



**Autodisplay der humanen Proteinkinase CK2 und
Entwicklung eines Verfahrens zur Inhibitionstestung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Andreas Gratz

aus Saarlouis

Düsseldorf, Mai 2010

aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Joachim Jose

Koreferent: Prof. Dr. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2010

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

(Andreas Gratz)

Mein Dank gilt

- Prof. Dr. Joachim Jose für die Überlassung des interessanten Themas, für viele hilfreiche Diskussionen, das in mich gesetzte Vertrauen, sowie die optimalen Arbeitsbedingungen im Arbeitskreis und die gute Zusammenarbeit bei der Praktikumsbetreuung;
- Prof. Dr. Peter Proksch für die Übernahme des Zweitgutachtens;
- Prof. Dr. Mathias Montenarh für die Übernahme des externen Gutachtens;
- allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des stetig wachsenden Arbeitskreises Bioanalytik (die ich aus Platzgründen nicht alle namentlich erwähnen kann) für das anhaltend fröhliche, kollegiale und produktive Arbeitsklima und die Bereitschaft zur fachlichen und weniger fachlichen Diskussion innerhalb und außerhalb des Labors;
- den Mitarbeitern der Medizinischen Biochemie und Molekularbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, v. a. Prof. Dr. Mathias Montenarh, Prof. Dr. Claudia Götz und Sabine Kartarius für die freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe, die Unterstützung während der Aufreinigung der CK2 und der Überlassung der cDNA der beiden CK2-Untereinheiten;
- Prof. Dr. Claudia Götz für die Durchführung der radiometrischen Aktivitäts- und Inhibitionstests mit den CK2-präsentierenden *E. coli*-Zellen und der zellbiologischen Charakterisierung des Inhibitors TF.
- Heinz Mathew für die gute Zusammenarbeit bei der Inhibitionstestung der CK2.
- Dr. Miriam Pein, Dr. Ruth Maas, Dr. Tatjana Brossette und Dr. Andre Kaeßler für das fleißige Korrekturlesen und die konstruktive Kritik;
- meinen ehemaligen und aktuellen Kollegen für die gute Zusammenarbeit und das stets angenehme Arbeitsklima bei der Organisation und Betreuung des Praktikums „Instrumentelle Analytik“: Dr. Ricardo Bollig, Dr. Dirk Betscheider, Dr. Miriam Pein, Stephanie Schumacher, Iris Gawarzewski, Najat Driouach, Silke Wilden, Markus Wirges, Jonathan Vaassen, Daniela Brock und Antje Below;
- Dr. Miriam Pein für die vielfältige Hilfe, die gute Zusammenarbeit im Institut und für die nötige Ablenkung durch außeruniversitäre Unternehmungen;
- meinen Eltern, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben;
- der BioStruct Graduate School für die zeitweilige Finanzierung dieser Arbeit;
- allen bisher nicht genannten Personen, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein herzlichster Dank gilt Dr. Tatjana Brossette, die mich stets unterstützt und mir gerade in der Endphase der Arbeit den Rücken freigehalten hat und so manch schlechte Laune ertragen musste. Danke für Dein Verständnis und Deine Hilfe !

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Summary.....	3
I Einleitung.....	5
1. Phosphorylierung von Proteinen.....	5
1.1. Die Proteinkinase CK2	6
1.2. Die CK2 beeinflusst Biorhythmus, Zellwachstum und Apoptose	10
2. Inhibition der Proteinkinase CK2	12
2.1. Die CK2 als pharmazeutisches Zielmolekül.....	12
2.1.1. Erhöhte CK2-Aktivität beeinflusst Hauptmerkmale der Onkogenese.....	13
2.1.2. CK2-Substrate fördern die Tumorentstehung und -ausbreitung	14
2.1.3. Das CK2-Niveau ist in Krebszellen erhöht.....	17
2.1.4. Die Hemmung der CK2 führt Krebszellen in die Apoptose	19
2.2. Inhibition der Proteinkinase CK2.....	20
2.2.1. Molekulare Testverfahren für CK2-Inhibitoren	20
2.2.2. Bekannte Inhibitoren der CK2	22
3. Das Autodisplay-System	26
4. Ziele der Arbeit.....	30
II Material und Methoden.....	31
1. Material	31
1.1. Geräte	31
1.2. Software	32
1.3. Chemikalien und Materialien.....	32
1.4. Reagenziensätze („kits“)	34
1.5. Antikörper	34
1.6. Enzyme	34
1.7. Oligonukleotide.....	35
1.8. Peptide	35
1.9. Bakterienstämme.....	36
1.10. Plasmide	36
1.11. Nährmedien.....	37
1.11.1. LB-Medium.....	37
1.11.2. PPM-Medium.....	37
1.11.3. SOC Medium.....	38
1.11.4. 2xYT Medium (pH 7,0).....	38
1.12. Lösungen und Puffer.....	38
1.12.1. Lösungen für die Agarosegelelektrophorese	38
1.12.2. Lösungen für die SDS-PAGE.....	38
1.12.3. Lösungen für die Isolierung von Proteinen der äußeren Bakterienmembran.....	39
1.12.4. Lösungen für die CK2-Aufreinigung und den CK2-Aktivitätstest	40
1.12.5. Lösungen für die Plasmidisolierung nach Birnboim und Doly.....	40
2. Methoden.....	41
2.1. Arbeiten mit <i>E. coli</i>	41

Inhaltsverzeichnis

2.1.1.	Kultivierung.....	41
2.1.2.	Stammhaltung	41
2.1.3.	Herstellung elektrokompeterer Stämme	41
2.1.4.	Transformation durch Elektroporation	42
2.1.5.	Expression der Autotransporter-Fusionsgene in <i>E. coli</i>	42
2.1.6.	Nachweis der Orientierung von Autodisplay-Passagieren durch Antikörper	43
2.1.7.	Fluoreszenzmarkierung von Zellen basierend auf Affinität zur CK2	43
2.1.8.	Durchflusszytometrie	44
2.2.	Arbeiten mit Nukleinsäuren	44
2.2.1.	Plasmidisolierung	44
2.2.2.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	45
2.2.3.	Hybridisierung von Oligonukleotiden	45
2.2.4.	DNA-Zweitstrangsynthese.....	46
2.2.5.	Enzymatische Spaltung von DNA-Fragmenten.....	46
2.2.6.	Agarosegelelektrophorese.....	47
2.2.7.	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel.....	47
2.2.8.	Ligation.....	47
2.2.9.	Entsalzen von DNA-Lösungen mittels Dialyse	48
2.2.10.	DNA Sequenzanalyse	48
2.3.	Arbeiten mit Proteinen	48
2.3.1.	Rekombinante Expression und Reinigung der humanen CK2	48
2.3.2.	Konjugation der CK2 mit Fluorescein.....	49
2.3.3.	Proteasesensitivität von Autotransporter-Fusionsproteinen	50
2.3.4.	Isolierung von Proteinen der äußeren Bakterienmembran	50
2.3.5.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	51
2.3.6.	Radiometrischer CK2 Aktivitätstest	52
2.3.7.	FRET-gestützter Aktivitätstest.....	52
2.3.8.	Fluoreszenzspektrum	53
2.3.9.	Kapillarelektrophoretische Analyse von Peptiden	53
2.3.10.	Kapillarelektrophoretische CK2-Aktivitätsbestimmung.....	53
2.3.11.	Kapillarelektrophoretische Inhibitionstestung der CK2.....	54
2.3.12.	Selektivitätsuntersuchung der Hemmung von „TF“ auf Proteinkinasen	54
III	Experimente und Ergebnisse	55
1.	Autodisplay der Untereinheiten der humanen CK2 in <i>E. coli</i>	55
1.1.	Konstruktion der Autotransporter-CK2-Fusionsgene	55
1.1.1.	Konstruktion des Plasmids pSS001 zum Autodisplay der CK2 α	55
1.1.2.	Konstruktion des Plasmids pSS002 zum Autodisplay der CK2 β	56
1.2.	Autodisplay und Aktivität der CK2 in <i>E. coli</i> UT5600(DE3)	57
1.2.1.	Autodisplay der CK2-Untereinheiten in <i>E. coli</i> UT5600(DE3)	57
1.2.2.	Untersuchung der Aktivität CK2-präsentierender <i>E. coli</i> UT5600(DE3)	61
1.3.	Autodisplay und Aktivität der CK2 in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	64
1.3.1.	Autodisplay der CK2-Untereinheiten in <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	64
1.3.2.	Untersuchung der Aktivität CK2-präsentierender <i>E. coli</i> BL21(DE3)	65
1.4.	CK2-Inhibitionstest im Ganzzellsystem.....	68
1.4.1.	Modulation der Aktivität oberflächenpräsentierter CK2 durch TBB.....	68
1.4.2.	Bestimmung des IC ₅₀ Wertes von TBB mit oberflächenpräsentierter CK2	69
2.	Entwicklung neuer Testverfahren für CK2-Inhibitoren.....	71

Inhaltsverzeichnis

2.1. FRET-gestützter CK2-Aktivitätstest.....	71
2.1.1. Theoretischer Ansatz	71
2.1.2. Etablierung der FRET-basierten Analytik.....	73
2.1.3. Messung der CK2-Aktivität und der CK2-Inhibition.....	76
2.2. Kapillarelektrophoretischer CK2-Aktivitätstest.....	78
2.2.1. Theoretischer Ansatz	78
2.2.2. Etablierung der kapillarelektrophoretischen Peptidanalytik	79
2.2.3. Messung der Inhibition der CK2-Aktivität.....	84
2.2.4. Anpassung der Testparameter an das Substratpeptid RRRDDDSDDD	85
3. Untersuchung neuer Inhibitoren für die CK2	88
3.1. Indolcarboxamidderivate als potentielle CK2-Inhibitoren	88
3.2. Durchmusterung einer Substanzbibliothek.....	90
3.3. Benzofuranderivate als CK2-Inhibitoren.....	95
3.3.1. Untersuchung zur Wirkung von TF in Krebszellen.....	97
4. Zugang zu neuen Inhibitoren der CK2-Substratbindestelle	103
4.1. Affinitätsuntersuchung mit Casein als Autodisplaypassagier	104
4.1.1. Affinitätsuntersuchung von N-terminal verkürztem α_{S1} -Casein.....	106
4.1.2. Untersuchung einer Peptidsequenz aus α_{S1} -Casein als Inhibitor der CK2	107
4.2. CK2-Pseudosubstrat als Autodisplaypassagier.....	108
4.2.1. Konstruktion von Expressionsplasmiden zum Peptid-Autodisplay.....	108
4.2.2. Affinitätsuntersuchung eines CK2-Pseudosubstrats als Autodisplaypassagier	109
4.3. Erstellung einer Autodisplay-Peptidbibliothek	112
4.3.1. Konstruktion des Vektors zur Klonierung der DNA-Bibliothek	112
4.3.2. Erstellung eines DNA-Bibliothekinserts	113
4.3.3. Analyse der Plasmidbibliothek	116
IV Diskussion.....	118
1. Autodisplay humaner CK2	118
2. Entwicklung neuer Testverfahren für CK2-Inhibitoren.....	122
2.1. FRET-gestützter CK2-Aktivitätstest.....	122
2.2. Kapillarelektrophoretischer CK2-Aktivitätstest.....	124
3. Identifizierung einer neuen Leitstruktur zur Hemmung der CK2	129
4. Identifizierung peptidischer Liganden der CK2.....	132
5. Ausblick.....	136
V Literaturverzeichnis	137
VI Anhang.....	156
1. Abkürzungsverzeichnis.....	156
2. Sequenzen	158
3. Plasmidkarten.....	159
4. Veröffentlichungen.....	160

Zusammenfassung

Die humane Proteinkinase CK2 ist ein heterotetrameres Enzym, welches aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten besteht. In dieser Arbeit wurde jede der beiden Untereinheiten als Autodisplay-Passagier an der Zelloberfläche von *Escherichia coli* präsentiert. Durch Coexpression der beiden Autotransporter-Fusionsgene in einem *E. coli*-Stamm konnte erstmalig das Autodisplay eines heterotetrameren Enzyms gezeigt werden. Sowohl Stämme, welche nur die α -Untereinheit präsentierten, als auch Stämme, welche beide CK2-Untereinheiten an der Oberfläche trugen, zeigten in radiometrischen Tests CK2-Aktivität. Mit diesen Zellen als Quelle des Zielmoleküls CK2 konnte so der IC_{50} Werte des bekannten CK2-Inhibitors TBB bestimmt werden. In dem beide Untereinheiten tragenden *E. coli* BL21(DE3)-Stamm ergab sich für TBB ein IC_{50} Wert von $0,295 \mu\text{M}$, der gut mit Literaturwerten übereinstimmte. Bei der Suche nach neuen Wirkstoffen ist neben der Verfügbarkeit des Zielmoleküls ein verlässliches und aussagekräftiges Testsystem von entscheidender Bedeutung. Zur Entwicklung eines neuen nicht-radiometrischen Testsystems für CK2 wurde dessen Substratpeptid RRRDDDSDDD C-terminal mit EDANS und N-terminal mit DABCYL konjugiert. Durch die räumliche Nähe entsteht ein FRET-Effekt, bei dem der Quencher DABCYL die Fluoreszenz von EDANS unterdrückt. In einer gekoppelten Enzymreaktion wurde dieses Peptid zunächst durch CK2 am Serylrest phosphoryliert, wodurch die Erkennungssequenz der anschließend eingesetzten pankreatischen Elastase maskiert wurde. Das Ausmaß der Phosphorylierung dieser Erkennungssequenz durch CK2 war der entscheidende Faktor für die Effizienz des darauffolgenden proteolytischen Entwicklungsschritts mit Elastase. Das nicht-phosphorylierte Peptid wurde mit höherer Effizienz durch Elastase hydrolysiert, was den Verlust des FRET-Effekts zur Folge hatte. Der daraus resultierende Anstieg der Fluoreszenzintensität bei 535 nm konnte nach Anregung bei 355 nm quantifiziert werden und war umgekehrt proportional zur Aktivität der CK2. Neben der qualitativen Erfassung der CK2-Aktivität ermöglichte dieser Test grundsätzlich die Identifizierung von Inhibitoren. Aufgrund einer geringen Sensitivität war mit diesem FRET-basierten Verfahren aber keine verlässliche Bestimmung von IC_{50} Werten durchführbar. Um diese verwirklichen zu können, wurde ein zweites Testverfahren entwickelt. Es basiert auf einer durch die Phosphorylierung induzierten Veränderung der elektrophoretischen Mobilität eines Substratpeptids der CK2. Dieses Peptid wurde sowohl in fluorophorkonjugierter Form RRRDDDSDDD-[EDANS], als auch in unkonjugierter Form RRRDDDSDDD als CK2-Substrat eingesetzt. Die Trennung und Quantifizierung von Substrat und Produkt wurde durch Etablierung einer kapillar-

elektrophoretischen Methode unter Benutzung einer „bare fused silica“ Kapillare und einer absorptionsspektroskopischen Detektion bei 214 nm möglich. Dieses neue Testverfahren eignete sich ausgezeichnet zur quantitativen Bewertung von Inhibitoren der CK2. Die damit bestimmten IC_{50} Werte der Inhibitoren TBB (0,27 μ M) und Emodin (1,33 μ M) stimmten gut mit Angaben aus der Literatur überein. Dieser kapillarelektrophoretische Inhibitionstest wurde bei einer Durchmusterung einer Substanzbibliothek eingesetzt und führte zur Identifizierung neuer potenter CK2-Inhibitoren. Die beste Testsubstanz (TF) zeigte einen exzellenten IC_{50} Wert von 0,03 μ M.

Summary

Human Protein kinase CK2 is a heterotetrameric enzyme composed of two α - and two β -subunits. In this study, each of the two individual subunits was displayed on the cell surface of *Escherichia coli* using Autodisplay. For the first time, the coexpression of two different autotransporter fusion genes in one strain of *E. coli* enabled the Autodisplay of a heterotetrameric enzyme. CK2 activity could not only be detected by a radiometric assay for strains that exclusively displayed the α -subunit but also for strains that displayed both subunits of CK2. These cells were employed as a source for the target CK2 in order to determine the IC_{50} value of the known CK2 inhibitor TBB. The use of host strain *E. coli* BL21(DE3) that displayed both subunits yielded an IC_{50} value of 0.295 μ M, which is in good agreement with published data. The screening for active agents requires the availability of the target and a reliable and distinct assay method. In order to develop a novel non-radiometric assay for CK2, the N-terminus of the substrate peptide RRRDDDSDDD was labeled with EDANS and its C-terminus with DABCYL. Their proximity causes a FRET effect; the quencher DABCYL suppresses the fluorescence characteristics of EDANS. The assay makes use of a coupled enzyme reaction. At first, serine residue of the substrate peptide is phosphorylated by CK2 which blocks a recognition sequence of the second enzyme, pancreatic elastase. The extent of this CK2-driven serine phosphorylation was crucial for the efficiency of the following proteolytic cleavage step by elastase that produced the readout-signal. The non-phosphorylated peptide was cleaved by elastase with higher efficiency compared to the non-phosphorylated peptide and resulted in a loss of the FRET effect. The resulting increase of fluorescence at 535 nm after excitation at 355 nm could be quantified and was inversely correlated with CK2 activity. It could be demonstrated that this assay not only enables the quantitative detection of CK2 activity, but also allows the identification of inhibitors. However, the poor selectivity prevented the reliable determination of IC_{50} values. In order to enable quantitative evaluation of inhibitors, a second assay was developed. It is based on the change of electrophoretic mobility that is induced by CK2-catalyzed phosphorylation of a substrate peptide, which was deployed in either a fluorophore-coupled form RRRDDDSDDD-[EDANS] or in an unmodified form RRRDDDSDDD. The separation and quantification of substrate and product was enabled by capillary electrophoresis using a bare fused silica capillary and UV detection at 214 nm. The novel assay is suitable to determine the potency CK2 inhibitors. It could be used to determine IC_{50} values of the known CK2-inhibitors TBB (0.27 μ M) and Emodin (1.33 μ M). These values were in excellent agreement with published data. The screening of a

compound library by this capillary electrophoresis assay revealed novel CK2 inhibitors. The most potent compound (TF) exhibited an excellent IC_{50} value of $0.03 \mu\text{M}$.

I Einleitung

1. Phosphorylierung von Proteinen

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen ist ein wichtiger biologischer Regulationsmechanismus, der nahezu jeden Aspekt des Lebens auf zellulärer Ebene beeinflusst. Edmond H. Fischer und Edwin G. Krebs erhielten für ihre Pionierarbeit, die wesentlich zu dieser Erkenntnis beigetragen hat, 1992 den Nobelpreis für Medizin (Fischer, 1993; Krebs, 1993). Die Motivation zur Erforschung der Proteinphosphorylierung entwickelte sich zu Beginn der 50er Jahre aus der Beobachtung, dass schnell proliferierendes Gewebe und insbesondere bestimmte Tumorzellen einen hohen Anteil an „Phosphoprotein“ besaßen, welches darüber hinaus schnell umgesetzt wurde (Kennedy und Smith, 1954). Nachdem Phosphatasen als dephosphorylierende Enzyme bereits bekannt waren, suchte man nach Mediatoren der Proteinphosphorylierung. Die ersten Phosphoproteine, die dabei untersucht wurden, waren Nahrungseiweiße wie Phosvitin aus Eigelb und Casein aus Milch, da sie über Fällungsreaktionen leicht zu isolieren waren. Mit Casein identifizierten Burnett und Kennedy im Jahr 1954 die ersten „Protein Phosphokinasen“ (Burnett und Kennedy, 1954). Hinter diesen „Caseinkinasen“ verbargen sich nach heutiger Nomenklatur höchstwahrscheinlich die Proteinkinasen CK1 und CK2 (Pinna, 1994). Die physiologische Funktion dieser beiden Enzyme blieb aber noch unbekannt, weshalb dieser Entdeckung zunächst wenig Beachtung geschenkt wurde. Dies änderte sich bereits ein Jahr später mit der Entdeckung der Glycogen-Phosphorylase-b-Kinase (heute „Phosphorylase-Kinase“ genannt) durch Fischer und Krebs (Krebs und Fischer, 1956). Die Identifizierung dieses regulatorischen Schlüsselenzyms des Glykogenstoffwechsels führte zu einer Beschleunigung der Proteinkinaseforschung. Allerdings rückte ihr Fokus von der Krebsforschung weg und wurde zur Untersuchung der Proteinkinasen im Kontext metabolischer Prozesse verschoben. Seit dieser Zeit hat die Erforschung von Proteinkinasen kontinuierlich an Bedeutung gewonnen. Die Entdeckung und Untersuchung der cAMP-abhängigen Proteinkinase PKA (Walsh *et al.*, 1968), der cyclin-abhängigen Proteinkinasen, der mitogen-aktivierten Proteinkinasen und die Entdeckung einiger Rezeptor-Tyrosinkinasen (Fischer, 1993; Krebs, 1993) zeigte, dass Phosphorylierung ein generelles regulatorisches Prinzip darstellt. Die Konsequenzen sind dabei vielfältig. So kann Phosphorylierung beispielsweise die biologische Aktivität von Proteinen erhöhen oder reduzieren, diese für den Abbau markieren und ihre Stabilität beeinflussen. Darüber hinaus ermöglichen oder blockieren Phosphorylierungen und Dephosphory-

lierungen den Transport zwischen Zellkompartimenten oder die Interaktion zwischen Proteinen (Cohen, 2002a). Die wesentliche Reaktion, die von Proteinkinasen katalysiert wird, ist der Transfer des Phosphatrestes eines Donors, meist das γ -Phosphat von Adenosintriphosphat (ATP), auf das nukleophile Zentrum bestimmter proteingebundener Aminosäureseitenketten. In Eukaryoten kommen hauptsächlich Phosphorylierungen von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten (*O*-Phosphate) vor (Ubersax und Ferrell, 2007). Darüber hinaus wurden auch Phosphate von Lysin-, Arginin- (Yan *et al.*, 1998) und Histidinresten (Klumpp und Krieglstein, 2005) gefunden (*N*-Phosphate), über deren Funktion zur Zeit aber noch wenig bekannt ist.

Im humanen Genom wurden 518 homologe Gene identifiziert, die potentiell für Proteinkinasen codieren. Für diese hat sich mittlerweile der Begriff humanes „Kinom“ etabliert. Eine allgemein akzeptierte Einteilung des humanen Kinoms ist in Abbildung 1 dargestellt. Derzeit geht man davon aus, dass etwa ein Drittel aller Proteine der 20.000 bis 25.000 humanen Gene phosphoryliert ist. Die Gesamtheit dieser phosphorylierten Proteine wird als Phosphoproteom bezeichnet (Manning *et al.*, 2002). Da jedes Protein von verschiedenen Kinasen teilweise mehrfach phosphoryliert werden kann, errechnen sich für jede Proteinkinase im Durchschnitt etwa 20 Substrate (Cohen, 2002a). Obwohl die Primärstrukturen der Proteinkinasen teilweise stark differieren, ist der katalytische Kern der Proteinkinasen hochkonserviert und bildet eine bilobale Tertiärstruktur (Cheek *et al.*, 2002; Cheek *et al.*, 2005). Diese besteht aus einem N-terminalen Segment mit mehreren β -Faltblättern, einem „Gelenkbereich“, der das aktive Zentrum beinhaltet, und einer α -Helix-reichen C-terminalen Domäne.

1.1. Die Proteinkinase CK2

Obwohl sie als eine der ersten Proteinkinasen entdeckt wurde, erregte die CK2 zunächst keine große Aufmerksamkeit. Im Nobelvortrag von Fischer und Krebs wurde sie beispielsweise nur in einem Nebensatz erwähnt (Fischer, 1993; Krebs, 1993). Folglich fand die Forschung zur bis heute nicht vollständig aufgeklärten physiologischen Funktion der Proteinkinase CK2 in eher kleinem Rahmen statt. Dies mag auch ein Grund sein, warum sie in den über 55 Jahren seit ihrer Entdeckung unterschiedlich benannt wurde.

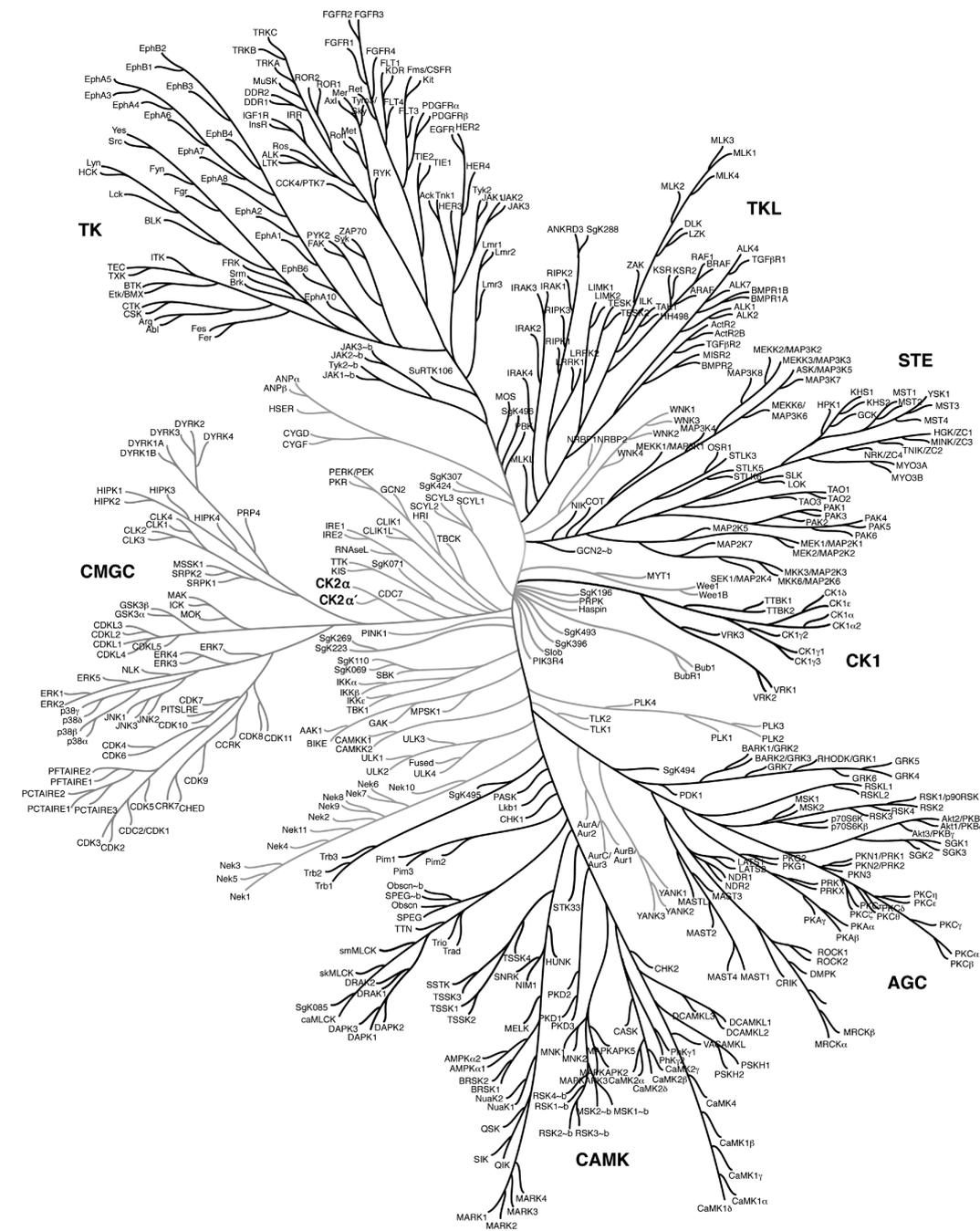


Abbildung 1: Dendrogramm des humanen Kinoms. Dargestellt sind 491 der 518 Proteinkinasen. Die restlichen 27 Proteinkinasen werden als „atypische Kinasen“ zusammengefasst und sind hier nicht abgebildet. Die beiden Isoformen α und α' der katalytischen CK2-Untereinheit sind hervorgehoben. Abkürzungen: TK: Tyrosinkinasen; TKL: Tyrosinkinase-ähnliche Kinasen; STE: Kinasen mit Ähnlichkeit zu Steril-7-, Steril-11-, Steril-20-Kinasen aus Hefe; CMGC: Zusammenfassung von CDK (Cyclin-abhängige Kinasen), MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen), GSK3 (Glycogensynthase-Kinase 3-ähnlichen Kinasen) und CLK (CDK-ähnliche Kinasen); CK1: Caseinkinase 1; AGC: Zusammenfassung der Proteinkinasen A, G und C; CAMK: Calmodulin-abhängige Proteinkinasen (Abbildung verändert nach Manning *et al.* (2002)).

Neben dem ursprünglichen Begriff Protein Phosphokinase von Burnett und Kennedy, wurde das Enzym in der Literatur z. B. als Nukleäre Proteinkinase NII (Thornburg und Lindell, 1977), eIF-2 β -Kinase (DePaoli-Roach *et al.*, 1981), Troponin-T-Kinase (Villar-Palasi und Kumon, 1981), Caseinkinase TS (Deana *et al.*, 1978) oder auch Caseinkinase II (Prowald *et al.*, 1984) bezeichnet. Auf einer Konferenz führender CK2-Forscher im Jahre 1994 wurde schließlich beschlossen, Proteinkinase CK2 oder das Akronym CK2 als Bezeichnungen für diese Proteinkinase zu verwenden (Ahmed *et al.*, 1994).

Die humane Serin-/Threonin-Proteinkinase CK2 bildet eine heterotetramere Quartärstruktur, für die sich in der Literatur die Bezeichnung Holoenzym durchgesetzt hat. Es liegt als Komplex aus katalytischer Untereinheit (CK2 α) und nicht-katalytischer Untereinheit (CK2 β) in einer $\alpha_2\beta_2$ -Stöchiometrie vor. Neben der am häufigsten vorkommenden, 44 kDa großen katalytischen α -Untereinheit gibt es zwei weitere Isoformen dieser Untereinheit (α' , 38 kDa (Lozeman *et al.*, 1990) und α'' , 44 kDa (Shi *et al.*, 2001)). Diese Isoformen zeigen ebenfalls katalytische Aktivität, sind aber weniger gut untersucht (Litchfield *et al.*, 2001). Die 26 kDa große β -Untereinheit besitzt eine Zinkfingerdomäne, die eine Dimerisierung zweier β -Monomere ermöglicht. Das Dimer bildet den Ankerpunkt für die Oligomerisierung des Enzyms (Graham und Litchfield, 2000). An der β -dimeren Kernstruktur binden zwei α -Monomere in der Weise, dass sie im Komplex keinen direkten Kontakt miteinander haben (Niefind *et al.*, 2001). Diese Oligomerisierung findet spontan statt und ist sehr stabil. Es gibt aber auch Hinweise, dass die CK2 *in vivo* nicht ausschließlich als tetrameres Holoenzym vorliegt. Seinen isolierten Untereinheiten könnte auch eine physiologische Funktion zukommen (Faust und Montenarh, 2000; Bibby und Litchfield, 2005). Weiterhin konnten ringförmige oder filamentöse Aggregate mehrerer CK2-Holoenzyme *in vitro* nachgewiesen werden (Valero *et al.*, 1995; Niefind und Issinger, 2005).

Die Klassifizierung der CK2 beruht auf der katalytisch aktiven α -Untereinheit. Aufgrund ihrer Sequenzhomologie wird sie der Familie der CMGC-Proteinkinasen zugeordnet (siehe Abbildung 1). Diese umfasst die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen), die Glycogensynthase-Kinase 3-ähnlichen Kinasen (GSK3) und CDK-ähnlichen Kinasen (CLK). Die nächsten Verwandten der CK2 in dieser Familie sind die MAP-Kinasen, die CDKs und die GSK3 (Manning *et al.*, 2002). Die Sequenzidentität der CK2 α zu diesen Enzymen liegt bei bis zu 35 %.

Im Gegensatz zu anderen Vertretern der Proteinkinasen weist die CK2 einige auffällige Besonderheiten auf. In den letzten Jahren ist die Anzahl der experimentell bestätigten Substrate nahezu exponentiell gestiegen und liegt mittlerweile bei deutlich über 300 (Meggio und Pinna, 2003; Salvi *et al.*, 2009). Diese als „Pleiotropie“ bezeichnete Eigenschaft ist für Proteinkinasen äußerst ungewöhnlich und spiegelt sich in den bereits erwähnten, multiplen Bezeichnungen für dieses Enzym wider. Die meisten Proteinkinasen zeigen keine oder lediglich eine niedrige basale Aktivität. Ihre Aktivierung ist meist streng reguliert und erfolgt durch einen Reiz, einen Effektor oder einen physiologischen Status (Blume-Jensen und Hunter, 2001). Im Gegensatz dazu besitzt die CK2 eine hohe zelluläre Aktivität (Pinna, 1990). Sowohl die isolierte CK2 α , als auch das tetramere Holoenzym sind konstitutiv aktiv. Bislang ist auf Proteinebene kein für Kinasen typischer Mechanismus bekannt, der die CK2-Aktivität reguliert. Stattdessen hat sich in den letzten Jahren ein mehrschichtiges Modell für die Regulation der CK2 etabliert, das den Großteil der empirischen Erkenntnisse über die komplexe Regulation der CK2 einbezieht und erste Erklärungsversuche bietet (Filhol und Cochet, 2009). Demnach ist das Niveau der CK2-Aktivität einer spatiotemporalen Regulation unterworfen. Beispielsweise kann sich die Substratspezifität der CK2 α nach Tetramerisierung zum Holoenzym oder in höheren Assoziationsformen ändern (Meggio *et al.*, 1992; Valero *et al.*, 1995; Salvi *et al.*, 2006). Dieser Effekt wurde auch nach intermolekularer Assoziationen mit diversen Substraten oder Bindepartnern beobachtet (Olsten und Litchfield, 2004; Olsten *et al.*, 2005). Auf diese Weise könnte die Aktivität, bezogen auf ein bestimmtes Substrat, durch allosterische Effektoren moduliert werden. Außerdem findet eine dynamische Lokalisierung der CK2, bzw. ihrer Untereinheiten zwischen verschiedenen subzellulären Kompartimenten statt, vorwiegend zwischen Kern und Zytoplasma (Faust und Montanarh, 2000). So kann die Aktivität der CK2 in bestimmten Kompartimenten variiert werden, während die Gesamtaktivität der Zelle konstant bleibt. Ein weiteres atypische Merkmal der CK2 ist ihre duale Cosubstratspezifität für ATP und GTP (Niefind *et al.*, 1999). Beide Moleküle können nahezu gleichwertig als Phosphatdonoren genutzt werden. Mit Ausnahme der Src-Kinase (Graziani *et al.*, 1983) und der EGF-Rezeptorkinase (Carpenter *et al.*, 1979) ist dies keiner anderen Proteinkinase möglich. Neue Untersuchungen zeigen außerdem, dass die CK2 unter gewissen Umständen neben Serin- und Threonin- auch Tyrosinreste phosphorylieren kann. Neben der dualen Cosubstrat- könnte sie also auch eine duale Substratspezifität besitzen (Vilk *et al.*, 2008).

Generell ist die CK2 α acidophil, d. h. die Sequenzumgebung des Substrats, in der sich der zu phosphorylierende Rest (n) befindet, muss saure Aminosäuren aufweisen.

Eine minimale Konsensussequenz für Substrate lautet (n)-X-X-(D/E/Sp/Tp) (Meggio und Pinna, 2003). In Position (n+3) scheint eine negativ geladene Aminosäureseitenkette essentiell für die Substraterkennung zu sein. Diese kann auch durch ein phosphoryliertes Serin (Sp) oder Threonin (Tp) dargestellt werden. Weitere negative Ladungen, v. a. in Position (n+1) sind förderlich. Als Modellsubstrat zur Untersuchung der CK2-Aktivität hat sich in mehreren Arbeitsgruppen das Peptid mit der Sequenz RRRDDDSDDD durchgesetzt (Kuenzel *et al.*, 1987; Olsen *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2010), das auch in dieser Arbeit Verwendung findet.

Zur β -Untereinheit der CK2 findet sich, ganz im Gegensatz zur α -Untereinheit, kein Homolog im humanen Proteom. Sie zeigt aber eine extrem hohe Konservierung zwischen den verschiedenen Spezies (Allende und Allende, 1995), was eine wichtige funktionelle Rolle für dieses Protein impliziert. In der Literatur wird sie bisweilen als „regulatorische Untereinheit“ beschrieben, da sie die Substratspezifität beeinflussen und so die Aktivität des CK2-Holoenzym modulieren kann (Meggio *et al.*, 1992; Tiganis *et al.*, 1993; Salvi *et al.*, 2006). Andererseits wird aus der Kristallstruktur des Holoenzym ersichtlich, dass CK2 β vermutlich keinen direkten Einfluss auf die katalytischen Schlüsselstrukturen der CK2 α hat (Niefind *et al.*, 2001). Eine Rolle als „Kontaktvermittler“ für Substrate scheint für CK2 β denkbar. Unstrittig ist bislang, dass mit der CK2 β -induzierten Oligomerisierung eine drastisch erhöhte Stabilität und eine verminderte Proteasesensitivität einhergeht (Meggio *et al.*, 1992).

1.2. Die CK2 beeinflusst Biorhythmus, Zellwachstum und Apoptose

Es sprechen mehrere Indizien für eine wichtige physiologische Rolle der CK2. Ihre Aminosäuresequenz ist über Speziesgrenzen hinweg hochkonserviert. Darüber hinaus kann CK2-Aktivität nahezu in allen Geweben, Zelltypen und in vielen Zellkompartimenten nachgewiesen werden. Auch die große Anzahl an Interaktionspartnern, sowie ihre konstitutive Aktivität legen eine wichtige Rolle nahe. Im Folgenden werden kongruente Erkenntnisse auf Schlüsselfunktionen der CK2 im zellulären Kontext hervorgehoben. Auf Wirkungen der CK2 innerhalb verschiedener Signaltransduktionswege und deren Konsequenzen wird weiter unten eingegangen.

Die CK2 unterscheidet sich funktionell von den meisten anderen Proteinkinasen, die ihre Aufgabe an einer spezifischen Stelle innerhalb eines streng hierarchisch gegliederten „vertikalen“ Signaltransduktionsweges in binärem Modus ausüben. Meggio und Pinna formulierten die Einschätzung, dass die Informationsübertragung durch die CK2 vielmehr auf lateraler Ebene stattfindet und mehrere Signalwege verknüpft (Meggio und Pinna, 2003). Der CK2 könnte so eine grundlegende

Bedeutung für basale Zellfunktionen zukommen. Ihr ubiquitäres Vorkommen, ihre hohe konstitutive Aktivität und ihre über 300 Substrate legen die Vermutung nahe, dass die CK2 maßgeblich daran beteiligt ist, das Phosphoproteom auf einem lebenswichtigen Niveau zu halten (Barz *et al.*, 2003). Metaphorisch ausgedrückt kommt der CK2 damit eher die Rolle des teamorientierten Spielers als die des hochspezialisierten Torjägers zu.

Im Gegensatz zu dieser eher globalen, recht unspezifischen Aufgabe häufen sich aktuell Ergebnisse, die der CK2 eine Rolle im Biorhythmus zuweisen. So wurde bei *Drosophila melanogaster* eine hohe Expression von CK2 α im Zytoplasma von Neuronen detektiert, die eine Schrittmacherfunktion für die innere Uhr besitzen. Heterozygot CK2 α -defiziente Fruchtfliegen haben einen sogenannten „timekeeper“-Phänotyp: Sie zeigen eine um ca. 1 h verlängerte Rhythmik (Lin *et al.*, 2002). Ergebnisse ähnlicher *in vivo*-Studien in Pflanzen (*Arabidopsis*) (Sugano *et al.*, 1999), Pilzen (*Neurospora*) (Yang *et al.*, 2002), Mäusen (Tsuchiya *et al.*, 2009) und in humanen Zellen (Maier *et al.*, 2009) zeigen ebenfalls einen direkten Zusammenhang von CK2-Aktivität und Biorhythmus. Die CK2 scheint ein wichtiges, konserviertes Element zu sein, das die Steuerung des Biorhythmus in diesen drei phylogenetischen Reiche verbindet.

Die lebenswichtige Bedeutung der CK2 für diverse Organismen wurde durch Stilllegung der Expression der CK2-Gene nachgewiesen. Bei Mäusen führte sowohl ein „knockout“ von CK2 β (Buchou *et al.*, 2003), als auch von CK2 α (Lou *et al.*, 2008) zu embryonaler Letalität. Im letzten Fall starben die Mäuse in der Embryogenese mit Entwicklungsdefekten in Herz und Neuralröhre (Seldin *et al.*, 2008). Die Deletion von CK2 α' in männlichen Mäusen konnte während der Embryonalentwicklung von CK2 α kompensiert werden, führte später aber zu defekter Spermatogenese und Unfruchtbarkeit (Xu *et al.*, 1999b; Escalier *et al.*, 2003). Deletionsexperimente mit *Saccharomyces cerevisiae* (Glover, 1998) und humanen Fibroblasten (Lorenz *et al.*, 1994) bestätigten die lebenswichtige Funktion der CK2. Abwesenheit der CK2-Aktivität führte in diesen Experimenten zum Zellzyklusarrest. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von eIF5 („eukaryotic translation initiation factor 5“) durch CK2 ein essentielles Ereignis für das Fortschreiten des Zellzyklus darstellt (Homma und Homma, 2008). Bei dieser Untersuchung konnte die funktionelle Aktivierung der CK2 mit einer Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern korreliert werden. Diese Erkenntnisse vermuten, dass der CK2 eine tragende Rolle in der Regulation des Zellzyklus und der Zellproliferation zukommt.

Andere Hinweise deuten auf eine Schlüsselfunktion der CK2 als negativer Regulator der Apoptose hin. In der Apoptose spielen spezifische proteolytische Ereignisse eine zentrale Rolle, die von Caspasen ausgeführt werden. Für einige Caspase-Substrate wurde gezeigt, dass deren Empfindlichkeit für Caspase-vermittelte Degradation nach Phosphorylierung durch die CK2 stark herabgesetzt ist (Desagher *et al.*, 2001; Ruzzene *et al.*, 2002). Verantwortlich dafür könnte eine ähnliche Konsensussequenz von Caspase- und CK2-Substraten sein (Litchfield, 2003). Zusätzlich kann die CK2 die Aktivität von Caspasen auch direkt hemmen. Eine Phosphorylierung der murinen Pro-Caspase-9 durch CK2 beispielsweise schützt vor deren Abbau durch Caspase-8 (McDonnell *et al.*, 2008). Des Weiteren verhindert eine CK2-vermittelte Phosphorylierung der Caspase 2 deren Dimerisierung und verhindert so ihre Aktivierung (Shin *et al.*, 2005). Die Phosphorylierung von ARC („apoptose repressor with caspase recruitment domain“) durch CK2 ist Voraussetzung für seine effektive Hemmung der Caspase-8 (Li *et al.*, 2002). Die postulierte Korrelation der CK2-Aktivität und der Unterdrückung der Apoptose konnte durch Zellkulturexperimente belegt werden, in denen die Aktivität der CK2 auf ein leicht erniedrigtes Niveau gebracht wurde (Unger *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). Diese Zellen waren deutlich sensitiver gegenüber Apoptose-induzierenden Reizen als Zellen mit normalem Niveau an CK2-Aktivität. Umgekehrt machte eine Überexpression der CK2 die Zellen resistenter gegen diese Reize (Ahmad *et al.*, 2008).

2. Inhibition der Proteinkinase CK2

2.1. Die CK2 als pharmazeutisches Zielmolekül

Die CK2 wurde mit einer Reihe von Erkrankungen in direkte oder mittelbare Verbindung gebracht, von denen einige in Tabelle 1 aufgelistet sind. Dabei wurden verschiedene Arten der Dysregulation essentieller Informationsübertragung nachgewiesen. Im Falle viraler Erkrankungen wird die CK2-Aktivität teilweise parasitär von viralen Proteinen genutzt (Filhol und Cochet, 2009). Die enorme Anzahl der gefundenen Implikationen dieses Enzyms basiert vermutlich auf der erläuterten Vielzahl an Substraten und den daraus resultierenden pleiotropen Effekten. Erkenntnisse zu der Rolle der CK2 in diesen und anderen Krankheiten werden in einem Übersichtsartikel von Guerra und Issinger (2008) diskutiert. Die meisten und am besten erforschten Hinweise auf eine pathologische Wirkung dysregulierter CK2 gibt es jedoch im Kontext von Krebserkrankungen. Dieser Zusammenhang wird im Folgenden aus mehreren Perspektiven beleuchtet, die sowohl rationale als auch empirische Fakten einbeziehen.

Tabelle 1: Übersicht humaner nicht-onkologischer Erkrankungen, bei denen es Hinweise auf eine Beteiligung der CK2 gibt.

Krankheitsgebiet	Beispiele / Erreger	Referenz
Neurodegeneration	Alzheimer Parkinson Spongiforme Enzephalopathie	(Blanquet, 2000) (Ryu <i>et al.</i> , 2008) (Chen <i>et al.</i> , 2008)
Entzündungsprozesse	Autoimmunerkrankungen (z.B. RA) Glomerulonephritis Mukoviszidose	(Shimoyama <i>et al.</i> , 2001) (Yamada <i>et al.</i> , 2005) (Pagano <i>et al.</i> , 2010)
Protozoeninfektionen	Chagas (<i>Trypanosoma cruzi</i>) Malaria (<i>Plasmodium falciparum</i>) Toxoplasmose (<i>Toxoplasma gondii</i>)	(Augustine <i>et al.</i> , 2006) (Hora <i>et al.</i> , 2009) (Delorme <i>et al.</i> , 2003)
Virale Infektion	EBV HIV HPV	(Medina-Palazon <i>et al.</i> , 2007) (Caples <i>et al.</i> , 2006) (Chien <i>et al.</i> , 2000)
Vaskuläre Erkrankungen	Arteriosklerose	(Harvey <i>et al.</i> , 2007)

2.1.1. Erhöhte CK2-Aktivität beeinflusst Hauptmerkmale der Onkogenese

Viele Jahre der Krebsforschung auf medizinisch-anatomischer, zellulärer, biochemischer und molekulargenetischer Ebene haben eine unermessliche Anhäufung von Fakten und Einschätzungen zur Entstehung der Krankheit hervorgebracht, die heutzutage in ihrer Komplexität nicht mehr vollständig zu erfassen sind. Folglich muss versucht werden, die Onkogenese mit einigen Kernprinzipien zu beschreiben, die den meisten Krebserkrankungen zugrunde liegen. Allgemein wird davon ausgegangen, dass die Entstehung von Krebs ein mehrstufiger Prozess ist, der zum Erwerb einiger Defekte und Fähigkeiten führt („cancer acquired capabilities“), die zusammen eine onkogene Transformation bewirken. Neben der modifizierten Reaktion auf äußere Reize der Mikroumgebung muss es zum Verlust zellautonomer Kontrollmechanismen kommen. Von Hanahan und Weinberg wurden Anfang des Jahrtausends sechs Hauptmerkmale („hallmarks“) für die Manifestation eines Tumors formuliert: 1) Autarkie bezüglich Wachstumssignalen; 2) Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen; 3) Unterdrückung von Apoptose; 4) Unbegrenztes Replikationspotential; 5) Nachhaltige Angiogenese und 6) Invasives Wachstum und Metastasierung (Hanahan und Weinberg, 2000). Viele dieser Fähigkeiten werden durch ein erhöhtes CK2-Niveau begünstigt. Wie bereits erwähnt, stört eine gesteigerte CK2-Aktivität die Kontrolle des Zellzyklus und des Zellwachstums und hat antiapoptotische Wirkungen. In der parasitären Rindererkrankung Theileriose (Ostafrika-Fieber) wurde mit diesen Erkenntnissen übereinstimmend eine erhöhte CK2-Aktivität festgestellt, die mit einer starken Proliferation von Lymphozyten

einhergeht (ole-MoiYoi, 1995). Weiterhin ist ein Zusammenhang zwischen CK2-Aktivität und Angiogenese gefunden worden (Mottet *et al.*, 2005; Kramerov *et al.*, 2008).

Neben diesen direkten Verknüpfungen von Krebsmerkmalen und CK2-Aktivität gibt es weitere Verknüpfungen, deren kausale Zusammenhänge teilweise indirekt und weniger eindeutig sind. Beispielsweise wird ein gestörter Biorhythmus, dessen Regulation die CK2 beeinflussen kann, mit Krebserkrankungen in Verbindung gebracht (Fu und Lee, 2003). Weiterhin wurde die CK2 kürzlich als ein wichtiger Regulator von Entzündungsreaktionen postuliert (Singh und Ramji, 2008), was auf ihre weiter unten beschriebene Rolle im NF- κ B-Weg zurückzuführen sein könnte (Abbildung 2 C). Die Bedeutung von Entzündungsprozessen in der Onkogenese wird schon länger diskutiert (Mantovani *et al.*, 2008). Diese Beispiele zeigen, dass viele der durch CK2-Aktivität beeinflusste zelluläre Merkmale mit Hauptmerkmalen der Onkogenese übereinstimmen.

2.1.2. CK2-Substrate fördern die Tumorentstehung und -ausbreitung

Mehrere Untersuchungen legen eine direkte Verknüpfung von CK2 und krebsrelevanten zellulären Prozessen nahe. So interagiert die CK2 über verschiedene Mechanismen mit mehreren Proteinen und Signaltransduktionswegen, die direkte Auswirkungen auf die Onkogenese haben. Dadurch lassen sich einige der von CK2 beeinflussten Krebsmerkmale auf molekularer Ebene erklären.

Der Wnt-Signalweg (Abbildung 2 A) treibt durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Embryogenese, die Zelldifferenzierung und die Zellteilung voran. Zielgene dieses Signalwegs gehören zu den am häufigsten mutierten Genen in menschlichen Tumoren. Der klassische Wnt-Signalweg wird durch einen extrazellulären Wnt-Faktor aktiviert, der an einen Transmembranrezeptor der Fizzeld Familie (Fz) bindet. Danach kommt es zu einer Dimerisierung von Fz mit dem Corezeptor LRP und einer Aktivierung des zytoplasmatischen Proteins Dishevelled (Dsh). Die Phosphorylierung von Dsh wird durch CK2 vermittelt und ist wichtig für dessen Hemmwirkung auf die Glykogensynthase-Kinase3 β (GSK3 β). Durch eine Hemmung der GSK3 β kann β -Catenin das Wnt-Signal bis in den Zellkern weiterleiten, anstatt nach GSK3 β -Phosphorylierung abgebaut zu werden (Willert *et al.*, 1997). Inzwischen wird davon ausgegangen, dass β -Catenin und sein Rezeptor, der Transkriptionsfaktor TCF/LEF, selbst Substrate der CK2 sind und CK2-vermittelte Phosphorylierung ihre Aktivität fördern (Wang und Jones, 2006). Durch Verstärkung des Wnt-Signals wird die Expressionsstärke der Wnt-Zielgene gesteigert. Unter diesen Zielgenen befinden

sich auch mehrere Proto-Onkogene. Eine gesteigerte CK2-Aktivität könnte über die geschilderten lateralen Mechanismen zu einer Verstärkung des Wnt-Signalwegs führen und über eine vermehrte Expression von Proto-Onkogenen die Onkogenese begünstigen (Seldin *et al.*, 2005; Dominguez *et al.*, 2009).

Weitere Substrate der CK2 finden sich im PI3K/Akt-Weg (Abbildung 2 B). Allgemein hat die Aktivierung dieses Signalwegs eine anti-apoptotische Wirkung (Sale und Sale, 2008; Chalhoub und Baker, 2009). PTEN („phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10“) ist ein Tumorsuppressor und eines der CK2-Substrate, die in diesem hierarchischen Weg auf einer hohen Ebene angesiedelt sind. In aktiver Form stellt PTEN einen negativen Regulator dieses Wegs da. Phosphorylierung durch die CK2 hat sowohl negative Auswirkungen auf seine Stabilität, als auch auf seine Phosphataseaktivität (Torres und Pulido, 2001). Eine zweite zentrale Komponente dieses Signalwegs ist Akt, die auch Protein Kinase B genannt wird. Eine CK2-vermittelte Phosphorylierung potenziert die Aktivität von Akt (Di Maira *et al.*, 2005). Sie unterstützt vermutlich die Komplexbildung von Akt mit dem Chaperon Hsp90, was zu einer Stabilisierung des aktiven Status von Akt führt (Sato *et al.*, 2000). Beide Effekte der CK2, die Abschwächung von PTEN und die Aktivierung von Akt, führen zu einer Verstärkung des PI3K/Akt-Wegs. Zusammen mit der beschriebenen Hemmung von Caspasen kommt der CK2 so eine globale Rolle als anti-apoptotischem Regulator zu, dessen dysregulierte Aktivität onkogenes Potential entwickelt.

