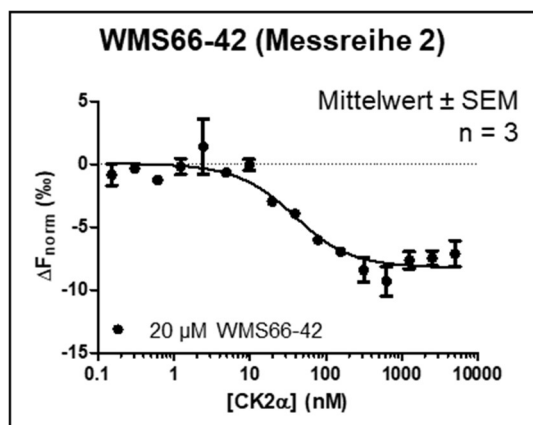
8.3 Daten aus Einzelmessungen für die Podophyllotoxin-Indol-Analoga











8.4 Inhibitionskonstanten der Podophyllotoxin-Indol-Analoga: Vergleich mit Kröger et al.

Tabelle 12: Dissoziationskonstanten K_D , K_D' und K_i für die Podophyllotoxin-Indol-Analoga. Auflistung der Dissoziationskonstanten K_D' aus den MST-Messungen in Anwesenheit der Podophyllotoxin-Indol-Analoga und den daraus errechneten K_i -Werten aus dieser Arbeit (neue Auswertung) und der vorherigen Publikation.^{217,280} Mit *präz.* sind Messungen gekennzeichnet, in der die Substanz präzipitiert ist. In blau hinterlegte Messungen wurden von Dr. Michaela Steinkrüger durchgeführt.

K_D ohne Inhibitor		neue Auswertung (Mittelwert $\pm$ SEM), n [nM]		Kröger et al. (Mittelwert $\pm$ SEM), n [nM]		
		11 $\pm$ 7		11 $\pm$ 6		
Substanz	Bezeichnung in Kröger et al.	K_D' Messreihe 1 (Mittelwert $\pm$ SEM), n [nM]	K_i neue Auswertung (Mittelwert $\pm$ SEM), n [μ M]	K_i Kröger et al. (Mittelwert $\pm$ SEM), n [μ M]	K_D' Messreihe 2 (Mittelwert $\pm$ SEM), n [nM]	
WMS66-08 (W16)	(+)-3a	61 $\pm$ 17 n=3	31 $\pm$ 14	31 $\pm$ 14		
WMS66-11	(+)-3d	38 $\pm$ 4 n=3	43 $\pm$ 6	42 $\pm$ 6		
WMS66-12	(-)-3a	174 $\pm$ 51 n=4	4,9 $\pm$ 1,8	4,9 $\pm$ 1,8	17 $\pm$ 11 n=3	
WMS66-13	(-)-10a	171 $\pm$ 47 n=3	8,6 $\pm$ 2,9	8,5 $\pm$ 2,9	präz.	
WMS66-14	(+)-10b	186 $\pm$ 36 n=4	7,2 $\pm$ 1,5	7,2 $\pm$ 1,5	72 $\pm$ 29 n=5	
WMS66-15	(-)-9a	332 $\pm$ 52 n=3	3,6 $\pm$ 0,6	3,6 $\pm$ 0,6		
WMS66-16	(+)-9b	248 $\pm$ 30 n=4	4,9 $\pm$ 0,8	4,9 $\pm$ 0,8	46 $\pm$ 21 n=3	
WMS66-17	(+)-10a	524 $\pm$ 132 n=4	2,8 $\pm$ 0,9	2,8 $\pm$ 0,9	4,7 $\pm$ 3,0 n=3	
WMS66-18	(-)-10b	328 $\pm$ 63 n=3	3,8 $\pm$ 0,7	3,7 $\pm$ 0,7	62 $\pm$ 22 n=3	
WMS66-19	(+)-9a	8,0 $\pm$ 2,0 n=5			26 $\pm$ 17 n=2 für 20 μ M	19 $\pm$ 12 n=2 für [10 μ M]
WMS66-20	(-)-9b	261 $\pm$ 15 n=3	4,4 $\pm$ 0,3	4,4 $\pm$ 0,3	9,4 $\pm$ 3,1 n=4	
WMS66-21	(+)-11	59 $\pm$ 25 n=2	32 $\pm$ 17	32 $\pm$ 17	7,3 $\pm$ 1,0 n=2	
WMS66-22	($\pm$)-12	758 $\pm$ 338 n=2	1,9 $\pm$ 0,8	1,8 $\pm$ 0,8	58 $\pm$ 21 n=3	
WMS66-23		62 $\pm$ 19 n=3	14 $\pm$ 5		23 $\pm$ 10 n=3	
WMS66-24		132 $\pm$ 43 n=3	6,0 $\pm$ 2,2		24 $\pm$ 9 n=3	
WMS66-25		17 $\pm$ 3 n=2			13 $\pm$ 1 n=2 für 20 μ M	16 $\pm$ 2 n=2 für [10 μ M]
WMS66-26		158 $\pm$ 17 n=2	3,8 $\pm$ 0,4		25 $\pm$ 15 n=3	
WMS66-27		89 $\pm$ 13 n=3	7,4 $\pm$ 1,2		31 $\pm$ 10 n=3	
WMS66-28		72 $\pm$ 12 n=3	9,7 $\pm$ 1,6		45 $\pm$ 17 n=3	
WMS66-29		101 $\pm$ 4 n=2	6,1 $\pm$ 0,3		28 $\pm$ 5 n=3	
WMS66-30		93 $\pm$ 13 n=3	7,1 $\pm$ 1,2		27 $\pm$ 7 n=3	
WMS66-31		72 $\pm$ 2 n=3	9,1 $\pm$ 0,4		28 $\pm$ 4 n=3	
WMS66-32		94 $\pm$ 24 n=3	7,7 $\pm$ 1,8		29 $\pm$ 9 n=3	
WMS66-33					14 $\pm$ 6 n=4	
WMS66-34	(-)-14d				9,2 $\pm$ 2,7 n=3	
WMS66-35	(+)-14c				20 $\pm$ 3 n=3	
WMS66-36	(-)-9d				16 $\pm$ 3 n=4	
WMS66-37	(+)-9c				präz.	
WMS66-38	(+)-14d				26 $\pm$ 8 n=3	
WMS66-39	(-)-14c				23 $\pm$ 3 n=3	
WMS66-40	(+)-9d				25 $\pm$ 13 n=3	
WMS66-41	(-)-9c				präz.	
WMS66-42					29 $\pm$ 7 n=3	