Ein weiterer Signalübertragungsweg, der durch CK2-Aktivität moduliert werden kann, ist der NF- κ B-Weg (Abbildung 2 C). Neben seiner Hauptaufgabe in Entzündungsprozessen wurde dieser Weg auch mit pro-proliferativer und anti-apoptotischer Aktivität sowie Zelltransformation in Verbindung gebracht. Dadurch beeinflusst er einige der angesprochenen Hauptkennzeichen der Onkogenese (Ravi und Bedi, 2004). CK2 verstärkt auch in diesem Fall den Signalweg über verschiedene Mechanismen durch laterale Interaktion mit IKK, I κ B und NF- κ B (Dominguez *et al.*, 2009).

Im Kontext dieser kaskadischen Signalweiterleitungen zeigt sich abermals, dass CK2 keine eindeutig in eine spezifische physiologische Funktion eingebundene Aufgabe besitzt. Die beschriebenen Signalwege beeinflussen hauptsächlich Zelldifferenzierung, -proliferation und -überleben, also genau die zellulären Eigenschaften, deren fehlerhafte Ausprägungen in der Onkogenese zu beobachten sind. Der Einfluss der CK2 ist hier lateral, führt also zu einer Modulation des „vertikalen“ Informationsflusses und potenziert in allen Fällen den ursprünglichen Reiz (Abbildung 2).

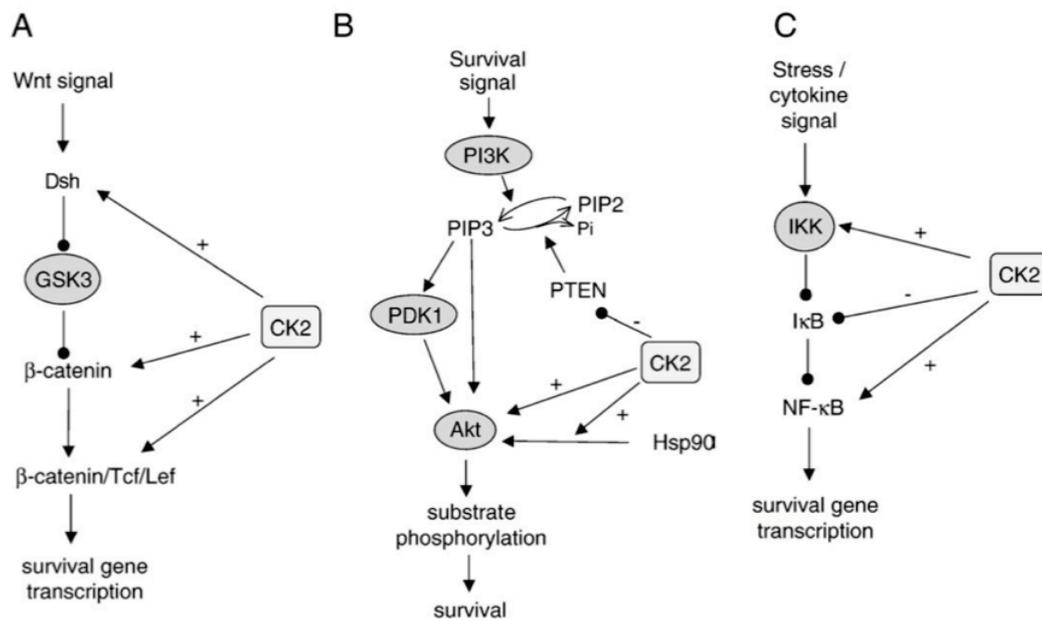


Abbildung 2: Laterale Wirkung von CK2 auf (A) Wnt-, (B) Akt-, und (C) NF-κB- Signaltransduktion. Negative Effekte (-) sind durch punktköpfige Pfeile gekennzeichnet und basieren auf Inhibition bzw. auf verstärktem Abbau. Positive Effekte (+) sind durch normale Pfeile gekennzeichnet und basieren auf verstärkter Stabilität und/oder Aktivität (verändert nach Ruzzene und Pinna (2010)).

CK2 stellt somit eine Art Hauptregulator und gleichzeitig ein Bindeglied essentieller Zellfunktionen dar. Es ist deshalb wenig verwunderlich, dass eine Änderung seiner zellulären Gesamtaktivität tiefgreifende Auswirkungen hat. Tatsächlich wurde in Untersuchungen vieler Krebsarten eine Korrelation zwischen gesteigerter CK2-Aktivität und Induktion, bzw. Verstärkung der beschriebenen Signalwege festgestellt (Seldin *et al.*, 2005; Guerra, 2006; Di Maira *et al.*, 2009; Dominguez *et al.*, 2009).

Die meisten Substrate der CK2 sind nicht in solche Signalwege eingebunden. Einige sind aber direkt an der Krebsentstehung beteiligt. Der Transkriptionsfaktor p53 wird als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane, 1992). Er vermittelt nach Induktion durch Zellstress die Biosynthese von Proteinen, die den Zellzyklus stoppen, die Angiogenese hemmen, die Apoptose induzieren oder zum DNA-Reparatursystem der Zelle gehören. Die p53-vermittelten Effekte wirken insgesamt einer Onkogenese entgegen und p53 wird als eines der wichtigsten Tumorsuppressorproteine angesehen (Brown *et al.*, 2009). Tatsächlich scheint die Inhibition von p53 ein Schlüsselfaktor von Krebs zu sein, da in über 50 % der humanen Tumoren eine Veränderung des p53-Gens vorliegt, die seine Wirkung abschwächt oder ganz unterdrückt (Montenarh, 1997). Neben einer direkten Phosphorylierung von p53 durch CK2 wurden nicht-enzymatische Interaktionen von CK2α und CK2β mit p53 gefunden, welche die

Funktion von p53 und der CK2 beeinflussen. Daneben interagiert die CK2 auch mit p53-regulierenden Enzymen, wie z. B. Mdm2 (Allende-Vega *et al.*, 2005). Alle diese CK2-vermittelten Effekte hemmen die Aktivität von p53. Ein weiteres krebsrelevantes CK2-Substrat ist der Tumorsuppressor PML („promyelocytic leukemia tumor suppressor“)(Salomoni und Pandolfi, 2002). Ein Ubiquitin-vermittelter Abbau von PML in Krebszellen ist die direkte Folge einer Phosphorylierung durch gesteigerte CK2-Aktivität (Scaglioni *et al.*, 2008).

So unterschiedlich die Mechanismen der Interaktion zwischen der CK2 und ihren Substraten auch sind, das Resultat ist in den beschriebenen Fällen immer dasselbe: In gesunden Zellen ist die Aktivität der CK2 wichtig für die normale Zellfunktion. Ihre Erhöhung führt allerdings zu einer Schwächung zellulärer Abwehrmechanismen gegen die Entstehung von Krebs und begünstigt Zustände, die eine Onkogenese fördern.

2.1.3. Das CK2-Niveau ist in Krebszellen erhöht

Untersuchungen des CK2-Niveaus in Krebszellen liefern die bisher eindeutigsten Hinweise auf eine Rolle der CK2 im Krebsgeschehen. In jedem Krebsgewebe, das bislang auf CK2 untersucht wurde, fand man eine verstärkte Expression der CK2 oder eine erhöhte CK2-Aktivität verglichen mit entsprechendem gesundem Gewebe (Trembley *et al.*, 2009). Zum Beispiel wurde in humanen Mammakarzinomen eine CK2-Aktivität festgestellt, die im Durchschnitt um den Faktor 10 höher war als in gesundem Brustgewebe (Landesman-Bollag *et al.*, 2001a; Landesman-Bollag *et al.*, 2001b). Auch die CK2 α -Konzentration in diesen Tumoren war deutlich erhöht. In einer anderen Studie wurde die Aktivität und die Expression von CK2 in histologisch unterschiedlichen Nierentumoren mit ipsilateralem Normalgewebe verglichen (Siemer *et al.*, 1996). Bei der quantitativen Untersuchung der Untereinheiten wurde in allen Nierentumoren ein Anstieg sowohl der α -, als auch der β -Untereinheit detektiert. Die Aktivität der CK2 war in den unterschiedlichen Nierentumoren durchschnittlich um den Faktor 2 erhöht. Zu der größten Aktivitätszunahme von 375 % kam es beim malignen Nephroblastom. Beim benignen Onkozytom betrug die Zunahme dagegen lediglich 59 %. Außerdem wurden in diesen Tumoren Hinweise auf eine heterogene Expressionsstärke der beiden CK2-Untereinheiten im Vergleich zum Normalgewebe gefunden (Stalter *et al.*, 1994), die auch in anderen Untersuchungen nachgewiesen werden konnten (Faust *et al.*, 1999). Ein erhöhtes CK2-Niveau wurde auch in einer Vielzahl weiterer Krebserkrankungen festgestellt (Guerra und Issinger, 2008), u. a. bei Kolonkarzinomen (Münstermann *et al.*, 1990), bei Leukämie (Roig *et al.*, 1999), in Tumoren der Lunge (Daya-Makin *et al.*, 1994), des

Endometriums (Llobet *et al.*, 2008; Pallares *et al.*, 2009), sowie der Prostata (Yenice *et al.*, 1994; Laramas *et al.*, 2007). Verschiedene Studien deuten darüber hinaus auf einen direkten Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der CK2-Aktivitätssteigerung und der Malignität der Krebserkrankung hin (Tawfic *et al.*, 2001; Unger *et al.*, 2004). Aufgrund dieser Erkenntnisse wird CK2 α als prognostischer Marker für diverse Krebsarten diskutiert (Kim *et al.*, 2007; Laramas *et al.*, 2007).

Bislang ist noch unklar, wie und auf welcher Ebene der neoplastischen Transformation die Steigerung der CK2-Aktivität einsetzt. Sie scheint allerdings keine Folge der starken Proliferation von Krebszellen zu sein, da bereits in präkanzeröser Dysplasie erhöhte CK2-Aktivität festgestellt werden konnte (Faust *et al.*, 1999). Anders als bei krebserrelevanten Onkogenen oder Tumor-Suppressorgenen wurde interessanterweise bislang keine Mutation des CK2-Gens gefunden, die zu einer Hyperaktivität des Enzyms führt. Hauptmechanismus der Aktivitätssteigerung der CK2 in Tumorzellen scheint demnach die Erhöhung der Enzymmenge aufgrund einer verstärkten Expression der CK2-Gene zu sein. Daneben könnte auch die bislang unvollständig verstandene Regulation der CK2 eine Rolle spielen (Guerra und Issinger, 1999, 2008).

Neben diesen deskriptiven Studien wurde in komplementären Untersuchungen die Expression der CK2 in Modellsystemen künstlich erhöht, um die pathophysiologischen Konsequenzen zu beobachten. Transgene Mäuse mit gesteigertem lymphozytärem CK2-Expressionsniveau zeigten eine deutlich erhöhte Inzidenz für Leukämie. Sie entwickelten ab dem 6. Lebensmonat Lymphome mit einer Inzidenz von 6-15 % pro Jahr (Seldin und Leder, 1995; Kelliher *et al.*, 1996). Wenn zusätzlich zu CK2 α ein Onkogen, z. B. *c-myc* oder *TAL-1*, überexprimiert wird, verstärkte das den pathogenen Phänotyp verglichen mit der jeweils singulären Überexpression erheblich. Solch ein synergistischer onkogener Effekt lässt sich auch durch Hemmung des Tumorsuppressors p53 in Kombination mit erhöhtem CK2-Niveau feststellen. Mäuse, die heterozygot für p53 sind und eine gesteigerte CK2 α -Expression besitzen, entwickeln T-Zell Lymphome im Durchschnitt doppelt so schnell wie p53-heterozygote Mäuse (Landesman-Bollag *et al.*, 1998). Andere transgene Mäuse mit einer verstärkten CK2 α -Expression in den Brustdrüsen entwickelten in diesem Gewebe rasch Hyper- und Neoplasien. In den transgenen Mausmodellen mit ausschließlich erhöhter CK2 α -Expression, war eine Latenz in der Tumorentwicklung festzustellen (Landesman-Bollag *et al.*, 2001a). Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte CK2-Aktivität für die Onkogenese alleine nicht hinreichend ist. Es wird vielmehr diskutiert, dass die Transformation dieser Mäuselymphozyten durch einen mehrstufigen Prozess ausgelöst wurde (Xu *et al.*, 1999a; Landesman-Bollag *et al.*, 2001b).

Die beobachtete schnellere Onkogenese nach zusätzlich gesteigerter Onkogen- bzw. verminderter Tumorsupressorgen-Expression unterstützt diese Hypothese. In Kombination mit den zuvor beschriebenen Erkenntnissen kann man annehmen, dass eine übermäßige CK2-Aktivität ein zelluläres Milieu schafft, welches dem unkontrollierten Wachstum Vorschub leistet und der Apoptose entgegenwirkt. Solche Zellen sind der meisten natürlichen Abwehrmechanismen gegen sekundäre, kanzerogene Ereignisse beraubt und erliegen schneller einer neoplastischen Transformation. Strenggenommen stellt die CK2 selbst demnach kein Onkoprotein dar (Trembley *et al.*, 2009). Falls nicht schon zu Beginn der Onkogenese die Abhängigkeit von erhöhter CK2-Aktivität besteht, scheinen viele Tumorzellen diese mit fortschreitender Progression zu entwickeln (Ruzzene und Pinna, 2010).

2.1.4. Die Hemmung der CK2 führt Krebszellen in die Apoptose

In verschiedenen Studien konnte durch eine Hemmung der CK2 das Wachstum von Tumorzellen begrenzt oder sogar eine Remission des Tumorphänotyps erreicht werden. Auswirkungen einer Unterdrückung der CK2-Biosynthese und einer daraus resultierenden geringen CK2-Menge im Tumorgewebe wurden beispielsweise im murinen Xenograft-Modell des Prostatakarzinoms untersucht (Slaton *et al.*, 2004). Dort wurde die CK2-Expression *in vivo* durch intratumorale Injektion von antisense RNA gegen CK2 α reduziert. Eine einmalige Administration von 5 μ g antisense RNA reduzierte die Tumorgroße innerhalb von 7 Tagen auf 30-40 %. Eine Dosiserhöhung auf 20 μ g führte nach 7 Tagen zu einer völligen Rückbildung des Tumors. Diese beeindruckenden Ergebnisse bestätigten die Abhängigkeit des Tumors von der CK2 α . Sie klärten aber nicht, ob tatsächlich deren katalytische Aktivität oder nicht-katalytische Wechselwirkungen für die tumorfördernde Wirkung verantwortlich waren. So wertvoll antisense-Oligonukleotide in der Grundlagenforschung sind, so begrenzt ist noch die Möglichkeit, sie zu therapeutischen Zwecken bei Krebserkrankungen einsetzen zu können. Zur klinischen Anwendung werden nach wie vor bevorzugt niedermolekulare Inhibitoren entwickelt. In einigen Experimenten wurde dazu der Effekt zellpermeabler, niedermolekularer CK2-Inhibitoren auf kultivierte Krebszelllinien untersucht. So induzierten DRB (Farah *et al.*, 2003), Emodin (Olsen *et al.*, 2007), TBB (Sarno *et al.*, 2001), TBI (Zien *et al.*, 2005), DMAT (Pagano *et al.*, 2004), IQA (Sarno *et al.*, 2003) und TBCA (Pagano *et al.*, 2007) die Apoptose und wirkten zytotoxisch. Die Effekte dieser ATP-kompetitiven Inhibitoren ergeben sich höchstwahrscheinlich aus der Hemmung der in den Krebszellen erhöhten CK2-Aktivität. Für einige Inhibitoren wie Emodin, TBCA und TBB wurde darüber hinaus

eine Hemmung der Angiogenese nachgewiesen (Kramerov *et al.*, 2008). Eine Senkung der CK2-Aktivität wirkt demnach einigen Hauptmerkmalen der Onkogenese entgegen.

Alle bisherigen Erkenntnisse belegen die Abhängigkeit der Krebserkrankungen von erhöhter CK2-Aktivität. Insgesamt untermauern die aufgeführten Ergebnisse die Annahme, dass in erster Linie die katalytische Aktivität für die pathologischen Effekte des erhöhten CK2-Niveaus in Krebserkrankungen verantwortlich ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der CK2-Aktivität dem Tumor-Phänotyp entgegenwirkt. Die CK2 ist demnach ein attraktives Zielmolekül für die Entwicklung von Wirkstoffen zur therapeutischen Intervention bei Krebserkrankungen.

2.2. Inhibition der Proteinkinase CK2

Einer hohen Aktivität der Proteinkinasen kann auf Proteinebene durch niedermolekulare Wirkstoffe begegnet werden. Die ersten Inhibitoren von Proteinkinasen wurden vor über 25 Jahren identifiziert und zunächst hauptsächlich zur Aufklärung der physiologischen Funktion dieser Enzymklasse eingesetzt (Hidaka *et al.*, 1984). Der überwältigende Erfolg von Imatinib beflügelte die Hoffnung auf einen breiten klinischen Einsatz dieser Wirkstoffgruppe gegen onkologische Erkrankungen (Druker, 2009). Die Entwicklung des Proteinkinase-Inhibitors Imatinib zielte darauf ab, das Onkoprotein Bcr-Abl zu hemmen. Seit diesen bahnbrechenden Arbeiten hat die Erforschung und Entwicklung von Proteinkinase-Inhibitoren stark an Bedeutung gewonnen. Schätzungen zufolge beschäftigen sich zur Zeit über 30 % der industriellen Programme zur Wirkstoffentwicklung mit Inhibitoren von Proteinkinasen (Cohen, 2002b; Eglén und Reisine, 2009). Diese Wirkstoffklasse ist damit zu einem der bedeutendsten pharmazeutischen Forschungsschwerpunkte geworden.

2.2.1. Molekulare Testverfahren für CK2-Inhibitoren

Um die Potenz eines Inhibitors bestimmen zu können, ist ein verlässlicher und aussagekräftiger Aktivitätstest für das Zielenzym unerlässlich. Die z. Zt. meist genutzte Methode, um die Aktivität von Proteinkinasen zu bestimmen, ist ein radiometrischer Test (Hastie *et al.*, 2006). In publizierten Untersuchungen zur CK2-Aktivität wird fast ausschließlich ein radiometrischer Filterbindungstest als Standardmethode eingesetzt (Bretner *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2009). Dieser basiert auf der Quantifizierung des Transfers [³²P]-markierten γ -Phosphats von ATP auf eine Serylseitenkette eines Peptid- oder Protein-Substrats durch CK2. Ein Peptid, das für viele CK2-Aktivitätstests eingesetzt wird, hat die AS-Sequenz RRRDDDSDDD

und kann über die N-terminalen Arginine an ein Kationenaustauscher-Filterpapier gebunden werden. Nicht umgesetztes γ -[^{32}P]-ATP bindet nicht und kann abgewaschen werden. Die verbleibende Radioaktivität kann quantifiziert werden und ist proportional zur CK2-Aktivität (Hastie *et al.*, 2006). Die radiometrische Detektion des Phosphotransfers ist ein Grundprinzip, das eine Aktivitätsbestimmung nahezu aller Proteinkinasen erlaubt. Zu diesem Zweck muss ein CK2-Substrat verwendet werden, das man zur Analyse z. B. über ionische Wechselwirkungen immobilisieren kann. Weiterhin wird in kurzen Intervallen neues γ -[^{32}P]-ATP benötigt, da die Halbwertszeit des ^{32}P -Isoptops gering ist. Somit fällt ständig radioaktiver Abfall an. Ein radiometrischer Kinasetest ist daher nur mit großem Aufwand automatisierbar und ist besonders bei geringem Probendurchsatz recht aufwendig.

Es gibt mehrere alternative Methoden, die Aktivität von Proteinkinasen nicht-radiometrisch zu bestimmen (Jia *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2008). Zur effektiven Messung der CK2-Aktivität wurde bislang allerdings nur ein einziges nicht-radiometrisches Testverfahren in der Literatur beschrieben (Hung *et al.*, 2009). Dieses auch kommerziell erhältliche Reagenzenset („CK2 Kinase Assay/Inhibitor Screening Kit“, CycLex, Nagano, Japan) nutzt einen Peroxidase-gekoppelten anti-phospho-p53-Antikörper, der an Ser-46 in p53 bindet, sofern diese Seitenkette durch CK2 phosphoryliert wurde. Dieser Antikörper dient als Reporter in einem homogenen ELISA-Ansatz. Er entwickelt nach Inkubation mit dem chromogenen Substrat Tetramethylbenzidin ein farbiges Produkt, das spektroskopisch detektiert werden kann. Durch Absorptionsmessung kann die Menge an umgesetztem CK2-Substrat quantifiziert werden. Vergleichende Untersuchungen der CK2-Aktivität mit diesem Testverfahren stehen allerdings aus. Bislang sind damit nur wenige semi-quantitative Bestimmungen beschrieben worden (Hung *et al.*, 2009). Daneben existieren indirekte Tests, z. B. eine luminometrische Detektion der Abnahme des Cosubstrats ATP während der Kinasereaktion mittels Luziferase („Kinase-Glo assay“, Promega, Mannheim).

Für die Inhibitionsbestimmungen, die in dieser Arbeit durchgeführt werden sollten, wurde ein Test benötigt, der mehrere Voraussetzungen erfüllt. Er sollte auf Radioisotope verzichten sowie möglichst einfach durchzuführen und dabei reproduzierbar und robust sein. Darüber hinaus sollte er sich zur Reihenuntersuchung von niedermolekularen Verbindungen eignen und im Idealfall die Bestimmung von IC_{50} Werten ermöglichen. Die Ergebnisse sollten nicht nur untereinander vergleichbar sein, sondern auch einen Vergleich zu Literaturdaten ermöglichen. Keiner der veröffentlichten CK2-Inhibitionstests genügte diesen Anforderungen.

2.2.2. Bekannte Inhibitoren der CK2

Bei den bisher potentesten ($IC_{50} < 1 \mu M$) und am besten untersuchten Inhibitoren der CK2 handelt es sich um niedermolekulare Substanzen, welche die Cosubstratbindestelle des aktiven Zentrums adressieren (Abbildung 3). Aktuelle Übersichten zu bisher bekannte Inhibitoren der CK2 bieten Publikationen von Bortolato *et al.* (2008), Battistutta (2009), Cozza *et al.* (2010) sowie Prudent und Cochet (2010). Einige wichtige Verbindungen mit verschiedenen Grundgerüsten werden im Folgenden exemplarisch vorgestellt.

Viele der heute bekannten CK2-Inhibitoren leiten sich vom Benzimidazol-Grundgerüst des DRB (5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol) ab. DRB ist ein Adenosin-Analogon und wurde als einer der ersten CK2-Inhibitoren identifiziert (Zandomeni *et al.*, 1986). Sein hoher IC_{50} Wert von $13 \mu M$ und seine mäßige Selektivität unter verschiedenen Proteinkinasen führten jedoch zu seiner heutigen geringen Relevanz als CK2-Inhibitor. Strukturvariationen von DRB führten hingegen zu potenteren Verbindungen. Dabei zeigte sich, dass der Zuckerrest für die Hemmung keine Rolle spielt, der Austausch der zwei Chlor- gegen vier Brom-Substituenten am Benzimidazol-Grundkörper die inhibitorische Potenz jedoch deutlich steigert (Meggio *et al.*, 1990). Dies führte zur Entwicklung der zwei halogenierten Benzimidazol-Derivate TBI (4,5,6,7-Tetrabrombenzimidazol) und TBB (4,5,6,7-Tetrabrombenzotriazol, Abbildung 3), welche beide einen IC_{50} Wert um $1 \mu M$ besitzen. Wichtiger als die Potenz waren allerdings die gute Zellpermeabilität und die relativ hohe Selektivität, die v. a. TBB in Untersuchungen mit 33 anderen Proteinkinasen zeigte (Sarno *et al.*, 2001). Diese Eigenschaften machten TBB in der Erforschung biologischer Funktionen von CK2 zum Inhibitor erster Wahl. Durch weitere Variation des TBI-Grundgerüsts konnte zuletzt der Inhibitor DMAT (2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabrombenzimidazol) identifiziert werden, dessen IC_{50} Wert im Vergleich zu TBB um knapp eine Zehnerpotenz auf $0,14 \mu M$ gesenkt werden konnte. Er stellt einen der potentesten Vertreter dieser halogenierten Benzimidazol-Derivate dar (Pagano *et al.*, 2004). In einer breit angelegten Selektivitätsuntersuchung fand man allerdings, dass DMAT auch andere Proteinkinasen, z. B. PIM 1 („proto-oncogene serine/ threonine-protein kinase 1“) und DYRK1a („dual-specificity tyrosine-phosphorylated and -regulated kinase 1a“), mit ähnlicher Potenz hemmt (Sarno *et al.*, 2003; Pagano *et al.*, 2008), was seine Bedeutung als selektiver CK2-Inhibitor schmälerte. Aus diesem Grund wird in den letzten Jahren in erster Linie an einer Selektivitätssteigerung der Benzimidazol-Derivate gearbeitet (Pagano *et al.*, 2008).

Mehrere polyphenolische CK2-Inhibitoren konnten aus Pflanzenextrakten isoliert werden. Eine Reihe natürlicher Flavonoide, wie Apigenin (aus *Apium graveolens*, Abbildung 3), Luteolin oder Quercetin zeigen zwar IC_{50} Werte um $1 \mu\text{M}$ (Li *et al.*, 2009), hemmen aber zugleich mehrere andere Proteinkinasen, teilweise sogar deutlich stärker als die CK2. Deutlich selektiver ist Hämatein, das einen IC_{50} Wert von $0,55 \mu\text{M}$ besitzt (Hung *et al.*, 2009). Auch einige Anthrachinon-Derivate sind CK2-Inhibitoren. Ein potenter Vertreter dieser Gruppe ist Emodin aus *Rheum palmatum* (Abbildung 3), das bei mäßiger Selektivität für CK2 einen IC_{50} Wert um $1 \mu\text{M}$ zeigt (Yim *et al.*, 1999). Sowohl seine Potenz als auch seine Selektivität konnte durch Modifikationen verbessert werden. So hat MNX (1,8-Dihydro-4-nitroxanthen-9-on) beispielsweise einen IC_{50} Wert von $0,4 \mu\text{M}$ und Chinalizarin (1,2,5,8-Tetrahydroxy-anthrachinon) einen IC_{50} Wert von $0,11 \mu\text{M}$ (Cozza *et al.*, 2009). Durch Modifikationen des Grundgerüsts zu Cumarin-Derivaten konnten weitere Inhibitoren entwickelt werden, die einige Nachteile der Anthrachinon-Derivate beseitigten. Ein potenter Vertreter dieser Cumarin-Derivate ist DBC (3,8-Dibrom-7-hydroxy-4-methylchromen) mit einem IC_{50} Wert von $0,1 \mu\text{M}$. Die Ellagsäure (Abbildung 3) wurde als bisher potentester polyphenolischer CK2-Inhibitor aus dem pflanzlichen Sekundärstoffwechsel identifiziert. Sie besitzt einen IC_{50} Wert von $0,04 \mu\text{M}$ und zeigte im Vergleich zu 12 anderen Proteinkinasen eine selektive Hemmung der CK2 (Cozza *et al.*, 2006).

In den letzten Jahren haben technische Fortschritte wie computergestützte Methoden oder „library screening“ dazu geführt, dass CK2-Inhibitoren mit bislang unbekanntem Grundstrukturen identifiziert wurden. Beispielsweise wurde die synthetische IQA (5-Oxo-5,6-dihydroindolo[1,2-*a*]chinazolin-7-yl)essigsäure, Abbildung 3) wie die bereits erwähnte Ellagsäure durch computergestützte „virtual screening“-Methoden als CK2-Inhibitor identifiziert (Sarno *et al.*, 2003). Das Indolochinazolin-Derivat IQA unterscheidet sich strukturell von allen anderen beschriebenen Inhibitoren, hat einen IC_{50} Wert von $0,39 \mu\text{M}$ und zeigt selektive CK2-Hemmung unter 44 Proteinkinasen (Sarno *et al.*, 2003). Es ist damit zwar weniger potent als andere Inhibitoren, zeigt aber eine größere Selektivität und lässt weitere Strukturmodifikationen zu. Weiterhin wurde so auch TBCA (Tetrabromzimtsäure) identifiziert, die einen IC_{50} Wert von $0,11 \mu\text{M}$ besitzt und unter 28 getesteten Proteinkinasen selektiv für CK2 war (Pagano *et al.*, 2007). Kürzlich wurden planare, teilweise makrozyklische Pyrazolo [1,5-*a*][1,3,5]triazine beschrieben, die in initialen Zellkulturtests starke inhibitorische Aktivität gegenüber CK2 zeigten (Nie *et al.*, 2008) und z. Zt. weiter untersucht werden. Ebenfalls neueren Datums sind die Hemmdaten substituierter Pyrazin-

Grundstrukturen. Derivate dieser Substanzklasse zeigten in ersten Hemmversuchen mit der CK2 α IC₅₀ Werte im nanomolaren Bereich (Suzuki *et al.*, 2008).

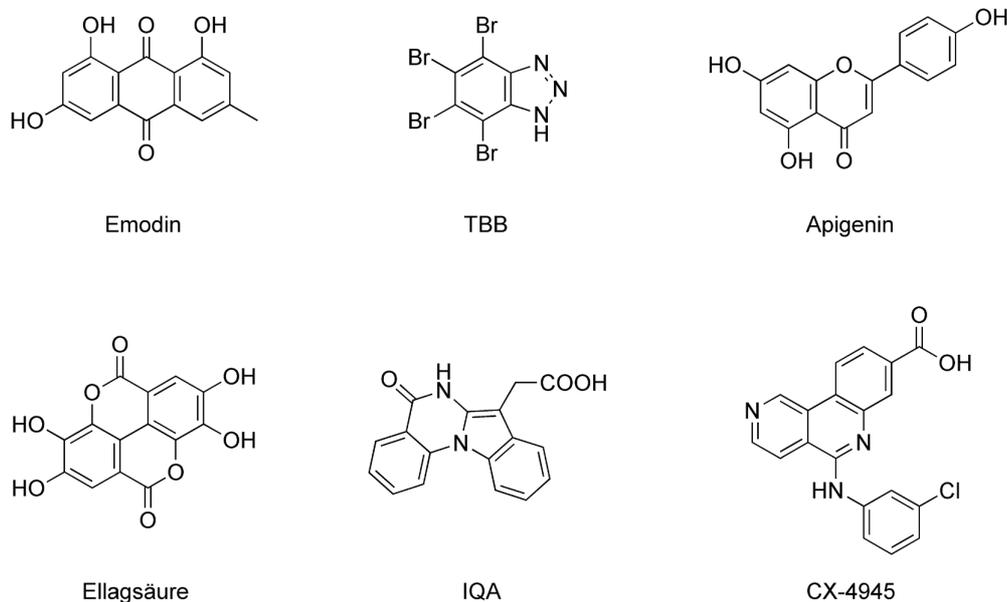


Abbildung 3: Vertreter ATP-kompetitiver Inhibitoren mit unterschiedlichen Grundgerüsten, die bereits in mikromolarer Konzentration eine Wirkung auf die Aktivität der CK2 zeigen.

Die Cosubstratkavität ist bislang die Zielstruktur, an der die potentesten Inhibitoren der CK2 binden. Die ATP-Konzentration in der Zelle liegt zwischen 1 mM und 10 mM (Cohen, 1999). Mögliche ATP-kompetitive Inhibitoren müssen eine hohe Affinität aufweisen, um ATP unter diesen Umständen aus seiner Bindetasche zu verdrängen. Zudem ist genau diese Struktur innerhalb verschiedener Proteinkinasen am wenigsten variiert. Deshalb ist es schwierig, selektive ATP-kompetitive Inhibitoren für die CK2 zu entwickeln. Eine selektive Adressierung des Zielmoleküls ist allerdings eine Voraussetzung für eine potentielle klinische Anwendung. Darüber hinaus sollte ein Arzneistoffkandidat klassische Anforderungen der Medizinischen Chemie, wie Lipinskis „rule of five“ erfüllen (Lipinski *et al.*, 2001). Er muss wasserlöslich, zell-permeabel und unter physiologischen Bedingungen stabil sein, um eine ausreichende Bioverfügbarkeit zu gewährleisten.

Ein großer Nachteil vieler Anthrachinon-Derivate wie Emodin ist deren potentielle Interkalation in DNA (Wang *et al.*, 2006). Diese Eigenschaft macht die Substanzgruppe für CK2-spezifische Untersuchungen in zellulären Systemen und zur gezielten therapeutischen CK2-Hemmung unbrauchbar. TBB hingegen ist zwar gut für *in vitro*-

Experimente geeignet, aber aufgrund seiner relativ schlechten Wasserlöslichkeit ist dieser CK2-Inhibitor nicht für den klinischen Einsatz geeignet (Battistutta *et al.*, 2000). Auch IQA ist zwar potent und sehr selektiv für die CK2, ist aber im wässrigen Milieu instabil, da sein Lactamring anfällig für eine langsame Hydrolyse ist (Sarno *et al.*, 2003; Sarno *et al.*, 2005a). Wie an diesen Beispielen gezeigt, erfüllen bislang nur sehr wenige der veröffentlichten ATP-kompetitiven CK2-Inhibitoren grundlegende Anforderungen an einen Arzneistoffkandidat. Das ist auch ein Grund für die Entwicklung von Inhibitoren mit alternativen Wirkmechanismen, die zunehmend an Bedeutung gewinnen. Für DRB fiel durch Cokristallisationen mit CK2 eher zufällig auf, dass diese Verbindung neben einer Affinität zur Cosubstratkavität auch eine Affinität zu einer hydrophilen Bindetasche an der Kontaktfläche zur β -Untereinheit aufwies. Diese Bindetasche könnte als allosterisches Ziel neuer selektiver Inhibitoren eine Tetramerisierung der CK2 verhindern und somit ihre Regulation beeinflussen. Darüber hinaus wurden in den letzten drei Jahren diverse Substanzen gefunden, die effektiv eine Bindung von CK2 α und CK2 β verhindern (Prudent *et al.*, 2010). So konnten von CK2 β zyklische 11-mer Peptide abgeleitet werden, die in niedriger mikromolarer Konzentration eine Bildung des CK2 α -CK2 β Komplexes blockieren (Laudet *et al.*, 2007). Basierend auf diesen Ergebnissen ist es derselben Gruppe gelungen, niedermolekulare Substanzen zu entwickeln, die diese allosterische Bindetasche adressieren. Dabei handelt es sich um Podophyllotoxin-indolo-Derivate, die als nicht-kompetitive Inhibitoren IC₅₀ Werte bis zu 20 μ M zeigen (Laudet *et al.*, 2008). Auch anorganische Substanzen können als allosterische Inhibitoren wirken. Beispielsweise wurden für einige Polyoxometallate IC₅₀ Werte im einstelligen nanomolaren Bereich sowohl für CK2 α als auch für das Holoenzym festgestellt (Prudent *et al.*, 2008). Neben dem CK2 α -CK2 β Kontakt bietet die acidophile Substratbindestelle der CK2 α eine noch wenig adressierte, attraktive Struktur zur Entwicklung selektiver Inhibitoren. In einer selten zitierten Studie einer kubanischen Arbeitsgruppe wurde von einem zyklischen Peptid mit Affinität zur CK2 α berichtet (AS-Sequenz CWMSPRHLGTC) (Perea *et al.*, 2004). Die Autoren entwickelten das Fusionspeptid CIGB-300, das aus dieser Sequenz und einem zellpermeablen Peptid besteht, welches von dem HIV-Tat Protein abgeleitet ist. *In vivo* Studien zeigten, dass CIGB-300 pro-apoptisches Potential besitzt und eine Wachstumshemmung von Tumorgewebe bewirkt (Perea *et al.*, 2008). In dieser Studie blieb jedoch offen, ob die pro-apoptische Aktivität von CIGB-300 tatsächlich auf eine Hemmung der CK2 zurückgeführt werden kann. Neuere Untersuchungen berichten nicht mehr von einer generellen Inhibition der CK2 durch CIGB-300 sondern von einer Interaktion zwischen CIGB-300 und Nucleophosmin, einem Substrat der CK2 (Perera *et al.*, 2009).

Es ist anzunehmen, dass neben den publizierten Ergebnissen der Wirkstoffforschung mehrere industrielle Programme zur Entwicklung von CK2-Inhibitoren betrieben werden. Beispielsweise wurde erst kürzlich bekannt, dass mit dem Wirkstoff CX-4945 (Abbildung 3) der erste niedermolekulare CK2-Inhibitor in einer klinischen Phase I-Studie als orales Krebstherapeutikum untersucht wird (Chua *et al.*, 2008; Pinna und Allende, 2009). In der präklinischen Untersuchung zeigte CX-4945 eine potente und selektive Hemmung der CK2, sowie gute anti-tumorale Eigenschaften in Zelllinien und Xenograft-Krebsmodellen (Dancey, 2009).

Wirkstoffe, welche die Aktivität der CK2 modulieren, stellen wertvolle Werkzeuge dar, mit deren Hilfe (patho)physiologische Funktionen dieses Enzyms aufgeklärt werden können. Neben der Variation vorhandener CK2-Inhibitoren ist die Erkundung neuer Leitstrukturen ein wichtiger Beitrag zur Entwicklung potenter und selektiver Wirkstoffe, die sich auch für die klinische Anwendung eignen. Erste Erfolge bestärken die Hoffnung, dass CK2-Inhibitoren identifiziert werden können, die als gezielte Arzneistoffe in der Tumorthherapie eingesetzt werden können.

3. Das Autodisplay-System

Als Autotransportermechanismus bezeichnet man den einzig bekannten Ein-Komponenten-Sekretionsmechanismus in Gram-negativen Bakterien (Jose *et al.*, 1995). Ein Autotransporter-Protein besitzt alle Informationen, die zu seiner Sekretion aus dem Zytoplasma in den Extrazellularraum benötigt werden. Ein typisches Autotransporter-Protein lässt sich in 4 Domänen unterteilen. Am N-Terminus besitzt es ein „Signalpeptid“ (SP), das die Translokation des Proteins über die innere Membran steuert. Der Export ins Periplasma wird vom Sec-Apparat, einem bakteriellen Sekretionsmechanismus, vermittelt. Dabei wird das SP abgespalten (Abbildung 4 B). In der Primärsequenz des Autotransporterproteins folgt C-terminal zum SP eine Passagier- und eine Verbindungsdomäne („Linker“). Den C-Terminus des Proteins bildet eine Domäne, die für die Translokation über die äußere bakterielle Membran verantwortlich ist (Abbildung 4 A). Sie bildet in der äußeren Membran eine fassartige Tertiärstruktur aus amphipatischen β -Faltblättern aus, kurz β -Fass genannt. Für die Translokation über die äußere Membran postulierten Maurer *et al.* (1997) ein Modell, welches in Abbildung 4 B schematisch dargestellt ist.

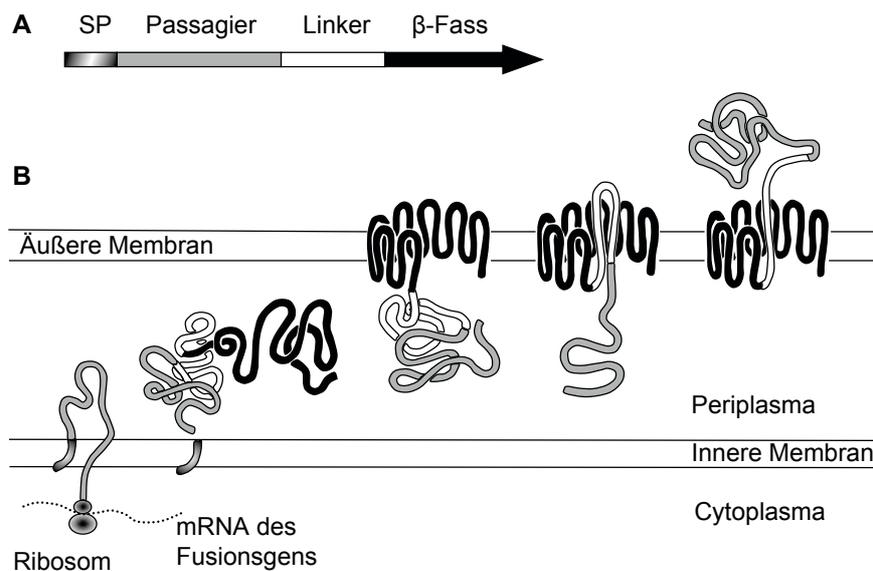


Abbildung 4: (A) Primärstruktur eines Autotransporter-Fusionsproteins und (B) postuliertes Modell des Autotransporter-Sekretionsmechanismus in *E. coli*. Das Signalpeptid (SP) des Vorläuferproteins wird im Zytoplasma vom Sec-Apparat erkannt, über die innere bakterielle Membran transportiert und prozessiert. Die C-terminale Translokationsdomäne faltet sich in der äußeren Membran zu einem Porin-artigen β -Fass, wodurch der bislang ungefaltete Passagier unter Beteiligung des haarnadelförmigen Linkers zum Extrazellulärraum transloziert wird (Abbildung verändert nach Maurer *et al.* (1997)).

Demnach wird zunächst der Linker in das Porin-ähnliche β -Fass inkorporiert und bildet eine haarnadelartige Struktur, welche anschließend den Passagier in ungefaltetem Zustand an die Zelloberfläche transportiert (Abbildung 4 B). Die Passagierdomäne vermittelt die physiologische Effektorfunktion des Proteins und wird entweder ins extrazelluläre Medium entlassen oder durch die β -Fass-Domäne an der Zelloberfläche verankert. Linker- und β -Fass-Domäne werden gelegentlich zusammenfassend als „Autotransporter“ bezeichnet. Nach der Translokation befindet sich lediglich die Passagierdomäne an der Zelloberfläche. Abhängig vom Vorhandensein eines entsprechenden Erkennungsmotivs in der Proteinsequenz kann der Passagier von OmpT, einer natürlichen Außenmembranprotease von *E. coli*, in das extrazelluläre Medium entlassen werden.

Im Gegensatz zum Autotransportermechanismus definiert der Begriff „Autodisplay“ ein artifizielles System, das sich den natürlichen Sekretionsmechanismus der Autotransporter-Proteine zunutze macht, um rekombinante Proteine oder Peptide an der Oberfläche Gram-negativer Bakterien zu präsentieren (Maurer *et al.*, 1997; Jose und Meyer, 2007). Dabei wird der für den natürlichen Passagier codierende DNA-

Abschnitt gegen einen offenen Leserahmen eines anderen Proteins oder Peptids ausgetauscht. Dieser artifizielle Passagier wird dann über den Autotransportermechanismus zum Extrazellularraum transloziert. Autodisplay wurde im Arbeitskreis von Prof. Jose erfolgreich als Plattformtechnologie für verschiedene biotechnologische, analytische und pharmazeutische Fragestellungen weiterentwickelt (für eine Übersicht siehe Jose (2006), sowie Jose und Meyer (2007)). Das in diesem Rahmen optimierte chimäre Fusionsprotein setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen: Das Signalpeptid stammt von Cholera toxin B (CtxB aus *Vibrio cholerae*) und die Translokationsdomäne („Autotransporter“) stammt aus dem Protein AIDA-I („adhesin involved in diffuse adherence“), einem Adhärenzfaktor aus dem enteropathogenen *Escherichia coli* 2787 (EPEC) (Benz und Schmidt, 1989; Maurer *et al.*, 1997). Um die Verankerung des Passagiers in der Außenmembran aufrechtzuerhalten, werden *E. coli*-Stämme eingesetzt, die *ompT*-defizient sind.

Ein Einsatzgebiet dieses Systems sind Bindungsstudien. In Kombination mit Methoden des „protein design“ ermöglicht Autodisplay von funktioneller Antikörperfragmenten deren Anpassung an beliebige Epitope (Blasshofer, 2008). Die Bindung von freien Antikörpern durch eine zellverankerte IgG-affine Passagierdomäne als „Biosensor“ führte in Antigennachweisen mit ELISA (Park *et al.*, 2010) und mit Oberflächenplasmonresonanz (Jose *et al.*, 2010) zu einer Signalverstärkung um den Faktor 30-100 (Jose *et al.*, 2009). Des Weiteren wurde durch Autodisplay peptidischer Inhibitoren der humanen Proteasen Leukozyten-Elastase (Jose und Zangen, 2005) und Cathepsin G (Jose *et al.*, 2005) demonstriert, dass die Affinität zwischen Enzym und Inhibitor ausgenutzt werden kann, um Inhibitor-präsentierende *E. coli*-Zellen mit dem entsprechenden Zielenzym zu markieren. Darauf aufbauend konnte mit Autodisplay von Peptidbibliotheken und durchflusszytometrischer Affinitätsauslese ein potenter peptidischer Inhibitor von Cathepsin G mit einem IC_{50} Wert von 11,5 μ M identifiziert werden (Jose *et al.*, 2005).

Weiterhin wurden durch Autodisplay von Sorbit-Dehydrogenase (Jose und von Schwichow, 2004) oder Adrenodoxin (Jose *et al.*, 2002) Ganzzellbiokatalysatoren entwickelt. Diese konnten zur Synthese von Zuckern und Steroiden eingesetzt werden, die durch klassische Synthese nur bedingt zugänglich sind. Darüber hinaus macht Autodisplay Enzyme auch für analytische Zwecke leicht verfügbar, wie z.B. zur Testung von Substraten oder Inhibitoren. Eine aufwendige Proteinisolierung kann dadurch ebenso vermieden werden, wie die Bildung von „inclusion bodies“. Dadurch konnte u. a. erstmals eine funktionelle Hyaluronidase in *E. coli* rekombinant exprimiert werden, die über klassische Expressionsstrategien „inclusion bodies“ bildete und inaktiv vorlag (Kaessler *et al.*, 2010).

Autodisplay bietet einige Vorteile gegenüber den wenigen anderen universell einsetzbaren zellulären „surface display“-Systemen (für eine Übersicht siehe (Wernéus und Ståhl, 2004)): 1) Autodisplay erlaubt die nachträgliche Aufnahme einer prosthetischen Gruppe durch den an der Zelloberfläche präsentierten Apoenzym-Passagier (Jose *et al.*, 2001). 2) Autodisplay ermöglicht die effektive Translokation von weit über 100.000 Passagieren pro *E. coli*-Zelle, ohne dabei die zelluläre Integrität so zu vermindern, dass spontane Zellyse eintritt oder die Viabilität der Zellen deutlich geschwächt wird (Jose und von Schwichow, 2004; Jose *et al.*, 2005). 3) Durch die β -Fass-Domäne ist das Autotransporter-Fusionsprotein beweglich in der bakteriellen Außenmembran verankert. Dies ermöglicht monomeren Autodisplay-Passagieren, sich spontan zu funktionellen Homodimeren (Jose *et al.*, 2002; Jose und von Schwichow, 2004) oder zu größeren Aggregaten zusammenzulagern, die vermutlich aus bis zu 14 Untereinheiten bestehen können (Detzel *et al.*, 2010). Blasshofer (2008) konnte erstmals die funktionelle Oberflächenpräsentation zweier heteromerer Autodisplaypassagiere, sogenannter „twin-chain“-Antikörperfragmente, in *E. coli* nachweisen. Autodisplay sollte sich auch für oligomere Proteine mit heterogenen Untereinheiten, wie die CK2 eines darstellt, eignen. Eine funktionelle Präsentation heteromerer Enzym-Passagiere konnte bislang jedoch noch nicht gezeigt werden. Auch eine Kinase konnte bislang noch nicht an der Zelloberfläche präsentiert werden.

4. Ziele der Arbeit

Die Bewertung des inhibitorischen Potentials von Substanzen am isolierten Zielenzym stellt einen experimentellen Engpass in der Wirkstoffentwicklung dar. Auf der Suche nach Inhibitoren der humanen Proteinkinase CK2 gliedert sich dieses Problem in zwei Teilaspekte: 1) Die Verfügbarkeit des Enzyms und 2) Die Verfügbarkeit eines verlässlichen Testverfahren. Im Rahmen dieser Dissertation sollten beide Problemstellungen bearbeitet werden.

Mit der Autodisplay-Technologie sollte die CK2 in aktiver Form auf der Zelloberfläche von *E. coli* präsentiert werden. Mit solch einem *E. coli*-Stamm könnte das Enzym innerhalb kürzester Zeit verfügbar gemacht werden und aufwendige Aufreinigungsschritte würden vermieden. Da es sich bei der nativen CK2 um ein heterotetrameres Enzym handelt, sollten beide Untereinheiten separat per Autodisplay an die bakterielle Zelloberfläche gebracht werden, um dort zu oligomerisieren. Die CK2-Aktivität eines solchen Ganzzellsystems sollte verifiziert und seine Eignung für CK2-Inhibitionstests überprüft werden.

Das zweite zentrale Element dieser Arbeit sollte die Entwicklung eines neuen Testverfahrens für CK2-Inhibitoren sein. Dieses neue Testverfahren sollte eine Alternative zu dem z. Zt. gebräuchlichen radiometrischen Test darstellen und eine verlässliche Identifizierung und Charakterisierung von Inhibitoren erlauben. Ferner sollte die Nutzung radioaktiver Isotope vermieden werden. Nach seiner Etablierung sollte dieses Testverfahren mit bekannten CK2-Inhibitoren bewertet werden und gegebenenfalls zur Durchmusterung einer Substanzbibliothek eingesetzt werden.

Auf der Basis des Autodisplay-Systems sollte ferner eine Affinitätsuntersuchung von CK2-Substrat-Passagieren mit CK2 etabliert werden. Die Bindung von fluoreszenzmarkierter CK2 an ein oberflächenpräsentiertes Peptid sollte mittels durchflusszytometrischer Methoden detektiert werden. Dieses Vorgehen sollte einen Zugang zu peptidischen Inhibitoren ermöglichen, die außerhalb der Cosubstratbindestelle der CK2 binden.

II Material und Methoden

1. Material

1.1. Geräte

Tabelle 2: In dieser Arbeit eingesetzte Geräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Autoklav	3850 ELV	Systemec, Wetzlar
Brutschrank	P10825028	Memmert, Schwabach
CE-Kapillare, „bare-fused“	Reorder No 338451	Beckman Coulter, Krefeld
Durchflusszytometer	FACSAria	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektroporationsküvetten	1 mm Küvetten	PeqLab, Erlangen
Elektroporator	2510	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage	2001 MP2	Sartorius, Göttingen
Gefriertruhe (-70 °C)	HAT2086	Hettich, Tuttlingen
Geldokumentation	Gel Jet Imager	Intas, Göttingen
Gelkammer (Agarose)	Electrophoresis Sub System 150	Labnet, Edison, NJ, USA
Gelkammern (SDS-PAGE)	Mini Protean II / III / IV	Bio-Rad, München
Heizblock	AccuBlock Digital Dry Bath	Labnet, Edison, NJ, USA
Heizrührgerät	RCT IKAMAG	IKA, Staufen
Inkubationsschüttler	Minitron	Infors, Einsbach
Kapillarelektrophoresesystem	ProteomeLab PA800	Beckman Coulter, Krefeld
Kühl-/Gefrierkombination (4 °C/-20 °C)	Fris88f	Thermo Fisher, Dreieich
Kühlzentrifuge	Universal 32R	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge	Sorvall RC-5C Plus	Thermo Fisher, Dreieich
Kühlzentrifuge	J2-HS	Beckman, München
Mikrowellengerät	MW 1000	Alaska, Mannheim
Mikrotiterplatten-Reader	Mithras LB 940	Berthold, Bad Wildbach
Mikrotiterplatte	384 „well plates“ (schwarz)	Nunc, Langenselbold
Netzteil	Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Netzteil	GPS 200/400	Pharmacia, Piscataway, NJ, USA
pH-Meter / Einstabmesskette	pH-Meter766 Calimatic	Knick, Berlin
Photometer	Genesys 6	Thermo Fisher, Dreieich
Pipetten Pipetman Neo	P2N, P20N, P200N, P1000N	Gilson, Limburg-Offheim
Reinstwasseranlage	MilliQ Biocel	Millipore, Eschborn
Rotoren (Sorvall)	SS-34, SLA-1500	Thermo Fisher, Dreieich
Rotoren (Tischzentrifuge)	1612, 1617	Hettich, Tuttlingen
Schüttelinkubator	Minitron	Infors, Einsbach
Spülmaschine	Compact-Desinfektor G7783CD	Miele, Gütersloh
Szintillationsanalysator	TRI-CARB 190S AB7LA	Canberra-Packard, Dreieich
Thermocycler	Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Primus 25 advanced	PeqLab, Erlangen
Tischzentrifuge	MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge, kühlbar	Mikro 120	Hettich, Tuttlingen

Gerät	Bezeichnung	Firma
Trockenschrank	ET6130	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge	L-60	Beckman, München
Vortex Schüttler	Reax-Top	Heidolph, Schwalbach
Waage	2337	Sartorius, Göttingen
Wärme-/Trockenschrank	ET 6130	Heraeus, Hanau
Wasserbad	Extratherm U3 electronic	Julabo, Seelbach

1.2. Software

Tabelle 3: In dieser Arbeit eingesetzte Software

Bezeichnung	Bezugsquelle
VectorNTI 10	Invitrogen, Karlsruhe
MikroWin 2000	Mikrotek, Overath
CFS	PerkinElmer, Walham, MA, USA
32Karat 7.0	Beckman Coulter, Krefeld
Prism 5	GraphPad, La Jolla, CA, USA
FACSDiva 5.02 und 5.03	Becton Dickinson, Heidelberg
FlowJo 8.86	Tree Star, Ashland, OR, USA
GCG	Accelrys, San Diego, CA, USA

1.3. Chemikalien und Materialien

Tabelle 4: In dieser Arbeit eingesetzte Chemikalien und Materialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
1,4-Dithiothreitol	AppliChem, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
2-Propanol	Sigma-Aldrich, Deishofen
Agar Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe
Agarose, StarPure High Resolution (3:1)	Starlab, Ahrensburg
Ampicillin-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Roth, Karlsruhe
APS	Merck, Darmstadt
ATP	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Fisher Scientific, Schwerte
BSA	Sigma-Aldrich, Deishofen
Casein, human α_{s1}	Calbiochem, Darmstadt
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva, Heidelberg
D-Glucose	Fisher Scientific, Schwerte
D-Saccharose	Roth, Karlsruhe
Dialyseschlauch, MWCO: 10-30 kDa	Boehringer, Mannheim
Dialyseschlauch, MWCO: 12-14 kDa	Serva, Heidelberg
DMSO	Sigma-Aldrich, Deishofen

Bezeichnung	Bezugsquelle
DNA-Größenmarker (Jules (500 bp), Felix (100 bp))	Qbiogene, Heidelberg
DNA-Größenmarker 25 bp STEP Ladder	Promega, Mannheim
DNA-Größenmarker GeneRuler 1 kb	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP-Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
ECL Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare, München
ECL-Detektionslösung	Amersham Pharmacia, Freiburg
EDTA	Roth, Karlsruhe
Emodin	Calbiochem, Darmstadt
Essigsäure	Riedel-de-Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	AppliChem, Darmstadt
IPTG	Fermentas, St. Leon-Rot
Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe
KCl	Merck, Darmstadt
Methanol	VWR Prolabo, Lutterworth, UK
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	VWR Prolabo, Lutterworth, UK
Mikroreaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
N-Laurylsarcosin	Sigma-Aldrich, Deishofen
Na ₂ HPO ₄	Fisher Scientific, Schwerte
NaCl	Fisher Scientific, Schwerte
P81 Kationentauscher Filterpapier 3MM	Whatman, Dassel
PEG 20.000	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen (10 µl)	Gilson, Limburg-Offheim
Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl)	Starlab, Ahrensburg
PMSF	Sigma-Aldrich, Deishofen
Proteose Pepton	Becton Dickinson, Heidelberg
PVDF-Membran	Macherey-Nagel, Düren
Rotiphorese Acrylamid Gel 30 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
SDS-PAGE Größenmarker PAGERuler	Fermentas, St. Leon-Rot
TBB	Calbiochem, Darmstadt
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypton/Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zulkowsky Stärke	Merck, Darmstadt
γ-[³² P]-ATP	ICH, Eschwege

1.4. Reagenziensätze („kits“)

Tabelle 5: In dieser Arbeit eingesetzte Reagenziensätze („kits“)

Reagenziensatz	Bezugsquelle
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Fluorescein Labeling Kit	Promega, Mannheim
PCR-Master-Mix S	PeqLab, Erlangen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
TOPO-TA Cloning Kit (pCR2.1)	Invitrogen, Karlsruhe

1.5. Antikörper

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Antikörper (AK)

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
Anti-CK2 α (1A5)	Monoklonaler muriner CK2 α AK	AG Montenarh, Homburg/Saar (Faust <i>et al.</i> , 2002)
Anti-HA (12CA5)	Monoklonaler muriner Hämagglutinin AK (#11583816001)	Roche, Mannheim
Sekundärer Dylight 649-AK	Ziege Anti-Maus IgG AK (#35515)	Thermo Fisher, Dreieich

1.6. Enzyme

Tabelle 7: In dieser Arbeit eingesetzte Enzyme

Bezeichnung	Bezugsquelle
Acc65I	NEB, Frankfurt a.M.
Antarktische Phosphatase	NEB, Frankfurt a.M.
BsiWI	NEB, Frankfurt a.M.
CK2 Holoenzym (CK2 $\alpha_2\beta_2$)	In dieser Arbeit aufgereinigt (Abschnitt 2.3.1)
Elastase (Schweinepankreas)	Lee Biosolutions, St. Louis, MO, USA
Elastase (Schweinepankreas)	Roche, Mannheim
Klenow Fragment (3'-5' exo-)	NEB, Frankfurt a.M.
KpnI	NEB, Frankfurt a.M.
Lysozym aus Hühnereiweiß	Roth, Karlsruhe
NdeI	NEB, Frankfurt a.M.
Phusion DNA Polymerase	NEB, Frankfurt a.M.
SacII	NEB, Frankfurt a.M.
Sall	NEB, Frankfurt a.M.
T4 DNA Ligase	NEB, Frankfurt a.M.
Trypsin (Schweinepankreas)	Roth, Karlsruhe
XhoI	NEB, Frankfurt a.M.

1.7. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (München) synthetisiert und über Umkehrphasen-Kartuschen aufgereinigt. Eine Ausnahme stellt das Oligonukleotid Pr249 dar, das per HPLC aufgereinigt wurde.

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide¹

Bezeichnung	Funktion	Sequenz
Pr004	DNA-Sequenzanalyse	CACCACCAGACGGTCCGTAAGTG
Pr009	DNA-Sequenzanalyse	CAGCATATGCACATGGAACACC
Pr099	Sensestrang für ORF des Peptids DDDADDD	TCGAGGACGACGACGCTGACGACGACTACCCGTACGACGTT CCGGACTACGCTGGTAC
Pr100	Antisensestrang für ORF des Peptids DDDADDD	CAGCGTAGTCCGGAACGTCGTACGGGTAGTCGTCGTCAGC GTCGTCGTCC
Pr101	Sensestrang für ORF des Peptids DDDSDDD	TCGAGGACGACGACTCCGACGACGACTACCCGTACGACGTT CCGGACTACGCTGGTAC
Pr102	Antisensestrang für ORF des Peptids DDDSDDD	CAGCGTAGTCCGGAACGTCGTACGGGTAGTCGTCGTCGGA GTCGTCGTCC
Pr199	Amplifikation CK2 α -ORF upstream	CCAGT <u>CGACT</u> CGGGACCCGTGCCAAGCAGGGCCAGAGTTTA
Pr200	Amplifikation CK2 α -ORF downstream	AAGGTACCCTGCTGAGCGCCAGCGG CAGCTGGAACA
Pr201	Amplifikation CK2 β -ORF upstream	AACTCGAGAGCAGCTCAGAGGAGGT GTC
Pr202	Amplifikation CK2 β -ORF downstream	AAGGTACC <u>GCGAAT</u> CGTCTTGACTGG GCT
Pr248	Bibliothekserstellung (Primer)	CAATGCGTCACATATGCACATGG
Pr249	Bibliothekserstellung (enthält Zufallsbasen)	GAAGCTGCGTAGCGTAGACCTGAACGT <u>CGTACGGGTANTC</u> NTCvNNvNNrTAvNNvNNGGTACCATG TGCATATGTGACGCATTG ²
T7II	DNA-Sequenzanalyse	TAATACGACTCACTATAGG

¹ Die unterstrichenen Nukleotide kennzeichnen in den Experimenten verwendete Restriktionsschnittstellen.

² Abkürzungen für nicht standardkonforme Nukleinsäuren siehe Anhang

1.8. Peptide

Die Peptidsynthese wurde im analytischen Zentrallabor des Biologisch-Medizinischen Forschungsinstituts (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Als Methode wurde die Festphasensynthese nach Merrifield (Merrifield, 1963) mit Fmoc als N-terminaler Schutzgruppe (Chang und Meienhofer, 1978) eingesetzt. Nach der Synthese wurden die Peptide mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Der Reinheitsgrad wurde massenspektrometrisch bestimmt. Insgesamt wurden auf diesem Weg folgende Derivate synthetisiert (AS-Sequenz jeweils vom N- zum C-Terminus):

- 1) RRRDDDSDDD
- 2) RRRDDDSDDD-[EDANS] (im Text auch „E-Peptid“ bezeichnet)
- 3) [DABCYL]-RRRDDDSDDD-[EDANS] (im Text auch als „D/E-Peptid“ bezeichnet)

Die in eckigen Klammern stehenden Moleküle bezeichnen den Fluorophor EDANS (5-[(2-Aminoethyl)amino]naphthalin-1-sulfonsäure) und den Quencher DABCYL (4-[[4-(Dimethylamino)-phenyl]azo]-benzoesäure), mit denen das Peptid für FRET-Untersuchungen markiert wurde.

1.9. Bakterienstämme

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Genomische Determinanten	Referenz
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	B, F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , λ(DE3)	(Studier und Moffatt, 1986)
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , (r _K ⁻ m _K ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , λ-, <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , φ80 <i>lacZ</i> ΔM15,	(Bethesda Research Labs, 1986)
<i>E. coli</i> One Shot TOP10	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> , λ-	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> UT5600(DE3)	F ⁻ , <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>secA6</i> , <i>lacY1</i> , <i>proC14</i> , <i>tsx-67</i> , Δ(<i>ompT-fepC</i>)266, <i>entA403</i> , <i>trpE38</i> , <i>rfbD1</i> , <i>rpsL109</i> (Str ^r), <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>thi-1</i> , λ(DE3)	(Jose und Handel, 2003)

1.10. Plasmide

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Bezeichnung	Determinanten	Referenz
pAG008	aph, T7 Promotor (pET-System), AT-Fusionsgen mit für Peptid DDDSDDD+HA-Epitop codierender Sequenz als Passagier, <i>lacI</i> , ColA origin	Diese Arbeit, siehe Anhang
pAG009	aph, T7 Promotor (pET-System), AT-Fusionsgen mit für Peptid DDDADDD+HA-Epitop codierender Sequenz als Passagier, <i>lacI</i> , ColA origin	Diese Arbeit, siehe Anhang
pAG011	aph, T7 Promotor (pET-System), AT-Fusionsgen mit 1.000 bp unterbrechender DNA-Sequenz, <i>lacI</i> , ColA origin	Diese Arbeit, siehe Anhang
pBL002	aph, T7 Promotor (pET-System), AT-Fusionsgen mit NADH-Oxidase-I-ORF als Passagier, <i>lacI</i> , ColA origin	AK Jose
pET-Adx04	bla, T7 Promotor (pET-System), AT-Fusionsgen mit für Adrenodoxin codierender Sequenz als Passagier, <i>lacI</i> , ColE1 origin ¹	(Jose <i>et al.</i> , 2002)

Bezeichnung	Determinanten	Referenz
pET-Afaec	bla, T7 Promotor (pET-System), AT-Fusionsgen mit Nitrilase (<i>A. faecalis</i>)-ORF als Passagier, lacI, ColE1 origin ¹	AK Jose
pET-RAA	bla, T7 Promotor (pET-System), AT-Fusionsgen mit h _{α51} Casein-ORF als Passagier, lacI, ColE1 origin ¹	AK Jose
pGEX-CK2α	bla, <i>tac</i> Promotor, CK2α (cDNA nt 1-1178)-ORF, lacI, GST, ColE1 origin ¹	AG Montenarh, Homburg/Saar
pGEX-CK2β	bla, <i>tac</i> Promotor, CK2β (cDNA nt 1-648)-ORF, lacI, GST, ColE1 origin ¹	AG Montenarh, Homburg/Saar
pKP003	bla, T7 Promotor (pET-System), AT-Fusionsgen mit für verkürztes Casein (KP3) codierender Sequenz als Passagier, lacI, ColE1 origin ¹	AK Jose
pKP007	bla, T7 Promotor (pET-System), AT-Fusionsgen mit für verkürztes Casein (KP7) codierender Sequenz als Passagier, lacI, ColE1 origin ¹	AK Jose
pSS001	aph, T7 Promotor (pET-System), AT-Fusionsgen mit für CK2α codierender Sequenz als Passagier, lacI, ColA origin	Diese Arbeit, siehe Anhang
pSS002	bla, T7 Promotor (pET-System), AT-Fusionsgen mit für CK2β codierender Sequenz als Passagier, lacI, ColE1 origin ¹	Diese Arbeit, siehe Anhang
pT7-7-CK2α	bla, T7 Promotor, CK2α-ORF, ColE1 origin ¹	(Grankowski <i>et al.</i> , 1991)
pT7-7-CK2β	bla, T7 Promotor, CK2β-ORF, ColE1 origin ¹	(Grankowski <i>et al.</i> , 1991)

¹Anmerkung: Die Bezeichnungen pMB1-, pBR322- und ColE1-origin werden in der Literatur synonym verwendet.

1.11. Nährmedien

Die Nährmedien wurden im Anschluss an ihre Herstellung bei 121 °C und einem Druck von 1,1 kg/cm² für 20 min im Autoklav sterilisiert. Nicht autoklavierbare Zusätze wie Glucose und Antibiotika wurden sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße), bevor sie den abgekühlten Medien zugegeben wurden.

1.11.1. LB-Medium

10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl,
16 g/l Agar (nur bei Festmedien)

1.11.2. PPM-Medium

15 g/l Proteose Pepton, 5 g/l NaCl, 1 g/l Zulkowsky Stärke, 1 g/l KH₂PO₄,
0,8 g/l K₂HPO₄, 20 % (v/v) Glycerol

1.11.3. SOC Medium

20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl, 2,5 g/l KCl,
20 mM D-Glucose (sterilfiltriert), 10 mM MgCl₂ (autoklaviert)

1.11.4. 2xYT Medium (pH 7,0)

16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl

1.12. Lösungen und Puffer

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen und Puffer mit Reinstwasser angesetzt.

1.12.1. Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

0,8 % (w/v) Agarose in 1xTAE-Puffer (Lösen durch Aufkochen)

5 % High Resolution (3:1) Agarose in 1xTAE-Puffer (Lösen auf Heizmixer)

TAE-Puffer (50x, pH 8,0):

2 M Tris, 0,1 M Essigsäure, 50 mM EDTA (pH 8,0)

DNA-Probenpuffer (10x):

0,42 % (w/v) Bromphenolblau, 50 % (v/v) Glycerol, 10 mM EDTA (pH 8,0)

DNA-Färbebad:

1 mg Ethidiumbromid in 1 l 1xTAE-Puffer

1.12.2. Lösungen für die SDS-PAGE

Trenngel-Puffer (4x):

1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,4 % (w/v) SDS, 0,4 % (v/v) TEMED

Sammelgel-Puffer (4x):

1,25 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,4 % (w/v) SDS, 0,4 % (w/v) TEMED

Polyacrylamidtrenngel (12,5 %):

41,6 % (v/v) Rotiphorese Acylamid Gel 30, 25 % (v/v) Trenngel-Puffer (4x),
0,1 % (w/v) APS

Polyacrylamidsammelgel (4 %):

13,1 % (v/v) Rotiphorese Acylamid Gel 30, 25 % (v/v) Sammelgel-Puffer (4x),
0,1 % (w/v) APS

Tris-Glycin Elektrodenpuffer (5x):

125 mM Tris, 1,25 M Glycin, 0,5 % (w/v) SDS

Protein-Probenpuffer (2x):

100 mM Tris/HCl (pH 6,8), 4 % (w/v) SDS, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau,
20 % (v/v) Glycerol, 200 mM Dithiothreitol

Protein-Probenpuffer, nicht-reduzierend (2x):

100 mM Tris/HCl (pH 6,8), 4 % (w/v) SDS, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau,
20 % (v/v) Glycerol

Coomassie Brilliant Blue Färbelösung:

2,5 g/l Coomassie Brilliant Blue R250, 10 % (v/v) Essigsäure,
45 % (v/v) Methanol

1.12.3. Lösungen für die Isolierung von Proteinen der äußeren Bakterienmembran

Tris/HCl-Puffer:	0,2 M	Tris/HCl (pH 8,0)
Saccharoselösung:	1,0 M	D-Saccharose
EDTA-Lösung:	10,0 mM	Na ₂ EDTA
Lysozym:	10,0 mg/ml	Lysozym
PMSF:	100,0 mM	PMSF in 2-Propanol
Aprotinin:	10,0 mg/ml	Aprotinin in 10 mM HEPES (pH 8,0)
N-Laurylsarcosin:	1,0 mg/ml	N-Laurylsarcosin in PBS
DNase I:	1,0 mg/ml	DNase I
Trypsin:	2,5 %	Trypsin in NaCl (0,9 % (w/v))

Extraktionspuffer:

50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM MgCl₂, 2 % (v/v) Triton X-100

PBS:

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄

1.12.4. Lösungen für die CK2-Aufreinigung und den CK2-Aktivitätstest

P100:

100 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 8,5), 7 mM 2-Mercaptoethanol, 0,2 mM PMSF

P300:

300 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 8,5), 7 mM 2-Mercaptoethanol, 0,2 mM PMSF

P1000:

1 M NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 8,5), 7 mM 2-Mercaptoethanol, 0,2 mM PMSF

P1500:

1,5 M NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 8,5), 7 mM 2-Mercaptoethanol, 0,2 mM PMSF

Kinasepuffer:

100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

Assaypuffer (radioaktiv):

150 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 8,5), 7 mM 2-Mercaptoethanol,
5 mM MgCl₂, 0,19 mM Substratpeptid, 0,6 µCi γ-[³²P]ATP, 100 µM ATP

Assaypuffer:

150 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 8,5), 7 mM 2-Mercaptoethanol,
5 mM MgCl₂, 0,19 mM Substratpeptid, 100 µM ATP

Assaypuffer (für einen Gesamtumsatz des Substrats und zur Bestimmung der Kinetik):

150 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl (pH 8,5), 7 mM 2-Mercaptoethanol,
5 mM MgCl₂, 0,19 mM Substratpeptid, 200 µM ATP

Substratpeptide waren Peptid RRRDDDSDDD oder folgende Derivate:
RRRDDDSDDD-[EDANS] oder [DABCYL]-RRRDDDSDDD-[EDANS].

1.12.5. Lösungen für die Plasmidisolierung nach Birnboim und Doly

Lösung 1: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM Na₂EDTA; 100 µg/ml RNase

Lösung 2: 0,2 M NaOH ; 1 % (w/v) SDS

Lösung 3: 2,55 M Kaliumacetat (pH 4,8 mit Eisessig eingestellt)

2. Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle molekularbiologischen Methoden basierend auf Vorschriften von Sambrook *et al.* (2001) durchgeführt.

2.1. Arbeiten mit *E. coli*

2.1.1. Kultivierung

In dieser Arbeit wurden verschiedene Stämme von *E. coli* entweder auf LB-Agarplatten oder in LB-Flüssigmedium kultiviert. LB-Agarplatten wurden mit einem Kügelchen aus einem Kryoröhrchen der Stammhaltung (siehe 2.1.2) oder mit einer Einzelkolonie einer anderen LB-Agarplatte beimpft und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Den Medien wurde Antibiotikum zugegeben (15 µg/ml bis 30 µg/ml Kanamycin oder 50 µg/ml bis 100 µg/ml Ampicillin), sofern die Stämme die jeweilige Resistenzdeterminante exprimierten. Das LB-Flüssigmedium wurde genauso beimpft und im Schüttelinkubator über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

2.1.2. Stammhaltung

Bakterienstämme wurden zur kurzfristigen Lagerung (1-4 Wochen) auf bebrüteten Agarplatten (mit zur Resistenz des Stamms passendem Antibiotikum) im Kühlschrank aufbewahrt. Zur langfristigen Lagerung wurden sie bei -70 °C in PPM-Medium aufbewahrt. Dazu wurde zunächst eine LB-Agarplatte (mit zur Resistenz des Stamms passendem Antibiotikum) mit dem entsprechenden Stamm beimpft und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Die Kultur wurde mit einem sterilen Wattestäbchen von der Agarplatte in ein mit 1 ml PPM-Medium gefülltes Mikroreaktionsgefäß überführt und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf zwei sterile, mit Glaskügelchen gefüllte Kryoröhrchen verteilt und abschließend in einem Ethanol/Trockeneisbad schockgefroren.

2.1.3. Herstellung elektrokompetenter Stämme

Eine Flüssigkultur von frisch aus der Stammsammlung entnommenen Zellen wurde über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Mit 1 % (v/v) dieser Vorkultur wurden 200 ml 2xYT-Medium beimpft und bis zu einer OD_{578 nm} von 0,5 kultiviert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension bei 4 °C und 2.500 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Die Zellen wurden

zunächst zweimal mit eiskaltem, sterilem Reinstwasser und dann einmal mit eiskaltem 10 %igen Glycerol gewaschen (je 1.000 x g, 4 °C, 15 min). Das Sediment wurde in 1 ml 10 %igem (v/v) Glycerol resuspendiert, in Aliquots von 50 µl schockgefroren (Ethanol/Trockeneisbad) und bei -70 °C gelagert.

2.1.4. Transformation durch Elektroporation

Ein 50 µl-Aliquot elektrokompetenter *E. coli* Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit einem kleinen Volumen (1-10 µl) Plasmid-DNA oder Ligationsansatz versetzt und in eine eiskalte Elektroporationsküvette (Schichtdicke: 1 mm) überführt. Der Ansatz wurde im Elektroporator 22510 (Eppendorf, Hamburg) für 5 ms einer Spannung von 1.800 V ausgesetzt. Unverzüglich wurde 1 ml eines auf 37 °C vorgewärmten SOC-Mediums hinzu pipettiert und der Ansatz in ein steriles 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Unter leichtem Schütteln wurde der Transformationsansatz für 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Volumina der Zellsuspension (z.B. 20 µl und 100 µl) auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die solche Selektionsantibiotika enthielten, gegen die erfolgreich transformierten Bakterienstämme resistent, Zellen ohne entsprechend neu aufgenommenes Plasmid jedoch sensitiv waren.

2.1.5. Expression der Autotransporter-Fusionsgene in *E. coli*

Zunächst wurde eine „Starterkultur“ mit einer Kolonie des auf einer LB-Agarplatte gewachsenen Stammes angeimpft. Sofern die *E. coli*-Stämme Resistenzdeterminanten exprimierten, enthielt das LB-Medium der „Starterkultur“ das entsprechende Antibiotikum (50-100 µg/ml Ampicillin und/oder 15-30 µg/ml Kanamycin). LB-Medium mit passendem Selektionsantibiotikum wurde mit 1/1.000 des Volumens der bis zur stationären Phase kultivierten „Starterkultur“ inokuliert („Hauptkultur“). Neben LB-Medium und Selektionsmedium enthielt die „Hauptkultur“ in der Regel 10 µM EDTA und 15 mM 2-Mercaptoethanol. Diese Hauptkultur wurde bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD_{578 nm} von 0,6-0,7 bebrütet. Die Expression eines unter der Kontrolle des T7-Promotor stehenden Gens wurde durch Zugabe von IPTG (1 mM) und Inkubation für 1 h induziert. Danach wurde die Kultur 15 min bei 4 °C gelagert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 3.850 x g (4 °C, 4 min) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in Kinasepuffer aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (3.850 x g, 4 °C, 4 min) wurde das Sediment noch zweimal mit Kinasepuffer gewaschen und im letzten Schritt eine OD_{578 nm} von 1 eingestellt. So präparierte Zellen wurden nach Möglichkeit sofort weiterverwendet oder maximal 2 Tage bei 4 °C gelagert.

2.1.6. Nachweis der Orientierung von Autodisplay-Passagieren durch Antikörper

Wenn möglich, wurde die Orientierung von Autodisplay-Passagieren über die Zugänglichkeit eines enthaltenen Hämagglutinin-Epitopes (HA-Epitop) nachgewiesen. Dazu wurden IgG-Antikörper (AK) eingesetzt, welche zu groß für eine Passage über die äußere Membran von *E. coli* sind. Anti-HA AK können also lediglich dem Extrazellularraum zugewandte HA-Epitope binden. Eine spezifische Bindung eines Anti-HA AK an eine Zelle weist damit die Existenz des HA-Epitopes an der Zelloberfläche nach. Über einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, der den Anti-HA AK spezifisch bindet, kann diese Zelle fluoreszenzmarkiert werden.

Der gewünschte Stamm wurde kultiviert und die Expression des Autotransporter-Fusionsgens induziert (Abschnitt 2.1.6). 250 µl der gewaschenen Bakteriensuspension wurde bei 11.500 x g (RT, 30 s) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 25 µl Kinasepuffer aufgenommen. Dazu wurden 2 µl Anti-HA AK (0,4 mg/ml Lösung) gegeben, leicht geschüttelt, 20 min auf Eis und danach 10 min bei RT inkubiert. Das Volumen wurde mit Kinasepuffer auf 500 µl vergrößert und die Zellen sedimentiert (11.500 x g, RT, 30 s). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 25 µl Kinasepuffer aufgenommen, 1 µl Dylight 649-konjugierter Anti-Maus AK (1 mg/ml Lösung) zugegeben und nach vorsichtigem Mischen 30 min lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Die Probe wurde mit Kinasepuffer auf 500 µl aufgefüllt, zentrifugiert (11.500 x g, RT, 30 s) und das Sediment in 500 µl Kinasepuffer aufgenommen. Die Fluoreszenz so behandelter *E. coli* wurde anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

2.1.7. Fluoreszenzmarkierung von Zellen basierend auf Affinität zur CK2

Die Affinität zwischen Autodisplay-Passagierdomäne und der Proteinkinase CK2 wurde über die Detektion der Bindung von CK2 zu Autodisplay-Zellen nachgewiesen. Zur Markierung wurde eine Suspension von Bakterienzellen mit Fluorescein-konjugierte CK2 (Abschnitt 2.3.2) inkubiert. Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 2.1.5 beschrieben, kultiviert und präpariert. Die Zellsuspension wurde sedimentiert (11.500 x g, RT, 30 s) und in Kinasepuffer mit 200 µM ATP zu einer OD_{578 nm} von 1 resuspendiert. Zu 20 µl dieser Suspension wurden 10 µl Fluorescein-konjugierte CK2 (Stammlösung ca. 1 mg/ml) gegeben und 30 min bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde mit Kinasepuffer (mit 200 µM ATP) auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt und weitere 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 11.500 x g (RT, 30 s) wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment vorsichtig in 200 µl Kinasepuffer resuspendiert. Die Fluoreszenzintensität so behandelter Zellen wurde durchflusszytometrisch untersucht.

2.1.8. Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Analysen (Herzenberg und Sweet, 1976) von *E. coli* wurden mit Hilfe eines FACSAria-Systems der Firma Becton-Dickinson (Heidelberg) und der Analyse- und Steuersoftware FACSDiva (Vers. 5.0.3) durchgeführt. Dieses Gerät besitzt zwei Anregungslaser (Argonlaser, 488 nm und Helium-Neon-Laser, 633 nm). In den Experimenten wurden optische Bandpassfilter der Wellenlänge 530 nm (grüne Fluoreszenz, Bandbreite: 30 nm, für FITC und Fluorescein) und der Wellenlänge 660 nm (rote Fluoreszenz, Bandbreite: 20 nm, für Dylight 649) zur Fluoreszenzdetektion eingesetzt. Zur Auswertung der Fluoreszenzintensität wurde in jedem Kanal die Signalhöhe herangezogen. Als Maß des Fluoreszenzmittelwertes wurde in allen Messungen der durch die Software ermittelte „mean“-Wert aller jeweils untersuchten Zellen angegeben. Die Grundeinstellungen zur Detektion und Darstellung der *E. coli*-Zellen sind in Tabelle 11 angegeben. Diese wurden für jede Messung neu überprüft und eventuell angepasst, da mit diesen Parametern nicht alle die Messung betreffenden Faktoren vollständig erfasst und kontrolliert werden konnten. Alle in durchflusszytometrischen Experimenten verwendeten Lösungen wurden zeitnah vor der Analyse sterilfiltriert.

Tabelle 11: Geräteparameter für eine typische durchflusszytometrische Analyse von *E. coli*.

Parameter	Darstellung	Verstärkung	„Threshold“
„Forwardscatter“ (FSC)	log	200	300
„Sidescatter“ (SSC)	log	450	200
Detektion bei 530 nm	log	600	-
Detektion bei 660 nm	log	1000	-

2.2. Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.1. Plasmidisolierung

In der Regel wurde für analytische Anwendungen Plasmid-DNA aus *E. coli* mit der Methode der alkalischen Lyse ohne Phenol/Chloroform-Extraktion gewonnen (Birnboim und Doly, 1979). Für präparative Anwendungen wurde Plasmid-DNA mit Hilfe des „QIAprep Miniprep Kits“ (Qiagen, Hilden) isoliert. Die DNA-Aufreinigung nach der Zelllyse beruht bei dieser Methode auf einer Festphasenextraktion mit Silikapartikeln als fester Phase, an die DNA in Anwesenheit chaotroper Salze bindet. Man erhält so im Vergleich zur Methode nach Birnboim und Doly Plasmid-DNA, die weniger Verunreinigungen wie Salze und Proteine enthält. Nachfolgende Arbeits-

schritte, wie z.B. eine DNA-Sequenzanalyse oder Klonierungen werden so weniger beeinträchtigt. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Vervielfältigung der offenen Leserahmen, die CK2 α und CK2 β codierten, erfolgte durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988). Dabei wurden die Plasmide pGEX-CK2 α und pGEX-CK2 β als jeweilige Matrizen zur Amplifikation eingesetzt. Als „primer“ dienten zu den Enden des jeweiligen offenen Leserahmens (α -Untereinheit: CSNK2A1, β -Untereinheit: CSNK2B) partiell komplementäre Oligonukleotide. Diese wurden so konstruiert, dass die entstehenden dsDNA-Abschnitte flankierende Erkennungssequenzen für Restriktionsschnittstellen enthielten, über die das Fragment in einen passenden Vektor ligiert werden konnte. Da Restriktionsenzyme am äußeren Ende eines dsDNA-Abschnitts nur mit geringer Effizienz hydrolysieren, wurden je nach Enzym weitere Nukleotide zusätzlich angefügt, um die Restriktionseffizienz zu erhöhen.

Die PCR wurde jeweils mit dem „PCR-Master-Mix S“ (PeqLab, Erlangen) in einem Gesamtvolumen von 20 μ l mit folgender Zusammensetzung durchgeführt:

PCR-Master-Mix S	10 μ l
„forward primer“ (10 μ M)	1 μ l
„reverse primer“ (10 μ M)	1 μ l
Plasmid-DNA (Matrize)	0,5 μ l (ca. 500 ng)
Reinstwasser	7,5 μ l

PCR-Programme zur Amplifikation von CSNK2A1 und CSNK2B:

1) Initiale Denaturierung:	96 °C 4 min	96 °C 4 min
2) Denaturierung:	94 °C 20 s	94 °C 20 s
3) „Annealing“ der „primer“:	60 °C 30 s	50 °C 60 s
4) Elongation	72 °C 60 s	72 °C 60 s
5) Terminale Elongation	72 °C 5 min	72 °C 5 min

Die Sequenz der Schritte 2-4 wurde pro PCR 29 x wiederholt.

2.2.3. Hybridisierung von Oligonukleotiden

Kurze Sequenzen doppelsträngiger DNA wurden durch Hybridisierung zweier synthetisch hergestellter, komplementärer Oligonukleotide erzeugt. Dazu wurde eine Lösung von zwei komplementären Oligonukleotiden (je 50 pmol) in 10 μ l Reinstwasser hergestellt. Die DNA wurde 5 min bei 95 °C denaturiert und durch Abkühlen auf 4 °C hybridisiert.

2.2.4. DNA-Zweitstrangsynthese

Die DNA-Doppelstrangsynthese des Bibliotheksinserts erfolgte enzymatisch. Ein 85 bp langes Oligonukleotid (Pr249) enthielt eine eingeschränkt zufällige DNA-Sequenz, die von konstanten DNA-Abschnitten flankiert war. Zusätzlich wurde ein 23 bp langes Oligonukleotid (Pr248) konstruiert, das komplementär zum konstanten 3'-Abschnitt von Pr249 war. Pr248 diente als Primer für das Klenow(exo-)-Fragment der DNA-Polymerase I, die den Zweitstrang auffüllte.

Schritt 1: Hybridisierung der Oligonukleotide:

2 µl Pr248 (100 µM)
2 µl Pr249 (100 µM)
4 µl Puffer 2 (NEB, Frankfurt a.M.)
28 µl Reinstwasser

Diese Komponenten wurden auf Eis pipettiert und im Thermocycler bei 95 °C für 5 min denaturiert. Anschließend wurde die Temperatur in Schritten von 0,1 °C/min bis auf 36 °C abgesenkt.

Schritt 2: Polymerase-Reaktion:

Zu dem Produkt aus Schritt 1 wurden folgende Reagenzien zugegeben:

0,6 µl Puffer 2 (NEB, Frankfurt a.M.)
5 µl dNTPs (10 mM pro dNTP)
3 µl Klenow(exo-) (NEB, Frankfurt a.M.)

Im Thermocycler wurde anschließend folgende Sequenz durchlaufen:

Polymerasereaktion: 35 °C 1 h
Stopp der Reaktion: 75 °C 20 min
Renaturieren der dsDNA: 75 °C → 35 °C mit 0,1 °C/min
Äquilibrierung: 35 °C 5 min

2.2.5. Enzymatische Spaltung von DNA-Fragmenten

Die hydrolytische Spaltung von DNA-Molekülen durch Restriktionsendonukleasen wurde sowohl analytisch als auch präparativ eingesetzt. Verwendet wurden Restriktionsenzyme des Herstellers NEB (Frankfurt a.M.). Ein typischer Ansatz enthielt dabei neben DNA noch 5-20 units Restriktionsenzym, den passenden vorgemischten Reaktionspuffer (NEB, Frankfurt a.M.) und Reinstwasser. Dieser wurde 2-3 h oder über Nacht bei der vom Hersteller vorgegebenen enzym-spezifischen Optimumstemperatur (meist 37 °C) inkubiert.

2.2.6. Agarosegelelektrophorese

Die aufzutrennenden DNA-Lösungen wurden mit Probenpuffer versetzt, um ihre spezifische Dichte zu erhöhen und die Beladung des horizontalen „submarine“-Gels zu erleichtern. Um den Fortschritt der Elektrophorese verfolgen zu können, enthielt der Probenpuffer außerdem Bromphenolblau als Farbmarker. Standardmäßig wurden 0,8 %ige (w/v) Agarosegele zur Auftrennung von Vektorfragmenten genutzt. Diese wurden mit einer Spannung von 8-12 V/cm in 1x TAE-Laufpuffer getrennt. Zur Trennung kleiner Oligonukleotide (< 150 bp) wurden Gele mit bis zu 5 % High Resolution Agarose (Starlab, Ahrensburg) mit einer Spannung von 4-6 V/cm eingesetzt.

Nachdem die DNA für ca. 20 min im Ethidiumbromidbad (1 mg in 1 l TAE-Puffer) (Ethidiumbromid=3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid) angefärbt wurde, konnten entsprechende Banden durch Anregung mit UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation erfolgte durch digitale Fotografie mittels CCD-Kamera.

2.2.7. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Um DNA-Fragmente aus einem präparativen Agarosegel zu isolieren, wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen, Hilden) aus der Gelmatrix gelöst. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.8. Ligation

DNA-Fragmente mit kompatiblen, überhängenden Enden wurden durch T4-DNA-Ligase enzymatisch verknüpft. Eine Berechnung der Reaktionsvolumina erfolgte mittels einer selbst verfassten Excel-Vorlage. Diese berücksichtigt für die Berechnung der Zusammensetzung von Ligationsansätzen die Größe und Konzentration der DNA-Fragmente (Formel nach Cranenburgh (2004)). Ein typischer Ligationsansatz enthielt DNA-Ligase-Puffer (1x) und T4-DNA-Ligase (NEB, Frankfurt a.M.) in wässriger Lösung. Die Ligation wurde im Thermocycler bei 16 °C durchgeführt und nach 16 h durch Hitzedenaturierung des Enzyms (10 min bei 65 °C) gestoppt. Das Produkt der Ligation wurde durch Dialyse entsalzt und zur Transformation von kompetenten *E. coli* Stämmen eingesetzt.

2.2.9. Entsalzen von DNA-Lösungen mittels Dialyse

Eine hohe Salzkonzentration im Ligationsprodukt setzt die Effizienz einer Elektroporation herabsetzt. Zur Verringerung der Salzkonzentration wurden Ligationsprodukte standardmäßig dialysiert (MF Membranfilter VSWP02500, Porenweite: 0,025 μm). Dazu wurde eine Petrischale mit Reinstwasser befüllt, ein Viertel der Membran auf die Wasseroberfläche gelegt und max. 20 μl der zu dialysierenden DNA-Lösung auf die Membran pipettiert. Nach ca. 30 min wurde der Tropfen vorsichtig in ein Mikroreaktionsgefäß überführt.

2.2.10. DNA Sequenzanalyse

Die Analyse von DNA-Sequenzen erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977) und wurde vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität oder von GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt.

2.3. **Arbeiten mit Proteinen**

2.3.1. Rekombinante Expression und Reinigung der humanen CK2

Die Aufreinigung der Proteinkinase CK2 erfolgte nach einem leicht modifizierten Protokoll von Grankowski *et al.* (Grankowski *et al.*, 1991). Die α - (CSNK2A1) und die β -Untereinheit (CSNK2B) der CK2 wurden, basierend auf einem pT7-7 Vektorsystem, getrennt voneinander in separaten *E. coli* BL21(DE3) Stämmen exprimiert. Dazu wurden *E. coli* BL21(DE3) Zellen frisch mit dem jeweiligen Expressionsvektor (für die α -Untereinheit: pT7-7-CK2 α , für die β -Untereinheit: pT7-7-CK2 β) transformiert. Ausgehend von einer Kolonie wurde zuerst eine Vorkultur (300 ml LB_{Amp100}-Medium) beimpft und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden je 3 l LB_{Amp100}-Medium mit jeweils 300 ml der Vorkultur inokuliert und bis zu einer OD_{600 nm} von 0,6 kultiviert, bevor die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (1 mM) induziert wurde. Nach vierstündiger Expression wurden die Stämme durch Zentrifugation bei 6.000 x g (10 min, 4 °C) geerntet und das Sediment über Nacht bei -80 °C gelagert. Alle folgenden Reinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt, um eine Denaturierung und eine Degradation der CK2 zu minimieren. Die Bakterienzellen wurden in sterilem, mit 7 mM 2-Mercaptoethanol und „Complete Protease Inhibitor Cocktail“ (Roche, Mannheim) supplementiertem Reinstwasser resuspendiert (100 ml/10 g Bakterien). Der Zellaufschluss erfolgte mit Ultraschall (3 x 30 s mit Ultraschallsonde, unterbrochen durch je 30 s Kühlung auf Eis). Das Lysat wurde bei 30.000 rpm (Rotor: 4lTi, 30 min, 4 °C) zentrifugiert und der Überstand als

Wasserextrakt aufbewahrt. Das Sediment wurde in P1500 aufgenommen (100 ml/10 g) und bei 4 °C über Nacht unter Rühren weiter extrahiert. Nach erneuter Ultrazentrifugation (Rotor: 4Ti, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand (P1500-Extrakt) abgenommen und mit dem Wasserextrakt vereinigt. Das Sediment wurde verworfen. Die Extrakte mit den beiden Untereinheiten wurden vereinigt und gegen P300 dialysiert (Ausschlussgrenze 10-20 kDa). Parallel wurde eine Chromatographiesäule mit 150 ml gequollener Phosphozellulose (Kationentauscher P11 (Whatman, Maidstone, UK)) gepackt und mit P300 äquilibriert. Das filtrierte Dialysat (ca. 450 ml) wurde mit einer Flussrate von 1,5 ml/min auf die Säule geladen (Econo-System (Bio-Rad, München)). Die Säule wurde so lange mit P300 gespült, bis kein Protein mehr eluiert wurde. Dies wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm durch einen an der Säule angeschlossenen UV-Detektor kontrolliert. Die nun an der stationären Phase adsorbierten Proteine wurden durch einen linearen Salzgradienten von 300 mM bis 1.500 mM NaCl (Flussrate: 1 ml/min, 600 ml Gesamtvolumen) eluiert und fraktioniert (80 Fraktionen à 7,5 ml). Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.3.5) und mittels eines radiometrischen Aktivitätstests (siehe Abschnitt 2.3.6) untersucht. CK2-haltige Fraktionen wurden anschließend vereinigt (ca. 400 ml) und über Nacht gegen P300 dialysiert (Ausschlussgrenze 10-20 kDa). Die CK2 wurde ab einer Salzkonzentration von etwa 600-700 mM NaCl von der Säule eluiert. Zur weiteren Aufkonzentrierung wurde eine kleine P11-Säule (ca. 15 ml in mit P300 gequollener Phosphozellulose) mit dem Dialysat beladen. Die CK2-Fraktion wurde durch sofortigen Wechsel des Puffers auf P1.000 eluiert und fraktioniert. Durch Messung der Absorption bei 280 nm wurden die proteinhaltigen Fraktionen identifiziert. Anschließend wurden diese Fraktionen vereinigt (ca. 48 ml) und in einem Dialyseschlauch (Ausschlussgrenze 3 kDa) gegen Polyethylenglycol 20.000 auf ca. 5 ml eingengt. Die anschließende Gelfiltration erfolgte mit einer Superose-6-Matrix (2,6 x 90 cm (Pharmacia, Stockholm, Schweden)) und P1000 mit einer Flussrate von 1 ml/min. Proteinhaltiges Eluat wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm detektiert. Dieses Eluat wurde fraktioniert und mittels SDS-PAGE und radiometrischem CK2-Aktivitätstest analysiert. CK2-haltige Proben wurden vereinigt, gegen P100 dialysiert, in Portionen von je 1 ml in Mikroreaktionsgefäßen durch flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

2.3.2. Konjugation der CK2 mit Fluorescein

Isolierte Proteinkinase CK2 wurde mit dem „Fluorescein Labeling Kit“ (Roche, Mannheim) markiert. Dabei wurde 5(6)-Carboxyfluorescein-N-succinimidylester (FLUOS) als Markierungsreagenz eingesetzt. Die freien Amingruppen der CK2 reagierten dabei mit der Esterfunktionalität des FLUOS zu entsprechenden

Carbonsäureamid-Derivaten. Die Reaktion wurde durchgeführt wie im Protokoll des Herstellers angegeben.

2.3.3. Proteasesensitivität von Autotransporter-Fusionsproteinen

Nach der Konstruktion neuer Autotransporter-Fusionsproteine sollte überprüft werden, ob die Passagierdomäne in den Extrazellularraum orientiert ist. Neben der in Abschnitt 2.1.6 beschriebenen Methode stellt die Proteasesensitivität ganzer *E. coli*-Zellen durch Trypsin ein übliches Mittel zur Bestimmung der Lokalisierung eines Proteins dar. Zu Autotransporter-Fusionsproteinen ist nur dann Zugang zu erwarten, wenn diese auf der Außenseite der Bakterienzelle präsentiert werden oder wenn die Außenmembran der Bakterienzelle für Proteasen durchlässig wird. Um letzteres auszuschließen, kann man OmpA als Marker benutzen, dessen C-terminale Domäne natürlicherweise im Periplasma vorliegt. Nur wenn diese Domäne nicht von der eingesetzten Protease angegriffen wird und OmpA in voller Größe erhalten bleibt, ist die Integrität der Außenmembran gewährleistet.

Der zu untersuchende *E. coli*-Stamm wurde kultiviert und geerntet wie in Abschnitt 2.1.5 beschrieben. Das Zellsediment einer 40 ml Hauptkultur wurde zweimal mit 5 ml 0,2 M Tris/HCl (pH 8) gewaschen und in 1 ml dieses Puffers resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl einer 2,5 %igen Trypsinlösung wurde der Ansatz 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml Tris/HCl + 10 % FCS gestoppt und die Zellen zweimal mit diesem FCS-haltigen Puffer gewaschen. Daran schloss sich die Isolierung der Außenmembranproteinfraktion an (Abschnitt 2.3.4).

2.3.4. Isolierung von Proteinen der äußeren Bakterienmembran

Zur Kontrolle der Expression neu konstruierter Autotransporter-Fusionsgene wurde untersucht, ob das entsprechende Fusionsprotein in der Fraktion der Außenmembranproteine identifiziert werden konnte. Die Außenmembranproteinisolierung wurde nach einem von Hantke (1981) beschriebenen Protokoll in leicht modifizierter Form durchgeführt. Der zu untersuchende *E. coli*-Stamm wurde vorbereitet wie in Abschnitt 2.1.5 beschrieben. Abweichend davon wurde allerdings das gesamte Sediment einer 20 ml Hauptkultur für die folgenden Schritte verwendet. Für die Untersuchung der Proteasesensitivität des Fusionsproteins wurden die Zellen vorbehandelt wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben.

Das Bakteriensediment wurde zweimal mit 0,2 M Tris/HCl-Puffer (pH 8) gewaschen und anschließend in 1,5 ml dieser Lösung resuspendiert. Durch Zugabe von 100 µl Saccharose (1 M), 100 µl EDTA (10 mM), 100 µl Lysozym (10 mg/ml) und 3,2 ml

Reinstwasser wurde die Zellwand hydrolysiert. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden so Sphäroplasten erzeugt. Diese wurden durch Zugabe von 5 ml Extraktionspuffer aufgeschlossen und mögliche Proteasen durch Zugabe von 50 μ l PMSF (100 mM) und 10 μ l Aprotinin (10 mg/ml) inhibiert. Außerdem wurde 100 μ l DNase I (1 mg/ml) zugegeben, um freierwerdende DNA innerhalb der 25-minütigen Inkubation (bei 4 °C) abzubauen. Zelltrümmer wurden bei 2.400 $\times g$ (5 min, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt und bei 38.500 $\times g$ (10 min, 4 °C) zentrifugiert. Der Überstand dieses Zentrifugationsschritts wurde verworfen, das Sediment vorsichtig mit 2 ml N-Laurylsarcosin gewaschen und erneut bei 38.500 $\times g$ (10 min, 4 °C) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml Reinstwasser aufgenommen, in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und bei 15.000 $\times g$ sedimentiert (10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in einem Volumen Reinstwasser aufgenommen, das dem Volumen des Sediments entsprach. Diese Proteinlösung wurde mit 1,5-fachem Volumen SDS-Probenpuffer versetzt. Vor Trennung und Analyse durch SDS-PAGE wurde die Proteinprobe für 5-10 min bei 95 °C denaturiert. So präparierte Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE getrennt oder bei -20 °C gelagert.

2.3.5. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach ihrem Molekulargewicht auftrennen und analysieren zu können, wurde die Methode der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese mit dem Puffersystem nach Laemmli angewendet (Laemmli, 1970). Dazu wurden standardmäßig 12,5 %ige Gele (8 cm) gegossen, die aus einem ca. 1 cm hohen Sammelgel und einem ca. 7 cm hohen Trenngel bestanden (Mini Protean System, Bio-Rad, München). Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V gestartet, bis die durch Bromphenolblau sichtbare Lauffront das Sammelgel durchlaufen hatte. Das Netzteil wurde im „current-Modus“ betrieben. Wenn die Gelkammer ein Gel enthielt wurden 25 mA angelegt, wenn Sie zwei Gele enthielt 50 mA. Die Elektrophorese wurde durchgeführt, bis die durch Bromphenolblau sichtbare gemachte Lauffront das Trenngel verlassen hatte. Zum Größenvergleich wurde ein Proteingemisch definierter Größe eingesetzt („PAGE Ruler unstained“, Fermentas, St. Leon-Rot). Nach der SDS-PAGE wurde das Gel für 15-30 min in Coomassie Brilliant Blue-Lösung gefärbt und anschließend über mehrere Stunden in Essigsäure (10 % in Reinstwasser) soweit entfärbt, bis die unspezifische Hintergrundfärbung verschwand und nur noch die gefärbten Proteinbanden zu sehen waren.

2.3.6. Radiometrischer CK2 Aktivitätstest

Die Aktivität der CK2 wurde über die Phosphorylierung des CK2-spezifischen Substratpeptids RRRDDDSDDD (Kuenzel *et al.*, 1987) mit γ -[³²P]-ATP als Cosubstrat bestimmt. Die Reaktion wurde gestartet, indem 0,25 μ g heterotetramere CK2 in 20 μ l Kinasepuffer zu 30 μ l Assaypuffer (radioaktiv) gegeben wurde. Die Probe wurde 5 min bei 37 °C inkubiert und dann zum Abstoppen der Reaktion auf Eis gestellt. Je 30 μ l wurden auf ein ca. 1 x 1 cm großes P81 Kationenaustauscher-Filterpapier (P81 Phosphozellulose, Whatman, Maidstone, UK) überführt und anschließend dreimal 5 min mit 85 mM Phosphorsäure und einmal mit purem Ethanol gewaschen. Die Filterblättchen wurden getrocknet, in Szintillationsgefäße überführt und im Szintillationsanalysator (TRI-CARB, Canberra-Packard, Dreieich) gemessen. In der einminütigen Messung wurde die von den Filterblättchen ausgehende Čerenkov-Strahlung als „counts per minute“ (cpm) gemessen.

2.3.7. FRET-gestützter Aktivitätstest

Im Falle der Inhibitionstests wurde die Testsubstanz initial in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst. Um die gewünschte Konzentration der Testsubstanz zu erreichen wurde diese Lösung mit Kinasepuffer verdünnt. Die Endkonzentration an DMSO im Reaktionsansatz war dabei \leq 1%. In einem Gesamtvolumen von 4 μ l Kinasepuffer waren 5 μ g heterotetramere CK2 enthalten, sowie für einen Inhibitionstest 10 μ M Testsubstanz. Dieser Ansatz wurde 10 min bei 37 °C vorinkubiert. Die CK2-Reaktion wurde durch Zugabe von 6 μ l Assaypuffer (mit D/E-Peptid) gestartet. Der Reaktionsansatz mit einem Volumen von 10 μ l wurde 60 min bei 37 °C und hoher Luftfeuchtigkeit in einer 384 well Platte inkubiert. Anschließend wurden pro Ansatz 10 mU Schweinepankreaselastase in Tris-Puffer (1 mM Tris/HCl, pH 8,5) zugegeben, sodass ein Endvolumen von 40 μ l pro well erhalten wurde. Die entstehende Fluoreszenz wurde mit einem Mikrotiterplattenleser (Mitras LB 940, Berthold, Bad Wildbad) und der Software MikroWin 2000 bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm (Bandbreite: 40 nm) und einer Emissionswellenlänge von 535 nm (Bandbreite: 25 nm) detektiert. Die erhaltenen Fluoreszenzwerte sind als Mittelwerte aus n=3 Messungen mit Standardabweichung angegeben. Die statistische Analyse wurde mit einem ungepaarten Student's *t*-Test durchgeführt und Werte von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

2.3.8. Fluoreszenzspektrum

Das Fluoreszenzspektrum des EDANS-markierten Peptids wurde bei einer Peptidkonzentration von 10 μM mit dem „LS-5B luminescence spectrometer“ und der „CFS control software“ (PerkinElmer, Walham, MA, USA) aufgenommen.

2.3.9. Kapillarelektrophoretische Analyse von Peptiden

CK2 Substratpeptide wurden kapillarelektrophoretisch untersucht. Dazu wurde das „ProteomeLab PA 800 Protein Characterization System“ der Firma Beckman Coulter (Krefeld) eingesetzt. Zur Trennung wurden „bare fused silica“ Kapillaren mit 20 cm oder 50 cm effektiver Länge und 50 μm Innendurchmesser (375 μm Außendurchmesser) benutzt. Hintergrundelektrolyt war 2 M wässrige Essigsäure. Ein Diodenarraydetektor wurde bei einer Wellenlänge von 214 nm zur Aufzeichnung der Absorption eingesetzt. Die Software „32Karat Version 7.0“ (Beckman Coulter, Krefeld) diente zur Programmierung des Geräts und zur Auswertung des Elektropherogramms. Vor der erstmaligen Benutzung der Kapillare wurde diese mit 0,1 M NaOH konditioniert, mit Reinstwasser gespült und danach mit 2 M wässriger Essigsäure äquilibriert. Diese Prozedur wurde vor jeder Messung wiederholt.