8.5 Vereinbarungen zu Bildrechten

Abbildung 1	Selbst erstellt mit PDB 3D viewer.
Abbildung 2	Selbst erstellt mit PDB 3D viewer.
Abbildung 3	Selbst erstellt mit Chemdraw20.1.1.
Abbildung 4	Selbst erstellt mit Chemdraw20.1.1.
Abbildung 5	Selbst erstellt mit Chemdraw20.1.1.
Abbildung 6	Mit Erlaubnis des Verlags übernommen:

JOHN WILEY AND SONS LICENSE

TERMS AND CONDITIONS

Mar 13, 2023

This Agreement between Universitaet zu Koeln -- Miriam Lauwers ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number 5507050182821

License date Mar 13, 2023

Licensed Content

Publisher John Wiley and Sons

Licensed Content

Publication Protein Science

Licensed Content

Title The interaction of CK2 α and CK2 β , the subunits of protein kinase CK2, requires CK2 β in a preformed conformation and is enthalpically driven

Licensed Content

Author Jennifer Raaf, Elena Brunstein, Olaf-Georg Issinger, et al

Licensed Content

Date Jan 2, 2009

Licensed Content

Volume 17

Licensed Content

Issue 12

Licensed Content

Pages 7

Type of use Dissertation/Thesis

Requestor type University/Academic

Format Print and electronic

Portion Figure/table

Number of figures/tables 1

<i>Will you be translating?</i>	<i>Yes, including English rights</i>
<i>Number of Languages</i>	<i>1</i>
<i>Title</i>	<i>Untersuchung der Quartärstruktur der Proteinkinase CK2: Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung der CK2α/β-Interaktion sowie von Hemmstoffen dieser Protein-Protein-Wechselwirkung</i>
<i>Institution name</i>	<i>Universität zu Köln</i>
<i>Expected presentation date</i>	<i>Mar 2023</i>
<i>Portions figure 1 B</i>	
<i>Specific Languages</i>	<i>German, English</i>
<i>Requestor Location</i>	<i>Universitaet zu Koeln Gebaeude 36, Gleueler Str. 24 Koeln, 50931 Germany Attn: Universitaet zu Koeln</i>
<i>Publisher Tax ID</i>	<i>EU826007151</i>
<i>RightsLink Printable License</i>	
<i>Total</i>	<i>0.00 EUR</i>

Abbildung 7	Creative Commons Lizenz: <i>This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons CC-BY license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.</i> <i>You are not required to obtain permission to reuse this article.</i>
Abbildung 8	Eigene Daten, erstellt mit Nanotemper MO.Affinity Analysis.
Abbildung 9	Selbst erstellt mit Microsoft Excel und Daten des Thermo Fisher Scientific Fluorescence SpectraViewer. ²
Abbildung 10	Eigene Daten.
Abbildung 11	Eigene Daten.
Abbildung 13	Eigene Daten.
Abbildung 12	Eigene Daten.
Abbildung 14	Eigene Daten.
Abbildung 15	Eigene Daten.
Abbildung 16	Eigene Daten.
Abbildung 17	Eigene Daten.
Abbildung 18	Eigene Daten.
Abbildung 19	Erstellt mit ChemDraw Version 20.1.1.
Abbildung 20	Erstellt mit ChemDraw Version 20.1.1.
Abbildung 21	Erstellt mit ChemDraw Version 20.1.1.
Abbildung 22	Eigene Daten.

Abbildung 23	Eigene Daten.
Abbildung 24	Eigene Daten.
Abbildung 25	Eigene Daten.
Abbildung 26	Eigene Daten.
Abbildung 27	Eigene Daten.
Abbildung 28	Eigene Daten.
Abbildung 29	
Eigene Daten.	
Abbildung 30	Erstellt mit ChemDraw Version 20.1.1.
Abbildung 31	Eigene Daten.
Abbildung 32	Eigene Daten.