2.3.10. Kapillarelektrophoretische CK2-Aktivitätsbestimmung

Heterotetrameres CK2-Enzym (0,25 μg) wurde in einem Gesamtvolumen von 80 μl Kinasepuffer aufgenommen und auf 37 °C temperiert. Die Kinasereaktion wurde durch die Zugabe von 120 μl Assaypuffer (mit 200 μM ATP, auf 37 °C vorgewärmt) gestartet. Für standardmäßige Aktivitätstests wurde die Reaktion nach 15 min bei 37 °C durch die Zugabe von 2 μmol EDTA gestoppt. Die Probe wurde anschließend bei 4 °C gelagert, bis sie in die Kapillare injiziert wurde. Für die Untersuchung der vollständig phosphorylierten Peptidfraktion wurde eine Kinasereaktion 209 min bei 37 °C inkubiert. In kinetischen Untersuchungen wurde der Probenraum des Kapillarelektrophorese-Systems auf 37 °C temperiert und die Probe direkt nach Reaktionsstart dort gelagert. Die Einzelproben wurden nach den im Ergebnisteil angegebenen Zeitintervallen durch den Autosampler direkt aus dem Reaktionsansatz entnommen. Nach der Injektion wurde der Ansatz zurück in den Probenraum gefahren und bei 37 °C weiter inkubiert.

2.3.11. Kapillarelektrophoretische Inhibitionstestung der CK2

Im Gegensatz zum Aktivitätstest wurden im Inhibitionstest die Bedingungen so angepasst, wie sie im radiometrischen Testverfahren (vgl. Abschnitt 2.3.6) standardmäßig eingesetzt wurden. Unter diesen Bedingungen sollten die Ergebnisse besser mit Literaturwerten verglichen werden können. Heterotetrameres CK2-Enzym (1 µg) wurde dafür in 80 µl Kinasepuffer aufgenommen und auf 37 °C temperiert. Zu diesem Ansatz wurden 2 µl Testsubstanz gegeben, die zuvor in purem DMSO gelöst wurde. Als Kontrolle für die ungehemmte CK2-Reaktion (=100 % Aktivität) wurde ein Ansatz mit 2 µl DMSO inkubiert. Nach einer Inkubationsdauer von 10 min bei 37 °C wurden 120 µl Assaypuffer zugegeben, der auf 37 °C vorgewärmt worden war. Die CK2-Reaktion wurde nach 15 min bei 37 °C durch Zugabe von 2 µmol EDTA gestoppt und die Probe bis zur Injektion in die Kapillare bei 4 °C gelagert. Die Parameter für die Trennung von unphosphoryliertem Peptid und phosphoryliertem Peptid variierten und sind im Ergebnisteil (Abschnitt 2.2) jeweils genannt. Die statistische Analyse wurde mit einem ungepaarten Student's *t*-Test durchgeführt und Werte von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Bei einer Bestimmung des IC_{50} Wertes wurden die relative Inhibition der CK2 bei verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz bestimmt und in ein semilogarithmisches Diagramm gegen die jeweilige Konzentration der Testsubstanz aufgetragen. An diese Werte wurde eine vierparametrische sigmoidale Ausgleichsfunktion angepasst, mit deren Hilfe der IC_{50} Wert der Substanz bestimmt werden konnte. Die Berechnung dieser Ausgleichfunktion erfolgte mit dem Programm „Prism“ (GraphPad, LaJolla, CA, USA).

2.3.12. Selektivitätsuntersuchung der Hemmung von „TF“ auf Proteinkinasen

Zum Zweck einer Selektivitätsbestimmung wurde die Inhibition von TF gegenüber 63 isolierten humanen Proteinkinasen getestet. Diese Experimente wurden von Reaction Biology (Malvern, PA, USA) durchgeführt. TF wurde in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt. Pro Proteinkinase wurde in Doppelbestimmungen die relative Aktivität im Vergleich zu einer Probe ohne TF bestimmt. Die ATP-Konzentration betrug in allen Kinasereaktionen 10 µM.

III Experimente und Ergebnisse

1. Autodisplay der Untereinheiten der humanen CK2 in *E. coli*

Im ersten Teil der Untersuchungen sollten die katalytisch aktive α -Untereinheit und die katalytisch inaktive β -Untereinheit der humanen CK2 mittels Autodisplay an der Zelloberfläche von *Escherichia coli* präsentiert werden. Dazu sollten zunächst zwei Expressionsplasmide mit entsprechenden Autotransporter-Fusionsgenen konstruiert werden. Anschließend sollte die Kinaseaktivität dieses Ganzzellsystems und sein möglicher Einsatz in einem CK2-Inhibitionstest verifiziert werden. Die cDNA der humanen CK2 α und CK2 β wurden vom Arbeitskreis Montenarh (Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar) zur Verfügung gestellt.

1.1. Konstruktion der Autotransporter-CK2-Fusionsgene

1.1.1. Konstruktion des Plasmids pSS001 zum Autodisplay der CK2 α

Die für die humane CK2 α codierende Sequenz wurde ohne Start- und Stoppcodon von der Matrize pGEX-CK2 α mit den beiden Oligonukleotiden Pr199 und Pr200 amplifiziert. Durch die verwendeten Primer wurde das Amplikon mit Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen Sall am 5'-Ende und Acc65I am 3'-Ende versehen. Das Produkt der PCR sollte eine Größe von 1.187 bp besitzen, was durch Agarosegelelektrophorese bestätigt wurde. Dieses DNA-Fragment wurde aus dem Gel extrahiert, mit den Enzymen Sall und Acc65I geschnitten und erneut über ein Agarosegel mit anschließender Extraktion aufgereinigt. Um dieses Fragment in den Vektor pBL002 einzubringen, wurde dieser mit XhoI und Acc65I geschnitten. Dadurch wurde die in pBL002 vorhandene Passagiersequenz dieses Autotransporter-Fusionsgenes entfernt und es wurden kompatible Enden für das zuvor präparierte Fragment geschaffen. Durch Agarosegelelektrophorese wurde die codierende Sequenz des alten Passagiers (1.353 bp) vom Vektorrückgrat (4.832 bp) getrennt und letzteres nach Aufreinigung mit dem CK2 α -codierenden Fragment ligiert (Abbildung 5). Es entstand ein neues Fusionsgen mit einer Größe von 2.610 bp. *E. coli* UT5600(DE3) Zellen wurden per Elektroporation mit diesem Ligationsansatz transformiert und auf kanamycinhaltigem Selektionsmedium ausplattiert. Die Plasmide mehrerer Kolonien wurden isoliert und mittels Restriktionsanalyse kontrolliert. Ein Klon, dessen Plasmid ein korrektes Restriktionsmuster zeigte, wurde ausgewählt. Die DNA-Sequenzanalyse dieses Plasmids ergab eine vollständige

Übereinstimmung mit der für CK2 α codierenden Sequenz CSNK2A1 (UniProt Accession Number: P68400). Dieses Autodisplayplasmid wurde im Weiteren als pSS001 bezeichnet. Eine Karte des Plasmids ist im Anhang abgebildet.

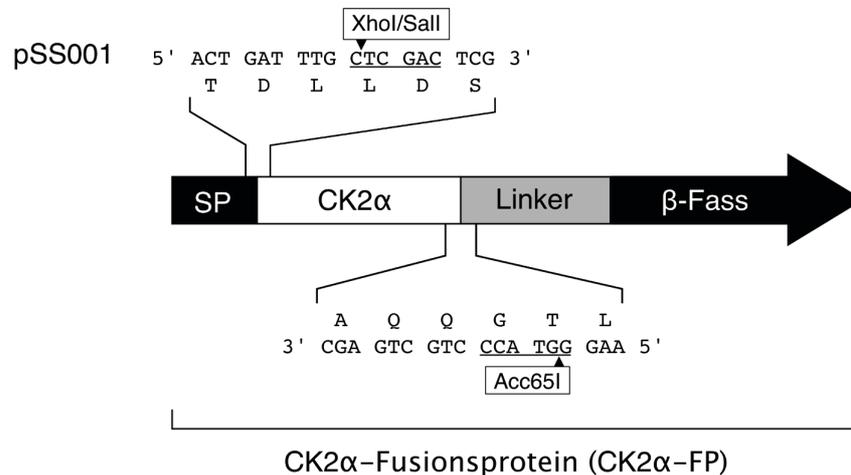


Abbildung 5: Schematische Darstellung des CK2 α -Fusionsproteins (CK2 α -FP). Es besteht aus dem Signalpeptid (SP), der α -Untereinheit der humanen CK2 als Passagier, der Linker- sowie der β -Fass-Domäne. Die zur Konstruktion des CK2 α -FP-Autodisplayplasmids pSS001 verwendeten Restriktionschnittstellen sind hervorgehoben und die codierte Proteinsequenz ist an diesen Stellen angegeben.

1.1.2. Konstruktion des Plasmids pSS002 zum Autodisplay der CK2 β

Die Konstruktion des CK2 β -Autodisplayplasmids wurde weitgehend analog zur Konstruktion von pSS001 durchgeführt. In einer PCR wurde das Gen für CK2 β aus Plasmid pGEX-CK2 β mit den Oligonukleotiden Pr201 und Pr202 amplifiziert. Das Produkt der PCR enthielt den offenen Leserahmen der β -Untereinheit ohne Start- und Stoppcodon und war flankiert von den Erkennungssequenzen für XhoI am 5'-Ende und KpnI am 3'-Ende. Das PCR-Produkt wurde mithilfe des „TOPO TA Cloning Kits“ in den Vektor pCR2.1 ligiert und in *E. coli* Top10 Zellen eingebracht. Nach Plasmid-isolierung und Restriktionskontrolle wurde ein korrektes Plasmid mit den Enzymen XhoI und KpnI geschnitten und das 648 bp große Insert wurde mittels Gelextraktion isoliert. Dieses Insert wurde mit dem ebenfalls XhoI/KpnI geschnittenen Autodisplayplasmid pET-Adx04 ligiert (Abbildung 6) und in *E. coli* DH5 α Zellen eingebracht. Die DNA-Sequenzanalyse dieses Plasmids ergab, dass die CK2 β codierende Sequenz vollständig mit der bei UniProt hinterlegten Sequenz (CSNK2B, Accession Number: P67870) übereinstimmte. Das konstruierte Plasmid enthielt ein Autotransporter-CK2 β Fusionsgen der Größe 2.082 bp und wurde im Folgenden als pSS002 bezeichnet. Eine Karte des Plasmids ist im Anhang abgebildet.

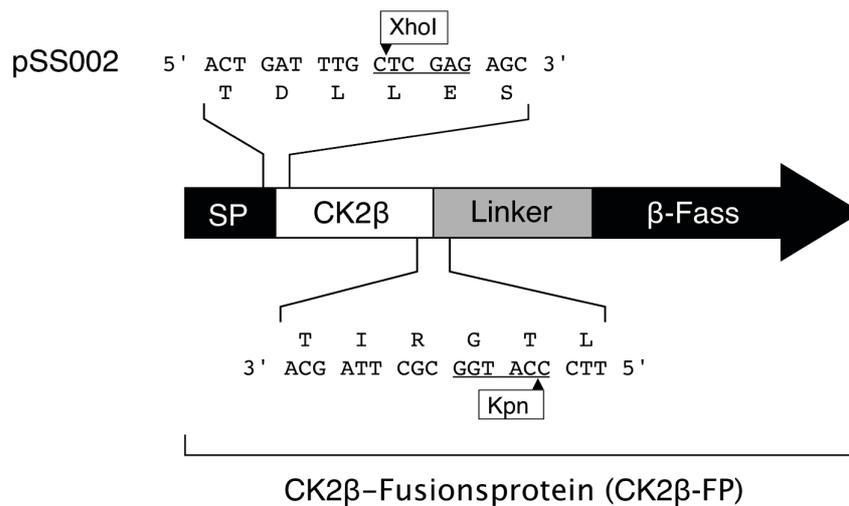


Abbildung 6: Schematische Darstellung des CK2β-Fusionsproteins (CK2β-FP). Es besteht aus dem Signalpeptid (SP), der β-Untereinheit der humanen CK2 als Passagier, der Linker- und der β-Fass-Domäne. Die zur Konstruktion des CK2β-FP-Autodisplayplasmids pSS002 verwendeten Restriktionschnittstellen sind hervorgehoben und die codierte Proteinsequenz ist an diesen Stellen angegeben.

1.2. Autodisplay und Aktivität der CK2 in *E. coli* UT5600(DE3)

1.2.1. Autodisplay der CK2-Untereinheiten in *E. coli* UT5600(DE3)

E. coli UT5600(DE3) pSS001 wurde kultiviert und die Expression des CK2α-Fusionsproteins (CK2α-FP) induziert. Die Proteine der äußeren Zellmembran wurden durch differentielle Zellfraktionierung isoliert und nach Auftrennung durch SDS-PAGE analysiert (Abbildung 7). Als Vergleich dienten Außenmembranproteine des Wirtsstamms *E. coli* UT5600(DE3). Die Proteinbande bei einem apparenten Molekulargewicht von 95 kDa entsprach der errechneten Größe für das CK2α-FP und ließ folgende Schlüsse zu: 1) Das Fusionsgen wurde korrekt exprimiert, 2) der Transport über die innere Membran war erfolgreich und 3) das Fusionsprotein war in der äußeren Membran verankert. Bei den beiden Banden, die in Abbildung 7 (Spuren 1 bis 3) ein niedrigeres apparentes Molekulargewicht zeigten, handelte es sich die prozessierten *E. coli*-Außenmembranproteine OmpF (37 kDa, UniProt Code: P02931), OmpC (38 kDa, UniProt Code: P06996) und OmpA (35 kDa, UniProt Code: P0A910). Mit einer konstanten Anzahl von 2×10^5 Molekülen pro Zelle (Cole *et al.*, 1982) eignet sich OmpA als interner Standard für die Quantifizierung der Autotransporter-Fusionsproteine in der äußeren Zellmembran.

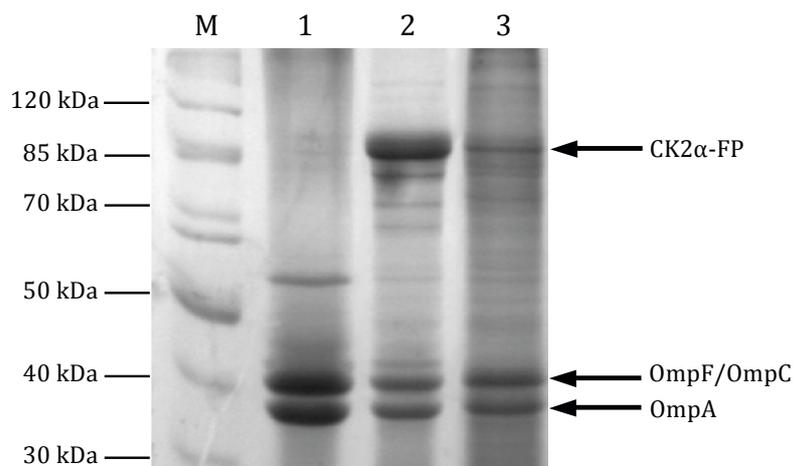


Abbildung 7: Nachweis der Expression und der Oberflächenständigkeit von CK2 α -FP in *E. coli* UT5600(DE3) pSS001. Außenmembranproteine wurden mittels differentieller Zellfraktionierung isoliert, durch SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) aufgetrennt und mit **Coomassie Brilliant Blue** gefärbt. Spur 1 zeigt Außenmembranproteine des Wirtsstamms *E. coli* UT5600(DE3). In Spur 2 sind Außenmembranproteine von *E. coli* UT5600(DE3) pSS001 abgebildet. Spur 3 zeigt eine Probe dieses Stamms, die vor der differentiellen Zellfraktionierung mit Trypsin behandelt wurde (M= Proteingrößenstandard).

Das SDS-PAGE-Gel, das in Abbildung 7 dargestellt ist, wurde einer densitometrischen Analyse unterzogen. Dabei wurde festgestellt, dass die Bande des CK2 α -FP dreifach intensiver war als die Bande von OmpA. Berücksichtigt man das um den Faktor 3 größere Molekulargewicht des Fusionsproteins, so befinden sich ca. 2×10^5 CK2 α -FP in der äußeren Membran von *E. coli* UT5600(DE3) pSS001. Die Zugänglichkeit von Außenmembranproteinen kann durch eine Behandlung ganzer Bakterienzellen mit Trypsin nachgewiesen werden. OmpA besitzt eine C-terminale Domäne, welche die membranständige N-terminale Domäne mit der Peptidoglykanschicht der Bakterienzellwand verbindet. Ist die Integrität der äußeren Membran von *E. coli* gestört, so wird die C-terminale Domäne bei einer Trypsinbehandlung ganzer Zellen proteolytisch angegriffen und die OmpA-Bande bei 35 kDa verschwindet. Ist die äußere Membran hingegen unversehrt, so kann Trypsin diese aufgrund seiner Größe nicht überwinden und OmpA bleibt vollständig erhalten. Falls die äußere Membran intakt ist, kann auch die Orientierung des Autotransporter-Passagier durch Trypsinbehandlung ganzer Zellen untersucht werden. Ist die Passagierdomäne zum Periplasma hin orientiert, so ist sie für Trypsin nicht zugänglich und das Autotransporter-Fusionsprotein ist nach Proteasebehandlung ganzer Zellen in unveränderter Größe und Intensität auf dem SDS-PAGE-Gel zu sehen. Ist der Passagier zum Extrazellularraum gerichtet, kann er von Trypsin abgebaut werden und die Bande des Fusionsproteins ist auf dem Gel nur noch schwach oder gar nicht mehr zu sehen. Nach der Ganzzell-Trypsinbehandlung

(Abbildung 7, Spur 3) konnte OmpA mit einer Größe von 35 kDa in einem SDS-PAGE Gel nachgewiesen werden. Dies zeigte, dass die Integrität der äußeren Membran unversehrt blieb. Anders als OmpA war CK2 α -FP für Trypsin zugänglich und wurde proteolytisch abgebaut. Es konnte nur noch eine äußerst schwache Bande bei 95 kDa detektiert werden. Dieses Experiment belegte, dass die α -Untereinheit der CK2 als Autodisplay-Passagier an der Oberfläche von *E. coli* UT5600(DE3) pSS001 präsentiert wurde.

Die Oberflächenständigkeit der β -Untereinheit als Passagier im Autodisplaysystem wurde analog nachgewiesen. Dazu wurde zunächst *E. coli* UT5600(DE3) mit dem Plasmid pSS002 transformiert. Nach Kontrolle der Aufnahme des korrekten Plasmids und Expression von CK2 β -FP wurde auch hier eine differentielle Zellfraktionierung mit und ohne vorherige Ganzzell-Trypsinbehandlung durchgeführt. In Abbildung 8, Spur 1 ist eine deutliche Bande zwischen 70 und 85 kDa zu erkennen, die mit dem errechneten Gewicht von 74 kDa für CK2 β -FP übereinstimmt. Die vierfache Intensität der Fusionsproteinbande im Vergleich zu OmpA ließ, unter Berücksichtigung der Molekulargewichte, auf eine ungefähre Anzahl von ca. 3×10^5 CK2 β -FP-Molekülen in der äußeren Membran einer Bakterienzelle schließen.

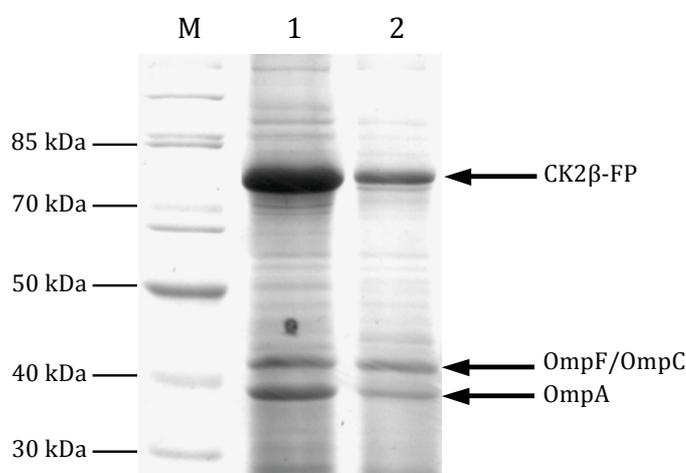


Abbildung 8: Nachweis der Expression und der Oberflächenständigkeit von CK2 β -FP in *E. coli* UT5600(DE3) pSS002. Außenmembranproteine dieses Stamms (Spur 1) wurden mittels differentielle Zellfraktionierung isoliert, durch SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Spur 2 zeigt eine Probe dieses Stamms, die vor der differentiellen Zellfraktionierung mit Trypsin behandelt wurde (M= Proteingrößenstandard).

Nach einer Trypsinbehandlung der CK2 β -tragender Zellen konnte nur wenig Außenmembranprotein gewonnen werden. In Abbildung 8, Spur 2 ist deshalb eine im Vergleich zu Spur 1 geringere Proteinmenge aufgetragen. Der Erhalt von OmpA

deutet auch hier darauf hin, dass die äußere Membran unversehrt blieb. Die insgesamt geringere Proteinmenge in Spur 2 macht einen direkten Vergleich schwierig. Dennoch lässt sich durch Vergleich mit den Banden von OmpA, OmpF und OmpC als internen Standards erkennen, dass die Menge von CK2 β -FP nach Trypsinbehandlung abnahm, jedoch nicht so stark wie zuvor im Falle des CK2 α -FP. Dieses Ergebnis wurde als Hinweis auf eine Oberflächenständigkeit von CK2 β gewertet.

Neben Stämmen, die jeweils eine der beiden CK2-Untereinheiten an der Zelloberfläche präsentieren, wurde ein *E. coli*-Stamm hergestellt, der simultan beide Untereinheiten präsentierte. Dazu wurden elektrokompente *E. coli* UT5600(DE3) pSS001 hergestellt und mit pSS002 transformiert. Die Plasmide pSS001 und pSS002 besitzen Gene für unterschiedliche Antibiotikaresistenzen und ihre Replikationsursprünge stammen aus unterschiedlichen Kompatibilitätsgruppen. Sie können somit problemlos parallel in einem Stamm gehalten werden. Dieser Stamm wurde zur gleichzeitigen Expression beider CK2-Untereinheiten genutzt. Durch differentielle Zellfraktionierung wurden die Proteine der *E. coli*-Außenmembran isoliert und mittels SDS-PAGE analysiert. Zur Identifizierung eventueller Oligomere der CK2-Untereinheiten wurden zusätzlich Proben derselben Außenmembranproteinisolation mit nichtreduzierendem SDS-Probenpuffer präpariert. Durch die in diesen Proben milderen Bedingungen können Oligomere im Gel detektiert werden. In Abbildung 9 sind Isolate von verschiedenen behandelten Außenmembranproteinen des

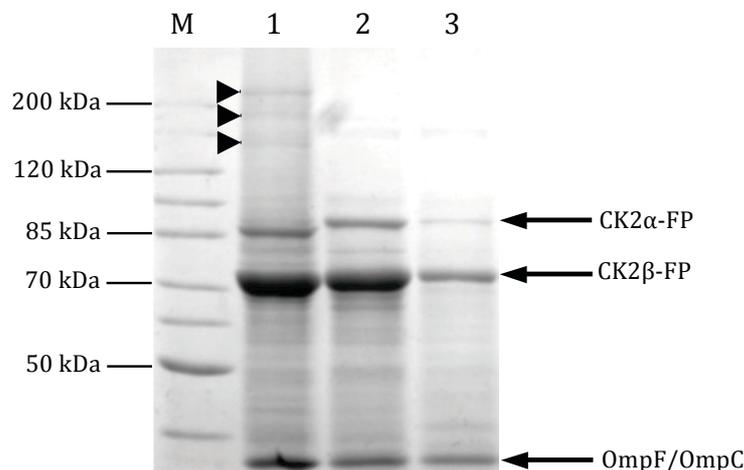


Abbildung 9: Nachweis der Oberflächenständigkeit und der Oligomerisierung der beiden CK2-Fusionsproteine in *E. coli* UT5600(DE3) pSS001+pSS002. Außenmembranproteine dieses Stamms wurden mittels differentieller Zellfraktionierung isoliert, durch SDS-PAGE (7,5 % Acrylamid) aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Spur 2 zeigt eine Probe dieser Proteine mit einer Zugabe von DTT. Wird auf die Zugabe von DTT verzichtet (Spur 1) treten zusätzliche Banden auf, die durch Pfeile gekennzeichnet sind. Spur 3 zeigte den Einfluss einer Trypsinbehandlung vor der differentiellen Zellfraktionierung (mit Zugabe von DTT) (M= Proteingrößenstandard).

E. coli-Stamms gezeigt, der beide Untereinheiten der CK2 coexprimierte. In Spur 2 ist die Probe der standardmäßig präparierten Probe der Außenmembranproteine von *E. coli* UT5600(DE3) pSS001+pSS002 abgebildet. Die beiden erwarteten Banden bei 74 kDa (CK2 β -FP) und bei 95 kDa (CK2 α -FP) sind hier eindeutig zu erkennen, wobei CK2 β -FP in höherer Konzentration in der Außenmembran vorlag. In Spur 1 ist die Auftrennung der Außenmembranproteinpräparation ohne zusätzliche Zugabe von DTT zu sehen. Ohne dieses reduzierende Agens konnte ein leicht verändertes Laufverhalten beider CK2-FP festgestellt werden. Im Vergleich zu Spur 2 zeigte die Bande des CK2 α -FP eine weitere Laufstrecke. Dies trifft bedingt auch für CK2 β -FP zu. Eine mögliche Erklärung wäre eine unvollständige Denaturierung der beiden Proteine. Darüber hinaus waren in der Probe ohne DTT im Gegensatz zu der Probe, die DTT enthielt, zusätzliche, durch Pfeile gekennzeichnete Banden im großen Molekulargewichtsbereich zu erkennen. In Spur 1 konnte eine Bande etwa auf Höhe des doppelten Molekulargewichtes von CK2 β -FP (bei knapp unter 150 kDa) detektiert werden, während die Bande bei >200 kDa dem Heterotetramer (CK2 α -FP)₂(CK2 β -FP)₂ mit einem Molekulargewicht von 336 kDa entsprechen könnte. Bei der dritten zusätzlichen Bande zwischen 150 und 200 kDa könnte es sich um ein (CK2 α -FP)(CK2 β -FP) Dimer handeln (168 kDa). Zu beachten ist hierbei, dass es sich gerade bei der Größenordnung der Banden der nicht vollständig denaturierten Probe ohne DTT um apparente Molekulargewichte handelte. Deshalb war eine eindeutige Zuordnung aufgrund der Laufhöhen nicht möglich. Die drei durch Pfeile markierten Banden deuteten jedoch stark auf eine Oligomerisierung der CK2-Fusionsproteine hin. In Abbildung 9 konnte darüber hinaus die Oberflächenständigkeit von CK2 α -FP und CK2 β -FP durch eine Verringerung der Bandenintensitäten nach Trypsinbehandlung dieser Zellen (Spur 3) bestätigt werden. Insbesondere die in Abbildung 8 nur unvollständig belegte Trypsin zugänglichkeit von CK2 β -FP konnte hier deutlicher gezeigt werden. Damit ist seine Oberflächenständigkeit von CK2 β nachgewiesen.

1.2.2. Untersuchung der Aktivität CK2-präsentierender *E. coli* UT5600(DE3)

Die Stämme, die CK2-Fusionsproteine auf der Oberfläche präsentierten, wurden mit dem radiometrischen Filterbindungstest auf CK2-Aktivität untersucht. Als Substrat diente das CK2-Standardsubstratpeptid mit der Aminosäuresequenz RRRDDDDSDDD. Vor der Aktivitätsmessung wurden die *E. coli* UT5600(DE)-Stämme kultiviert und die Expression der Autotransporter-Fusionsgene für die Dauer von einer Stunde mit 1 mM IPTG induziert. Von einem Teil der jeweiligen Kultur wurden die Proteine der äußeren Bakterienmembran isoliert und per SDS-PAGE analysiert, um das Ausmaß der Expression des rekombinanten Fusionsproteins zu kontrollieren. Abbildung 10

zeigt die Außenmembranproteinpräparationen der Kulturen, welche dem nachfolgend beschriebenen radiometrischen Aktivitätstest unterzogen wurden.

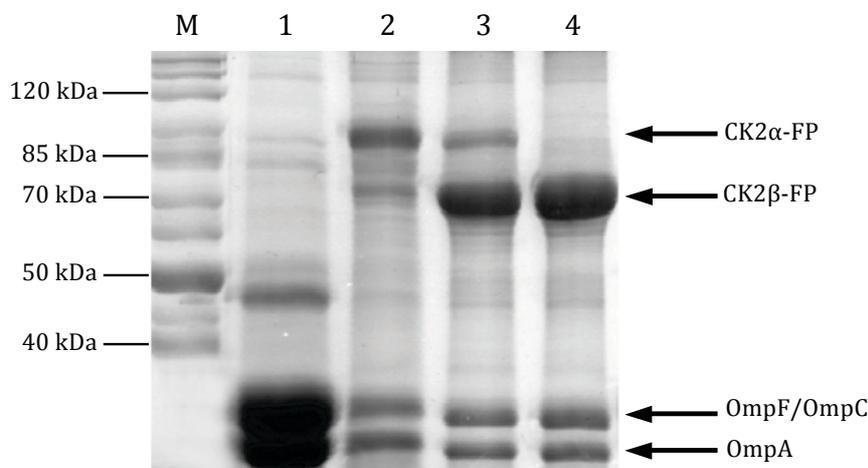


Abbildung 10: Außenmembranproteine der im CK2-Aktivitätstest eingesetzten *E. coli* UT5600(DE3) Kulturen. Diese wurden mittels SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) getrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Dargestellt sind Außenmembranproteine von *E. coli* UT5600(DE3) pSS001 (Spur 2), *E. coli* UT5600(DE3) pSS002 (Spur 4) und *E. coli* UT5600(DE3) pSS001+pSS002 (Spur 3). Zum Vergleich ist in Spur 1 die Präparation der Außenmembranproteine des Wirtsstamms *E. coli* UT5600(DE3) abgebildet (M= Proteingrößenstandard).

In allen Proben war die bereits beschriebene Expression des jeweiligen CK2-Fusionsproteins bzw. der Kombination beider Fusionsproteine nachweisbar. Auch in diesen Proben war, wie schon zuvor beobachtet, eine stärkere Expression des CK2β-FP im Vergleich zum CK2α-FP feststellbar. Die in Spur 2 zu erkennende Bande bei ca. 70 kDa könnte von einem minimalen Übertritt der Probe, die in die Tasche von Spur 3 aufgetragen wurde, stammen. Als Vergleich diente der in Spur 1 abgebildete reine Wirtsstamm *E. coli* UT5600(DE3).

Der jeweils andere Teil der geernteten Zellen wurde in einer Zellkonzentration von $OD_{578}=1$ (entspricht ca. $8,6 \times 10^7$ Zellen pro Milliliter) im radiometrischen Filterbindungstest auf CK2-Aktivität untersucht. Zusätzlich wurden in diesem Test zwei Vergleichsproben getestet. Zum einen eine Probe mit Puffer ohne Zellen, um das inhärente Rauschen des Testsystems festzustellen. Zum anderen eine Probe, die den reinen Wirtsstamm *E. coli* UT5600(DE3) enthielt. Diese gab Aufschluss über eventuelle Störfaktoren durch die Wirtszellen. Die Ergebnisse des CK2-Aktivitätstests aller untersuchten *E. coli* UT5600(DE3)-Stämme sind in Abbildung 11 zusammengefasst.

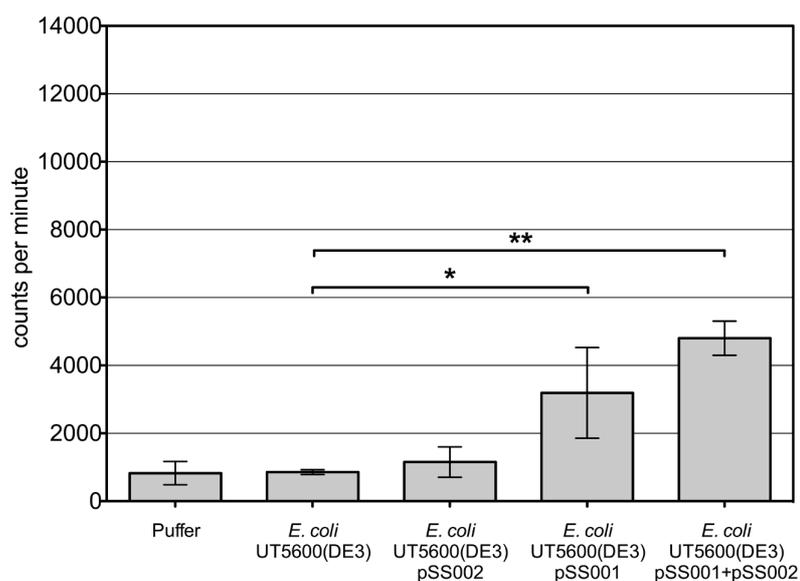


Abbildung 11: Radiometrischer Aktivitätstest mit CK2-exprimierenden *E. coli* UT5600(DE3).

Gemessen wurde die Menge des durch CK2 katalysierten Phosphotransfers von γ -[32 P]-ATP auf das synthetische CK2-Substratpeptid RRRDDSSDDD durch Inkubation mit Zellen, die CK2 β -FP (*E. coli* UT5600(DE3) pSS002), CK2 α -FP (*E. coli* UT5600(DE3) pSS001), oder beide CK2-Fusionsproteine (*E. coli* UT5600(DE3) pSS001+pSS002) an der Oberfläche präsentierten. Zum Vergleich dienten der Wirtstamm *E. coli* UT5600(DE3) und eine Probe ohne Zellen („Puffer“). Dargestellt sind die Mittelwerte aus n=3 Messungen mit Standardabweichung (*p < 0,05; **p < 0,0005).

Die Umsätze des reinen Wirtstamms *E. coli* UT5600(DE3) (857 cpm) und des Stamms *E. coli* UT5600(DE3) pSS002, der die katalytisch inaktive β -Untereinheit als Autodisplay-Passagier enthielt (1.155 cpm), unterschieden sich nicht signifikant von der Probe ohne CK2-Aktivität („Puffer“, 827 cpm). Der Stamm *E. coli* UT5600(DE3) pSS001, der CK2 α auf der Zelloberfläche präsentierte, zeigte mit 3.190 cpm eine signifikant erhöhte CK2-Aktivität (p < 0,05), die vom Stamm *E. coli* UT5600(DE3) pSS001+pSS002 noch übertroffen wurde. Dieser Stamm, der beide CK2-Untereinheiten co-präsentierte, zeigte mit 4.802 cpm einen hochsignifikanten Aktivitätsunterschied zum reinen Wirtstamm (p < 0,0005).

Grundsätzlich konnte nach Expression von CK2 α -FP, ob alleine oder in Kombination mit CK2 β -FP, eine CK2-Aktivität der Bakterienzellen nachgewiesen werden. Berücksichtigt man, dass die CK2 α -FP in der Außenmembran von *E. coli* UT5600(DE3) pSS001+pSS002 in geringerer Konzentration vorliegt als in *E. coli* UT5600(DE3) pSS001 (Abbildung 10), so wird die in Abbildung 11 erkennbare Tendenz des positiven Einflusses der Coexpression beider Autotransporter-Fusionsproteine weiter verstärkt. Auch das Auftreten der Oligomerbanden (Abbildung 9, Spur 1) legt eine Wechselwirkung zwischen den beiden CK2-Fusionsproteinen nahe. Der

positiven Einfluss der Coexpression auf die CK2-Aktivität war im Vergleich zur alleinigen Expression von CK2 α -FP jedoch nicht signifikant.

1.3. Autodisplay und Aktivität der CK2 in *E. coli* BL21(DE3)

1.3.1. Autodisplay der CK2-Untereinheiten in *E. coli* BL21(DE3)

In früheren Arbeiten wurde zum Autodisplay neben dem Stamm *E. coli* UT5600(DE3) auch der Stamm *E. coli* BL21(DE3) eingesetzt (Jose und von Schwichow, 2004; Schultheiss *et al.*, 2008). Um den optimalen Wirtstamm für eine möglichst hohe CK2-Aktivität zu ermitteln, wurde neben dem Stamm *E. coli* UT5600(DE3) auch der Stamm *E. coli* BL21(DE3) mit den Plasmiden pSS001 und pSS002 transformiert. So konnten vergleichende Aktivitätsbestimmungen durchgeführt werden. Die zum Autodisplay der CK2 α und CK2 β konstruierten Plasmide wurden in *E. coli* BL21(DE3) eingebracht und durch Restriktionsanalyse kontrolliert. So entstanden Stämme, die jeweils eins der beiden CK2-Fusionsgene enthielten (*E. coli* BL21(DE3) pSS001 bzw. *E. coli* BL21(DE3) pSS002) und ein Stamm, der beide CK2-Fusionsgene enthielt (*E. coli* BL21(DE3) pSS001+pSS002). Von letzterem wurde zur Kontrolle der Oberflächenständigkeit der beiden CK2-Untereinheiten eine Isolierung der Außenmembranproteine jeweils mit und ohne vorherige Trypsinbehandlung durchgeführt. Das Ergebnis der Auftrennung dieser Außenmembranproteine mittels SDS-PAGE ist in Abbildung 12 dargestellt.

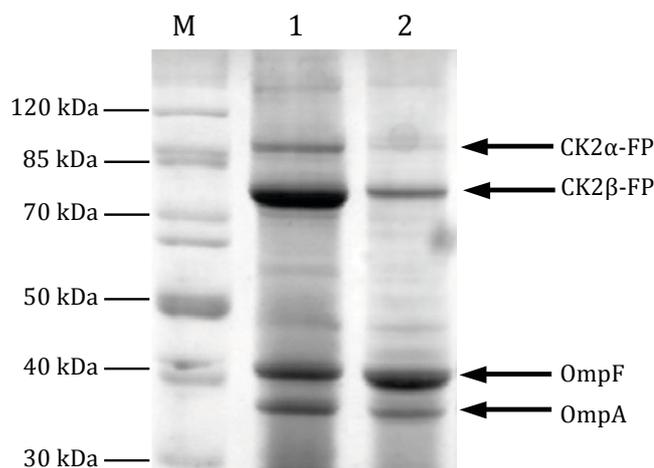


Abbildung 12: Nachweis der Expression und der Oberflächenständigkeit der Fusionsproteine CK2 α -FP und CK2 β -FP in *E. coli* BL21(DE3) pSS001+pSS002. Außenmembranproteine dieses Stamms Spur 1 wurden mittels differentieller Zellfraktionierung isoliert, durch SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Spur 2 zeigt eine Probe dieses Stamms, der vor der Zellfraktionierung mit Trypsin behandelt wurde (M= Proteingrößenstandard).

Die für Stamm *E. coli* BL21(DE3) pSS001+pSS002 erwarteten Banden von 95 kDa für CK2 α -FP und 75 kDa für CK2 β -FP sind in Spur 1 deutlich zu erkennen. Nach Trypsinbehandlung ganzer Zellen nahmen die Intensitäten dieser beider Banden deutlich ab, was auf die Zugänglichkeit der Passagiere für Trypsin zurückzuführen war (Spur 2). Analog zu den Experimenten mit *E. coli* UT5600(DE3) pSS001+pSS002 konnte so auch für *E. coli* BL21(DE3) pSS001+pSS002 die Orientierung der beiden CK2-Untereinheiten zum Extrazellularraum nachgewiesen werden.

1.3.2. Untersuchung der Aktivität CK2-präsentierender *E. coli* BL21(DE3)

Neben den UT5600(DE3)-Stämmen wurden auch die BL21(DE3)-Stämme von *E. coli*, die CK2-Untereinheiten als Autodisplay-Passagiere enthielten, auf CK2-Aktivität hin untersucht. Diese Stämme wurden kultiviert und anschließend wurde die Expression der Fusionsgene in der exponentiellen Wachstumsphase induziert. In Abbildung 13 sind die isolierten und aufgetrennten Außenmembranproteine der im späteren CK2-Test untersuchten Kulturen dargestellt, um die Expressionsstärke der CK2-Fusionsgene vergleichen zu können.

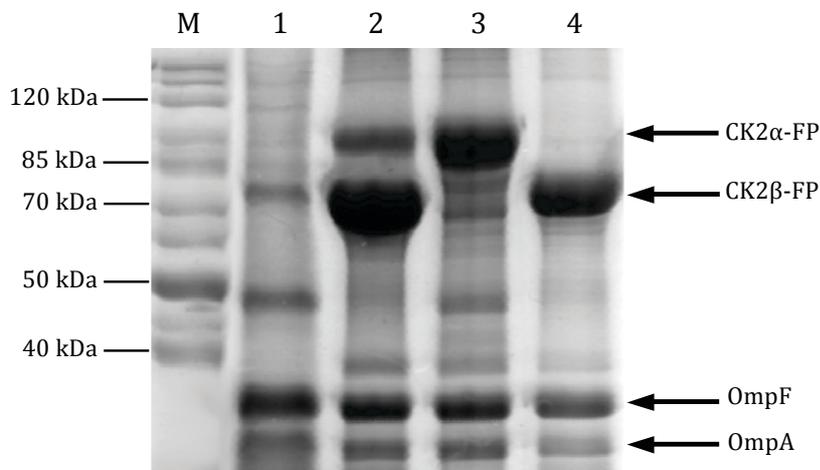


Abbildung 13: Außenmembranproteinisolate der im CK2-Aktivitätstest eingesetzten *E. coli* BL21(DE3) Kulturen. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) getrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Dargestellt sind Außenmembranproteine von *E. coli* BL21(DE3) pSS001 (Spur 3), *E. coli* BL21(DE3) pSS002 (Spur 4) und von *E. coli* BL21(DE3) pSS001+pSS002 (Spur 2). Zum Vergleich sind in Spur 1 die Außenmembranproteine des Wirtsstamms *E. coli* BL21(DE3) gezeigt (M= Proteingrößenstandard).

In allen Proben war eine Expression des jeweilig erwarteten CK2-Fusionsproteins, bzw. im Stamm *E. coli* BL21(DE3) pSS001+pSS002 beider Fusionsproteine, zu beobachten. Als Kontrolle diente der reine Wirtsstamm *E. coli* BL21(DE3), der in

Abbildung 13, Spur 1 dargestellt ist. Die in dieser Spur erkennbare Bande bei ca. 70 kDa war vermutlich auf ein minimales Übertreten der Probe aus Spur 2 zurückzuführen. Im Vergleich zur Expression im Stamm *E. coli* UT5600(DE3) konnte hier eine generell leicht verstärkte Expression der CK2-Fusionsproteine festgestellt werden, wenn man das Protein OmpA als internen Standard zur Quantifizierung zugrunde legte. Im Gegensatz zur Präparation der Außenmembranproteine des Stamms *E. coli* UT5600(DE3) pSS001 in Abbildung 10, Spur 2 fiel außerdem die verstärkte Expression von CK2 α -FP im Stamm *E. coli* BL21(DE3) pSS001 auf.

Analog zum Vorgehen mit *E. coli* UT5600(DE3) wurden auch in den folgenden radiometrischen Aktivitätstests *E. coli* BL21(DE3)-Zellsuspensionen mit einer optischen Dichte von OD₅₇₈=1 (ca. 8,6×10⁷ Zellen pro Milliliter) eingesetzt. Das Ausmaß der Peptidphosphorylierung durch die CK2-Aktivität der beschriebenen Stämme ist in Abbildung 14 zusammengefasst.

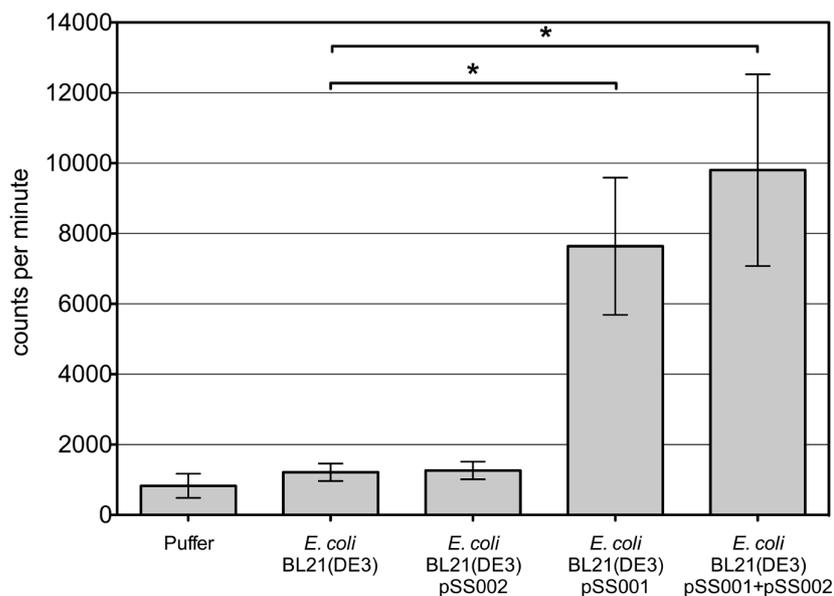


Abbildung 14: Radiometrischer Aktivitätstest mit CK2-exprimierenden *E. coli* BL21(DE3).

Gemessen wurde die Menge des durch CK2 katalysierten Phosphotransfers von γ -[³²P]-ATP auf das synthetische CK2-Substratpeptid RRRDDDSDDD durch Inkubation mit Zellen, die CK2 β -FP (*E. coli* BL21(DE3) pSS002), CK2 α -FP (*E. coli* BL21(DE3) pSS001), oder beide CK2-FP (*E. coli* BL21(DE3) pSS001+pSS002) an der Oberfläche präsentierten. Zum Vergleich wurde der Wirtstamm *E. coli* BL21(DE3) und eine Probe ohne Zellen („Puffer“) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n=3 Messungen mit Standardabweichung (* p < 0,005).

Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) pSS002, der ausschließlich die enzymatisch inaktive β -Untereinheit als Autodisplay-Passagier enthielt, zeigte einen Messwert von

1.264 cpm. Er befand sich damit auf dem Niveau des reinen Wirtsstamms (1.211 cpm) und der Pufferkontrolle ohne Zellen (827 cpm). Diese drei Proben hatten keine CK2-Aktivität und zeigten folglich das Hintergrundrauschen des Testverfahrens. Für die CK2 α -FP-enthaltenden Stämme *E. coli* BL21(DE3) pSS001 und *E. coli* BL21(DE3) pSS001+pSS002 war eine, im Vergleich zu der des reinen Wirtsstammes, signifikant erhöhte CK2-Aktivität feststellbar. Dies bestätigte, dass CK2 α sowohl einzeln als auch in Kombination mit CK2 β mittels Autodisplay in aktiver Form auf der Oberfläche von *E. coli* BL21(DE3) präsentiert werden konnte. Im Vergleich zu den entsprechenden UT5600(DE3)-Stämmen war die CK2-Aktivität von *E. coli* BL21(DE3) pSS001 mit 7.638 cpm um den Faktor 2,4 und die Aktivität von *E. coli* BL21(DE3) pSS001+pSS002 mit 9.802 cpm um den Faktor 2,0 größer. Auffällig war, dass der *E. coli* BL21(DE3) pSS001+pSS002 eine um den Faktor 1,2 höhere CK2-Aktivität aufwies als *E. coli* BL21(DE3) pSS001, obwohl im letzteren Stamm das CK2 α -FP im Vergleich in 4 bis 8-facher Menge in der Außenmembran vorkam. Wenn man diese starke Expression des katalytisch aktiven CK2 α -FP im Stamms *E. coli* BL21(DE3) pSS001 mit einbezieht, kann von einer 5- bis 10-fach höheren CK2-Aktivität des Stamms *E. coli* BL21(DE3) pSS001+pSS002 ausgegangen werden. Auch hier kann lediglich von einer Tendenz gesprochen werden. Die CK2-Aktivitäten dieser beiden Stämme (Abbildung 14) unterschieden sich nicht signifikant.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse des Autodisplays der CK2-Untereinheiten in *E. coli* BL21(DE3) die Erkenntnisse der Ganzzellaktivitätsbestimmung mit *E. coli* UT5600(DE3). In beiden Fällen ist das Autodisplay von CK2 α hinreichend, um Kinaseaktivität mit dem CK2-spezifischen Substrat RRRDDDSDDD radiometrisch nachweisen zu können. Daneben konnte jeweils durch zusätzliches Autodisplay von CK2 β die Aktivität weiter gesteigert werden. Die CK2-Aktivität der oberflächenexponierten Passagiere war in *E. coli* BL21(DE3) unter gleichen Versuchsbedingungen etwa doppelt so groß wie in *E. coli* UT5600(DE3). Für entsprechende CK2-Aktivitätstest im Ganzzellsystem ist demnach *E. coli* BL21(DE3) am besten geeignet.

Die CK2-präsentierenden Stämme wurden mit dem Ziel konstruiert eine einfache CK2-Enzymquelle zur Inhibitionstestung bereitzustellen und die aufwendige Isolierung der sonst intrazellulär in *E. coli* produzierten CK2 zu ersetzen. Durch eine Kultivierung und Induktion der hier beschriebenen Stämme war die für diesen Zweck benötigte CK2-Aktivität innerhalb eines Tages verfügbar.

1.4. CK2-Inhibitionstest im Ganzzellsystem

1.4.1. Modulation der Aktivität oberflächenpräsentierter CK2 durch TBB

Die Möglichkeit der Anwendung CK2-tragender *E. coli*-Zellen in einem Inhibitionstest wurde im Arbeitskreis von Prof. Montenarh (Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar) überprüft. Dazu wurden *E. coli* BL21(DE3) pSS002 und *E. coli* BL21(DE3) pSS001+pSS002 kultiviert und die Expression der Fusionsgene induziert. Im radiometrischen CK2-Test wurde statt des normalerweise eingesetzten isolierten CK2-Enzyms eine Zellsuspension mit einer Endkonzentration $OD_{578}=1$ (ca. $8,6 \times 10^7$ Zellen pro Milliliter) eingesetzt. Jeder Stamm wurde 10 min mit je 5 verschiedenen Konzentrationen des CK2-Inhibitors TBB (Abbildung 3) zwischen 0,1 und 50 μM oder ohne TBB inkubiert. Allen Proben wurde das gleiche Volumen DMSO zugegeben, das als Lösungsmittel von TBB diente. Die Phosphotransferaseaktivität der CK2 wurde mithilfe des synthetischen Substratpeptid RRRDDDSDDD radiometrisch bestimmt und ist in Abbildung 15 dargestellt.

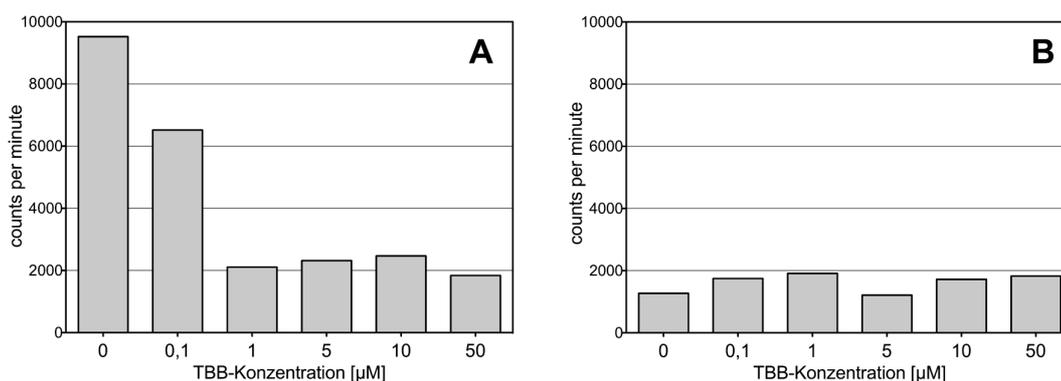


Abbildung 15: Dosisabhängige Hemmung der CK2-Aktivität von *E. coli* BL21(DE3) pSS001+pSS002 durch Inkubation mit TBB (A). Zellsuspensionen einer $OD_{578}=1$ wurden mit den angegebenen Konzentrationen an TBB für 10 min inkubiert. Anschließend wurde im radiometrischen CK2-Test das Ausmaß des Phosphotransfers von γ - $[^{32}\text{P}]$ -ATP auf das synthetische CK2-Substratpeptid RRRDDDSDDD detektiert. **(B)** *E. coli* BL21(DE3) pSS002 dienten als Kontrolle (keine CK2-Aktivität) und wurden ebenso behandelt.

E. coli BL21(DE3) pSS001+pSS002 ohne TBB zeigte einen Messwert von 9.524 cpm (Abbildung 15 A), welcher die CK2-Aktivität dieses Stamms im vorherigen Aktivitätstests widerspiegelte (9.802 cpm, Abbildung 14). Verglichen damit konnte eine Reduktion der CK2-Aktivität mit zunehmender TBB-Konzentration verzeichnet werden. Nach Inkubation des Stamms mit 0,1 μM TBB war mit 6.517 cpm bereits eine

deutliche Inhibition der CK2-Aktivität feststellbar. Ab einer TBB-Konzentration von $1 \mu\text{M}$ wurde ein Messwert von ca. 2.000 cpm erreicht, der auch durch höhere Konzentrationen nicht weiter unterschritten wurde. Die Ergebnisse der Inhibitionstests mit *E. coli* BL21(DE3) pSS001+pSS002 belegen eine dosisabhängige Hemmung der CK2-Aktivität durch TBB. Da TBB als spezifischer Inhibitor der CK2 beschrieben wurde (Sarno *et al.*, 2001), bestätigte dieses Ergebnis, dass in diesem Testverfahren mit Bakterien tatsächlich die CK2-Aktivität detektiert wurde. Das Experiment wurde mit *E. coli* BL21(DE3) pSS002 wiederholt (Abbildung 15 B). Dieser Stamm präsentierte die katalytisch inaktive β -Untereinheit der CK2 an der Zelloberfläche. So konnten eventuelle störende Einflüsse variierender TBB-Konzentrationen auf die Bakterienzellen und das Testverfahren untersucht werden. Die Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an TBB hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die erzielten Messwerte dieser Proben. Der durchschnittliche Messwert von ca. 1.800 cpm lag nur marginal über dem Messwert, der in Abbildung 14 für den reinen Wirtstamm vermerkt wurde. CK2-unabhängige, falsch-positive Messwerte konnten so ausgeschlossen werden. Das Autodisplay von CK2 β , bzw. die durch die Überexpression induzierten Veränderungen auf zellulärer Ebene hatten ebenfalls keinen merklichen Einfluss auf den Basalwert der CK2-Aktivitätsmessung. Ein Wert um 2.000 cpm konnte demnach als Hintergrundrauschen des Testverfahrens festgestellt werden. Demnach konnte die CK2-Aktivität von *E. coli* BL21(DE3) pSS001+pSS002 bei einer TBB-Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ um ca. 40 % gehemmt werden. Eine Inkubation dieser Zellen mit einer TBB-Konzentration von $1 \mu\text{M}$ oder höher führte zu einer vollständigen Hemmung der CK2-Aktivität.

1.4.2. Bestimmung des IC₅₀ Wertes von TBB mit oberflächenpräsentierter CK2

Zur Bestimmung des IC₅₀ Werts von TBB mit *E. coli* BL21(DE3) pSS001+pSS002 wurde der Inhibitionstest wegen starker Schwankungen in den vorangegangenen radiometrischen Bestimmungen mit einer Dreifachbestimmung pro Inhibitorkonzentration wiederholt. Die Ermittlung des IC₅₀ Wertes erfolgte mit den Mittelwerten der Messergebnisse für die einzelnen TBB-Konzentrationen. Dazu wurde die Aktivität der Probe ohne Zugabe von TBB gleich 100 % gesetzt und aus den mit TBB behandelten Proben relative Aktivitäten berechnet. Für die Inhibition galt dann: 100 % minus relative Aktivität. Die Inhibition wurde in einem semilogarithmischen Dosis-Effektdiagramm gegen die TBB-Konzentration dargestellt (Abbildung 16). An die einzelnen Werte wurde eine sigmoidale Ausgleichskurve angepasst. Diese wurde mittels einer vierparametrischen Ausgleichsfunktion mit dem Programm „Prism“ (GraphPad, La Jolla, CA, USA) berechnet. Daraus ließ sich ein IC₅₀ Wert von $0,295 \mu\text{M}$ bestimmen.

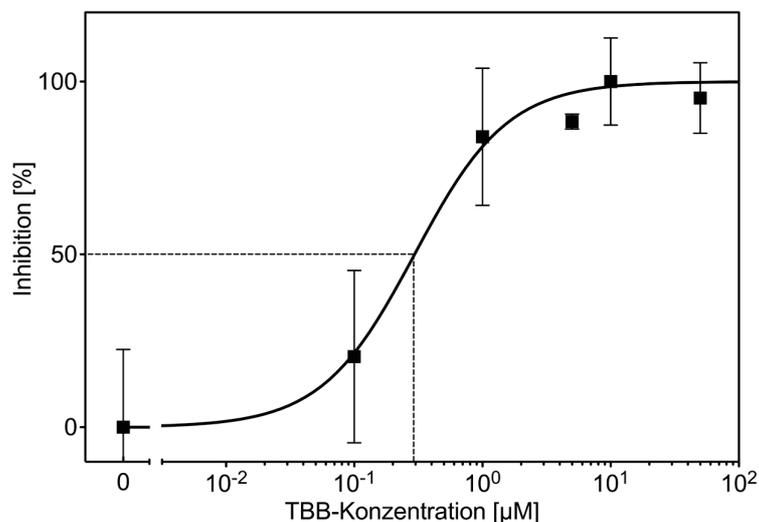


Abbildung 16: Bestimmung des IC_{50} Wertes von TBB mittels oberflächenexprimierter CK2 in *E. coli* BL21(DE3) pSS001+pSS002. Eine Zellsuspension einer $\text{OD}_{578}=1$ wurde jeweils mit den angegebenen Konzentrationen an TBB für 10 min inkubiert. Die Proben wurde einem radiometrischen CK2-Test unterzogen und relative Inhibitionen bezogen auf die unbehandelte Probe berechnet ($n=3$; gezeigt sind $\text{MW}\pm\text{SD}$). Der IC_{50} Wert wurden durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet.

Wie schon in den zuvor beschriebenen radiometrischen CK2-Tests mit Zellsuspensionen zeigten die Messwerte der mit TBB behandelten Proben teilweise hohe Standardabweichungen. Dennoch hatte die Ausgleichsfunktion ein Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,989. Trotz der für eine Standardanalytik nicht zufriedenstellenden Schwankung konnte mit diesem Experiment die Eignung des CK2-Autodisplays für einen quantitativen CK2-Inhibitionstest nachgewiesen werden. Auch mit aufgereinigtem CK2-Enzym zeigte der radiometrische Kinasetest teilweise starke Schwankungen, sodass die Größe der Standardabweichungen nur zum Teil auf die Verwendung der Zellsuspension mit oberflächenpräsentierter CK2 zurückzuführen war. Einen weiteren Grund für die Schwankungen im radiometrischen Test könnte die aus mehreren Schritten bestehende manuelle Probenaufbereitung darstellen. Um die Probleme des radiometrischen Tests zu umgehen und weil in der Arbeitsgruppe kein Isotopenlabor zur Verfügung stand, wurden alternative Testverfahren benötigt.

2. Entwicklung neuer Testverfahren für CK2-Inhibitoren

Nachfolgend wird die Entwicklung zweier Aktivitätstests für die Proteinkinase CK2 beschrieben, die dazu dienen sollten, den radiometrischen Standardtest zu ergänzen und gegebenenfalls zu ersetzen. Beide Tests basieren auf dem Nachweis eines synthetischen Substratpeptids mit der Sequenz RRRDDDSDDD (Kuenzel *et al.*, 1987), bzw. dessen Derivaten. Für die folgenden Studien wurde die humane Proteinkinase CK2 rekombinant in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt.

2.1. FRET-gestützter CK2-Aktivitätstest

2.1.1. Theoretischer Ansatz

Die Entwicklung des ersten Testverfahrens stützte sich auf die Überlegung, die Phosphorylierung eines Substratpeptids dadurch nachzuweisen, dass Substrat und Produkt der CK2 von einer Protease mit unterschiedlicher Umsatzgeschwindigkeit gespalten werden. Das grundsätzliche Prinzip dieses Testverfahrens wurde bereits publiziert und diente als Basis dieser Experimente (Rodems *et al.*, 2002). Ursprünglich wurde es allerdings für anderen Proteinkinasen beschrieben und sollte in diesen Experimenten analog mit der CK2 durchgeführt werden. Voraussetzung für das Gelingen dieses Prinzips war die Verfügbarkeit eines passenden CK2-Substrats. Bei der Suche nach möglichen Proteaseschnittstellen im Peptid RRRDDDSDDD wurde mit Hilfe der Sequenzanalysesoftware GCG (Accelrys, San Diego, CA, USA) die Peptidbindung zwischen Serin und Aspartat als Schnittstelle der Schweinepankreas-Elastase vorausgesagt. Die Substratspezifität von Schweinepankreas-Elastase war auch im Datenblatt der Firma Roche (Mannheim) angegeben. Sie spaltet die Peptidbindung zwischen einer ungeladenen, nicht-aromatischen Aminosäure und einer beliebig folgenden Aminosäure. Humane CK2 phosphoryliert das Substrat RRRDDDSDDD am Serylrest, wodurch dieser negativ geladen wird (Kuenzel *et al.*, 1987). Der Phosphatrest würde also die Erkennungssequenz der Elastase maskieren. Diese Stelle entspräche dann nicht mehr der Anforderung einer ungeladenen, nicht-aromatischen Aminosäure im Erkennungsmotiv der Elastase. Wie in Abbildung 17 dargestellt, sollte die Phosphorylierung des Peptids durch CK2 dessen Spaltung verhindern. Die Analytik der Peptidspaltung sollte durch terminale Modifizierung des Peptids RRRDDDSDDD mit einem Fluorophor und einem Quencher möglich gemacht werden. Am N-Terminus wurde das Peptid mit dem Quencher DABCYL (4-[[4-(Dimethylamino)phenyl]azo]benzoesäure) und am C-Terminus mit dem Fluorophor EDANS (5-[(2-Aminoethyl)amino]naphthalin-1-sulfonsäure) konjugiert. Das Peptid [DABCYL]-RRRDDDSDDD-[EDANS] wird nachfolgend als D/E-Peptid bezeichnet.

Die Kombination der Moleküle DABCYL und EDANS wird häufig in Untersuchungen molekularer Wechselwirkungen eingesetzt (Beythien und White, 2005; Weimer *et al.*, 2006). Hier macht man sich ein Phänomen zunutze, das als Fluoreszenz-(oder Förster-)Energie-Resonanz-Transfer (FRET) bezeichnet wird (Förster, 1948). Dabei kommt es zu einem Energieaustausch zweier räumlich naher Moleküle. Ein FRET-Donor ist dabei ein Fluorophor (hier: EDANS), der durch UV-Licht (336 nm) angeregt werden kann. Das Anregungsspektrum des FRET-Akzeptors (hier: DABCYL, Absorptionsmaximum bei 472 nm) überlagert sich mit dem Emissionsspektrum des Donors (Emissionsmaximum bei 490 nm) und kann dessen Energie durch weitreichende Dipol-Dipol-Wechselwirkungen aufnehmen, falls er sich in räumlicher Nähe befindet. Unter dieser Voraussetzung entwickelt der FRET-Donor keine Fluoreszenz.

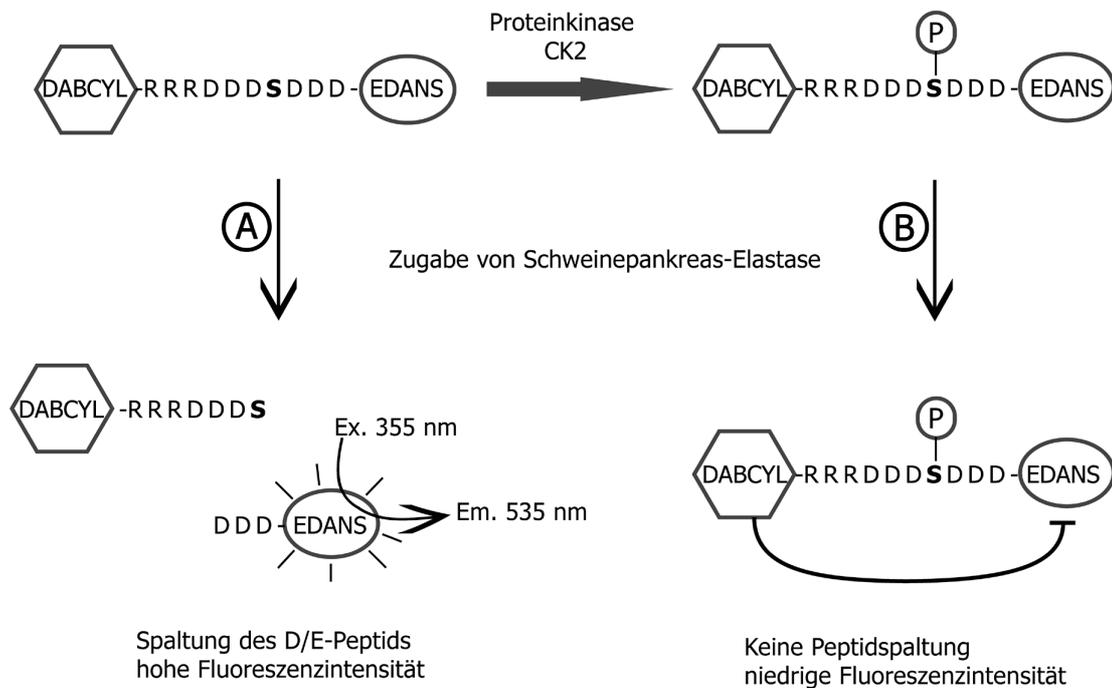


Abbildung 17: Konzept des FRET-basierten CK2-Testverfahrens. Die unterschiedliche Zugänglichkeit einer Proteaseschnittstelle innerhalb eines CK2-Substrats ist dabei abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus (P=Phosphatgruppe). (A) Das nicht phosphorylierte Peptid kann von der pankreatischen Elastase gespalten werden. Die FRET-Partner EDANS und DABCYL verlieren daraufhin ihre räumliche Nähe und Fluoreszenz kann angeregt werden. (B) Eine CK2-vermittelte Phosphorylierung des Peptids verhindert seine Spaltung durch die Elastase, die FRET-Partner EDANS und DABCYL bleiben in räumlicher Nähe und der FRET-Effekt unterdrückt die Fluoreszenz.

Werden die FRET-Partner getrennt, z. B. durch Spaltung des Peptids [DABCYL]-RRRDDSDDD-[EDANS], so geht der FRET-Effekt verloren und DABCYL kann die Fluoreszenz des EDANS-Moleküls nach entsprechender Anregung nicht mehr unterdrücken (Abbildung 17). Der Verlust des FRET-Effekts dient im hier beschriebenen Verfahren als Hilfsmittel zur Detektion der Peptidspaltung. Eine hohe CK2-Aktivität führt somit nach Zugabe von Elastase zu einem Erhalt des FRET-Effekts und hat eine geringe Fluoreszenzintensität zur Folge. Im Gegensatz dazu führt eine schwache CK2-Aktivität zu einer größeren Fluoreszenzintensität, da ein großer Anteil des Peptids durch die Elastase gespalten wird und der FRET-Effekt nachlässt.

2.1.2. Etablierung der FRET-basierten Analytik

Nach der Synthese des D/E-Peptids wurde überprüft, ob die spektroskopischen Eigenschaften des FRET-Paares DABCYL und EDANS durch die Konjugation an das Substratpeptid RRRDDSDDD verändert wurden. Ein Nebenprodukt der Peptidsynthese war das ausschließlich mit dem Fluorophor EDANS markierte Peptid. Von diesem Peptid RRRDDSDDD-[EDANS], das nachfolgend als E-Peptid bezeichnet wird, wurde ein Anregungs- (Abbildung 18 A) und ein Emissionsspektrum (Abbildung 18 B) aufgenommen.

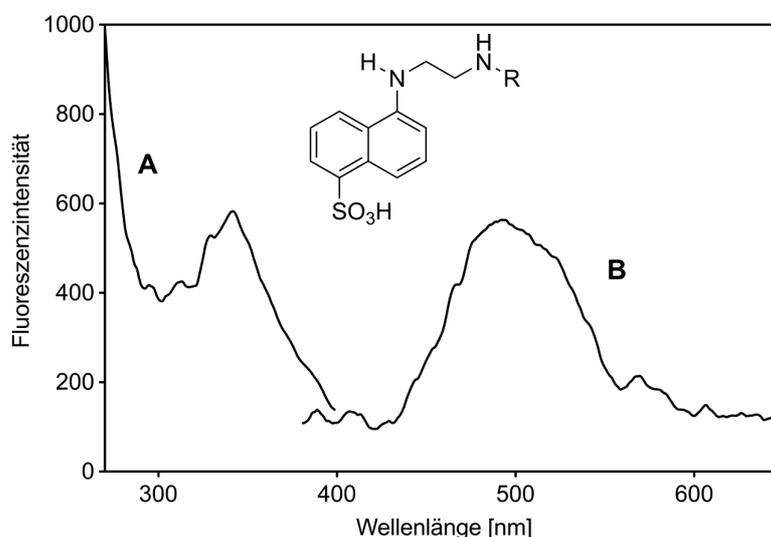


Abbildung 18: Anregungs- und Emissionsspektrum des EDANS-konjugierten Peptids. Die spektroskopischen Eigenschaften des E-Peptids (abgebildete Struktur, R= RRRDDSDDD) wurden mit den zwei abgebildeten Spektren ermittelt. Das Anregungsspektrum **A** wurde bei einer Emissionswellenlänge von 487 nm aufgenommen und hatte ein Maximum bei 341 nm. Das Emissionsspektrum **B** wurde bei einer Anregungswellenlänge von 342 nm aufgenommen und zeigte ein breites Signal mit einem Maximum bei 494 nm.

Sowohl das beobachtete Anregungsmaximum bei 341 nm, als auch das beobachtete Emissionsmaximum bei 494 nm lag nahe bei dem jeweils beschriebenen Wert für das freie EDANS-Molekül (Beythien und White, 2005). Das D/E-Peptid zeigte nach Anregung bei 355 nm praktisch keine Emission, was den erwarteten FRET-Effekt bestätigte. Um sicherzustellen, dass das Peptid auch nach der Kopplung mit DABCYL und EDANS noch von CK2 als Substrat akzeptiert wird, wurden alle drei Peptidformen dem radiometrischen Aktivitätstest unterzogen. In diesem wurde untersucht, ob CK2 ein radioaktiv markiertes Phosphat von γ - ^{32}P -ATP auf das E-Peptid und D/E-Peptid ebenso gut überträgt, wie auf das nicht modifizierte Peptid. Wie in Abbildung 19 dargestellt, konnte für alle Derivate des Substratpeptids eine Radioaktivität gleicher Stärke detektiert werden, die darüber hinaus deutlich über dem Niveau der Negativkontrolle ohne Zugabe von CK2 lag. Diese Ergebnisse legten nahe, dass sich die terminalen Modifikationen des Peptids nicht auf seine Eignung als CK2-Substrat auswirken.

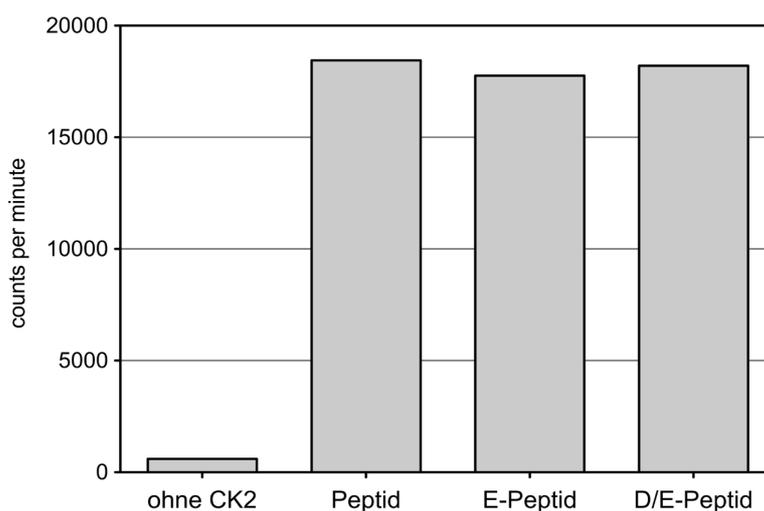


Abbildung 19: Effekt von terminalen Modifikationen des Substratpeptids auf die CK2-Aktivität. Das E-Peptid und das D/E-Peptid wurden jeweils als Substrat in einem radiometrischen CK2-Aktivitätstest eingesetzt. Als Kontrollen dienen eine Probe mit dem unmodifizierten Substratpeptid RRRDDDSDDD („Peptid“, Positivkontrolle) und eine Probe mit Peptid RRRDDDSDDD ohne CK2 (Negativkontrolle).

Ein grundlegender Schritt im Konzept dieses Aktivitätstests ist die Spaltung des D/E-Peptids durch Schweinepankreas-Elastase. Um diese Reaktion zu untersuchen, wurde zunächst die optimale Elastasemenge für die Peptidhydrolyse ermittelt. Diese sollte möglichst zu einem starken Fluoreszenzsignal und gleichzeitig zu einem größtmöglichen Unterschied der Fluoreszenzintensitäten zwischen dem nicht-phosphorylierten und dem phosphorylierten D/E-Peptid führen. Dadurch sollte die maximal

mögliche Sensitivität der Methode erreicht werden. Für einen Phosphorylierungsansatz mit CK2 wurden pro „well“ 1,14 nmol D/E-Peptid benötigt. Diese Menge wurde mit unterschiedlichen Elastasekonzentrationen (10^{-8} bis 10^{-1} units/Ansatz) inkubiert. Die aus der proteolytischen Spaltung resultierende Fluoreszenz wurde im Endpunkt bestimmt (Anregungsfilter 355 nm, Emissionsfilter 535 nm). Abbildung 20 zeigt die gemessene Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der eingesetzten Aktivität an Elastase pro Ansatz in einem semilogarithmischen Diagramm. Es ist zu erkennen, dass der FRET-Effekt bei Inkubation mit geringer Elastasekonzentration (10^{-8} bis 10^{-6} units pro well) vollständig erhalten blieb. Das Peptid wurde unter diesen Bedingungen demnach nicht in detektierbarem Ausmaß gespalten. Mit Elastasekonzentrationen zwischen 10^{-5} und 10^{-3} units pro well war eine dosisabhängige Steigerung der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen.

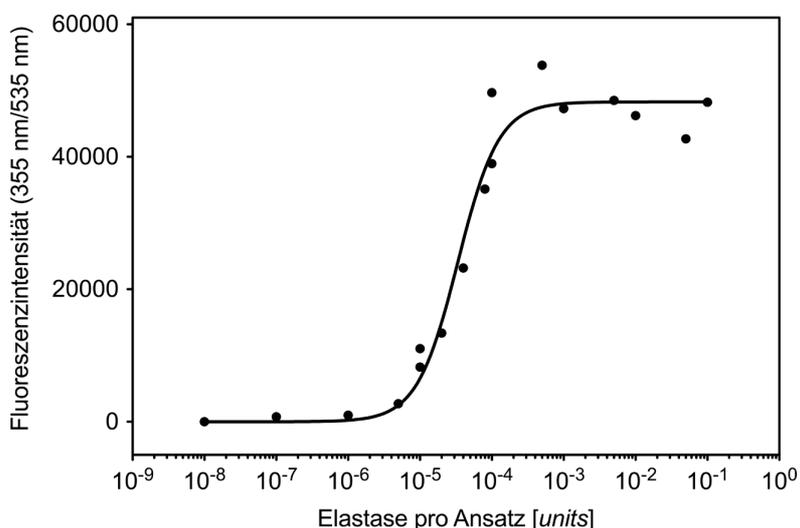


Abbildung 20: Auswirkung der Elastaseaktivität auf den FRET-Effekt im D/E-Peptid. Verschiedene Aktivitäten an Schweinepankreas-Elastase wurden jeweils einem well einer 384 well Platte mit konstanter D/E-Peptid-Stoffmenge (1,14 nmol) zugegeben. Das Reaktionsvolumen betrug 50 μ l. Nach 50 min wurde die jeweilige Fluoreszenzintensität (Anregung bei 355 nm/ Emission bei 535 nm) gemessen.

Der graduelle Verlust des FRET-Effekts mit steigender proteolytischen Aktivität der Elastase verursachte eine proportional erhöhte Konzentration an ungequenchem EDANS. Diese Steigerung der Fluoreszenzentwicklung in Bereich von 10^{-5} bis 10^{-3} units Elastase pro well war auf die erwartete zunehmende Peptidspaltung zurückzuführen. Ab einer Elastasemenge von ca. 10^{-2} units pro well konnte diese Fluoreszenzentwicklung nicht weiter gesteigert werden, was die Vermutung nahe legte, dass die im Testsystem benötigte Stoffmenge an D/E-Peptid unter diesen

Bedingungen vollständig umgesetzt wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in nachfolgenden Experimenten eine Elastaseaktivität von 10^{-2} units pro well eingesetzt. So sollte sichergestellt werden, dass die maximal mögliche Menge an Peptid gespalten wird.

2.1.3. Messung der CK2-Aktivität und der CK2-Inhibition

Der entscheidende Faktor dieses Aktivitätstests war der Einfluss der CK2-vermittelten Phosphorylierung des Peptids auf die Fluoreszenzentwicklung nach Zugabe der Elastase. Dieser Einfluss wurde nachfolgend in einem CK2-Aktivitätstest untersucht, dessen Parameter weitgehend auf den Standardbedingungen eines radiometrischen CK2-Aktivitätstests (ohne γ -[32 P]ATP) beruhen. Im Anschluss an die CK2-Reaktion wurde der Ansatz mit Elastase inkubiert.

Die Kinasereaktion wurde in einem Volumen von 10 μ l angesetzt. Nach der Reaktion wurden 40 μ l Elastase in Elastasepuffer (insgesamt 10^{-2} units) zugegeben. Diese 50 μ l wurden 50 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle diente eine Probe ohne das Cosubstrat ATP. Nach der Inkubation mit Elastase wurden die Proben in eine 384 „well“ Platte überführt und die Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm gemessen. Wie in Abbildung 21 A dargestellt, ergab sich im Mittel für drei Proben mit aktiver CK2 (CK2+ATP) eine Fluoreszenzintensität von 51.820 und für drei Proben mit inaktiver CK2 (CK2-ATP) ein Mittelwert der Fluoreszenzintensität von 60.180. Es war eindeutig feststellbar, dass in der Probe, in der das D/E-Peptid phosphoryliert wurde, der FRET-Effekt deutlich stärker erhalten blieb als in der Probe ohne ATP. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass die CK2-Aktivität eine Elastase-katalysierte Spaltung des Peptids hemmt. Im Vergleich der Proben mit und ohne ATP ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) in der Fluoreszenzintensität. Dieses Ergebnis verdeutlichte, dass die Bestimmung der CK2-Aktivität mit diesem Testverfahren möglich war.

Die Motivation zur Entwicklung dieses Tests bestand in einer Identifizierung von CK2-Inhibitoren. Dazu wurde der oben beschriebene Test in Anwesenheit von ATP und bekannten CK2-Inhibitoren durchgeführt. Daneben sollte so bestätigt werden, dass tatsächlich die CK2-Aktivität zu der in Abbildung 21 A dargestellten Fluoreszenzintensität geführt hat. Durch Hemmung der CK2-Aktivität müsste sich wie in der Negativkontrolle (CK2-ATP) auch hier eine erhöhte Fluoreszenzintensität messen lassen.

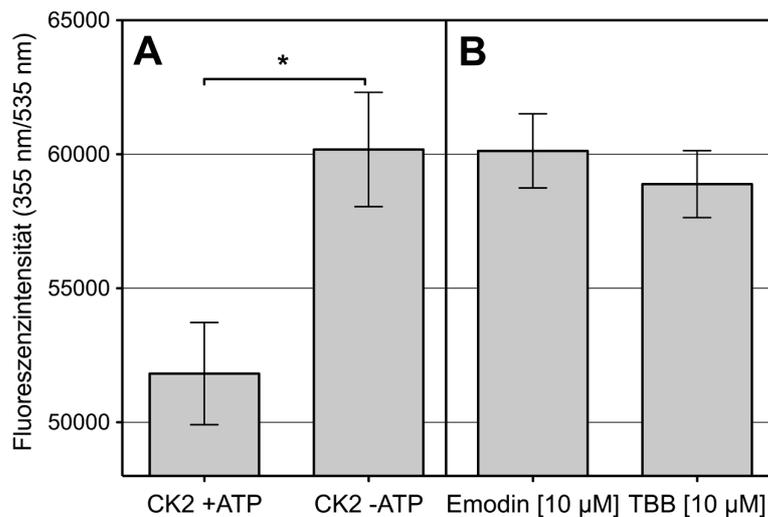


Abbildung 21: Bestimmung der CK2-Aktivität mit Hilfe des FRET-Testverfahrens. (A) Eine Kinasereaktion wurde mit (CK2+ATP) und ohne ATP (CK2-ATP) durchgeführt. Den Ansätzen wurden jeweils 10^{-2} units Elastase zugegeben und die Fluoreszenzintensität nach Anregung (355 nm) bei einer Emissionswellenlänge von 535 nm gemessen (* $p < 0,05$). **(B)** CK2 wurde 10 min mit 10 μ M Emodin bzw. TBB (Abbildung 3) inkubiert. Anschließend wurde Assaypuffer mit ATP zugegeben und die Fluoreszenz wie in (A) bestimmt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwerte aus $n=3$ Messungen mit Standardabweichung.

Als CK2-Inhibitoren wurden Emodin und TBB (Abbildung 3) eingesetzt. Beide besitzen einen IC_{50} Wert um 1 μ M, müssten also in der hier eingesetzten Konzentration von 10 μ M die CK2 deutlich hemmen. Diese Konzentration wurde gewählt, da sie auch in früheren CK2-Inhibitionsuntersuchungen standardmäßig eingesetzt wurde (Olgen *et al.*, 2007). Mit Inhibitor jeweils in Dreifachbestimmungen behandelte Proben wurden fluorimetrisch vermessen (355 nm/535 nm). Dabei zeigten Emodin und TBB Fluoreszenzintensitäten von durchschnittlich 60.129 und 58.886, die dem Niveau der Probe ohne CK2-Aktivität entsprachen (60.180, Abbildung 21). Dies ließ den Schluss zu, dass beide Inhibitoren die CK2-Aktivität nahezu vollständig hemmten und dadurch die Phosphorylierung des D/E-Peptids vermindert wurde. Folglich blieb die Proteaseschnittstelle für die Elastase zugänglich, was zu einer erhöhten Fluoreszenz führte. Dieses Ergebnis bestätigte, dass tatsächlich die CK2-Aktivität für die Unterdrückung der Fluoreszenz (Abbildung 21 A) verantwortlich war. Damit war sowohl die grundsätzliche Brauchbarkeit des Verfahrens zur Aktivitätsmessung der CK2, als auch dessen Eignung zur Testung von Inhibitoren der CK2 nachgewiesen. Allerdings führte die geringe Sensitivität des Test dazu, dass keine verlässlichen quantitativen Bewertungen von Inhibitoren möglich

waren. Aus diesem Grund wurde ein weiteres CK2-Testverfahren entwickelt, das auf einem anderen Prinzip basierte und im Folgenden beschrieben wird.

2.2. Kapillarelektrophoretischer CK2-Aktivitätstest

2.2.1. Theoretischer Ansatz

Eine alternative Möglichkeit der CK2-Aktivitätsmessung basiert darauf, dass sich einige physikochemische Eigenschaften eines Substrats durch seine Phosphorylierung ändern, beispielsweise sein isoelektrischer Punkt. Unter identischen äußeren Bedingungen besitzen Substrat und Produkt folglich unterschiedliche Ladungen und sollten sich elektrophoretisch trennen lassen. Durch die CK2-katalysierte Übertragung einer Phosphatgruppe vom Cosubstrat ATP auf das Peptid RRRDDDSDDD ist das Substrat dieser Reaktion positiver geladen als das Produkt. Dieser Ladungsunterschied führt zu einer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität der beiden Peptide.

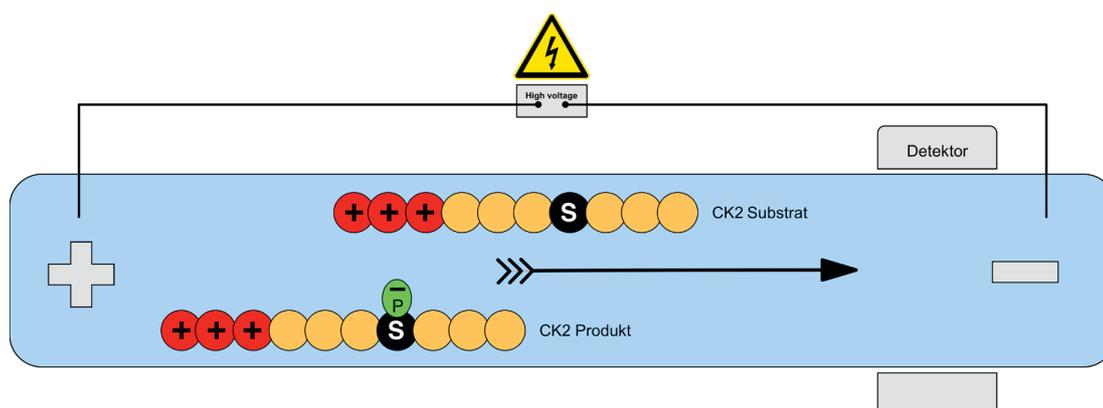


Abbildung 22: Konzept des kapillarelektrophoretischen CK2-Testverfahrens. Das insgesamt positiv geladene CK2-Substrat RRRDDDSDDD-[EDANS] wandert im elektrischen Feld zur Kathode (-). Nach Umsetzung durch die CK2 ist es am Serylrest (S) phosphoryliert (P). Die Nettoladung des Peptids nimmt durch die Phosphorylierung ab geringer. Substrat und Produkt einer CK2-Reaktion lassen sich durch die unterschiedliche elektrophoretische Mobilität trennen und durch einen geeigneten Detektor quantifizieren. Dargestellt sind die Ladung der Seitenketten von CK2-Substrat und CK2-Produkt bei einem pH-Wert von 2,2.

Als Methode der Wahl für die elektrophoretische Trennung kleinvolumiger Proben bietet sich die Kapillarelektrophorese (CE) an. Das Konzept dieses kapillarelektrophoretischen Aktivitätstests für die CK2 ist in Abbildung 22 dargestellt. Als Elektrolyt wurde 2 M Essigsäure gewählt, die einen pH Wert von ca. 2,2 besaß. Bei diesem pH Wert liegt Aspartat undissoziiert vor und ist damit ungeladen. Er lag außerdem unter

dem ersten pK_a Wert für proteingebundenes Phosphoserin von ca. 5,6 (Jaquet *et al.*, 1993). Nach Phosphorylierung des Peptids trägt Phosphoserin eine negative Ladung zum durch die Arginine und den N-Terminus insgesamt positiv geladenen Peptid bei. Eine Phosphorylierung macht also einen Ladungsunterschied von -1 aus. Substrat- sowie Produktpeptid migrieren wegen ihrer positiven Gesamtladung im elektrischen Feld Richtung Kathode. Da das Produktpeptid aber eine geringere positive Nettoladung aufweist, migriert es langsamer und passiert den Detektor erst nach dem Substratpeptid. Bei einem pH Wert von ca. 2,2 dürfte außerdem der für die Kapillarelektrophorese typische elektroosmotische Fluss zum Erliegen kommen. Die Trennung kommt somit einer klassischen Elektrophorese mit dem Vorteil des Einsatzes kleiner Volumina gleich.

Das Substrat RRRDDDSDDD sollte so verändert werden, dass es fluorimetrisch detektiert werden kann. Dies sollte die Detektion kleiner Mengen des Peptids ermöglichen. Bei der Entwicklung des FRET-basierten CK2-Tests wurde bereits nachgewiesen, dass die C-terminale EDANS-Modifikation des Peptids RRRDDDSDDD sich nicht nachteilig auf dessen Akzeptanz als Substrat der CK2 auswirkt. Deshalb bot sich das E-Peptid als CK2-Substrat für dieses kapillarelektrophoretische Experiment an. Um die Anfangsgeschwindigkeit v_0 der CK2-Reaktion zu erfassen, muss die Reaktion in einem Fließgleichgewicht („steady state“) stattfinden. Zum Zeitpunkt der Quantifizierung sind folglich sowohl nicht-phosphoryliertes Substrat, als auch phosphoryliertes Produkt der CK2 im Reaktionsansatz enthalten. Nach Zugabe eines Inhibitors wird v_0 erniedrigt. Nach identischer Reaktionszeit wird also eine geringere Menge Substrat zu Produkt umgesetzt. Ein quantitativer Vergleich einer solchen Reaktion ohne und mit Testsubstanz ermöglicht die Berechnung der relativen Aktivität des gehemmten Enzyms, welche Aussagen über die inhibitorische Potenz der Testsubstanz zulässt.

2.2.2. Etablierung der kapillarelektrophoretischen Peptidanalytik

Grundvoraussetzung für diesen Test ist die Trennung von unphosphoryliertem Substrat und phosphoryliertem Produkt der CK2-Reaktion. Es wurden zwei Reaktionsansätze untersucht, die sich nur durch die Zugabe des Cosubstrats ATP unterschieden. Ohne ATP ist die CK2 inaktiv und das Substratpeptid liegt in seiner nicht-phosphorylierten Form vor. Der Kinasereaktion wurde im Assaypuffer 200 μ M ATP zugesetzt, sodass es in dieser Probe zu einer vollständigen Phosphorylierung der Peptidfraktion kommen sollte. Anschließend wurden beide Reaktionsansätze mit Hilfe der Kapillaronenelektrophorese und einer „bare fused silica“ Kapillare untersucht. Mit den in Tabelle 12 aufgeführten Methodenparametern konnte eine

Trennung erzielt und die in Abbildung 23 dargestellten Elektropherogramme erhalten werden.

Tabelle 12: Analytische Parameter der kapillarelektrophoretischen Methode.

Parameter	Wert
Konditionierung:	0,1 N NaOH , H ₂ O, Elektrolyt
Injektion:	0,5 psi, 20 s (ca. 20 nl)
Effektive Kapillarlänge:	50 cm
Innendurchmesser Kapillare:	50 µm
Elektrolyt:	2 M Essigsäure
Spannung / Stromstärke:	30 kV / Stromstärke dynamisch
Detektion:	Absorption, 214 nm

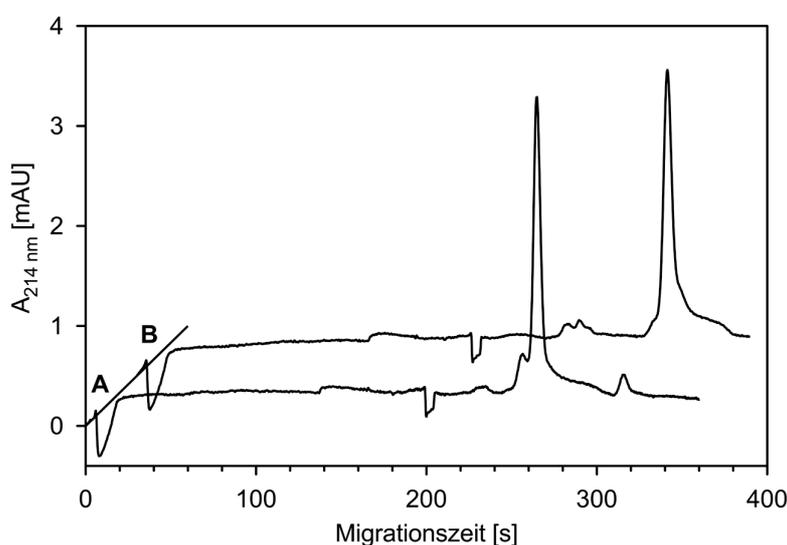


Abbildung 23: Elektrophoretische Mobilitätsverschiebung eines CK2 Substratpeptids nach Phosphorylierung. Dargestellt ist eine Überlagerung zweier kapillarelektrophoretischer Elektropherogramme. Elektropherogramm **A** zeigt eine Untersuchung des Reaktionsansatzes mit unphosphoryliertem Substratpeptid RRRDDDSDDD-[EDANS] und Elektropherogramm **B** eine Analyse des entsprechenden Peptids, das durch CK2 phosphoryliert worden war.

Das nicht-phosphorylierte E-Peptid wurde nach einer Migrationszeit von 270 s detektiert (Abbildung 23 A). Die Phosphorylierung durch CK2 verursachte eine Verlängerung der Migrationszeit auf 330 s (Abbildung 23 B). Überraschenderweise konnte unter den gewählten Bedingungen die Absorption der Peptidbindungen zur spektroskopischen Detektion des Peptids ausgenutzt werden. Bei 214 nm wurde für das Peptid ein gutes Signal-/Rauschverhältnis festgestellt. Dadurch wurde zwar nicht das Absorptionsmaximum der Peptidbindung erfasst, das bei 192 nm liegt, aber es wurde ein optimaler Kompromiss zwischen einer noch hohen Absorption der

Peptidbindung und der Hintergrundabsorption des Elektrolyts Essigsäure gefunden. Die Sensitivität und die Genauigkeit des Detektors führten zu einer reproduzierbaren Detektion bei 214 nm. Vermutlich absorbiert bei dieser Wellenlänge auch das an das Peptid gekoppelten EDANS-Moleküls und verstärkt so die Gesamtabsorption. Die festgestellte selektive UV-Detektion des Peptids bei 214 nm machte die ursprünglich geplante Benutzung eines Fluoreszenzdetektors überflüssig.

Nach der erfolgreichen Trennung von Substrat und Produkt der CK2-Reaktion konnte im nächsten Schritt untersucht werden, ob sich diese Reaktion auch kinetisch verfolgen lässt. Dazu wurde CK2 unter den beschriebenen Bedingungen mit E-Peptid gemischt und im Probenraum der Kapillarelektrophoreseapparatur bei 37 °C inkubiert. Anschließend an die Konditionierung der Kapillare wurde 6 min nach Beginn der Reaktion die erste Probe in die Kapillare injiziert, getrennt und analysiert. Das Reaktionsgefäß wurde unmittelbar nach Injektion wieder in den auf 37 °C temperierten Probenraum befördert. Weitere 14 Proben wurden automatisiert im Abstand von 14,5 min untersucht. In Abbildung 24 A wurden exemplarisch drei Elektropherogramme von Proben aufgetragen, die 6 min, 20 min und 209 min nach Beginn der Kinasereaktion injiziert wurden.

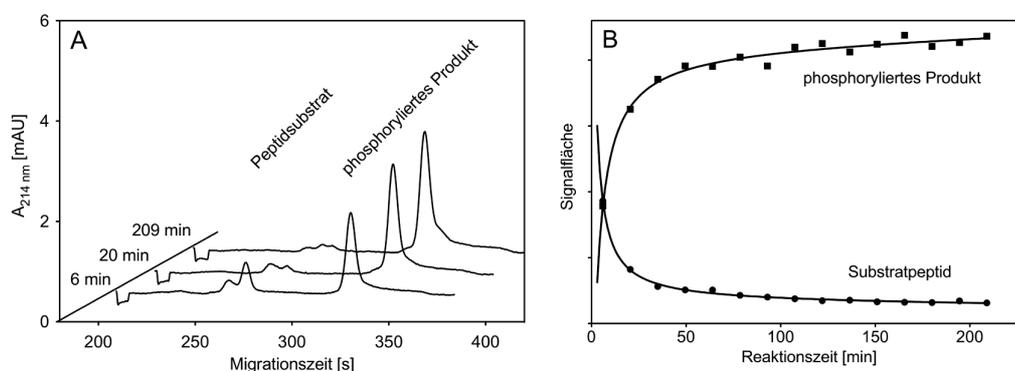


Abbildung 24: Kinetische Untersuchung der Peptidphosphorylierung durch CK2. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach dem Start der CK2-Reaktion wurden Proben entnommen und kapillarelektrophoretisch analysiert. **(A)** Exemplarisch sind Elektropherogramme dreier Proben gezeigt, welche nach 6, 20 und 209 min entnommen wurden. **(B)** Von allen Elektropherogrammen wurden jeweils Substrat-(●) sowie Produktsignal (■) integriert und deren jeweilige Signalfläche gegen die Reaktionszeit dargestellt.

In allen Elektropherogrammen konnte das Signal des Substrats vollständig von dem des Produkts getrennt werden, was eine Quantifizierung über die jeweiligen Flächen der Signale ermöglichte. Getrennt nach Substrat- und Produktsignal sind diese Flächen in Abbildung 24 B gegen die Reaktionszeit der Proben aufgetragen. Zu Beginn

der Reaktion stieg die Fläche des Produktsignals rasch an, während die Fläche des Substratsignals in gleichem Ausmaß abnahm. Der Verlauf beider Parameter beschreibt eine für eine Enzymkinetik typische Sättigungskurve. Trotz der groben zeitlichen Auflösung der kinetischen Analyse kann man erkennen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit während der ersten 25 min nahezu linear verläuft. Innerhalb dieser Zeit kann demnach die Anfangsgeschwindigkeit v_0 der CK2-Reaktion ermittelt werden. In Abbildung 23 und Abbildung 24 A ist zu erkennen, dass sich das Signal für das Substratpeptid in ein Cluster von mindestens zwei unvollständig getrennten Einzelsignalen aufspaltet, das einen Bereich von 260 s bis 290 s Migrationszeit umfasst. Wahrscheinlich handelte es sich dabei um Peptidderivate, die andere Mobilitäten besitzen und das Resultat einer unvollständigen HPLC-Aufreinigung nach der Peptidsynthese sind. Da die Signale dieser Derivate in später entnommenen Proben (z. B. nach 207 min) in deutlich schwächerer Form auftreten, ist anzunehmen, dass sie auch phosphoryliert werden und im Signal des phosphorylierten Produkts aufgehen. Deshalb wurde in folgenden Experimenten die Fläche des Produktsignals als Maß zur Quantifizierung herangezogen. Eine Kalibriergerade bestätigte, dass dieser Parameter im Messbereich des Tests von 20 μM bis 114 μM direkt proportional zur Konzentration des Produktpeptids war (Abbildung 25).

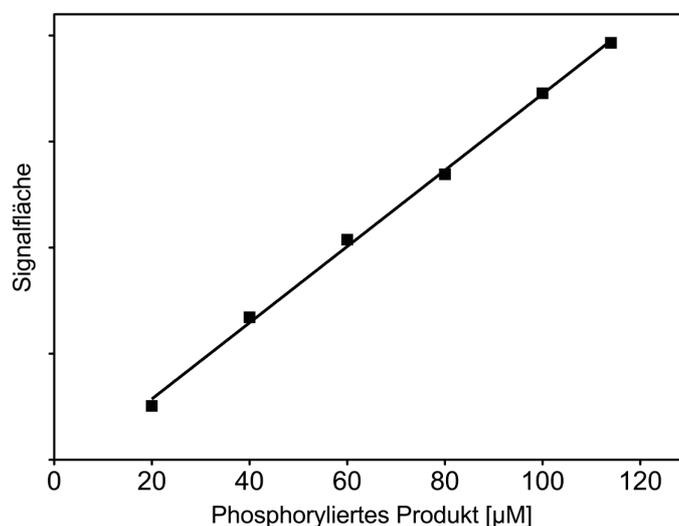


Abbildung 25: Zusammenhang zwischen der Konzentration des phosphorylierten Produkts und der Fläche des detektierten Absorptionssignals. Proben mit phosphoryliertem Produkt in sechs Konzentrationen zwischen 20 μM und 114 μM wurde kapillarelektrophoretisch getrennt und bei einer Wellenlänge von 214 nm absorptionsspektroskopisch detektiert. Die Fläche des Produktsignals konnte als lineare Funktion gegen die Konzentration des phosphorylierten Peptids dargestellt werden.

In mehreren unabhängigen Messungen wurde die Reproduzierbarkeit der Quantifizierung des Produktsignals festgestellt. Dabei konnte eine relative Standardabweichung von $< 1\%$ festgestellt werden. Da es sich bei dem hier eingesetzten Peptid um ein durch EDANS markiertes Derivat des beschriebenen CK2-Substrats RRRDDDSDDD handelte, wurde neben der in Abbildung 19 grundsätzlich nachgewiesenen Akzeptanz des E-Peptids als CK2-Substrat auch dessen Michaeliskonstante K_M bestimmt. Die Bestimmung wurde mit fünf Substratkonzentrationen von $5 \mu\text{M}$ bis $200 \mu\text{M}$ und zwei Enzymkonzentrationen ($5 \mu\text{g/ml}$ und $10 \mu\text{g/ml}$) unter Anwendung des beschriebenen kapillarelektrophoretischen Tests durchgeführt. Bei der Bestimmung des K_M -Wertes wurden die beiden Substratkonzentrationen $5 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ jedoch nicht berücksichtigt, da der Umsatz bei diesen Peptidkonzentrationen $> 80\%$ betrug und damit kein Fließgleichgewicht während der Messung vorlag (Copeland, 2005). Aus den Ergebnissen der Versuchsreihe mit einer Enzymkonzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ errechnete sich ein K_M -Wert von $68 \mu\text{M}$ und für eine Enzymkonzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ konnte ein K_M -Wert von $72 \mu\text{M}$ berechnet werden (Abbildung 26). Der Mittelwert beider Bestimmungen von $70 \mu\text{M}$ liegt nahe dem K_M -Wert des unmarkierten Peptids RRRDDDSDDD, der in der Literatur mit $60 \mu\text{M}$ angegeben wird (Kuenzel *et al.*, 1987).

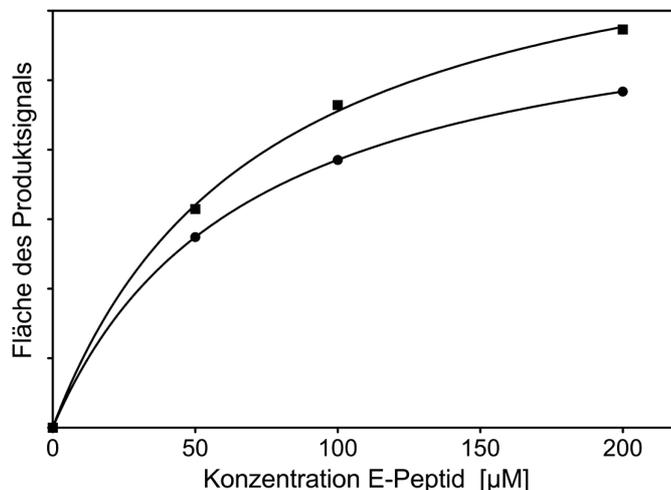


Abbildung 26: Bestimmung des K_M -Wertes für das E-Peptid. Zwei Konzentrationen der rekombinanten CK2 ($5 \mu\text{g/ml}$ (●) und $10 \mu\text{g/ml}$ (■)) wurden mit je fünf Konzentrationen an E-Peptid (von $5 \mu\text{M}$ bis $200 \mu\text{M}$) unter CK2-Reaktionsbedingungen inkubiert und die Aktivität mit Hilfe des kapillarelektrophoretischen Testverfahren im Endpunkt bestimmt. An die Messwerte der drei Konzentrationen, bei denen jeweils ein Fließgleichgewicht vorlag, wurde die Funktion $y = v_{\text{max}} \cdot x / (K_M + x)$ angepasst.

2.2.3. Messung der Inhibition der CK2-Aktivität

Die Ergebnisse der Arbeit belegen, dass die CK2-Aktivität mit der kapillarelektrophoretischen Methode bestimmt werden kann. Auch die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit v_0 kann so gemessen werden. Alternativ zu der kinetischen Bestimmung kann die Messung von v_0 innerhalb des linearen Bereichs auch über eine Endpunktbestimmung erfolgen. In diesem Fall ist v_0 der Quotient der Menge des Produktpeptids und der Dauer der Reaktion. Die Fläche des Produktsignals, das im Endpunkt detektiert werden kann, reicht für eine Berechnung des Umsatzes aus. Für die Bestimmung der relativen Aktivitäten wurde in den nachfolgend beschriebenen Experimenten jeweils zusätzlich eine Probe ohne Inhibitor (Positivkontrolle) angesetzt und vermessen, deren Produktsignalfläche in den einzelnen Experimenten 100 % Aktivität definierte. Die relative Aktivität der einzelnen Proben ergibt sich aus dem Quotient der Fläche des Produktsignals einer Probe und der Fläche des Produktsignals der Positivkontrolle. Für die quantitative Beschreibung der Inhibition dieser Probe gilt dann: 1 minus relative Aktivität. Zusammengefasst lässt sich die Inhibition folgendermaßen aus den Flächen der Produktsignale berechnen:

$$\text{Inhibition}[\%] = \left(1 - \left(\frac{\text{Produktsignalfläche Probe}}{\text{Produktsignalfläche Positivkontrolle}} \right) \right) \times 100\%$$

Um den neu entwickelten kapillarelektrophoretischen CK2-Inhibitionstest mit Standardverfahren zur Bestimmung der CK2-Inhibition vergleichen zu können, wurden für die Kinasereaktion Testparameter gewählt, die möglichst nah an denen des meistgenutzten radiometrischen Testverfahrens lagen. Basierend auf dem kapillarelektrophoretischen CK2-Aktivitätstest und den theoretischen Vorüberlegungen zur Bestimmung der Inhibition wurde eine Bestimmung von IC_{50} Werten der beiden CK2-Inhibitoren TBB und Emodin durchgeführt. Die Inhibitoren wurden initial in reinem DMSO zu 10 mM gelöst. Die DMSO-Konzentration im Reaktionsansatz aller Proben (auch der Positivkontrolle ohne Inhibitor) betrug 1 %. In dieser Konzentration hatte DMSO weder einen messbaren Einfluss auf die CK2-Aktivität, noch auf den Verlauf des Elektropherogramms. Für die Messung der Inhibition wurde die in Kinasepuffer vorliegende CK2 für 10 min mit je sieben Konzentrationen von TBB oder Emodin (je zwischen 0,01-100 μM) vorinkubiert. Nach Zugabe von Assaypuffer und 15-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die CK2-Reaktion durch Lagerung bei 4 °C und Zugabe von EDTA gestoppt. Die einzelnen Reaktionsansätze wurden nacheinander kapillarelektrophoretisch mit den in Tabelle 12 angegebenen Parametern analysiert. Die Inhibition wurde wie zuvor angegeben berechnet und gegen die eingesetzte Konzentration der jeweiligen Substanz in einem semilogarithmischen Dosis-Effekt-Diagramm aufgetragen (Abbildung 27). Mit Hilfe einer

sigmoidalen Ausgleichsfunktion konnte der IC_{50} Wert von TBB ($0,27 \mu\text{M}$) und der IC_{50} Wert von Emodin ($1,33 \mu\text{M}$) berechnet werden. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) der Ausgleichsfunktionen lag in beiden Fällen über 0,99. Diese Ergebnisse bestätigten die Anwendbarkeit dieses neuen CK2-Tests. Er kann sowohl als qualitativer Vortest, als auch zur quantitativen Bewertung der inhibitorischen Potenz von Substanzen eingesetzt werden.

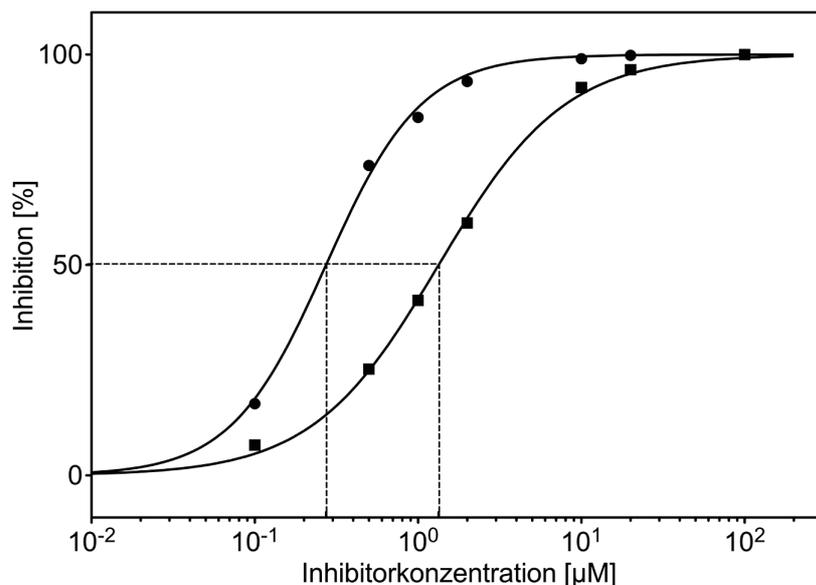


Abbildung 27: Mit dem kapillarelektrophoretischen Test ermitteltes Dosis-Effekt-Diagramm für zwei CK2 Inhibitoren in semilogarithmischer Darstellung. Die Inhibition der CK2 wurde nach zehnmütiger Präinkubation mit TBB (●) oder Emodin (■) in je sieben Konzentrationen zwischen $0,01 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ bestimmt. Die Analyse erfolgte kapillarelektrophoretisch mit dem E-Peptid als Substrat der CK2-Reaktion und den in **Tabelle 12** angegebenen analytischen Parametern.

2.2.4. Anpassung der Testparameter an das Substratpeptid RRRDDDSDDD

Der vorgestellte Test wurde weiter optimiert, um ihn als Standardverfahren anwenden zu können. Ziel der Optimierung war ein möglichst schneller, einfacher, verlässlicher und kosteneffektiver Inhibitionstest. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde zunächst das Substrat verändert. Statt des E-Peptids, dessen Fluoreszenzeigenschaften nicht benötigt wurden, wurde das Peptid RRRDDDSDDD ohne Fluorophorkonjugation synthetisiert. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die EDANS-Konjugation einen Einfluss auf die Mobilität hatte. Darüber hinaus trug EDANS vermutlich zur Absorption des Peptids bei und verbesserte das Detektionslimit des E-Peptids. In einem ersten Ansatz wurde das neu synthetisierte Peptid RRRDDDSDDD

statt des E-Peptids in dem sonst unveränderten beschriebenen CK2-Aktivitätstest eingesetzt und kapillarelektrophoretisch untersucht. Die Ergebnisse bestätigten bereits, dass der kapillarelektrophoretische CK2-Aktivitätstest grundsätzlich mit dem Peptid RRRDDDSDDD durchgeführt werden kann. Die Verschlechterung des Signal-/Rauschverhältnisses aufgrund der wie erwartet geringeren Absorption dieses Peptids bei 214 nm (nicht gezeigt) machte aber eine Optimierung des Analyseprotokolls nötig. Dazu wurde statt einer Kapillare mit 50 cm effektiver Länge eine Kapillare mit 20 cm effektiver Länge eingesetzt. Das Injektionsvolumen wurde auf 80 nl gesteigert, um eine größere Menge Analyt und folglich stärkere Absorptionssignale zu erhalten. Zusätzlich wurde festgestellt, dass die dynamische Regelung der Spannung über eine feste Einstellung des Stromflusses eine stabilere Basislinie zur Folge hatte, was die Integration der Messsignale erleichterte. Ein Konditionierungsschritt mit NaOH ist vor allem bei der Kapillarelektrophorese mit pH-neutralem Elektrolyt wichtig, um den elektroosmotischen Fluss (EOF) in unterschiedlichen Messungen konstant zu halten. Da unter den in Tabelle 12 beschriebenen Bedingungen kein erkennbarer EOF zustande kam, konnte auf den Konditionierungsschritt vor jeder Einzelmessung verzichtet werden, ohne dass die Trennung negativ beeinflusst wurde. Um Ablagerungen in der Kapillare zu vermeiden, wurde lediglich vor der Messung einer Serie von Proben konditioniert und zwischen den Einzelproben mit dem vierfachen Innenvolumen an Elektrolyt gespült. Diese neuen Parameter sind in Tabelle 13 zusammengefasst und wurden auf die Analytik eines CK2-Reaktionsansatzes angewendet.

Tabelle 13: Analytische Parameter der optimierten kapillarelektrophoretischen Methode.

Parameter	Wert
Konditionierung:	Spülen mit Elektrolyt
Injektion	1 psi, 20 s (ca. 80 nl)
Effektive Kapillarlänge:	20 cm
Innendurchmesser Kapillare:	50 μ m
Elektrolyt:	2 M Essigsäure
Spannung / Stromstärke:	Spannung dynamisch / 30 mA
Detektion:	Absorption, 214 nm

Eine CK2-Reaktion wurde mit dem Peptid RRRDDDSDDD als Substrat durchgeführt. Zur Kontrolle wurde eine CK2-Reaktion ohne ATP untersucht, um die Migrationszeit des nicht phosphorylierten Substrats zu identifizieren und so das entsprechende Absorptionssignal zuordnen zu können. In Abbildung 28 A ist das Elektropherogramm der CK2-Reaktion ohne Zugabe von ATP abgebildet. Man erkennt ein deutliches und scharfes Signal bei einer Migrationszeit von 153 s. Außerdem war ähnlich zu den Untersuchungen des E-Peptids ein kleines Signal bei einer leicht

erhöhten Migrationszeit zu sehen. Wie im Fall des E-Peptids lässt sich dieses Signal wohl auf eine unvollständige HPLC-Aufreinigung nach der Peptidsynthese zurückführen. Nach einer 15-minütigen CK2-Reaktion (Abbildung 28 B) konnten zwei klar voneinander getrennte Signale detektiert werden. Bei dem zusätzlichen Signal mit einer Migrationszeit von 155 s muss es sich um das Produkt der CK2-Reaktion, das phosphorylierte Peptid (RRRDDDSpDDD), handeln (Sp=Phosphoserin).

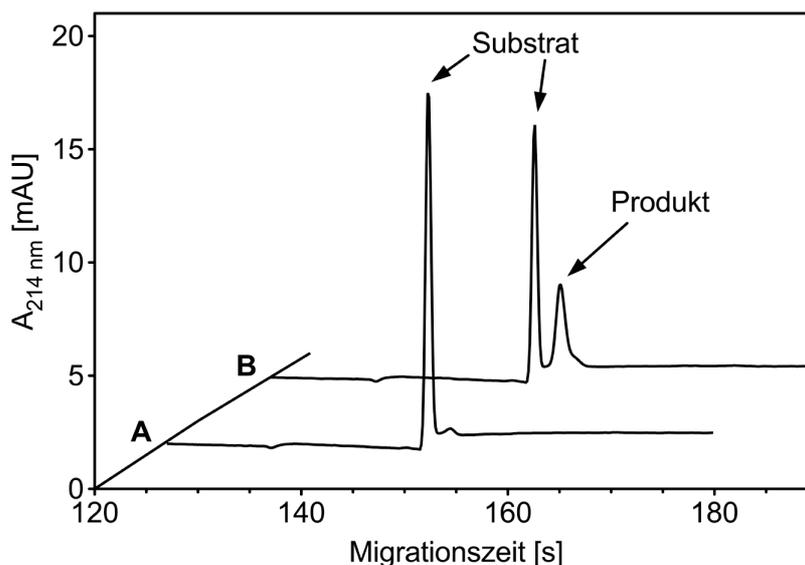


Abbildung 28: Trennung von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Peptid RRRDDDSDDD mit optimierten Testparametern. Ausschnitt zweier Elektropherogramme von Reaktionsansätzen mit dem CK2-Substratpeptid RRRDDDSDDD. In Elektropherogramm A wurde ein Reaktionsansatz ohne CK2-Aktivität kapillarelektrophoretisch getrennt. Elektropherogramm B zeigt die Trennung einer Probe, die für 15 min bei 37 °C mit CK2 unter Reaktionsbedingungen inkubiert wurde.

Beide Signale besaßen eine deutlich stärkere Absorption als die Signale der Elektropherogramme einer entsprechenden Messung, die bis dahin mit dem E-Peptid und den Analyseparametern aus Tabelle 12 aufgenommen wurden (vergleiche Abbildung 23). In Kombination mit der Stabilisierung der Basislinie führte dies zu einem deutlich besseren Signal-/Rauschverhältnis. Diese Bestimmung wurde in einem dreifachen Ansatz durchgeführt und ergab bei der Quantifizierung der Produktsignalfäche einer Probe eine relative Standardabweichung von < 1,5 %. Durch die Verwendung der in Tabelle 13 zusammengefassten Parameter konnte die Gesamtdauer eines Trennungsvorgangs von 19 min auf 6 min verkürzt werden. Mit diesen neuen Parametern wurde erneut der IC₅₀ Wert von Emodin bestimmt. Dazu wurde CK2 mit jeweils acht Konzentrationen (von 0,0001 µM bis 31,6 µM) Emodin inkubiert (10 min, 37°C). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Assaypuffer (mit

Peptid RRRDDDSDDD) gestartet und für 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde sie durch Zugabe von EDTA gestoppt und die Proben wurden bis zur kapillarelektrophoretischen Trennung bei 4°C aufbewahrt. Abbildung 29 zeigt die Auswertung der prozentualen Hemmungen der CK2 durch die verschiedenen Emodin-Konzentrationen. Wie in Abbildung 27 ist auch hier eine konzentrationsabhängige Zunahme der Hemmung festzustellen. Die Anpassung einer sigmoidalen Ausgleichsfunktion an die Einzelergebnisse hatte ein Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,999. Mit dieser Auswertung konnte für Emodin ein IC_{50} Wert von 0,49 μM bestimmt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass auch mit den optimierten Testparametern und dem unmodifizierten Substratpeptid RRRDDDSDDD die quantitative Bewertung eines CK2-Inhibitors möglich ist.

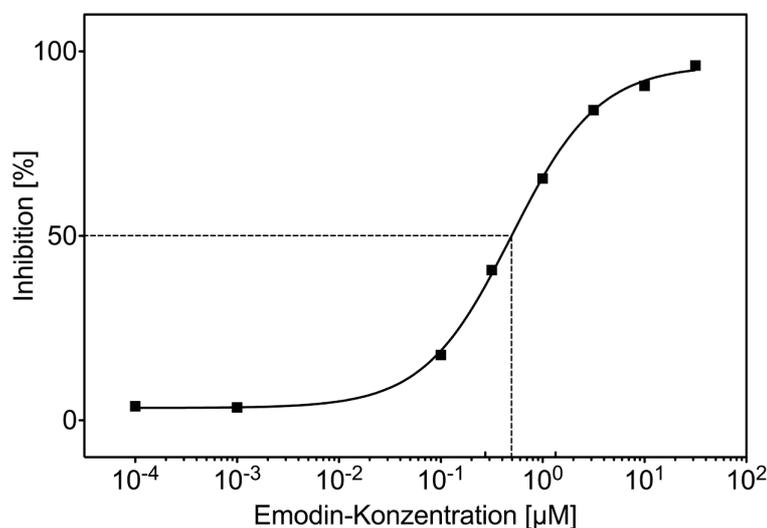


Abbildung 29: Bestimmung des IC_{50} Werts von Emodin mit dem Substratpeptid RRRDDDSDDD. Die Inhibition von CK2 wurde nach zehnmütiger Präinkubation mit Emodin bestimmt. Dabei wurden acht Konzentrationen zwischen 0,0001 μM und 31,6 μM untersucht. Die Messung erfolgte kapillarelektrophoretisch mit dem E-Peptid als Substrat der CK2.

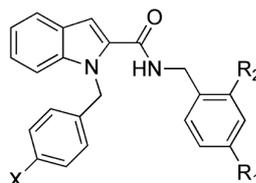
3. Untersuchung neuer Inhibitoren für die CK2

3.1. Indolcarboxamidderivate als potentielle CK2-Inhibitoren

Von Prof. Süreyya Ölgen (Universität Ankara, Türkei) wurden Indol-2- und Indol-3-carboxamidderivate synthetisiert (Kaessler *et al.*, 2008) und zur Testung auf CK2-Hemmung zur Verfügung gestellt. Der beschriebene kapillarelektrophoretische Aktivitätstest mit dem E-Peptid als Substrat wurde in einer Doppelbestimmung mit

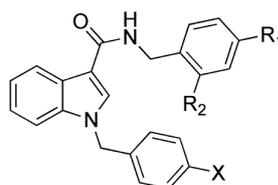
einer Substanzkonzentration von 10 μM durchgeführt. Die Ergebnisse der Inhibitionstests sind in Tabelle 14 und Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 14: Untersuchung unterschiedlich substituierter Indol-2-carboxamidderivate auf CK2-Hemmung im kapillarelektrophoretischen Aktivitätstest.



Substanzbezeichnung	X	R ₁	R ₂	CK2-Aktivität bei 10 μM
PE248	H	H	H	83 %
PE285	H	Cl	H	95 %
PE286	H	F	H	97 %
PE287	H	Cl	Cl	70 %
PE290	H	F	F	114 %
PE262	F	H	H	101 %
PE269	F	Cl	H	101 %
PE267	F	F	H	101 %
PE270	F	Cl	Cl	102 %
PE275	F	F	F	112 %

Tabelle 15: Untersuchung unterschiedlich substituierter Indol-3-carboxamidderivate auf ihre CK2-Hemmung im kapillarelektrophoretischen Aktivitätstest.



Substanzbezeichnung	X	R ₁	R ₂	CK2-Aktivität bei 10 μM
PE291	H	H	H	102 %
PE297	H	F	H	102 %
PE298	H	Cl	Cl	101 %
PE299	H	F	F	98 %
PE272	F	H	H	95 %
PE274	F	Cl	H	88 %
PE276	F	F	H	94 %
PE277	F	Cl	Cl	93 %
PE278	F	F	F	97 %

Wie in Tabelle 14 und Tabelle 15 dargestellt, ließ sich die Aktivität der CK2 durch keines der getesteten Indolcarboxamidderivate effektiv hemmen. Substanz PE287 wies mit einer Restaktivität der CK2 von 70 % die größte Hemmung auf. Für diese aktivste Verbindung PE287 wurde der IC_{50} Wert durch Messung der Inhibition bei acht verschiedenen Konzentrationen (von 0,01 μM bis 100 μM) bestimmt. Mit Hilfe einer sigmoidalen Ausgleichsfunktion konnte eine halbmaximale Hemmung der CK2 bei einer Konzentration von 14,6 μM PE287 ermittelt werden (Abbildung 30).

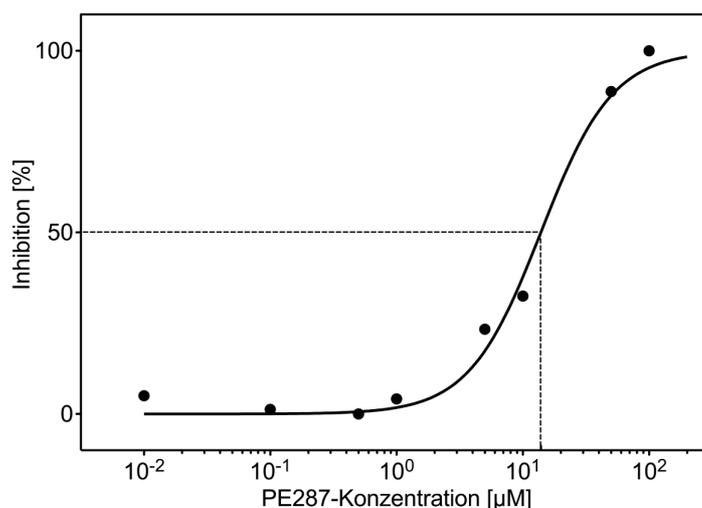
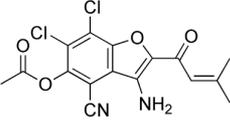
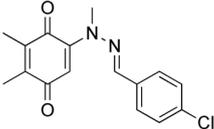
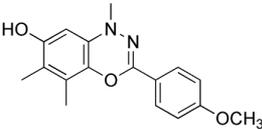
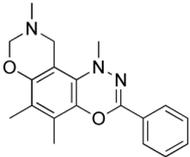
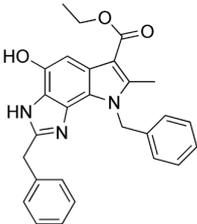
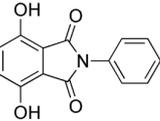
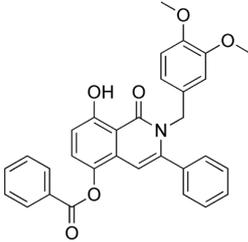
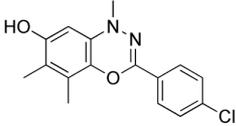


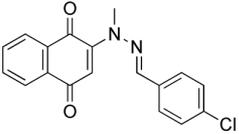
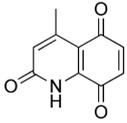
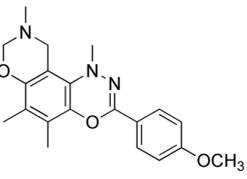
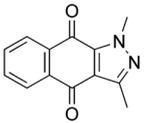
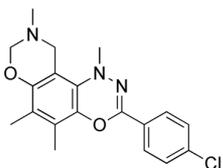
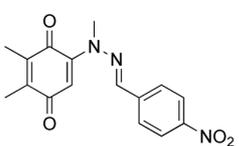
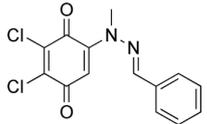
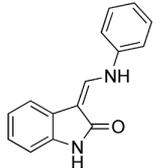
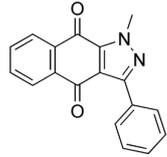
Abbildung 30: Bestimmung des IC_{50} Wertes von PE287 mit Hilfe des kapillarelektrophoretischen CK2-Aktivitätstests. Als CK2-Substrat wurde das E-Peptid eingesetzt. Die Inhibition von CK2 wurde nach zehnmütiger Präinkubation mit PE287 gemessen. Dabei wurden acht Konzentrationen zwischen 0,01 μM und 100 μM untersucht.

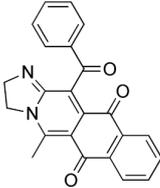
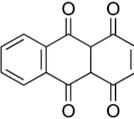
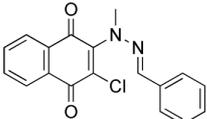
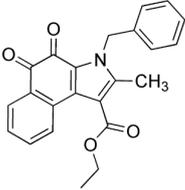
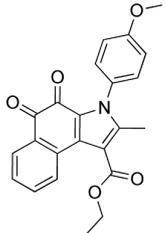
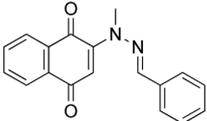
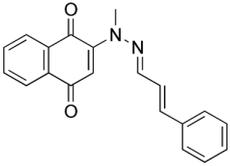
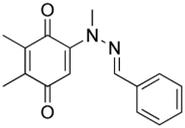
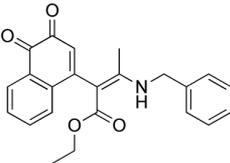
3.2. Durchmusterung einer Substanzbibliothek

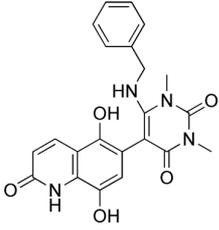
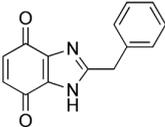
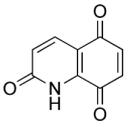
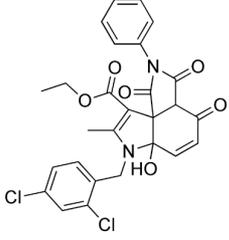
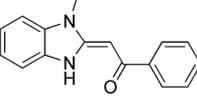
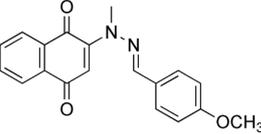
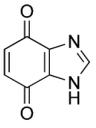
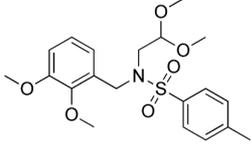
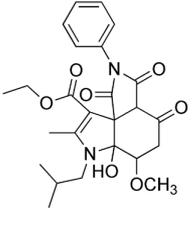
Von der Arbeitsgruppe von Prof. Kuckländer (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, HHU Düsseldorf) wurde eine Substanzbibliothek zur Verfügung gestellt (siehe Tabelle 16). Diese Substanzen wurden hinsichtlich ihrer Hemmwirkung auf das CK2 untersucht. Dabei wurden zunächst nur relative Hemmungen bei einer Substanzkonzentration von 10 μM ermittelt, um möglicherweise wirksame Strukturen als Ansatzpunkte für weitergehende Untersuchungen zu identifizieren. Auch hier wurde das kapillarelektrophoretische CK2-Testverfahren mit E-Peptid als Substrat eingesetzt. Die Ergebnisse der Inhibitionsuntersuchung sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

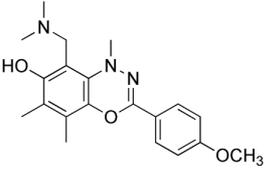
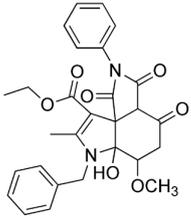
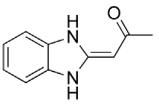
Tabelle 16: Untersuchung einer Substanzbibliothek auf Hemmung der CK2 im kapillarelektrophoretischen Aktivitätstest.

Substanzbezeichnung	Strukturformel	CK2-Aktivität bei 10 μM
Ric152		7 %
HB191		37 %
HB198		42 %
HB221		44 %
Kuck19d		51 %
SB1		51 %
Ric170		52 %
HB199		56 %

Substanzbezeichnung	Strukturformel	CK2-Aktivität bei 10 μ M
HB133		60 %
Kuck46		63 %
HB222		65 %
HB072		68 %
HB223		70 %
HB192		71 %
HB205		71 %
RicR1		76 %
HB144		79 %

Substanzbezeichnung	Strukturformel	CK2-Aktivität bei 10 μ M
PT140 (G17)		79 %
Rictetraon		79 %
HB164		80 %
20d		82 %
20g		83 %
HB131		84 %
HB136		85 %
HB189		85 %
Kuck45d		85 %

Substanzbezeichnung	Strukturformel	CK2-Aktivität bei 10 μ M
Kuck141		86 %
Kuck17		86 %
Kuck45		87 %
Kuck48d		87 %
PT39		87 %
HB174		90 %
SB2		90 %
Kuck106		98 %
Kuck50g		98 %

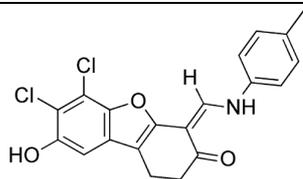
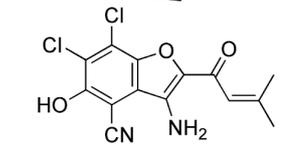
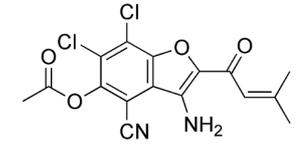
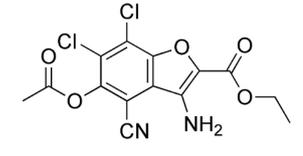
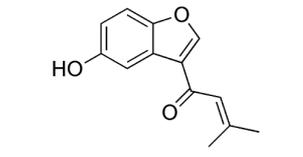
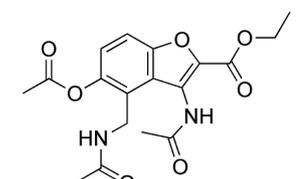
Substanzbezeichnung	Strukturformel	CK2-Aktivität bei 10 μM
HB219		100 %
Kuck50b		101 %
Kuck41a		102 %

Die meisten Substanzen zeigten keine oder nur eine mäßige Wirkung auf die CK2-Aktivität (Restaktivität > 50 %). Lediglich die vier Substanzen HB221, HB198, HB191 und Ric152 zeigten in einer Konzentration von 10 μM eine Inhibition der CK2, die zu einer Restaktivität < 50 % führte. Den stärksten inhibitorischen Effekt wies das Benzofuranderivat Ric152 mit einer CK2-Restaktivität von 7 % auf. Derivate dieser Grundstruktur könnten vielversprechende Verbindungen für potente CK2-Inhibitoren darstellen und wurden im Folgenden getestet.

3.3. Benzofuranderivate als CK2-Inhibitoren

Nach der Identifizierung von Ric152 als potentem CK2-Inhibitor wurden weitere Benzofuranderivate von Prof. Kuckländer zur Verfügung gestellt (Kuckländer und Töberich, 1982; Bollig, 2007). Die Wirkung dieser Substanzen auf die CK2-Aktivität wurde zunächst wieder bei einer Konzentration von 10 μM untersucht. Bei einer Hemmung der CK2-Aktivität von > 50 % wurde zusätzlich der IC_{50} Wert der Substanz bestimmt, um die inhibitorische Potenz genauer zu quantifizieren. Die mit dem kapillarelektrophoretischen Testverfahren erhaltenen Ergebnisse der untersuchten Substanzen sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Untersuchung verschiedener Benzofuranderivate auf Hemmung der CK2 im kapillarelektrophoretischen Aktivitätstest.

Substanz	Strukturformel	CK2-Aktivität bei 10 μM	IC ₅₀ Wert
TF		< 4 % ¹	0,03 μM
Ric151		< 4 % ¹	0,2 μM
Ric152		7 %	0,2 μM
Ric138		31 %	2,4 μM
Ric149		61 %	-
RicFur		110 %	-

¹Werte unter 4 % konnten nicht mehr verlässlich quantifiziert werden.

Die untersuchten Benzofuranderivate wiesen deutliche Unterschiede in der CK2-Hemmung auf. Ric149 und RicFur zeigten eine geringe, bzw. keine inhibitorische Wirkung auf die CK2-Aktivität. Im Gegensatz dazu führte die Hemmwirkung von TF, Ric151, Ric152, Ric138 zu einer CK2-Restaktivität von unter 50 %. Für diese Substanzen wurde zusätzlich IC₅₀ Werte bestimmt. Bei näherer Betrachtung lässt sich für die Substanzen Ric138 und Ric152 eine interessante Struktur-Wirkungsbeziehung aufzeigen. Sie unterscheiden sich lediglich durch die Seitenkette an Position 2 des Benzofuranrings. Dieser strukturelle Unterschied spiegelte sich in einem 10-fachen Unterschied des IC₅₀ Wertes wider, der für Ric138 2,4 μM und für Ric152 0,2 μM betrug. Der Austausch der Ethylesterfunktionalität von Ric138 durch das α,β -ungesättigte Carbonylsystem (3-Methylbutenon) von Ric152 wirkte sich demnach

deutlich positiv auf die inhibitorische Potenz aus. Die Acetylierung der phenolischen Hydroxylgruppe in Position 5 des Benzofuranrings scheint für die Wirkung von Ric152 nicht essentiell zu sein, da das entsprechend deacetylierte Derivat Ric151 mit $0,2 \mu\text{M}$ den identischen IC_{50} Wert aufwies. Den besten IC_{50} Wert zeigte die als „Töberichfuran“ oder kurz TF bezeichnete Verbindung (Z)-6,7-Dichlor-1,4-dihydro-8-hydroxy-4-[(4-methylphenylamino)methylen]dibenzo[b,d]furan-3(2H)-on (Kuckländer und Töberich, 1982). Diese lag mit $0,03 \mu\text{M}$ noch um knapp eine Zehnerpotenz unter dem IC_{50} Wert von Ric151 und Ric152 (Abbildung 31).

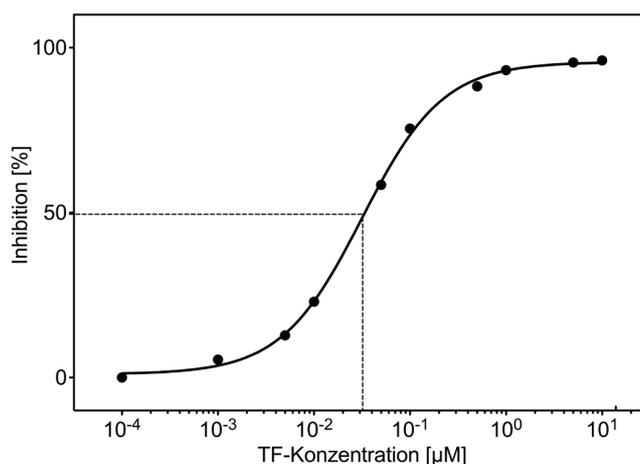


Abbildung 31: Bestimmung des IC_{50} Wertes von TF. Dazu wurde der kapillarelektrophoretische CK2-Inhibitionstest mit E-Peptid als Substrat eingesetzt. Die Inhibition von CK2 wurde nach zehnmütiger Präinkubation mit TF gemessen. Dabei wurden zehn Konzentrationen zwischen $0,0001 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ untersucht.

3.3.1. Untersuchung zur Wirkung von TF in Krebszellen

TF wurde als äußerst potenter CK2-Inhibitor identifiziert und wurde auf seine Membrangängigkeit, wachstumshemmenden Eigenschaften und Hemmung der nativen CK2 in der humanen Prostatakarzinomzelllinie LNCaP (Horoszewicz *et al.*, 1980) untersucht. Alle Zellkulturexperimente wurden von Claudia Götz in der Arbeitsgruppe von Prof. Montenarh (Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar) durchgeführt.

3.3.1.1 Wirkung auf die Viabilität

Mit einem MTT-Test wurde die Wirkung von TF auf die Viabilität von LNCaP-Zellen bestimmt. Dazu wurde diese Zelllinien mit drei TF-Konzentrationen ($25 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $75 \mu\text{M}$) behandelt. Der Effekt wurde nach 24 h, 48 h und 72 h als relative Viabilität im Vergleich zu unbehandelten Zellen bestimmt. Analog dazu wurden LNCaP-Zellen mit

denselben Konzentrationen des Inhibitors TBB inkubiert, um vergleichende Aussagen unter gleichen experimentellen Bedingungen treffen zu können. Nach Behandlung der LNCaP-Zellen mit TF waren sowohl Effekte durch Steigerung der Konzentration, als auch durch Verlängerung der Inkubationsdauer zu verzeichnen. Nach 24-stündiger Inkubation mit 25 μM TF ging die Viabilität bereits auf 45 % zurück und konnte nach derselben Inkubationsdauer mit 50 μM TF noch weiter auf 30 % gesenkt werden. Die Inkubation mit 75 μM TF hatte jedoch keine weitere Reduktion zur Folge (31 % Viabilität). Die Effekte nach 24 h konnten durch Verlängerung der Inkubationsdauer jeweils verstärkt werden. So war nach 48-stündiger Inkubation mit 25 μM , 50 μM und 75 μM TF noch eine Viabilität von 37 %, 15 %, bzw. 12 % feststellbar. Nach 72-stündiger Inkubation mit einer TF-Konzentration von 25 μM war nur noch eine Viabilität von 14 % detektierbar, die durch die höheren TF-Konzentrationen von 50 μM und 75 μM noch auf 5 %, bzw. 3 % gesenkt wurde (Abbildung 32 A). Die Behandlung von LNCaP-Zellen mit TBB hatte einen ähnlichen Effekt, der jedoch erst bei höheren Konzentrationen, bzw. längerer Inkubationsdauer einsetzte. So hatte eine Inkubationsdauer von 24 h nur geringe Auswirkungen. Mit der maximalen TBB-Konzentration von 75 μM wurde nach 24 h noch 90 % Viabilität gemessen. Auch nach 72 h waren bei der niedrigsten TBB-Konzentration von 25 μM keine Effekte zu sehen. Erst bei der höchsten Konzentration von 75 μM war nach 48 h eine Reduktion auf 45 % und nach 72 h noch eine Viabilität von 17 % zu verzeichnen (Abbildung 32 B). Unter Berücksichtigung der jeweiligen Inkubationsdauer wurden die Effekte der höchsten untersuchten TBB-Konzentration (75 μM) bereits von der kleinsten untersuchten TF-Konzentration (25 μM) übertroffen. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Viabilität von LNCaP-Zellen durch beide Substanzen herabgesetzt wurde. Der neu identifizierte CK2-Inhibitor TF wirkte jedoch deutlich potenter als der schon bekannte Inhibitor TBB.

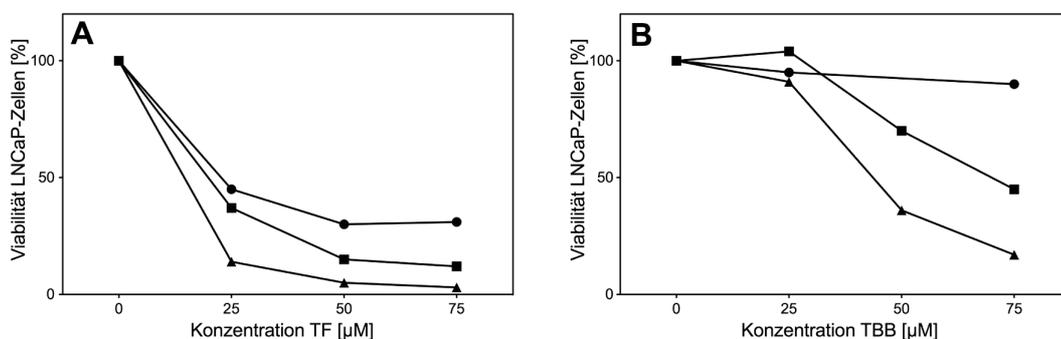


Abbildung 32: Effekt von TF (A) und TBB (B) auf die Viabilität von LNCaP-Zellen. Die Viabilität wurde mithilfe des MTT-Tests bestimmt. In jedem Diagramm ist der konzentrationsabhängige Effekt nach einer Inkubationsdauer von 24 h (●), 48 h (■) und 72 h (▲) aufgetragen.

3.3.1.2 Wirkung auf die Induktion von Apoptose

Anschließend wurde untersucht, ob die TF-vermittelte Reduktion der Zellviabilität auf apoptotische Ereignisse zurückgeführt werden konnte. Zu diesem Zweck wurde die Spaltung von Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) in den Zellen nachgewiesen. Caspase 3 spaltet die 115 kDa große PARP in zwei stabile Fragmente: die 24 kDa große, DNA-bindende, N-terminale Domäne und das 89 kDa große, C-terminale Fragment. Diese spezifische Proteolyse von PARP kennzeichnet den irreversiblen Punkt der Einleitung der Apoptose und kann im Western Blot von Zelllysaten mit einem spezifischen PARP-Antikörper nachgewiesen werden. LNCaP-Zellen wurden auf PARP-Spaltung nach 24- und 48-stündiger Inkubation mit 25 μM , 50 μM und 75 μM TF untersucht und mit dem Effekt von TBB gleicher Konzentration verglichen. Nach einer Inkubation mit TF war ab 50 μM zu sehen, dass die Bande des 89 kDa PARP-Fragments konzentrationsabhängig an Intensität zunahm. Dieser Effekt war sowohl nach einer Inkubationsdauer von 24 h, als auch, in verstärkter Form, nach 48 h zu erkennen. Eine Behandlung der LNCaP-Zellen mit TBB führte in diesen Experimenten zu nahezu identischen Ergebnissen (Abbildung 33). Hier war auch schon bei einer Konzentration von 25 μM eine leichte Bande bei 89 kDa zu erkennen. LNCaP-Zellen, die mit 75 μM TBB inkubiert wurden, konnten aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht ausgewertet werden. Als Ergebnis bleibt festzustellen, dass sowohl TF als auch TBB in LNCaP-Zellen im untersuchten Konzentrationsbereich ähnlich starke pro-apoptotische Wirkung zeigen.

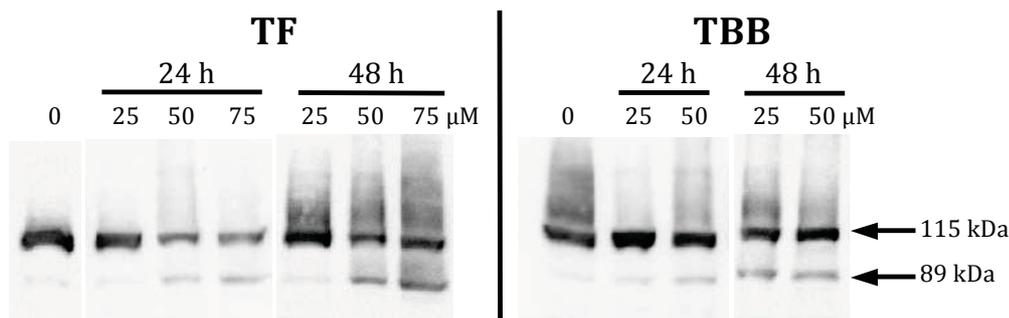


Abbildung 33: Effekt von TF und TBB auf die PARP-Spaltung in LNCaP-Zellen. Die Zellen wurden 24 h oder 48 h mit 25 μM , 50 μM und 75 μM TF oder mit 25 μM , 50 μM TBB inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit DMSO behandelt wurden (0 μM). Nach SDS-PAGE und Western Blotting wurden vollständiges PARP (115 kDa) und das durch Caspasespaltung entstehende 89 kDa große Fragment mit Hilfe eines Anti-PARP Antikörper markiert.

3.3.1.3 Hemmung der endogenen CK2-Aktivität durch TF

LNCaP-Zellen wurden analog zu den oben beschriebenen Experimenten mit TF inkubiert. Nach 24 h oder 48 h wurde die CK2-Aktivität von Lysaten mit Hilfe des radiometrischen CK2-Tests gemessen. Diese Untersuchung gab Aufschluss darüber, ob die am isolierten Enzym gefundene Hemmung von TF im zellulären System bestätigt werden konnte. Als Vergleich diente der Einfluss der jeweils gleichen Konzentration von TBB auf die Hemmung der zellulären CK2-Aktivität. Zellen wurden mit 25 μM , 50 μM oder 75 μM TF für 24 h oder 48 h inkubiert, danach gewaschen und lysiert. Von diesen Zelllysaten wurde die relative CK2-Aktivität berechnet. Als Bezug diente die CK2-Aktivität der Zelllysate von unbehandelten und entsprechende lange inkubierten Zellen. Um eventuell auftretende Schwankungen im radiometrischen Test auszugleichen, wurden im Falle von TF je zwei Proben pro Parameter gemessen. Die TBB-Proben wurden als qualitative Kontrolle jeweils einzeln angesetzt und gemessen. Beide Substanzen führten ab einer Konzentration von 25 μM zu einer Reduktion der endogenen CK2-Aktivität von LNCaP-Zellen auf 50 %. Durch eine Steigerung der Konzentration konnte in keinem Fall eine weitere Verminderung der CK2-Aktivität verzeichnet werden (Abbildung 34).

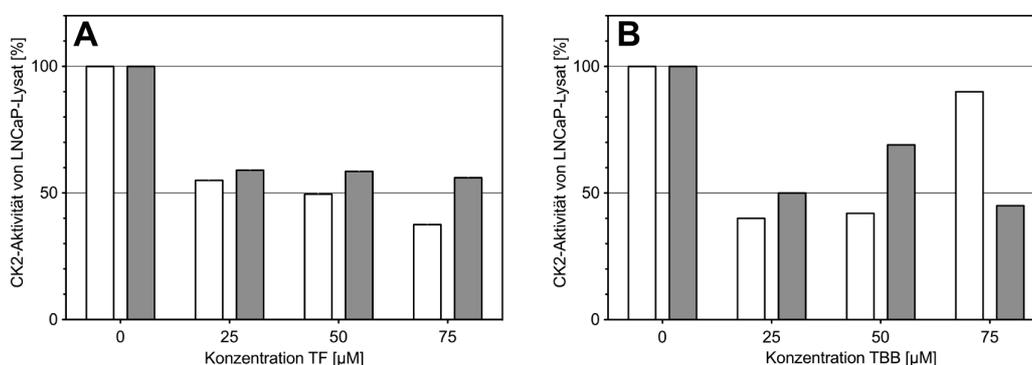


Abbildung 34: CK2-Aktivität in Lysaten von LNCaP-Zellen, die zuvor mit TF (A) oder TBB (B) inkubiert wurden. Die CK2-Aktivität wurde mit dem radiometrischen Testverfahren ermittelt. Die relativen Aktivitäten der Proben wurden jeweils auf unbehandelte Zellen bezogen. Weiße Balken geben die CK2-Aktivität nach 24 h, graue Balken die CK2-Aktivität nach 48 h Inkubation mit dem jeweiligen Inhibitor an. Für mit TF behandelte Proben (A) wurden Doppelbestimmungen durchgeführt (angegeben ist dort jeweils der MW).

Im Gegensatz zum MTT-Test war in keiner Versuchsreihe ein Zusammenhang zwischen verlängerter Inkubationsdauer mit der jeweiligen Substanz und einer verstärkten Hemmung der endogenen CK2-Aktivität zu erkennen. Parallel zum Aktivitätstest wurde durch Western Blots nachgewiesen, dass die exprimierte Menge

an endogener CK2 α in keinem der Zelllysate reduziert war. Die beobachtete Abnahme der CK2-Aktivität ist demnach auf die Modulation der CK2-Enzymaktivität zurückzuführen. Wegen der Schwankungen des radiometrischen Tests und der geringen Anzahl an gleichen Ansätzen sollten diese Ergebnisse jedoch in erster Linie als qualitative Untersuchung gewertet werden. So stellte z. B. die Probe der 24 h mit 75 μ M TBB inkubierten LNCaP-Zellen mit einer CK2-Aktivität von 90 % höchstwahrscheinlich einen Ausreißer dar. Zusammengenommen konnte gezeigt werden, dass TF die endogene CK2-Aktivität in LNCaP-Zellen senkt. Die Wirkstärke von TF lag in etwa auf dem Niveau von TBB. Der Nachweis der Hemmung intrazellulärer CK2 belegt darüber hinaus die Fähigkeit von TF zur Zellpermeation.

3.3.1.4 Selektivitätsuntersuchung von TF

Nachdem die inhibitorische Potenz von TF in LNCaP-Zellen bestätigt werden konnte, sollte untersucht werden, ob TF einen selektiven CK2-Inhibitor darstellt. Dazu wurde von dem Unternehmen „Reaction Biology“ (Malvern, PA, USA) die Hemmwirkung von TF auf 63 isolierte humane Proteinkinasen (PK) untersucht. Darunter waren PK aus allen Hauptgruppen des humanen Kinoms (Manning *et al.*, 2002, Abbildung 1) vertreten. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 35, geordnet nach den Hauptgruppen humaner PK, dargestellt. In dieser Testreihe wurden alle PK mit je 10 μ M ATP und 10 μ M TF inkubiert. In einem anschließenden radiometrischen Test wurde die jeweilige Kinaseaktivität in Bezug auf eine Probe ohne TF bestimmt. Da sich die K_M -Werte der PK bzgl. ATP teilweise deutlich unterscheiden (Knight und Shokat, 2005), ermöglichen die Ergebnisse lediglich einen semi-quantitativen Vergleich der Inhibition durch TF. Definiert man Hemmung in diesem Test als eine Aktivitätsminderung > 50 %, so wurden neben CK2 α und CK2 α' zwölf der 63 PK von TF gehemmt und 49 der 63 PK reagierten schwach, überhaupt nicht oder zeigten im Fall von IRAK4, MAPK14, PAK4 oder LBK1 eine deutliche Steigerung der Aktivität. CK2 α (von „Reaction Biology“ als „CK2a“ bezeichnet) und CK2 α' (von „Reaction Biology“ als „CK2a2“ bezeichnet) wurde in diesem Test mit knapp 24 %, bzw. 35 % Restaktivität (Abbildung 35) schwächer inhibiert, als dies in der kapillarelektrophoretischen Inhibitionsuntersuchung mit dem aufgereinigten CK2-Holoenzym (< 4 % Restaktivität, Tabelle 17) festgestellt wurde. Dabei müssen jedoch auch die unterschiedlichen Testparameter, wie Substrat- und ATP-Konzentrationen, Puffer, etc. berücksichtigt werden, sodass ein direkter Vergleich prozentualer Hemmdaten an dieser Stelle nicht möglich ist. Die sieben PK, die am stärksten (> 70 %) gehemmt wurden, sind in Tabelle 18 separat aufgelistet. Obwohl diese Ergebnisse lediglich einen groben Überblick über das quantitative inhibitorische Potential von TF gaben, deuteten sie darauf hin, dass TF ein multiselektiver Proteinkinaseinhibitor ist.

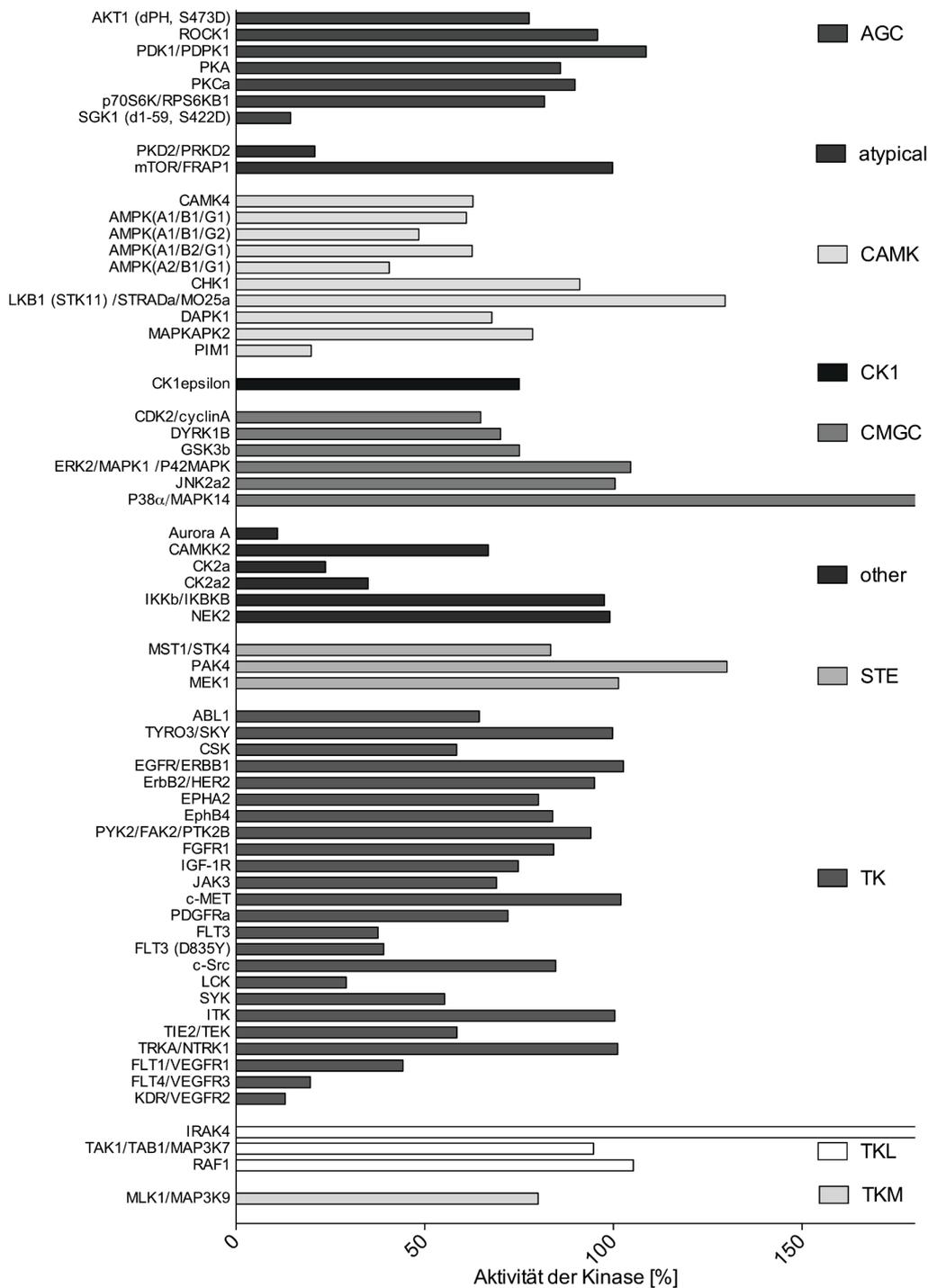


Abbildung 35: Selektivitätsprofil von TF mit einer Auswahl von 63 humanen Proteinkinasen. Die aufgelisteten PK wurden mit 10 µM TF und 10 µM ATP inkubiert. Anschließend wurde die relative prozentuale Kinaseaktivität bestimmt (Mittelwert aus n=2). 100 % Aktivität wurde als Aktivität der jeweiligen Kinase in Abwesenheit von TF definiert. Die Gruppierung der PK erfolgte nach Manning *et al.* (2002). (Abkürzungen der PK-Gruppen: siehe Abbildung 1).

Tabelle 18: Humane Proteinkinasen, die von TF zu mindestens 30 % gehemmt wurden.

Proteinkinase	Aktivität	UniProt Accession #	Physiologische Funktion
Aurora A	11,00 %	O14965	Zellzyklusregulation
KDR/VEGFR2	13,05 %	P35968	Gefäßentwicklung, Angiogenese
SGK1 (d1-59, S422D)	14,16 %	O00141	Stressantwort, Zellüberleben
FLT4/VEGFR3	19,68 %	P35916	Zellproliferation
PIM1	19,90 %	P11309	Zellproliferation, Zellüberleben
PKD2/PRKD2	20,90 %	Q9BZL6	Resistenz gegen oxidativen Stress
LCK	29,20 %	P06239	T-Zell-Differenzierung

4. Zugang zu neuen Inhibitoren der CK2-Substratbindestelle

Die überwiegende Mehrheit niedermolekularer Verbindungen mit CK2-inhibitorischer Aktivität üben ihre Wirkung durch eine kompetitive Affinität zur Cosubstrat-Bindetasche aus. Die Konformation dieser Struktur ist im Kinom hoch konserviert und stellt damit eine suboptimale Struktur zur spezifischen Hemmung dar. Ein Alleinstellungsmerkmal der CK2 unter den humanen Proteinkinasen ist ihre ungewöhnliche Substratkonsensussequenz (Kuenzel *et al.*, 1987; Meggio *et al.*, 1994). Die acidophile Substratbindedomäne der CK2 stellt deshalb eine vielversprechende Zielstruktur zur Entwicklung von selektiven Inhibitoren dar. Bis zum Beginn dieser Arbeit war noch kein Inhibitor veröffentlicht, der an diese Domäne bindet. Einzig CK2-Substrate boten potentielle Startpunkte für die Entwicklung neuer CK2-Inhibitoren auf der Basis einer peptidischen Leitstruktur.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Substrat als Passagier mittels Autodisplay an der Oberfläche von *E. coli* präsentiert werden und über eine eventuelle Affinität CK2 an die Zelloberfläche binden. Wird die CK2 vorher mit einem Fluorophor konjugiert, so lässt sich der Phänotyp „Affinitätsbindung zur CK2“ über dessen Fluoreszenzintensität detektieren: Weist ein Autodisplay-Passagier eine hohe Affinität zur CK2 auf, so hat diese Zelle mehr fluoreszierende CK2 gebunden als ein Bakterienstamm, der einen Passagier mit einer niedrigeren Affinität zur CK2 trägt. Das Maß der Fluoreszenzintensität einer Zelle nimmt demnach graduell mit der Affinität seines oberflächenpräsentierten Autodisplay-Passagiers zur CK2 zu. Die Fluoreszenz einzelner Zellen lässt sich mittels Durchflusszytometrie quantifizieren.

4.1. Affinitätsuntersuchung mit Casein als Autodisplaypassagier

Casein wurde als erstes Substrat der CK2 beschrieben (Burnett und Kennedy, 1954). Casein stellt einen Überbegriff für eine Gruppe verschiedener Proteine dar, die in der Literatur häufig nicht differenziert werden. Wegen dieser eher diffusen Literaturangaben wurde mit aufgereinigtem, rekombinant erzeugtem humanem α_{S1} -Casein (Merck, Darmstadt) zunächst bestätigt, dass dieses Enzym tatsächlich ein Substrat der CK2 darstellt (Ergebnisse nicht gezeigt). Von diesen Erkenntnissen ausgehend wurde humanes α_{S1} -Casein als Autodisplay-Passagier für Affinitätsuntersuchungen mit der CK2 eingesetzt. Im Arbeitskreis Jose war bereits ein entsprechendes Autodisplaykonstrukt vorhanden, das humanes α_{S1} -Casein als Passagier trug. Die Expression des entsprechenden α_{S1} -Casein-Fusionsgens, sowie die Orientierung des Passagiers zum Extrazellularraum, war bereits durch zuvor durchgeführte Studien bestätigt worden (persönliche Mitteilung K. Petermann, R. Maas). Das α_{S1} -Casein-Autotransporter-Fusionsprotein wurde von dem Plasmid pET-RAA codiert. Das in diesem Experiment eingesetzte CK2-Holoenzym wurde zunächst mit Fluorescein konjugiert, um die Bindung der CK2 an Casein-tragende Zellen fluorimetrisch detektieren zu können. Daraufhin wurde eine Kultur von *E. coli* UT5600(DE3) pET-RAA kultiviert und anschließend die Expression des Autotransporter-Fusionsgens induziert. Diese Bakteriensuspension wurde mit Fluorescein-konjugierter CK2 (CK2_F) inkubiert. In einer durchflusszytometrischen Analyse wurde die Fluoreszenz dieser Zellen bei einer Emissionswellenlänge von 530 nm analysiert. Diese Probe wurde mit zwei unterschiedlichen Geräteparametern („threshold“) untersucht. Die Ergebnisse dieser zwei separaten Analysen von *E. coli* UT5600(DE3) pET-RAA sind in Abbildung 36 dargestellt. Beide Histogramme verdeutlichen, dass dieser Stamm eine deutlich höhere mittlere Fluoreszenz aufweist als der ebenso behandelte Wirtsstamm *E. coli* UT5600(DE3) ohne Plasmid (Negativkontrolle). In Abbildung 36 A sind zwei Populationen des Stamms *E. coli* UT5600(DE3) pET-RAA zu erkennen, die unterschiedlich stark fluoreszieren. Das lokale Maximum bei einer Fluoreszenzintensität von ca. 100 liegt auf dem Niveau der Negativkontrolle, deren Fluoreszenzmittelwert bei 221 liegt. Dieses grundsätzliche Phänomen ist im Arbeitskreis für derartige durchflusszytometrische Messungen bekannt. Es ist darauf zurückzuführen, dass sich Bakterien und partikuläre Verunreinigungen des Hüllstroms, welche eine ähnliche Gestalt besitzen, nur unzureichend durch die Parameter FSC und SSC differenzieren lassen.

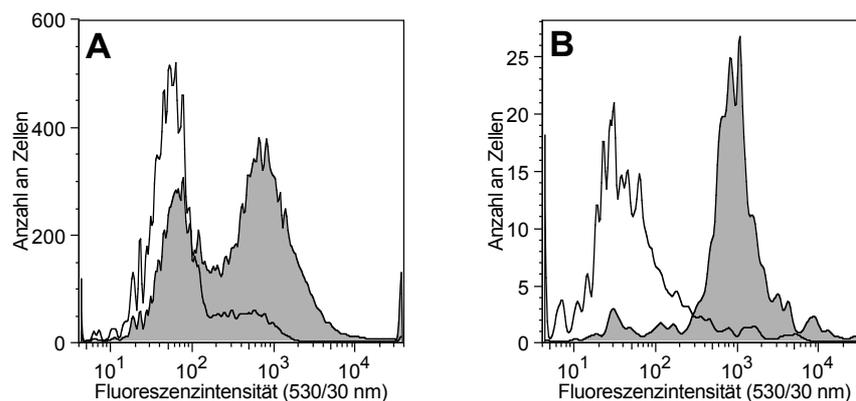


Abbildung 36: Affinitätsuntersuchung von *E. coli* UT5600(DE3) pET-RAA (grau) mit Fluorescein-konjugierter CK2 (CK2_F) und verschiedenen Geräteparametern. Als Negativkontrolle diente *E. coli* UT5600(DE3) ohne Plasmid (transparent). Die Stämme wurden jeweils mit CK2_F inkubiert und anschließend wurden die Proben durchflusszytometrisch untersucht. **(A)** „threshold“: FCS=200, SSC=200, Messung von 30.000 Zellen pro Probe. **(B)** „threshold“: FCS=400, SSC=400, Messung von 1.000 Zellen pro Probe.

Der „threshold“ für FSC und SSC definiert während der Messung den Wert, ab dem ein detektiertes „Ereignis“ überhaupt als Bakterienzelle in die Messung aufgenommen wird. Abhängig von der Einstellung des „thresholds“ und von der Variabilität der Bakteriengestalt variiert der prozentuale Anteil der negativen Teilpopulation. Abbildung 36 B verdeutlicht dies. Dort ist der „threshold“ von FSC und SSC von je 200 auf je 400 erhöht worden. Mit dem erhöhten „threshold“ zeigen dieselben Proben ein eindeutigeres Bild. Hier erkennt man für *E. coli* UT5600(DE3) pET-RAA eine homogene Population mit einem Fluoreszenzmittelwert von 2.133. Für die Population von *E. coli* UT5600(DE3) ohne Plasmid konnte ein Wert von 215 bestimmt werden. Der qualitative Vergleich der erhaltenen Daten mit unterschiedlichen „thresholds“ zeigt, dass die mittlere Fluoreszenzintensität der negativen Zellen (*E. coli* UT5600(DE3) ohne Plasmid) von dieser Änderung unberührt bleibt, die Probe (*E. coli* UT5600(DE3) pET-RAA) aber eindeutig homogener dargestellt wird. Ein deutlicher Nachteil der Erhöhung des „thresholds“ ist die Nicht-Erfassung eines Teils der Bakterienzellen (je nach Probe zwischen 60-90 %). Um in zukünftigen Experimenten ein Abbild aller Zellen in der Probe zu erhalten und keine Artefakte zu messen, wurde weiterhin mit dem niedrigeren „threshold“ (FSC=200 und SSC=200) gearbeitet. Deshalb wurde allein das Auftreten einer Population bei hohen Fluoreszenzwerten als positive Affinitätsmarkierung gewertet. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass das in der Autotransporter-Passagierdomäne präsentierte humane α_{s1} -Casein in der Lage ist an die CK2 zu binden. Daneben konnte der Nachweis

erbracht werden, dass eine Affinitätsuntersuchung der CK2 mittels Autodisplay eines Substrates und durchflusszytometrischer Analytik grundsätzlich durchführbar ist.

4.1.1. Affinitätsuntersuchung von N-terminal verkürztem α_{S1} -Casein

Der untersuchte α_{S1} -Casein-Passagier war mit einer Länge von 170 AS als Ausgangspunkt für die Entwicklung eines Inhibitors zu groß. Von Interesse waren allerdings die Bereiche des Proteins, welche für die Affinität an die CK2 von Bedeutung sind. Diese wurde mit Teilen der α_{S1} -Casein-Sequenz in „Epitop-Mapping“-ähnlichen Bindungsstudien genauer untersucht. Im Arbeitskreis Jose wurden zwei Fusionsgene konstruiert, die N-terminal verkürzte Proteinsequenzen des α_{S1} -Casein als Autodisplay-Passagiere codierten (KP3: 66 AS; KP7: 16 AS. Proteinsequenzen der Passagiere im Anhang). Bei beiden Verkürzungen war der N-terminal lokalisierte Bereich der bekannten physiologischen Hauptphosphorylierungsstellen des α_{S1} -Caseins nicht mehr vorhanden. Die Expression sowie die extrazelluläre Orientierung der Fusionsproteine KP3-FP (Stamm *E. coli* UT5600(DE3) pKP003) und KP7-FP (Stamm *E. coli* UT5600(DE) pKP007) wurden bereits nachgewiesen (persönliche Mitteilung K. Petermann). Die beiden Stämme wurden nach Kultivierung und Induktion der Proteinexpression dem Markierungsprotokoll mit CK2_F unterzogen. Daneben wurde *E. coli* UT5600(DE3) pET-RAA zum Vergleich herangezogen. *E. coli* UT5600(DE3) ohne Plasmid wurde als Negativkontrolle eingesetzt und demselben Markierungsprotokoll unterworfen. In Abbildung 37 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse als Fluoreszenzhistogramm für jeden der untersuchten Stämme dargestellt. Der α_{S1} -Casein-präsentierende Stamm (*E. coli* UT5600(DE3) pET-RAA) zeigte, wie schon in Abbildung 36, eine deutlich stärkere Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Negativkontrolle (*E. coli* UT5600(DE3) ohne Plasmid) (Abbildung 37 A und B). Auch der Stamm *E. coli* UT5600(DE3) pKP003 konnte eindeutig mit CK2_F markiert werden, was sich an einer homogenen, stark fluoreszierenden Population mit einem Fluoreszenzmittelwert von 1.792 feststellen ließ. In dieser durchflusszytometrischen Auswertung war interessanterweise nur eine äußerst schwach ausgeprägte negative Population zu erkennen. Eine Erklärung hierfür konnte bislang aber nicht gefunden werden. *E. coli* UT5600(DE3) pKP007 zeigte im Fluoreszenzhistogramm zwei Populationen mit lokalen Maxima bei ca. 100 und ca. 1.000, die nahezu vollständig mit dem Histogramm des Casein-präsentierenden Stamms übereinstimmte (Abbildung 37 D). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass beide N-terminal verkürzten α_{S1} -Casein-Sequenzen, wie α_{S1} -Casein selbst, eine Affinität zur CK2 aufweisen.

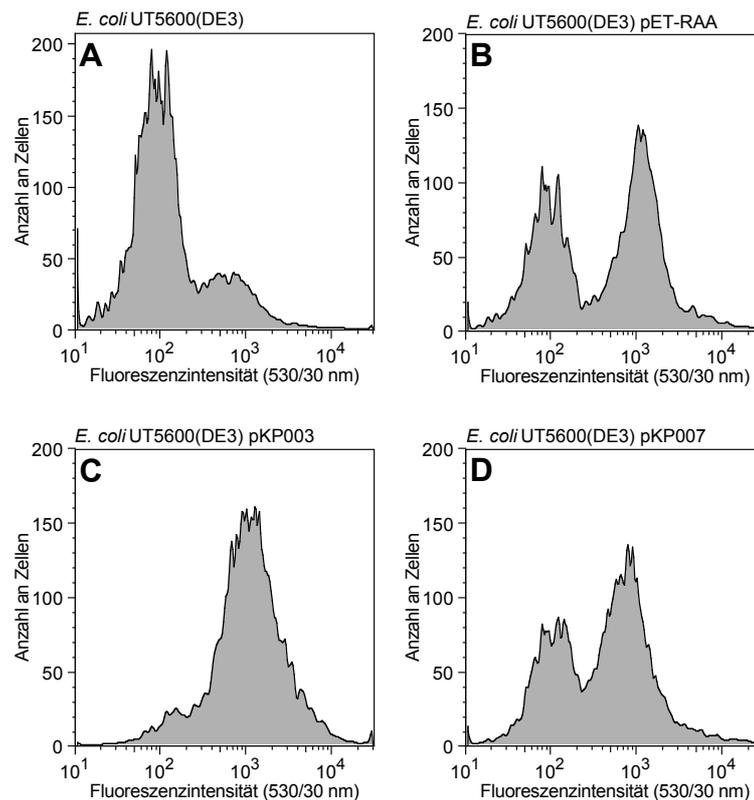


Abbildung 37: Affinitätsuntersuchung von CK2_F mit vollständigem α_{S1} -Casein (B) und den N-terminal verkürzten α_{S1} -Casein Sequenzen KP3 (C) bzw. KP7 (D). Die untersuchten α_{S1} -Casein-Fragmente wurden jeweils an der Zelloberfläche von *E. coli* präsentiert. Die zugehörigen Stammbezeichnungen sind an dem jeweiligen Fluoreszenzhistogramm angegeben. Als Negativkontrolle diente der Stamm *E. coli* UT5600(DE3) ohne Plasmid (A). Alle Stämme wurden jeweils mit CK2_F inkubiert und 10.000 Zellen pro Probe durchflusszytometrisch auf Fluoreszenz untersucht.

4.1.2. Untersuchung einer Peptidsequenz aus α_{S1} -Casein als Inhibitor der CK2

Die auf 16 AS verkürzte α_{S1} -Casein-Sequenz des Autodisplay-Passagiers KP7 lautete: PTAHENYEKNNVMLQW. Dieses Peptid beinhaltet kein klassisches CK2-Phosphorylierungsmotiv. Die starke Affinität zur CK2 in Kombination mit der Tatsache, dass das Peptid vermutlich nicht als Substrat umgesetzt wird, begründete die Vermutung, dass dieses Peptid die Aktivität der CK2 modulieren kann. Um einen möglichen Effekt dieses Peptids auf die CK2-Aktivität zu untersuchen, wurden ein von KP7 abgeleitetes Peptid synthetisch hergestellt (JPT, Berlin) und als Inhibitor im kapillarelektrophoretischen CK2-Aktivitätstest eingesetzt. Das Peptid mit der Sequenz PTAHENYEKNNVMLQW wurde im kapillarelektrophoretischen CK2-Inhibitionstest in Konzentrationen von 10 μ M und 100 μ M eingesetzt. In keiner der beiden Konzentrationen konnte allerdings eine Hemmwirkung auf die Aktivität der CK2 festgestellt werden. Im Falle von KP7 lässt sich demnach aus der starken Affinität zur CK2 keine inhibitorische Wirkung ableiten.

4.2. CK2-Pseudosubstrat als Autodisplaypassagier

Einen weiteren Ansatzpunkt zur Zellaffinitätsmarkierung mittels Autodisplay boten artifizielle Substrate der CK2, die durch rationale Modifikation zu Pseudosubstraten werden sollten. Das Peptid RRRDDDSDDD wurde schon früh als Substrat der CK2 identifiziert (Kuenzel *et al.*, 1987). Die drei N-terminalen Arginine stellen in der Sequenz lediglich einen „tag“ zur Bindung an Phosphozellulosefilter im konventionellen radiometrischen CK2-Assay dar. Als substratbestimmende Determinanten wurden die sauren Aspartatreste diskutiert, die den zu phosphorylierenden Serinrest flankieren (Kuenzel *et al.*, 1987). Bei der Konstruktion des Autodisplay-Passagiers wurde deshalb auf die N-terminalen Arginine verzichtet. Zusätzlich sollte das Peptid von der CK2 nicht umgesetzt werden können und so zum Pseudosubstrat werden. Zu diesem Zweck wurde der Serinrest durch einen Alaninrest ersetzt. Um dieses Peptid (DDDADDD) an der Oberfläche von *E. coli* zu präsentieren, musste ein Fusionsgen konstruiert werden, das für ein Autotransporter-Fusionsprotein, bestehend aus Signalpeptid, Passagier (=Peptid), Linker und β -Fass Domäne, codiert.

4.2.1. Konstruktion von Expressionsplasmiden zum Peptid-Autodisplay

Das im Arbeitskreis vorhandene Plasmid pBL002 codierte alle zum Autodisplay benötigten Domänen und wurde bereits als Vektor zur Klonierung von der CK2 α eingesetzt. Die Sequenz des darin enthaltenen Passagiers wird von den beiden Restriktionsschnittstellen XhoI (am 5'-Ende) und KpnI (am 3'-Ende) flankiert. Mittels Kassettenmutagenese konnte dieses 1.357 bp große Fragment durch eine DNA-Sequenz ausgetauscht werden, die das Peptid DDDADDD und das Hämagglutinin-Epitop mit der AS-Sequenz YPYDVPDYA (HA-Epitop) codiert. Das HA-Epitop wurde eingeführt, um die spätere Analytik der subzellulären Lokalisation und Orientierung der Passagierdomäne zu erleichtern. Die Klonierung erforderte eine doppelsträngige (ds) DNA-Sequenz, die aus zwei komplementären synthetischen Oligonukleotiden hergestellt wurde (Abbildung 38 B). Die Hybridisierung der Oligonukleotide Pr99 und Pr100 ergab ein dsDNA-Fragment, welches das Peptid DDDADDD + HA-Epitop codierte und kohäsive, zu XhoI (5'-Ende) und KpnI (3'-Ende) kompatible Enden hatte. Als Vektor diente das XhoI/KpnI geschnittene, 4.828 bp große Rückgrat von pBL002. Nach Ligation mit dem Pr099/Pr100-Hybrid entstand so das Plasmid pAG009 (Abbildung 38 B). Für vergleichende Untersuchungen wurde, basierend auf dieser Strategie, ein weiteres Fusionsgen kloniert, welches das CK2-Substratpeptid DDDSDDD+HA-Epitop als Passagier codierte (Abbildung 38 A). Dazu wurde das dsDNA-Hybrid der Oligonukleotide Pr101 und Pr102 mit dem Rückgrat aus pBL002 ligiert. Das entstehende Plasmid wurde pAG008 genannt. Die von pAG009 und

pAG008 codierten Autotransporter-Fusionsproteine unterschieden sich in genau einer Aminosäure, die an der Stelle des Phosphatakzeptors liegt und im Falle des Pseudosubstrat-Passagiers ein Alanin aufwies (pAG009) und im Falle des Substrat-Passagiers ein Serin (pAG008). Nach der Transformation von *E. coli* UT5600(DE3) mit pAG009 oder pAG008 wurde von Transformanten beider entstandenen Stämme eine Plasmidisolierung durchgeführt. Durch eine anschließende DNA-Sequenzanalyse wurde sichergestellt, dass das jeweilige Fusionsgen die korrekte DNA-Sequenz aufwies.

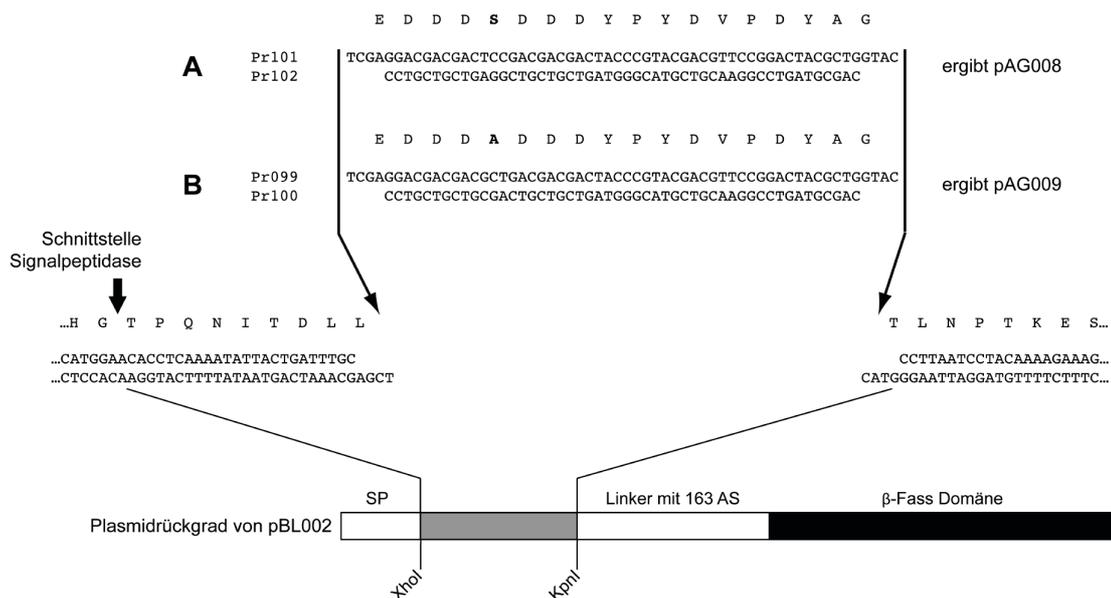


Abbildung 38: Konstruktion von pAG008 und pAG009. Nach Hybridisierung von Pr099 und Pr100 (B), bzw. Pr101 und 102 (A) bildete sich jeweils ein dsDNA-Fragment, das die jeweils darüberstehende AS-Sequenz codierte. Sie besaßen überhängende Enden, die kompatibel zu den Enden des Rückgrats von Plasmid pBL002 waren, der mit XhoI und KpnI geschnitten wurde. Die Klonierung des jeweiligen dsDNA-Fragments in pBL002 ergab Plasmid pAG008 (A), bzw. Plasmid pAG009 (B). Die Autotransporterdomänen, die von Plasmid pBL002 codiert werden sind gekennzeichnet (SP=Signalpeptid).

4.2.2. Affinitätsuntersuchung eines CK2-Pseudosubstrats als Autodisplaypassagier

Die subzelluläre Lokalisation und die Überprüfung der Orientierung der Passagierdomäne zum Extrazellulärraum wurde für Stamm *E. coli* UT5600(DE3) pAG009 gezeigt. *E. coli* UT5600(DE3) pAG009 wurde kultiviert und die Expression des Autotransporter-Fusionsgens induziert. Daraufhin wurde dieser Stamm neben *E. coli* UT5600(DE3) (Negativkontrolle) erst mit murinem Anti-HA-AK und danach mit Dylight 649-gekoppeltem Anti-Maus AK inkubiert. Die durchflusszytometrische

Analyse dieser beiden Proben ist in einer Überlagerung beider Fluoreszenzhistogramme in Abbildung 39 dargestellt. *E. coli* UT5600(DE3) pAG009 zeigte einen Fluoreszenzmittelwert von 1.947 (graues Histogramm), der deutlich über dem Mittelwert der Negativkontrolle (*E. coli* UT5600(DE3), transparentes Histogramm) von 195 lag. Im Falle der peptidtragender Zellen konnte durch den erwähnten niedrigen „threshold“ (FSC=200 und SSC=200) auch hier eine kleine Schulter im Histogramm festgestellt werden, die der Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle entsprach. Durch die spezifische Markierung der Zellen über das in der Passagierdomäne vorkommende HA-Epitop konnte dessen Orientierung in den Extrazellulärraum belegt werden. Da sich die Fusionsproteine der Plasmide pAG008 und pAG009 nur in einer Aminosäure unterscheiden, konnte für beide ein gleiches Verhalten angenommen werden.

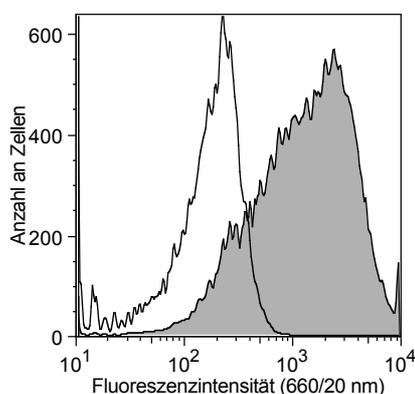


Abbildung 39: Durchflusszytometrischer Nachweis der extrazellulären Orientierung der Passagierdomäne durch Antikörperzugänglichkeit des HA-Epitopes in *E. coli* UT5600(DE3) pAG009. Der Stamm wurde zunächst mit murinem Anti-HA Antikörper, dann mit Dylight 649-gekoppeltem Anti-Maus Antikörper markiert. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch auf Fluoreszenz untersucht. Fluoreszenzintensitäten von *E. coli* UT5600(DE3) (transparent, Analyse von 30.000 Zellen) sind als Negativkontrolle über das Histogramm von *E. coli* UT5600(DE3) pAG009 gelegt (grau, Analyse von 50.000 Zellen).

Um die Affinität des Autodisplay-Passagiers zur CK2 zu untersuchen, wurde der Stamm *E. coli* UT5600(DE3) pAG009 zunächst einer Markierungsprozedur mit CK2_F unterzogen. Als Kontrollen dienten der reine Stamm *E. coli* UT5600(DE3) und *E. coli* UT5600(DE3) pAG008. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität der so behandelten Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 40 dargestellt. Der Stamm, der das Pseudosubstrat DDDADDD an der Oberfläche trug, zeigte einen Fluoreszenzmittelwert von 554 (Abbildung 40 C) und lag damit leicht über dem Mittelwert der Negativkontrolle

E. coli UT5600(DE3) (Abbildung 40 A) von 246. Der Stamm *E. coli* UT5600(DE3) pAG008, der das Substrat DDDSDDD trug (Abbildung 40 B), wies hingegen mit einem Mittelwert von 215 keinen Unterschied zur Negativkontrolle auf.

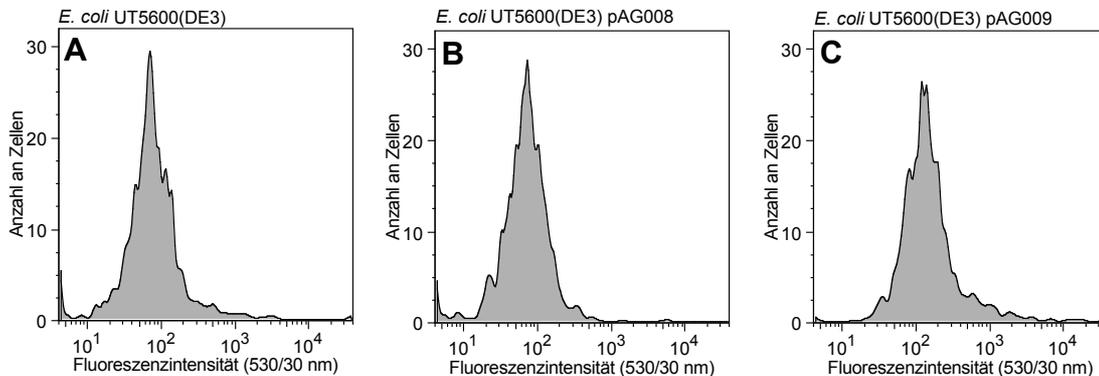


Abbildung 40: Affinitätsuntersuchung peptidtragender *E. coli*-Zellen mit CK2_F. Als Kontrolle diente der reine Wirtstamm (A; *E. coli* UT5600(DE3) ohne Plasmid). Die Stämme wurden jeweils mit Fluorescein-konjugierter CK2 inkubiert und 1.000 Zellen pro Probe durchflusszytometrisch auf Fluoreszenz untersucht. (B) *E. coli* UT5600(DE3) pAG008 trägt das Substrat DDDSDDD an der Oberfläche, (C) *E. coli* UT5600(DE3) pAG009 trägt das Pseudosubstrat DDDADDD an der Oberfläche.

Über das Pseudosubstrat DDDADDD konnten die Zellen nur unwesentlich stärker mit CK2_F markiert werden als die Negativkontrolle und Zellen, die das Substrat präsentierten. Dieser Unterschied von Faktor 2 lässt, verglichen mit den Unterschieden in den Fluoreszenzmittelwerten der vorangegangenen Affinitätsuntersuchungen, auf eine äußerst schwache Affinität zwischen Pseudosubstrat und CK2 schließen. Andererseits bekräftigt dieses Ergebnis jedoch die Erkenntnis aus den Experimenten mit den verkürzten α_{S1} -Casein Sequenzen als Autodisplay-Passagier. Die Anzahl der Aminosäuren in der Passagierdomäne und die Sequenz von Signalpeptid, Linker- und β -Fass-Domäne, sowie das Markierungsprotokoll mit CK2_F stimmten in beiden Experimenten überein. Alleine die Sequenz des Passagiers α_{S1} -Casein-Peptid KP7 unterschied sich von derjenigen des (Pseudo)Substrats. Somit kann für die Affinität des Stamms *E. coli* UT5600(DE3) pKP007 zur CK2 nur die Peptidsequenz von KP7 verantwortlich sein.

4.3. Erstellung einer Autodisplay-Peptidbibliothek

Da das rational entworfene Pseudosubstrat DDDADDD eine zu schwache Affinität zur CK2 aufwies, wurde eine andere Vorgehensweise entwickelt, um möglichst affine peptidische CK2-Liganden/Bindungspartner zu erhalten. In Anlehnung an „phage display“-Experimente (Noren und Noren, 2001) und Experimente im Arbeitskreis Jose (Jose *et al.*, 2005) sollte über eine bedingt zufällige Variation verschiedener Positionen innerhalb eines Autodisplay-Peptid-Passagiers eine Bibliothek erstellt werden. Autodisplay bietet dabei den Vorteil, dass pro Bakterienzelle der Genotyp (die genetische Information des zufälligen Peptids) und der Phänotyp (die Affinität zur CK2) physikalisch gekoppelt sind. In einer solchen Bibliothek von Autotransporter-Fusionsproteinen präsentiert jede Zelle nur eine Peptidpassagiervariante in hoher Kopienzahl. Nach Inkubation mit fluoreszenzkonjugierter CK2 werden Zellen mit CK2-affinem Peptid an der Oberfläche mehr CK2 binden, als Zellen, die ein Peptid tragen, das schwach an die CK2 bindet. Unter optimalen Bedingungen sollte man mit Durchflusszytometrie-gekoppelter Zellsortierung („FACS“) stark fluoreszierende Zellen aussortieren können. Diese sollten hochaffine Peptide tragen, deren Sequenz über DNA-Sequenzierung der codierenden Plasmide zugänglich ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Methode zur Erstellung einer Bibliothek etabliert und verifiziert werden.

4.3.1. Konstruktion des Vektors zur Klonierung der DNA-Bibliothek

Zur Klonierung des DNA-Bibliothekinserts sollte ein Vektor benutzt werden, der möglichst einfach und in reiner Form präpariert werden kann. Außerdem sollte ein möglichst kleines Bibliothekplasmid entstehen, weil so eine größere Effizienz bei der Transformation der Zellen zu erwarten war. Das Plasmid pAG009, das alle zum Autodisplay erforderlichen genetischen Informationen enthielt, stellte den Ausgangspunkt für die folgenden Experimenten dar. Das enthaltene DNA-Fragment für die Passagierdomäne, das hier von XhoI- und KpnI-Erkennungssequenzen flankiert wurde, war allerdings nur 58 bp groß. Dies erschwerte die Analytik der Entfernung dieses Passagierfragments nach Restriktionsverdau mit XhoI/KpnI erheblich, da das entstehende 58 bp große Fragment auf einem Agarosegel nicht ohne weiteres identifiziert werden konnte. Damit ließ sich auch das Gelingen des Restriktionsverdaus nicht eindeutig verifizieren. Dies war jedoch notwendig, um eine möglichst hohe Effizienz der nachfolgenden Klonierung des Bibliothekinserts sicherzustellen. Als Ausweg bot es sich an, ein 1.000 bp langes „nonsense“-Fragment in den Passagierbereich einzufügen, dessen Entfernung besser kontrolliert werden konnte. An diesem Punkt wurde ein weiterer Faktor berücksichtigt: Alle bisher im Arbeitskreis

benutzten Autodisplaykonstrukte besitzen nach Prozessierung durch die Signalpeptidase neun Aminosäuren N-terminal vor dem Beginn der Passagiersequenz. Die zu untersuchenden Peptide in der Passagierdomäne werden so immer N-terminal um ein festes Sequenzmotiv erweitert (siehe Abbildung 38). Dieses Motiv könnte zu einer Beeinflussung der Affinität des relativ kurzen Passagierbibliothekpeptids in nachfolgenden Experimenten führen. Deshalb wurde zunächst das in Plasmid pAG009 vorhandene Konstrukt so modifiziert, dass im prozessierten Autotransporter-Fusionsprotein lediglich eine Aminosäure (Threonin) N-terminal vom Bibliothekspeptid vorhanden sein sollte. Diese eine Aminosäure ist weiterhin notwendig, damit die Schnittstelle der Signalpeptidase erhalten bleibt und das Fusionsprotein dem Sec-Translokationsmechanismus zugeführt wird. Der entsprechende Teil der DNA-Sequenz war nur über die NdeI-Schnittstelle zugänglich, die allerdings in der für das Signalpeptid codierenden Sequenz vorlag. Der weiter 3' liegende Teil der DNA, der durch einen Restriktionsverdau mit NdeI entfernt wird, muss daher später durch das Bibliothekinsert wiederhergestellt werden. Die beiden genannten Ansprüche an einen zu konstruierenden Vektor wurden erfüllt, indem durch einen gleichzeitigen NdeI/XhoI-Restriktionsverdau zunächst ein 37 bp großes DNA-Fragment aus pAG009 entfernt wurde. Dieses enthielt die genetische Informationen über den C-terminalen Teil des Signalpeptids und codierte für acht der neun überflüssigen Aminosäuren, die N-terminal zum Passagier lagen. Dieser DNA-Abschnitt wurde durch ein 998 bp großes DNA-Fragment ersetzt, das laterale, zu NdeI (5'-Ende), bzw. XhoI (3'-Ende) kompatible Überhänge besaß. Es diente lediglich als „Füllsequenz“ und trug keine für die Experimente relevante genetische Information. Dieses Plasmid wurde pAG011 genannt. Aufgrund eines Stoppcodons führte eine Induktion der Proteinexpression in Stämmen mit diesem Plasmid zu einem Polypeptid von 40 AS, dem die Transportdomäne des Autotransporter-Fusionsproteins fehlt. Sollte es also trotz der durch das eingefügte 998 bp große Fragment prinzipiell verbesserten Aufreinigungsbedingungen zu einer Verschleppung des Plasmids pAG011 während der Konstruktion der Plasmidbibliothek kommen, könnte kein funktionelles Autotransporter-Fusionsprotein exprimiert werden.

4.3.2. Erstellung eines DNA-Bibliothekinserts

Wie in der Einleitung beschrieben, wurden in mehreren Studien synthetische Peptide und natürliche Substrate der CK2 eingesetzt, um die grundlegenden Eigenschaften eines effektiven CK2-Substrats zu untersuchen. Daraus ergab sich die Konsensussequenz: (E/D/X)-(S/T/Y)-(D/E/X')-(E/D/X)-(E/D)-(E/D/X) (Pinna, 2002). Die Symbole für die Aminosäuren sind dabei umso deutlicher hervorgehoben, je häufiger

sie in Erkennungsmotiven von CK2-Substraten gefunden wurden (X= beliebige AS, X'= beliebige AS, mit Ausnahme von Prolin oder einer basischen AS). Als essentiell für die Erkennung des Substrats durch die CK2 haben sich saure Reste im Abstand von drei und vier Aminosäuren C-terminal des Phosphatakzeptors erwiesen. Daran angelehnt wurde auf DNA-Ebene eine eingeschränkt zufällige Bibliothek konstruiert, dessen Peptidprodukte diesen Anforderungen an ein CK2-„Modellsubstrat“ Rechnung tragen. Zusätzlich wurde der am häufigsten vorkommende Phosphatakzeptor Serin durch Tyrosin ersetzt. Tyrosin kann als Phosphatakzeptor für die CK2 dienen, allerdings mit einer niedrigeren Umsatzgeschwindigkeit als Serin oder Threonin (Marin *et al.*, 1999). Deshalb konnte davon ausgegangen werden, dass der Einsatz dieser Aminosäure an der „Phosphatakzeptorposition“ die Bindung des Peptids erlauben sollte, ohne als typisches Substrat schnell umgesetzt zu werden. Die Codons für die zweite und dritte Aminosäure C-terminal des Phosphatakzeptors wurden so gewählt, dass in der resultierenden Peptidposition eine saure Aminosäure (Aspartat oder Glutamat) vorkommt. Die Codons für die zwei Aminosäuren N- sowie C-terminal des Phosphatakzeptors sollten rein zufällig variiert werden. In den Codons des codierenden Strangs wurde Adenosin als drittes Nukleotid ausgeschlossen, um die Entstehung der Stoppcodons UAA und UGA an diesen Stellen zu verhindern. Die folgende AS-Sequenz sollte von dem konstruierten Oligonukleotid codiert werden:

-N - N - Y - N - N - (D/E) - (D/E)-

Zusätzlich zu der DNA-Sequenz, die dieses variable Peptid codiert, musste der in Plasmid pAG011 entfernte Bereich, der für den C-terminalen Teil des Signalpeptids codiert, durch das zu konstruierende Oligonukleotid wiederhergestellt werden. Die Klonierung des fertigen DNA-Fragments sollte über die Restriktionsschnittstellen NdeI (5'-Ende) und BsiWI (3'-Ende) in den Vektor pAG011 erfolgen (siehe Abbildung 41). Die entsprechenden DNA-Erkennungssequenzen für beide Restriktionseendonukleasen mussten ebenfalls bei der Konstruktion des Oligonukleotids berücksichtigt werden. Zusätzlich wurden die zu den beiden Schnittstellen flankierenden Sequenzen soweit verlängert, dass der Erfolg eines NdeI/BsiWI Doppelverdau durch drei entstehende Fragmente in einem hochauflösenden Agarosegel nachgewiesen und das bibliothekstragende Fragment isoliert werden konnte. Dieses Fragment konnte in das NdeI/BsiWI geschnittene Plasmid pAG011 so ligiert werden, dass das Leseraster des Autodisplaykonstruktes erhalten wurde und entsprechende Fusionsproteine produziert werden können. Da sich pro Bakterienzelle nur eine Plasmidvariante einer Kompatibilitätsgruppe (in mehreren Kopien) halten kann, wird auch nur eine Passagierpeptidvariante pro Bakterienzelle produziert und präsentiert. Im Laufe des Experiments zeigte sich, dass die Sequenz der Oligonukleotidtermini, vor allem die des langen Oligonukleotids (Pr249), entscheidend zum Erfolg bzw. zur Effizienz der

Zweitstrangsynthese und der Restriktion beitragen. Pr248 und Pr249 stellten das Oligonukleotidpaar dar, das am besten zur effektiven Konstruktion des bibliothekcodierenden DNA-Abschnitts geeignet war. Die Konstruktion der Bibliothek wurde folgendermaßen durchgeführt: Die Oligonukleotide Pr248 und Pr249 wurden vereinigt, denaturiert und hybridisiert. Zu dem entstehenden partiellen Doppelstrang (Abbildung 41, grau hinterlegt) wurde Klenow(exo-) DNA-Polymerase und dNTPs gegeben, um Pr248 zu verlängern und dsDNA zu erhalten.

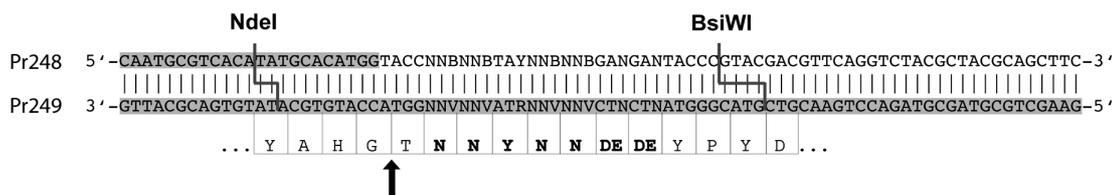


Abbildung 41: Konstruktion des dsDNA Bibliothekfragments. Die Oligonukleotide Pr248 und Pr249 wurden hybridisiert (grau hinterlegte DNA-Sequenzen) und der Zweitstrang mit Klenow(exo-) DNA-Polymerase synthetisiert. Das entstandene dsDNA Molekül konnte nach einem Restriktionsverdau mit NdeI und BsiWI in den ebenso geschnittenen Vektor pAG011 kloniert werden. Die unter der DNA-Sequenz fett gedruckte AS-Sequenz stellt die codierte Bibliotheksequenz dar, die an vier Stellen zufällige (N) und an zwei Stellen saure AS (DE= D oder E) enthält. Mit dem Pfeil ist die wiederhergestellte Signalpeptidaseschnittstelle gekennzeichnet.

In einem Ansatz mit zwei Restriktionsendonukleasen wurde das 5'-Ende des doppelsträngigen Fragments mit NdeI, das 3'-Ende (jeweils bezogen auf den codierenden Strang im späteren Fusionsgen) mit BsiWI geschnitten. Nach der Reaktion wurde diese Probe in einem hochauflösenden 5 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Wie auf dem Agarosegel in Abbildung 42 zu erkennen ist, gelang vor allem die Restriktion durch NdeI nicht vollständig. Die Effizienz dieser Spaltung konnte im Vergleich zu vorhergehenden Ansätzen (nicht gezeigt) gesteigert werden. Für eine optimale, hochvariable Bibliothek sollte diese Effizienz in zukünftig aber noch weiter verbessert werden. Das NdeI/BsiWI-geschnittene dsDNA-Fragment von 41 bp enthielt die variable Bibliotheksequenz und wurde aus dem Agarosegel isoliert.

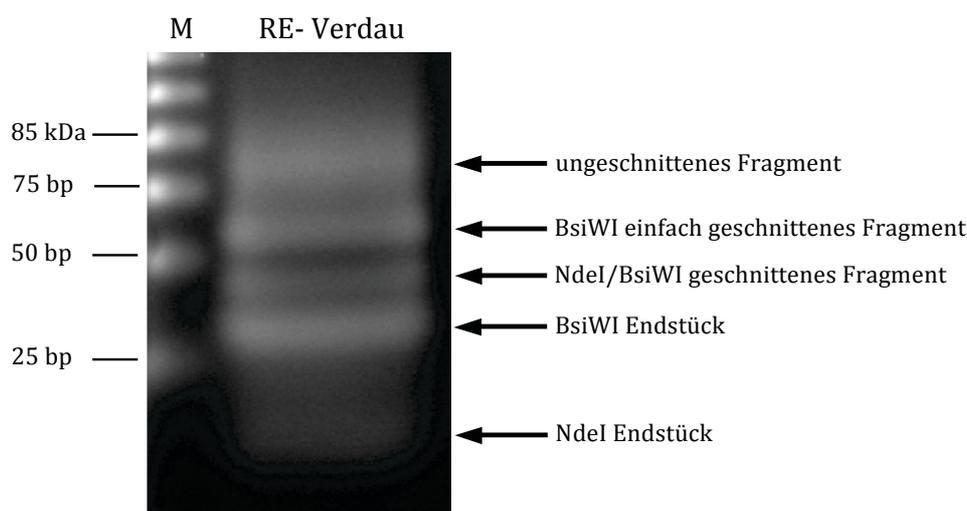


Abbildung 42: Auftrennung des präparierten Bibliotheksfragments durch ein 5 %iges Agarosegel. Das in **Abbildung 41** dargestellte dsDNA Molekül wurde durch die Restriktionsendonukleasen (RE) NdeI und BsiWI fragmentiert, sodass DNA-Fragmente entstanden, die mit Pfeilen annotiert sind (M= DNA-Größenstandard).

4.3.3. Analyse der Plasmidbibliothek

Dieses, die Zufallsbibliothek enthaltende DNA-Fragment mit lateralen köhasiven Enden wurde mit dem 4.818 bp großen Rückgrat des NdeI/BsiWI-geschnittenen Vektors pAG011 ligiert. Durch Elektroporation wurden hochkompetente *E. coli* DH5 α Zellen mit der so konstruierten Plasmidbibliothek transformiert. Diese Zellen waren nicht zur Expression des jeweils enthaltenen Autotransporter-Fusionsgens fähig, sondern dienten der Untersuchung der mit dieser Strategie hergestellten Bibliothek auf DNA-Ebene. Dazu wurde ein Teil der Bibliothek auf kanamycinhaltigen Agarplatten ausgestrichen, Einzelmutanten kultiviert und von 11 so vereinzelt Mutanten die Plasmid-DNA zur DNA-Sequenzanalyse isoliert. Die jeweils variablen Sequenzen des für den Peptidpassagier codierenden DNA-Abschnitts sind in **Abbildung 43** zusammengefasst. Alle ermittelten DNA-Sequenzen waren unterschiedlich. Daraus konnten 11 unterschiedliche Peptidvarianten abgeleitet werden. Sequenzen 9 und 10 zeigten an Nukleotidposition 18 ein Guanodin, was im Kontext der beiden vorherigen Nukleotide zum Stoppcodon und damit zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinbiosynthese führt. Im Oligonukleotid war an dieser Position der Einbau einer Pyrimidinbase (Cytosin oder Thymin) vorgegeben, was genau dieses Stoppcodon vermeiden sollte. Eine weitere Abweichung von der vorgegebenen DNA-Sequenz war in Sequenz 3 zu verzeichnen. An den Positionen 25 und 28 war statt eines durch das Oligonukleotid vorgegebenen Guanodins ein Cytidin zu finden, was in beiden Fällen zur Aminosäure Glutamin statt des geplanten Glutamats führte. Die

genannten Sequenzfehler können entweder durch fehlerhafte Synthese der Oligonukleotide oder einen Fehler bei der Zweitstrangsynthese erklärt werden.

	1	10	20	30	40	50	60
1	CATGGTACCNNBNNBTA	YNNBNNBGANGAN	TACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTGGT				
	H G T ? ? Y ? ? ? ? Y P Y D V P D Y A G						
2	CATGGTACCTCTTCTTA	TGCTTGCAGGACTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTGGT					
	H G T S S Y A C E D Y P Y D V P D Y A G						
3	CATGGTACCGCCGAGT	CATGCAACAAATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTGGT					
	H G T A E Y M H Q Q Y P Y D V P D Y A G						
4	CATGGTACCCCTCCCTA	TCTCACGGATGATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTGGT					
	H G T P P Y L T D D Y P Y D V P D Y A G						
5	CATGGTACCCCGACTTA	TAAGAGGGAAGAAATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTGGT					
	H G T P T Y K R D E Y P Y D V P D Y A G						
6	CATGGTACCCGGCGCTA	CCTTAACGACGAAATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTGGT					
	H G T R R Y L N D E Y P Y D V P D Y A G						
7	CATGGTACCGATGTGTA	TATCCCGGAAGACTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTGGT					
	H G T D V Y I P E D Y P Y D V P D Y A G						
8	CATGGTACCCCAATTA	CCCCAACGAAATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTGGT					
	H G T P N Y P N E D Y P Y D V P D Y A G						
9	CATGGTACCAAGCAGTA	GAACTATGAGGAAATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTGGT					
	H G T K Q * N Y E E Y P Y D V P D Y A G						
10	CATGGTACCCCAATTA	GCCCGACGACGAAATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTGGT					
	H G T P I * P D D E Y P Y D V P D Y A G						
11	CATGGTACCACCCACTA	CCGTCGGGACGACTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTGGT					
	H G T T H Y R R D D Y P Y D V P D Y A G						
12	CATGGTACCACCCCTA	TAACCGCAGAAATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTGGT					
	H G T T P Y N R D E Y P Y D V P D Y A G						

Abbildung 43: „Alignment“ der DNA-Sequenzen, die das Bibliothekfragment der einzelnen Mutanten abdecken. Zum Vergleich ist als Sequenz 1 die in **Abbildung 41** vorgegebene virtuelle Konsensussequenz des idealen Bibliothekfragments gezeigt. Unter den DNA-Sequenzen ist die sich jeweils ergebende Aminosäuresequenz angegeben. Mit der Referenzsequenz (1) übereinstimmende Nucleotide bzw. Aminosäuren sind zur besseren Übersicht hellgrau gedruckt.

Insgesamt konnte aus der Analyse dieser 11 Sequenzen abgeleitet werden, dass die angewandte Strategie die Erzeugung einer großen Varianz im Bibliothekfragment ermöglichte. Die bedingt zufällige Variation der Oligonukleotide mit anschließender Klonierung führte in 9 der 11 analysierten Fälle zu einem vollständigen offenen Leserahmen. Darunter wurden keine identischen Sequenzen gefunden. Bezogen auf das zentrale Tyrosin konnte eine zufällige Verteilung der Aminosäuren an Position -2, -1, +1 und +2 festgestellt werden. In 8 der 9 Fälle wurden die beiden Aminosäuren an den Positionen +3 und +4 C-terminal vom Tyrosin mit einer der beiden vorgegebenen sauren Aminosäuren Aspartat oder Glutamat besetzt, die als essentiell für die Affinität zur CK2-Substratbindestelle angesehen werden. Eine Hürde für die Anwendung stellt momentan noch die geringe Effizienz der Methode dar. Abschließend lässt sich feststellen, dass sich die vorgestellte Strategie der Bibliothekserstellung eignet, um eine Vielzahl von *E. coli* Stämmen herzustellen, die jeweils Varianten für potentielle peptidische CK2-Inhibitoren an der Oberfläche präsentieren.

IV Diskussion

Bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe stellen häufig zwei Faktoren eine Flaschenhals für die effiziente Testung neuer Substanzen dar. Zum einen ist die ausreichende Verfügbarkeit des Zielenzym ein limitierender Faktor. Eine quantitative Isolierung aus Gewebe ist meist nicht möglich und falls eine rekombinante Expression funktionellen Enzyms überhaupt erfolgreich ist, gestaltet sich die Aufreinigung oft aufwendig. Um die heterotetramere humane Proteinkinase CK2 für Inhibitionstests in ausreichender Menge verfügbar zu machen, wurde die CK2 in dieser Arbeit mit Hilfe des Autodisplay-System rekombinant in *Escherichia coli* produziert. Dadurch stand das Enzym an der bakteriellen Oberfläche ohne weitere Aufreinigung für Inhibitionstests zur Verfügung. Die zweite entscheidende Komponente der Wirkstoffentwicklung ist ein passender und verlässlicher Test zur quantitativen Bewertung eines potentiellen Inhibitors. Im Rahmen dieser Arbeit ist die Entwicklung zweier Verfahren zur Inhibitionstestung gelungen. Da unserer Arbeitsgruppe kein Isotopenlabor zu Verfügung stand, lag ein Schwerpunkt auf der Entwicklung nicht-radiometrischer Testverfahren. Im Falle der Entwicklung von Proteinkinase-Inhibitoren kommt noch eine weitere Schwierigkeit hinzu. Der Großteil der momentan betriebenen Wirkstoffentwicklung für diese Klasse von Enzymen konzentriert sich auf die Cosubstratbindetasche als Zielstruktur für niedermolekulare Verbindungen. Dadurch konnten bereits potente Inhibitoren identifiziert werden. Sie zeigen jedoch häufig eine geringe Selektivität, da diese Zielstruktur unter den Proteinkinasen stark konserviert ist. Die Substratbindestelle der CK2 hingegen unterscheidet sich deutlich von der anderer Proteinkinasen. In dieser Arbeit wurde eine Verfahren zur Adressierung der Substratbindedomäne gezeigt, die als Zielstruktur für Inhibitoren bislang wenig diskutierte wurde. Dadurch sollte es möglich werden, selektive Inhibitoren für die CK2 zu entwickeln.

1. Autodisplay humaner CK2

In dieser Arbeit wurde ein neuer Ansatz verfolgt, um die Phosphotransferaseaktivität der humanen Proteinkinase CK2 für Inhibitionstests einfach zugänglich zu machen. Ihre α - sowie ihre β -Untereinheit konnten mittels Autodisplay in den *Escherichia coli* Stämmen UT5600(DE3) und BL21(DE3) exprimiert werden. Die Inkubation dieser CK2-tragenden Stämme mit der Protease Trypsin zeigte, dass die Autodisplay-Fusionsproteine beider Untereinheiten sensitiv für proteolytischen Abbau waren. Dies bestätigte die Orientierung von CK2 α , bzw. CK2 β zum Extrazellularraum. In

E. coli UT5600(DE3) als auch in *E. coli* BL21(DE3) wurde die Proteasezugänglichkeit auch nach einer Coexpression beider Passagiere gezeigt. In *E. coli* UT5600(DE3) führte Autodisplay der katalytisch aktiven CK2 α zu einer deutlich messbaren Phosphotransferaseaktivität von Bakteriensuspensionen mit diesem Stamm. Die CK2-Aktivität war in den beiden CK2 α -tragenden *E. coli* UT5600(DE3)-Stämmen signifikant höher als in dem reinen Wirtsstamm. Der Stamm, der ausschließlich die katalytisch inaktive CK2 β trug, zeigte wie erwartet keine CK2-Aktivität. Gleichzeitiges Autodisplay beider CK2-Untereinheiten in einem Stamm führte tendenziell zu einer Steigerung der CK2-Aktivität im Vergleich zum alleinigen Autodisplay der CK2 α . Darüber hinaus konnte nach Coexpression von CK2 α -FP und CK2 β -FP eine partielle Komplexbildung von Außenmembranproteinen festgestellt werden, die auf eine Oligomerisierung der beiden Untereinheiten hindeuten könnte. Die nativ als Monomere vorliegenden Autotransporter-Proteine sind durch die β -Fass-Domäne beweglich in der äußeren Bakterienmembran verankert (Müller *et al.*, 2005). Dadurch ist eine Passagier-vermittelte Komplexbildung von Autotransporter-Fusionsproteinen prinzipiell möglich. Eine solche Oligomerisierung wurde schon für homomere Enzym-Passagiere, z. B. für Adrenodoxin (Jose *et al.*, 2002), Sorbit-Dehydrogenase (Jose und von Schwichow, 2004) und Nitrilase (Detzel *et al.*, 2010) nachgewiesen. Die in dieser Arbeit zusammengetragenen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass auch eine Oligomerisierung der heteromeren CK2-Untereinheiten an der bakteriellen Zelloberfläche wahrscheinlich ist. Zur Bestätigung dieser These und zur Aufklärung von Stöchiometrie und Struktur dieser Oligomere sind allerdings weitere Untersuchungen, wie z.B. „crosslinking“-Studien notwendig.

Für verlässliche Aktivitäts- oder gar Inhibitionsbestimmungen war die absolute Aktivität der CK2 α -tragenden *E. coli* UT5600(DE3) auf einem zu niedrigen Niveau. Grundsätzlich bestünde die Möglichkeit, durch Vergrößerung der Zellmenge in der Reaktion die CK2-Aktivität zu steigern. Dies wurde jedoch vermieden, da hochkonzentrierte Zellsuspensionen eine hohen Viskosität besitzen und es so zu Einsatz schlecht reproduzierbarer Zellmengen kommt. Diese schwierige Handhabung könnte zu einer weiteren Erhöhung der Schwankungsbreite führen. Stattdessen wurde der schon in anderen Arbeiten erfolgreich zum Autodisplay eingesetzt alternative *E. coli*-Wirtsstamm BL21(DE3) zur Expression benutzt (Schultheiss *et al.*, 2008). Autodisplay von CK2 α in *E. coli* BL21(DE3) führte zu einer 2,4-fach gesteigerten Aktivität, gleichzeitige Autodisplay von CK2 α und CK2 β zu einer 2-fach höheren CK2-Aktivität, jeweils verglichen mit den Aktivitäten der entsprechenden *E. coli* UT5600(DE3)-Stämme. Gleichzeitiges Autodisplay von CK2 α und CK2 β im Stamm *E. coli* BL21(DE3) steigerte die auf die Proteinmenge der CK2 α normierte CK2-Aktivität um einen Faktor zwischen 5 und 10, verglichen mit dem alleinigen

Autodisplay der CK2 α in diesem Wirtsstamm. Dies beruht anscheinend auf einer Stabilisierung der katalytisch aktiven α -Untereinheit durch die strukturell wichtige β -Untereinheit. Solche Phänomene wurden für die CK2 bereits in der Literatur beschrieben. Wird CK2 α beispielsweise rekombinant produziert und aufgereinigt, verliert sie sehr schnell an Aktivität und ist degradationsanfällig (Hathaway und Traugh, 1982; Guerra *et al.*, 2001). Wenn hingegen CK2 α und CK2 β separat produziert und in vereinigter Form als Holoenzym gelagert werden, ist dieser Komplex deutlich stabiler und länger aktiv (Meggio *et al.*, 1992). Ähnliches konnte in dieser Arbeit auch für Zellen festgestellt werden, die nur die CK2 α an der Oberfläche trugen. Nach kurzer Lagerung bei 4°C verloren sie schneller an CK2-Aktivität als *E. coli*-Zellen, die CK2 α und CK2 β gleichzeitig präsentierten (Ergebnisse nicht dargestellt). In der Literatur findet man außerdem einen Vergleich der spezifischen Aktivitäten rekombinanter CK2 α und rekombinantem Holoenzym, die mit dem auch in den hier beschriebenen Experimenten eingesetzten Substratpeptid RRRRDDSDDD bestimmt wurden. Guerra *et al.* (2001) berichten, dass das Holoenzym eine 5,6-fach höhere Aktivität aufweist als die isolierte α -Untereinheit. Dieser Wert korreliert mit der in dieser Arbeit ermittelten Tendenz, dass die Aktivitäten rein CK2 α -tragender *E. coli*-Stämme niedriger ist, als die Aktivität der Stämme, die beide Untereinheiten der CK2 trugen.

Die CK2-Aktivität von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, die beide CK2-Untereinheiten präsentierten, konnte durch Zugabe des selektiven CK2-Inhibitors TBB gehemmt werden. Ab einer Konzentration von 1 μ M führte TBB zu einer vollständigen Inhibition der CK2-Aktivität. Die durch TBB verursachte Hemmung der Peptidphosphorylierung bestätigte, dass tatsächlich die Aktivität der CK2 detektiert wurde. Sie zeigte darüber hinaus, dass diese Zellen, die beide CK2 Untereinheiten tragenden, grundsätzlich für Inhibitionsbestimmungen geeignet sind. Die hohen Schwankungen der Aktivitätsdaten ganzer Bakterienzellen basieren wohl zumindest zum Teil auf der Verwendung des eingesetzte radiometrischen Testverfahrens, das nicht für eine solche Messung konzipiert wurde. Vor dem routinemäßigen analytischen Einsatz der CK2-tragenden Zellen als Ersatz für das aufgereinigte Enzym müsste das Protokoll des radiometrischen Tests entsprechend optimiert werden. Ein Störfaktor in dieser Messung könnten beispielsweise die Arginine des Substratpeptids RRRRDDSDDD sein. Bei neutralem pH-Wert könnten sie durch ionische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen bakteriellen Oberfläche interagieren. So würde einen Teil des Peptidpools an die Zellen binden und ihn erstens schlechter für CK2 zugänglich machen und zweitens die Quantifizierung der inhärenten Radioaktivität ungünstig beeinflussen. Dies wäre eine potentielle Quelle für verstärktes Rauschen, könnte aber durch Austausch der Arginine gegen ein anderes Affinitäts-„tag“ vermieden werden.

Zum Beispiel könnte das zu analysierende Peptid mittels eines Biotin-„tags“ über eine Affinität zu immobilisiertem Streptavidin von den restlichen Testkomponenten getrennt werden. Abgesehen von der Schwankung der Messwerte war die Bestimmung von IC_{50} Werten grundsätzlich möglich. So wurde mit den *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, die beide CK2-Untereinheiten präsentierten, für TBB ein IC_{50} Wert von $0,3 \mu\text{M}$ ermittelt. Der Wert liegt auf dem Niveau der für TBB publizierten IC_{50} Werte (Sarno *et al.*, 2001; Sarno *et al.*, 2005a; Pagano *et al.*, 2008). Es ist jedoch anzumerken, dass die zitierten Werte von $0,15 \mu\text{M}$ bis $1,6 \mu\text{M}$ variieren (vergleiche Tabelle 19). Bei diesem direkten Vergleich mit IC_{50} Werten aus der Literatur ist außerdem zu berücksichtigen, dass die Zugabe der Bakterienzellen die Bedingungen während der Kinasereaktion in unbekanntem Ausmaß beeinflusst. So zeigte sich beispielsweise, dass die Bakterienzellen die ATP-Konzentration im Testansatz herabsetzen (Ergebnisse nicht dargestellt). Mit dem später diskutierten kapillarelektrophoretischen Inhibitionstest mit aufgereinigter CK2 wurde für TBB ein nahezu identischer IC_{50} Wert von $0,27 \mu\text{M}$ bestimmt (Tabelle 19). Diese bemerkenswerte Übereinstimmung wurde trotz der nur eingeschränkt vergleichbaren Testverfahren erzielt und belegt die prinzipielle Anwendbarkeit der oberflächenpräsentierten CK2 in Inhibitionsstudien.

Das Autodisplay der CK2 für Aktivitätsuntersuchungen kombiniert Vorteile eines zellulären Systems, wie schnelle und autonome Vervielfältigung, mit Vorteilen der Untersuchung des isolierten Enzyms. Es vermeidet gleichzeitig deren wesentlichen Nachteile. Durch die Lokalisation der CK2 an der bakteriellen Zelloberfläche ist sie effektiv vor vielen störenden Einflüssen zellulärer Komponenten geschützt. So können zytoplasmatische Faktoren, wie z. B. Proteasen die Zytoplasmamembran nicht passieren und gelangen nicht zur CK2. Der Einfluss der sekretierten Protease OmpT, welche die Aktivität der CK2 stören könnten, wurde durch Verwendung der *ompT*-defizienten *E. coli*-Stämme UT5600(DE3) und BL21(DE3) ausgeschlossen. Ein weiterer Vorteil der Präsentation an der Zelloberfläche ist der uneingeschränkte Zugang vom Extrazellularraum zur CK2. So muss das zum Aktivitätstest zu verwendende Substrat keine Membran überwinden. Zu einer passiven Membranpassage wären die meisten Substrate der CK2 auch nicht in der Lage. Nach geltender Meinung ist die äußere Membran von *E. coli* nur für Peptide $< 600\text{-}650 \text{ Da}$ permeabel (Alves *et al.*, 1985; Klebba, 2005). Das in den Experimenten eingesetzte Substratpeptid RRRDDDSDDD ist mit einem Molekulargewicht von über 1.200 Da jedoch deutlich größer. Dadurch bleibt auch das CK2-Substrat sowohl von zytoplasmatischen, als auch von periplasmatischen Einflüssen unberührt. Insgesamt können durch Autodisplay viele metabolische Störeinflüsse auf die CK2-Reaktion verhindert werden. Die in dieser Arbeit detektierte Phosphorylierung des Substratpeptids

RRRDDSDDD durch eine Suspension von CK2-präsentierenden *E. coli*-Zellen konnte in Übereinstimmung mit diesen Überlegungen auf die CK2-Aktivität des Autodisplay-Passagiers zurückgeführt werden.

In dieser Arbeit wurde erstmals die Präsentation eines funktionell aktiven heteromeren Enzyms an der Zelloberfläche von *E. coli*. Ferner wurde erstmals das Autodisplay einer Proteinkinase erfolgreich durchgeführt und entsprechende CK2-präsentierende *E. coli*-Zellen konnten darüber hinaus zur Bestimmung der quantitativen Inhibition einer Testsubstanz eingesetzt werden. In Zukunft könnte Autodisplay die Untersuchung und Inhibitionstestung vieler anderer pharmazeutisch interessanter und ansonsten schwer zugänglicher Zielenzyme erleichtern. Neuere Studien unseres Arbeitskreises, wie das Autodisplay von Hyaluronidasen (Kaessler *et al.*, 2010) und deren erfolgreiche Inhibitionstestung, bestätigten das breite Anwendungsspektrum von Autodisplay als Plattformtechnologie in der Wirkstoffentwicklung.

2. Entwicklung neuer Testverfahren für CK2-Inhibitoren

Für Proteinkinasen existieren nur wenige molekulare Testverfahren, die in veröffentlichten Inhibitorstudien Anwendung gefunden haben. In vielen Laboren ist die Methode der Wahl nach wie vor ein radiometrischer Test, der auf der Quantifizierung des Phosphotransfer von γ -[³²P]-ATP auf ein Substrat basiert. In dieser Arbeit konnten zwei alternative Tests für die humane Proteinkinase CK2 entwickelt werden. Mit diesen Verfahren ist es möglich, die Aktivität der CK2 quantitativ zu erfassen und potentielle CK2-Inhibitoren zu bewerten.

2.1. FRET-gestützter CK2-Aktivitätstest

Das Funktionsprinzip der ersten Testmethode ist von einer Veröffentlichung von Rodems *et al.* abgeleitet (Rodems *et al.*, 2002). Diese Arbeitsgruppe entwickelte ein Testverfahren für zwei Tyrosinkinasen (PKA und v-abl). Dabei wurde eine vom Phosphorylierungsstatus abhängige, differentielle proteolytische Sensitivität entsprechender Peptidsubstrate ausgenutzt, um den Umsatz der jeweiligen Kinase zu quantifizieren. Dort wurde Chymotrypsin als Protease und das FRET-Paar Fluorescein / Cumarin als Reporter für eine Detektion der Substratpeptidspaltung eingesetzt. Dieses Prinzip wurde in dieser Arbeit erfolgreich auf eine Bestimmung der Aktivität der Serin-/Threoninkinase CK2 übertragen. Die CK2-katalysierte Phosphorylierung verlangsamte die Spaltung D/E-Peptids verglichen mit der Spaltung des nicht-phosphorylierten D/E-Peptids. Eine völlige Unterdrückung der

Proteolyse konnte durch die Phosphorylierung nicht erreicht werden. Dies wurde auch im Verfahren von Rodems *et al.* (2002) mit PKA- und v-abl-Substratpeptiden und Chymotrypsin festgestellt. Dafür gibt es in dem hier beschriebenen FRET-basierten CK2-Test zwei mögliche Erklärungen: 1) Die Elastase spaltet entgegengesetzt zu den publizierten Daten auch an einer anderen Stelle des Peptids und 2) Die Elastase akzeptiert auch das phosphorylierte Peptid als Substrat. Nach Inkubation mit Elastase war sowohl in Proben des nicht-phosphorylierten sowie des phosphorylierten Substratpeptids der CK2 eine deutliche Steigerung der Fluoreszenzintensität des EDANS zu verzeichnen, die auf eine proteolytische Spaltung des Peptids zurückzuführen ist. Dabei unterschieden sich die Fluoreszenzintensitäten des nicht-phosphorylierten Peptids und des phosphorylierten Peptids (Substrat und Produkt der CK2-Reaktion) signifikant. Mit diesem FRET-basierten Verfahren kann demnach die Phosphotransferaseaktivität der CK2 eindeutig nachgewiesen werden. Die Spezifität dieses Aktivitätstests wurde durch Inhibitionsuntersuchungen mit den CK2-Inhibitoren TBB und Emodin bestätigt. Die Zugabe jeder der beiden Inhibitoren in einer Konzentration von 10 μM führte zu einer messbaren Unterdrückung der CK2-Reaktion auf den Nullwert des Tests. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass neben der Aktivität der CK2 auch deren Hemmung durch niedermolekulare Substanzen detektiert werden kann. Die Differenz zwischen der Fluoreszenzintensität der Negativprobe und der Probe mit maximaler CK2-Aktivität war zwar signifikant, zeigte jedoch eine mäßige Sensitivität und starke Schwankungen der Messwerte. Deshalb war eine verlässliche Quantifizierung der CK2-Aktivität und die Bestimmung von IC_{50} Werten mit diesem Test nicht möglich. Ein Grund für die niedrige Sensitivität war v. a. die schon angesprochene hohe Fluoreszenzintensität nach Inkubation des phosphorylierten Peptids mit Elastase. Diese kleine Differenz zwischen dem minimalen und dem maximalen Fluoreszenzwert des Tests führte zu einem relativ kleinen „Messfenster“. Dieses Problem könnte durch den Austausch des CK2-Substratpeptids in Kombination mit einer passenden, phosphatselektiven Protease vermindert werden. Mit dem in der Literatur beschriebenen Testverfahren von Rodems *et al.* (2002) ließen sich die Aktivitäten, bzw. Inhibitionen der untersuchten Kinasen mit deutlich besserer Sensitivität bestimmen. Dort wurden allerdings Fluorescein und Cumarin als FRET-Paar eingesetzt und als Maß für die Peptidspaltung der Quotient der Einzelfluoreszenzen dieser beiden Fluorophore nach der proteolytischen Spaltung herangezogen (Rodems *et al.*, 2002). Dies macht einen Vergleich mit den in den hier beschriebenen Experimenten bestimmten absoluten Fluoreszenzintensitäten schwierig. Auf Cumarin als FRET-Partner wurde im CK2-Test bewusst verzichtet, da Cumarin-Derivate selbst CK2-Inhibitoren darstellen (Chilin *et al.*, 2008). Neben diesen individuellen Probleme besitzt das Verfahren einen grundsätzlichen Schwachpunkt. Da es sich um einen gekoppelten Enzymtest handelt,

können die Testsubstanzen nicht nur die Aktivität der CK2 modulieren, sondern potentiell auch die der Elastase. Eine Testsubstanz, die beide Enzyme dieses Tests hemmt, würde zu einem falsch-negativen Ergebnis führen. Diese Verbindung würde demnach nicht als Inhibitor identifiziert. Dies ist jedoch wenig wahrscheinlich, da beide Enzyme mechanistisch und strukturell sehr unterschiedlich sind.

Für einen Vortest wäre das FRET-Testverfahren dennoch geeignet. Es bietet die Möglichkeit, pro Messung bis zu 384 Proben parallel auf ihre CK2-Hemmung zu untersuchen. Nach weiteren Anpassungen könnte das Verfahren ggf. noch weiter miniaturisiert und automatisiert werden, um „high-throughput“ Analysen durchzuführen. In nachfolgenden sensitiveren Testverfahren, wie dem kapillarelektrophoretischen CK2-Test können die mit dem FRET-Verfahren identifizierte aktive Verbindungen dann verifiziert und quantifiziert werden.

2.2. Kapillarelektrophoretischer CK2-Aktivitätstest

Die quantitative Bestimmung der CK2-Aktivität war mit dem zweiten etablierten Testverfahren deutlich besser möglich. Dieses Verfahren basiert auf dem direkten Nachweis eines durch die CK2 phosphorylierten Peptids. Als CK2-Substrat diente das Peptid RRRDDDSDDD und dessen EDANS-konjugiertes Derivat. Es konnte nachgewiesen werden, dass das phosphorylierte Peptid, also das Produkt der CK2-Reaktion, im Vergleich zum nicht-phosphorylierten Substrat eine deutlich veränderte Mobilität aufweist. Diese reichte aus, um beide Zustände mit einer kapillarelektrophoretischen Methode zu differenzieren. Entgegen ersten Erwartungen konnte die kapillarelektrophoretische Methode mit absorptionsspektroskopischer Detektion des Substrat-Peptids erfolgreich durchgeführt werden. Trotz der geringen Schichtdicke der Kapillare (50 μm) und des kleinen injizierten Volumens des Reaktionsansatzes (ca. 20 nl) konnten Substrat-Peptid und Produkt-Peptid bei einer Wellenlänge von 214 nm mit gutem Signal/Rauschverhältnis detektiert werden. Dies ermöglichte eine quantitative Bestimmung der Signale. Der Verlauf einer CK2-Reaktion ließ sich sowohl durch Abnahme des Substratsignals, wie auch durch Zunahme des Produktsignals kinetisch verfolgen. Die zu analysierende Probe muss vor der Messung nicht aufbereitet werden, sondern kann direkt in die Kapillare injiziert werden. Mit einem Autosampler und einem temperierbaren Probenraum ließ sich die kinetische Analyse der CK2-Reaktion automatisieren. Die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit v_0 konnte auch über eine Endpunktbestimmung ermittelt werden.

Die Anwendbarkeit für quantitative Inhibitionsstudien wurde nachgewiesen, indem die IC_{50} Werte der zwei bekannten CK2-Inhibitoren TBB und Emodin mit dem kapillarelektrophoretischen Testverfahren bestimmt wurden. Im Allgemeinen ist es

schwierig, IC_{50} Werte direkt miteinander zu vergleichen, da sie stark von Testparametern beeinflusst werden. Deshalb wurden die Reaktionsbedingungen bestmöglich an die des in der Literatur beschriebenen radiometrischen Filterbindungstests für die CK2 angepasst. Die möglichen Schwankungen von IC_{50} Werten spiegeln sich auch in der Literatur wider (Tabelle 19). Für TBB werden in der Literatur Werte von $0,15 \mu\text{M}$ bis $1,6 \mu\text{M}$ angegeben und für Emodin findet man IC_{50} Werte von $0,89 \mu\text{M}$ bis $2 \mu\text{M}$.

Tabelle 19: Vergleich von IC_{50} Werten, die mit dem kapillarelektrophoretischen Test bestimmt wurden, mit publizierten Werten.

	IC_{50} Wert TBB	IC_{50} Wert Emodin
Kapillarelektrophoretischer Test	$0,27 \mu\text{M}$	$1,33 \mu\text{M}$
Radiometrischer Test¹	$0,15 \mu\text{M} / 0,5 \mu\text{M} / 1,6 \mu\text{M}$	$0,89 \mu\text{M} / 1,4 \mu\text{M} / 2 \mu\text{M}$
Referenzen	(Pagano <i>et al.</i> , 2008) / (Sarno <i>et al.</i> , 2005a) / (Sarno <i>et al.</i> , 2001)	(Sarno <i>et al.</i> , 2003) / (Sarno <i>et al.</i> , 2002) / (Yim <i>et al.</i> , 1999)

¹Die radiometrischen IC_{50} Werte wurden der angegebenen Literatur entnommen.

Die in dieser Arbeit für die zwei Inhibitoren ermittelten IC_{50} Werte zeigen beide eine gute Übereinstimmung mit den jeweils publizierten Werten. Allerdings muss beachtet werden, dass das im kapillarelektrophoretischen Test eingesetzte Substratpeptid im Gegensatz zu dem in der Literatur benutzten Peptid mit EDANS konjugiert war. Für das EDANS-konjugierte Substratpeptid wurde eine Michaeliskonstante von $K_M = 70 \mu\text{M}$ bestimmt, die nahezu identisch mit dem publizierten Wert für das unmodifizierte Peptid mit $K_M = 60 \mu\text{M}$ war (Kuenzel *et al.*, 1987). Eine Beeinflussung der IC_{50} Werte durch die EDANS-Modifikation des Substratpeptides kann dennoch nicht ausgeschlossen werden. Nach Optimierung der kapillarelektrophoretischen Methode wurde die Bestimmung des IC_{50} Wertes von Emodin mit dem unmodifizierten CK2-Substratpeptid RRRDDDSDDD durchgeführt. Er lag in diesem Fall mit $0,49 \mu\text{M}$ etwas unter dem zuvor mit dem modifizierten Substratpeptid bestimmten IC_{50} Wert. Neben der EDANS-Modifikation könnte auch eine Anpassung der Auswertemethode zu dieser kleinen Abweichung des IC_{50} Werts geführt haben. So wurde im Falle der letzten Auswertung ein deutlich größerer Konzentrationsbereich mit in die Auswertung einbezogen ($10^{-4} \mu\text{M}$ bis $3,16 \times 10^1 \mu\text{M}$) als in der ersten Bestimmung ($10^{-2} \mu\text{M}$ bis $10^2 \mu\text{M}$). Der IC_{50} Wert eines ATP-kompetitiven Inhibitors hängt u. a. stark von der im Testverfahren eingesetzten ATP-Konzentration ab. Ein verlässlicher Vergleich von quantitativen Inhibitionsdaten über verschiedene Testverfahren und über Laborgrenzen hinaus ist deshalb mit Hilfe des IC_{50} Wertes

nur eingeschränkt möglich. Die im Vergleich zum IC_{50} Wert verlässlichere Angabe für die inhibitorische Potenz einer Verbindung ist seine Inhibitionskonstante K_i . Diese ist jedoch experimentell aufwendig zu bestimmen (Burlingham und Widlanski, 2003). Darüber hinaus wird die Angabe des IC_{50} Wertes oft damit begründet, dass dieser die realen Bedingungen des Experimentes besser widerspiegelt als die eher theoretische Inhibitionskonstante (Sarno *et al.*, 2005b). So werden in der Literatur für die Mehrzahl der CK2-Inhibitoren primär IC_{50} Werte angegeben, z. B. bei Pagano *et al.* (2008). Für die vergleichenden Untersuchungen wurden in dieser Arbeit deshalb IC_{50} Werte bestimmt. Falls dennoch ein Vergleich mit K_i Werten nötig sein sollte, besteht die Möglichkeit, IC_{50} Werte mit Hilfe der Gleichung von Cheng und Prusoff (1973) in K_i Werte umzurechnen. Prinzipiell können mit dem kapillarelektrophoretischen Test aber auch K_i Werte und K_M Werte (s.o.) experimentell bestimmt werden.

Das grundsätzliche Verfahren, Substrat und Produkt einer Reaktion kapillarelektrophoretisch zu trennen und über deren Quantifizierung den enzymatischen Umsatz zu bestimmen, wurde schon häufiger in der Literatur beschrieben (Glatz, 2006). Auch ein Inhibitionstest für die Proteinkinase A konnte mit einer solchen Methode bereits erfolgreich durchgeführt werden (He und Yeung, 2003). Für die CK2 jedoch wurde ein kapillarelektrophoretischer Inhibitionstest in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben. Seit kurzem bietet die Firma „Caliper LS“ ein integriertes Mikrofluidiksystem an („LabChip EZ Reader“), das die Aktivitätsbestimmung vieler Kinasen ermöglicht (Perrin *et al.*, 2010). Das Prinzip ist dem in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren sehr ähnlich. Die Trennung von Kinase-Substrat und phosphoryliertem Produkt erfolgt dabei auf einem Chip mit einer Kombination aus Druckfluss und Elektrophorese. Dieses Testverfahren hat sich für die bereits untersuchten Kinasen als qualitativ gleichwertig zum radiometrischen Messprinzip erwiesen (Card *et al.*, 2009). Aufgrund der deutlich kleineren Trennstrecke auf dem Chip ist die Auflösung aber geringer als in der Kapillarelektrophorese. Ein Nachteil des „EZ Reader“-Prinzips im Vergleich zu dem in dieser Arbeit vorgestellten kapillarelektrophoretischen Testverfahren ist die Notwendigkeit der Fluorophorkonjugation des Kinase-Substrats. Da die Detektion auf dem Chip ausschließlich fluorimetrisch erfolgt, kann kein unmodifiziertes Substrat eingesetzt werden. Außerdem eignet sich das „EZ-Reader“-Verfahren wegen der sehr hohen Kosten nur für groß angelegte Reihenuntersuchungen. Für die Aktivitätsbestimmung der CK2 bietet der Hersteller dieses Mikrofluidiksystems kein passendes Reagenzienset an. Auch in der Fachliteratur wurde bislang keine CK2-Aktivitätsbestimmung mit diesem Verfahren beschrieben. In diesem kommerziellen System könnte vermutlich der Einsatz des EDANS-markierten Substratpeptid eine Testung der CK2-Aktivität ermöglichen.

Der einzige bislang kommerziell erhältliche, nicht-radiometrische CK2-Inhibitorstest ist das „CK2 Kinase Assay/Inhibitor Screening Kit“ (CycLex, Nagano, Japan). Im Vergleich zu dem in dieser Arbeit entwickelten kapillarelektrophoretischen Verfahren hat es jedoch mehrere Nachteile. Zum einen ist es ein homogener Test, d.h. alle Reaktionsbestandteile und alle zur Analyse benötigten Komponenten befinden sich in einem Gefäß und können sich gegenseitig beeinflussen. So können z. B. farbige Verbindungen, die als potentielle Inhibitoren eingesetzt werden, die Detektion durch Eigenabsorption verfälschen. Zum anderen könnten Testsubstanzen die Reaktion der Meerrettichperoxidase beeinflussen, die für die Entwicklung des Detektionssignals verantwortlich ist. Diese Effekte werden zwar durch Waschschrte minimiert, die aber auch gleichzeitig den Aufwand in der Handhabung erhöhen. Ein weiteres Problem dieses Testverfahrens ist die Verwendung einer rekombinant produzierten p53-Domäne (N-Terminus von AS 1-99) als Substrat der CK2-Reaktion. Es ist zwar nachgewiesen, dass p53 von der CK2 phosphoryliert wird, es kann aber auch selbst die CK2-Aktivität hemmen (Schuster *et al.*, 2001). Für die CK2 zeigt p53 außerdem eine deutlich andere Michaeliskonstante ($K_M = 0,9 \mu\text{M}$ (Keller und Lu, 2002)) als das in Aktivitätstests standardmäßig eingesetzte Substratpeptid RRRDDSDDD ($K_M = 60 \mu\text{M}$ (Kuenzel *et al.*, 1987)). Da sich nicht nur die instrumentelle Analytik, sondern auch die Reaktionsbedingungen inklusive Substrat von dem gängigen radiometrischen CK2-Test unterscheiden, wird ein aussagekräftiger Vergleich der mit diesem Verfahren ermittelten IC_{50} Werten nahezu unmöglich. Im Handbuch dieses Testverfahrens ist die Bestimmung mehrerer IC_{50} Werte beispielhaft gezeigt (URL: <https://ruo.mbl.co.jp/gtf/1/1/CY-1170.pdf> [Stand: 26.04.2010]). Für TBB wurde dort ein IC_{50} Wert von $20 \mu\text{M}$ angegeben. Dieser Wert liegt um den Faktor 12,5 höher als der höchste in der wissenschaftlichen Literatur für TBB beschriebene IC_{50} Wert (vgl. Tabelle 19). Im Gegensatz dazu bieten die Ergebnisse des kapillarelektrophoretischen CK2-Inhibitionstests gute Übereinstimmungen mit radiometrisch ermittelten IC_{50} Werten aus der Literatur. Die IC_{50} Werte von TBB und Emodin sind zwar nicht exakt identisch mit den publizierten Werten, geben jedoch deren Größenordnung korrekt wieder und ermöglichen somit einen quantitativen Vergleich neuer und bereits veröffentlichter CK2-Inhibitoren.

Das Hauptziel dieses Teils der Arbeit, nämlich die Entwicklung einer gleichwertigen Alternative zu dem in vielen Laboren eingesetzten radiometrischen CK2-Inhibitionstest, wurde damit erreicht. Verglichen mit dem radiometrischen Filterbindungstest bietet das neu entwickelte Verfahren deutliche Vorteile. Neben dem Verzicht auf radioaktive Isotope gestattet es den direkten parallelen Nachweis von Substrat und Produkt der CK2 ohne die Notwendigkeit der vorherigen Aufarbeitung des Reaktionsansatzes. In dieser Arbeit wurde für eine Kinasereaktion ein Volumen von $200 \mu\text{l}$

eingesetzt, zur eigentlichen Analyse werden allerdings maximal 80 nl benötigt. D. h. das Reaktionsvolumen kann ggf. deutlich reduziert und der Verbrauch von Substratpeptid und rekombinant produzierter CK2 so deutlich minimiert werden. Außerdem werden keine speziellen kostenintensiven Reagenzien benötigt. Wird ein „Multiplex“-Kapillarelektrophorese-Gerät eingesetzt, kann das Verfahren sogar als „medium-throughput“-Methode mit kleinstmöglichem manuellem Aufwand durchgeführt werden. Weiterhin besteht ein methodischer Vorteil gegenüber anderen Testverfahren, wie z. B. dem luminometrischen Nachweis des ATP-Verbrauchs durch den kommerziell erhältlichen „Kinase-Glo Assay“ (Promega, Mannheim). Diese indirekte Methode zeigte in Vorversuchen zu hohe Schwankungen, um für einen CK2-Inhibitionstest eingesetzt zu werden (nicht gezeigt). Darüber hinaus können lediglich ATP-Konzentrationen von maximal 100 μM verlässlich quantifiziert werden. Auch radiometrische CK2-Testverfahren werden bei diesen relativ niedrigen ATP-Konzentrationen durchgeführt. Die physiologische ATP-Konzentration liegt hingegen bei ca. 1-10 mM und somit 10-100-fach höher als in diesen Testverfahren (Cohen, 1999; Battistutta, 2009). Der hier beschriebene kapillarelektrophoretische Test ist äußerst flexibel und ermöglicht auch den Einsatz größerer ATP-Konzentrationen.

Die kombinierte Anwendung des CK2-Autodisplays im kapillarelektrophoretischen Testverfahren wurde in ersten Versuchen dieser Arbeit überprüft. Dabei ist es nicht gelungen, die aufgereinigte CK2 durch das bakterielle CK2-Ganzzellsystem im kapillarelektrophoretischen Testverfahren zu ersetzen. Das Hauptproblem stellt dabei die Sekretion bakterieller Stoffwechselprodukte dar. Diese können nicht, wie die CK2-tragenden *E. coli* Zellen selbst, durch Zentrifugation aus dem CK2-Reaktionsansatz entfernt werden. Durch die relativ unspezifische absorptionspektroskopische Detektion bei 214 nm in der Kapillarelektrophorese werden viele dieser Stoffwechselprodukte mit erfasst. Darüber hinaus können diese mit den Standardparametern der elektrophoretischen Trennung nicht vollständig vom CK2-Substrat- bzw. Produktpeptid getrennt werden. Eine Verbesserung der Trennung durch den Einsatz einer längeren Kapillare mit größerem Innendurchmesser könnte in zukünftigen Experimenten eine vollständige Trennung des Substrat-, bzw. Produktpeptid von sekretierten bakteriellen Stoffwechselprodukten ermöglichen. Sollte dies nicht gelingen, könnte die Anschaffung eines Fluoreszenzdetektors in Kombination mit dem Einsatz eines fluoreszierenden CK2-Substratpeptids (z. B. RRRDDDSDDD-[EDANS]) eine spezifische Detektion von Substrat- und Produktpeptid ermöglichen. Erst durch isolierte Signale von Substrat- oder Produktpeptid in der kapillarelektrophoretischen Analyse könnte so eine quantitative Auswertung der CK2-Aktivität und ein Ersatz der aufgereinigten CK2 durch CK2-präsentierende Zellen im Inhibitionstest ermöglicht werden.

3. Identifizierung einer neuen Leitstruktur zur Hemmung der CK2

Mit dem kapillarelektrophoretischen Testverfahren konnte eine Reihe von Verbindungen untersucht werden, die am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität synthetisiert worden waren und die in einer zentralen Substanzbibliothek zur Verfügung standen. Von den 41 getesteten Verbindungen zeigten vier eine CK2-Hemmung > 50 %. Während HB221, HB198 und HB191 die CK2-Aktivität um jeweils 60 % hemmten, konnte für das Benzofuranderivat Ric152 eine Hemmung von 93 % festgestellt werden. Dessen inhibitorische Potenz spiegelte sich in einem IC_{50} Wert von 0,2 μ M wider und liegt damit auf dem Niveau von TBB (vgl. Tabelle 19). Im Rahmen der Dissertation von R. Bollig (2007) wurde die biologische Wirkung von Ric152 auf die murine Lymphomzelllinie L5178Y untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen 72 Stunden mit 27 μ M Ric152 inkubiert. Unter diesen Bedingungen führte Ric152 zu einem fast vollständigen Absterben der L5178Y-Zellen. Ein kausaler Zusammenhang mit der in dieser Arbeit nachgewiesenen potenten Hemmung der isolierten CK2 ist vorstellbar, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen. Von Ric152 standen einige Strukturmodifikationen zur Verfügung, deren Wirkung auf die CK2-Aktivität ebenfalls bestimmt wurde. Dabei konnte die Verbindung TF als potentestes Benzofuranderivat identifiziert werden. Mit einem IC_{50} Wert von 0,03 μ M wies es einen um nahezu eine Zehnerpotenz geringeren IC_{50} Wert auf als Ric152. Bei dieser erstmaligen Durchmusterung der hausinternen Substanzbibliothek nach CK2-Inhibitoren konnte somit eine Verbindung identifiziert werden, die potenter ist als Emodin und TBB. Der IC_{50} Wert von TF liegt auf dem Niveau der potentesten bislang publizierten CK2-Inhibitoren.

Ein Inhibitionstest am isolierten Enzym kann nicht alle relevanten Parameter für die Wirksamkeit eines potentiellen Arzneistoffs in der Zelle erfassen. Deshalb wurde auch die Wirkung von TF auf eine humane Krebszelllinie untersucht. Wie in der Einleitung ausgeführt, führt eine Hyperaktivität der CK2 in Krebszellen u. a. zu einer übermäßigen Proliferation und zu einer Unterdrückung der Apoptose. Ein in Zellen wirksamer CK2-Inhibitor müsste durch eine Hemmung endogener CK2 diesen beiden Merkmalen entgegenwirken. Dies wurde für TF mit der humanen Zelllinie LNCaP untersucht, die als Modellsystem für Prostatakarzinome gilt (Horoszewicz *et al.*, 1980). Mit einem MTT-Test (Mosmann, 1983) konnte gezeigt werden, dass TF die Lebensfähigkeit von LNCaP-Zellen bereits in der niedrigsten untersuchten Konzentration von 25 μ M um nahezu die Hälfte herabsetzt. TF war damit wirksamer als das äquimolar eingesetzte TBB. Erst durch Applikation der dreifachen Konzentration an TBB konnte der durch TF erzielte Effekt erreicht werden. In dieser Zelllinie hatte TF zudem eine mit TBB vergleichbar starke pro-apoptotische Wirkung. Sowohl TF, als

auch TBB reduzierten darüber hinaus die endogene CK2-Aktivität schon in der kleinsten untersuchten Konzentration von 25 μM um die Hälfte. Dies bestätigte die inhibitorische Wirkung von TF auf die CK2-Aktivität in dieser Krebszelllinie. Der kausale Zusammenhang zwischen Hemmung der CK2-Aktivität und Einleitung der Apoptose ist u. a. für LNCaP-Zellen in publizierten Experimenten bereits beschrieben und diskutiert (Ruzzene *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2010). Somit darf auch in dieser Arbeit davon ausgegangen werden, dass die Hemmung der CK2-Aktivität durch TF ein wahrscheinlicher Auslöser für die beobachtete Apoptose in LNCaP-Zellen war. Die Induktion der Apoptose war sicher ein Faktor, der die starke Reduktion der Viabilität verursachte. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass auch Wirkungen von TF auf andere zelluläre Signalwege eine Rolle bei der Reduktion der Viabilität spielen. Dies ist auch deshalb vorstellbar, weil TF zwar eine ähnliche starke Wirkung auf CK2-Aktivität und Induktion der Apoptose zeigte wie TBB, TF die Viabilität der LNCaP-Zellen aber deutlich stärker reduzierte. Wie in vielen vergleichbaren Untersuchungen wurde für eine effektive Wirkung des Inhibitors auf die CK2-Aktivität eine deutlich höhere Konzentration benötigt, als es der im zellfreien System ermittelte IC_{50} Wert vermuten ließe (Copeland, 2005; Sarno *et al.*, 2005b). Dies kann mehrere Gründe haben, u. a. die hohe zelluläre ATP-Konzentration, mit der ein ATP-kompetitiver Inhibitor konkurriert. Außerdem könnte es in diesen Zellen zu einem aktiven Export (Efflux) des Inhibitors kommen, welcher die intrazelluläre Konzentration von TF reduzieren würde (van Brussel *et al.*, 1999).

Um mögliche andere Zielmoleküle von TF zu identifizieren, wurde seine Hemmwirkung auf eine Auswahl anderer humaner Proteinkinasen untersucht. Für quantitative Vergleiche müssten strenggenommen die einzelnen Inhibitionskonstanten K_i des Inhibitors zu der zu vergleichenden Proteinkinase herangezogen werden, da jede Kinase unterschiedliche Michaeliskonstanten K_M in Bezug auf ATP und auf das jeweils eingesetzte Substrat besitzt. Diese aufwendige und kostenintensive Prozedur wird für erste Untersuchungen jedoch in der Regel durch eine deutlich günstigere standardisierte Reihenuntersuchung ersetzt. Dabei werden die relativen Inhibitionen verschiedener Proteinkinasen bei konstanter ATP- und Inhibitorkonzentration bestimmt. Diese Werte können zwar nicht direkt miteinander verglichen werden, ermöglichen aber eine grobe Einschätzung der Selektivität. In einer solchen Untersuchung wurde die Hemmwirkung von 10 μM TF auf 63 isolierte humane Proteinkinasen untersucht. Es wurden zwölf Proteinkinasen gefunden, die eine Hemmung > 50 % zeigten, darunter wurden sieben mindestens ebenso stark gehemmt wie CK2 α oder CK2 α' . Es ist generell schwierig, monoselektive Inhibitoren für Proteinkinasen zu finden. Selbst Imatinib, der Prototyp eines erfolgreichen, zugelassenen Inhibitors, hemmt neben seinem eigentlichen Zielenzym, der Proteinkinase BCR-ABL, auch

andere Proteinkinasen wie LCK, c-KIT und PDGF-R (Buchdunger *et al.*, 2000). Mono-selektivität ist für einen Inhibitor also nicht die oberste Prämisse der Wirkstofffindung. In der einschlägigen Fachliteratur wird noch darüber diskutiert, inwieweit sich ein multiselektiver Proteinkinase-Inhibitor als Arzneistoff eignet. Auf der einen Seite könnten sich synergistische Effekte durch die gleichzeitige Hemmung mehrerer krebsrelevanter Proteinkinasen, z. B. PIM und CK2, ergeben (López-Ramos *et al.*, 2010). Auf der anderen Seite steigert die Suche nach Verbindungen, die gezielt und potent mehrere Proteinkinasen hemmen, die Anforderungen an die Wirkstoffentwicklung enorm (Smyth und Collins, 2009; Knight *et al.*, 2010). Außerdem steigt das Risiko, durch die Applikation eines multiselektiven Inhibitors unerwünschte Wirkungen zu erzielen. Beispielsweise hemmte TF neben der CK2 auch die Proteinkinasen Aurora A, VEGFR2, VEGFR3, die einen Einfluss auf das Fortschreiten des Zellzyklus und der Zellproliferation ausüben. Dies könnte die wachstumshemmende Wirkung von TF in Krebszellen unterstützen, aber auch stärkere Nebenwirkungen in gesunden Zellen hervorrufen. In den mit TF behandelten LNCaP-Zellen könnte die kombinierte Hemmung der genannten Proteinkinasen und der CK2 zu der verglichen mit TBB überproportionalen Reduktion der Viabilität geführt haben.

Bei den Ergebnissen der Selektivitätsuntersuchung fiel auf, dass TF die CK2 α nur zu 76 % inhibiert. Im kapillarelektrophoretischen Test konnte zuvor festgestellt werden, dass TF in derselben Konzentration die Aktivität des CK2 Holoenzym fast vollständig hemmte (> 96 % Inhibition). Ein direkter Vergleich mit der TF-vermittelten Inhibition des CK2 Holoenzym war nicht möglich, da es für diesen Selektivitätstest nicht zur Verfügung stand. Diese Diskrepanz könnte auf andere Reaktionsbedingungen, wie ATP-Konzentration oder das jeweils eingesetzte Puffersystem, zurückzuführen sein. Es wurde beispielsweise beschrieben, dass die Salzkonzentration im Reaktionsansatz einen großen Einfluss auf die CK2-Aktivität hat (Grankowski *et al.*, 1991). Die Wirkung von TF könnte aber auch von der Quartärstruktur der CK2 (isolierte α -Untereinheit gegenüber Holoenzym) abhängig sein. Es wird diskutiert, dass verschiedene Assoziationsformen der CK2 unterschiedliche Effekte auf zellulärer Ebene haben könnten (Filhol und Cochet, 2009; Niefind *et al.*, 2009). Wenn sich die unterschiedliche Potenz von TF auf CK2 α und auf das CK2 Holoenzym unter identischen Reaktionsbedingungen bestätigen ließe, könnten mit TF gezielt entsprechende zelluläre CK2-Subpopulationen adressiert werden. Zusammengefasst lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass TF ein potenter und zellpermeabler CK2-Inhibitor ist. Weiterhin zeigten sie, dass TF in Prostatakarzinomzellen die Apoptose einleiten kann und zu einer deutlich verminderten Proliferation führt. Analog zu TBB oder DMAT, die neben der CK2 auch wenige

andere Proteinkinasen hemmen (Pagano *et al.*, 2008; Cozza *et al.*, 2010), kann auch TF vorerst als selektiver Inhibitor der CK2 bezeichnet werden. Das in dieser Arbeit entwickelte kapillarelektrophoretische CK2 Testverfahren hat sich zur Bewertung des inhibitorischen Potentials einzelner Verbindungen bewährt. Es ermöglichte die Identifizierung des neuartigen, hochpotenten und selektiven CK2 Inhibitors TF. Zur Zeit wird TF genauer charakterisiert, um seine Wirkung besser zu verstehen. Außerdem werden TF-Derivate synthetisiert, die zeigen werden, ob eine weitere Steigerung der Potenz oder der Selektivität möglich ist.

4. Identifizierung peptidischer Liganden der CK2

Der Großteil der potenten niedermolekularen CK2-Inhibitoren bindet in der ATP-Bindetasche des Enzyms, die unter den humanen Proteinkinasen stark konserviert ist. Die Identifizierung von affinen Molekülen, die andere Bindedomänen der CK2 adressieren, gewinnt in letzter Zeit zunehmend an Bedeutung (Laudet *et al.*, 2008; Prudent und Cochet, 2009). Solch ein Molekül könnte als Ausgangsstruktur für die Entwicklung neuartiger CK2-Inhibitoren dienen und so die chemische Diversität der bereits vorhandenen Inhibitoren erweitern. Um Moleküle mit alternativem Bindungsmodus zu finden, kann neben der Hemmung der Enzymaktivität auch die Affinität eines potentiellen Inhibitors zum Zielenzym untersucht werden. Für kompetitive Inhibitoren gilt dabei: Je stärker die Affinität, desto stärker ist auch die Inhibition bzw. je weniger Inhibitor wird benötigt, um eine Hemmung zu erreichen.

In vorherigen Arbeiten wurde Autodisplay erfolgreich eingesetzt, um Affinitäten zwischen Biomolekülen zu detektieren. In diesen Experimenten gelang es, ein Zielenzym an einen peptidischen Inhibitor zu binden, der auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen präsentiert wurde (Jose und Zangen, 2005). Dieses Konzept wurde erweitert, um mittels evolutiver Methoden hergestellte Varianten dieses peptidischen Inhibitors auf Affinität zum Zielenzym Cathepsin G zu untersuchen. Dazu wurde Cathepsin G fluoreszenzmarkiert, sodass *E. coli* Zellen, welche ein zu diesem Enzym affines Peptid präsentierten, eine hohe Fluoreszenzintensität zeigten. Die Selektion und Vereinzelung der fluoreszierenden Zellen erfolgte dabei mittels Durchflusszytometrie. Die Peptidsequenz der affinen Peptide war durch DNA-Sequenzanalyse der aussortierten Zellen problemlos zugänglich. So wurde eine neue peptidische Leitstruktur für Cathepsin G identifiziert (Jose *et al.*, 2005).

Analog zu dieser Vorgehensweise sollten in der vorliegenden Arbeit Peptide identifiziert werden, die eine Affinität zu CK2 aufweisen. Eine anschließende Inhibitionsuntersuchung sollte zeigen, ob diese Peptide die CK2-Aktivität hemmen. Im Vergleich zu Cathepsin G ließ die Kristallstruktur von CK2 eine tiefere Substrat-

bindetasche erkennen. Aus diesem Grund wurde ein anderes Autodisplay-Plasmid eingesetzt als in der Studie mit Cathepsin G. Anstelle des ursprünglich von Plasmid pJM942 codierten Autotransporter-Fusionsproteins mit einer Linkerlänge von 48 AS basierte das hier eingesetzte Autotransporter-Fusionsprotein mit einem 163 AS langen Linker ursprünglich auf dem Plasmid pJM7 (Maurer *et al.*, 1999). Dadurch sollte die Passagierdomäne weiter in den Extrazellularraum exponiert werden, um so Wechselwirkungen in tieferen Kavitäten der CK2 zu ermöglichen. Außerdem bestand ein weitaus gravierender Unterschied zu ähnlichen Studien. Als vielversprechender Ausgangspunkt für derartige Untersuchungen wurden bislang, wie im Falle von Cathepsin G, peptidische Inhibitoren eingesetzt. Für die CK2 war kein potenter peptidischer Inhibitor bekannt. Meggio *et al.* (1984) berichteten zwar von Polyglutamat als relativ unspezifische CK2-Inhibitoren, diese schienen aber als Ausgangspunkt für Peptidinhibitoren ungeeignet. Auch auf die Verwendung des Peptids CIGB-300 musste verzichtet werden, da die publizierten Daten seine CK2-Inhibition nicht zweifelsfrei belegten (Perea *et al.*, 2008). Um Affinitätsuntersuchungen überhaupt zu ermöglichen, musste statt eines peptidischen CK2-Inhibitors ein Substrat der CK2 als Startpunkt eingesetzt werden. Dieses sollten als Autodisplay-Passagier auf der Oberfläche von *E. coli* präsentiert werden. Nach Inkubation mit Fluoresceinkonjugiertem CK2 Holoenzym (CK2_F) sollte sich eine mögliche Affinität zwischen Substrat und CK2_F in einer Fluoreszenz der Bakterienzellen widerspiegeln. Eine Identifizierung von Bindedomänen des Substrates könnten zu einem affinen Peptid führen, das möglicherweise die Aktivität der CK2 moduliert.

Durch die Fluoreszenzmarkierung der α_{S1} -Casein-tragenden Zellen mit CK2_F konnte eine Affinität zwischen dem α_{S1} -Casein-Passagier und der CK2 nachgewiesen werden. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass ein solcher Affinitätsnachweis zwischen einem Enzym und seinem per Autodisplay präsentierten Substrat überhaupt möglich ist. Weiterhin konnten mit diesem Experiment ein Markierungsprotokoll sowie geeignete Parameter zur durchflusszytometrischen Analyse CK2_F-markierter Zellen etabliert werden. Eine Domäne von α_{S1} -Casein, die für eine Bindung an die CK2 verantwortlich ist, konnte auf diese Weise ebenfalls identifiziert werden. Die erste verkürzte Sequenz (KP3) bestand aus den C-terminalen 66 AS, die zweite Sequenz (KP7) aus den C-terminalen 16 AS des α_{S1} -Caseins. *E. coli* Zellen ließen sich über beide Passagiere mit CK2_F markieren. KP7 hat die Aminosäuresequenz PTAHENYEKNNVMLQW und wurde als kürzeste zu CK2 affine AS-Sequenz identifiziert. Diese für ein CK2-Substrat untypische Sequenz und die Abwesenheit des für CK2 typischen Phosphatakzeptors Serin spricht für eine Bindung von KP7 außerhalb der acidophilen Substratbindestelle. Möglicherweise besteht eine Affinität zu Domänen des Holoenzym, die für nicht-katalytische Interaktionen der CK2

diskutiert werden (Bibby und Litchfield, 2005). Diese Vermutung wird durch publizierte Plasmonresonanzuntersuchungen mit CK2 und Casein unterstützt (Benítez *et al.*, 2001). Hierbei wurden Interaktionen von nicht näher spezifiziertem „Casein“ mit dem CK2-Holoenzym, aber auch mit den einzelnen Untereinheiten (CK2 α und CK2 β) gefunden. Die physiologischen Hauptphosphorylierungsstellen von α_{S1} -Casein befinden sich im N-terminalen Bereich des Proteins (Sørensen *et al.*, 2003; Kjeldsen *et al.*, 2007; Poth *et al.*, 2008). Hier wird auch ein Phosphatakzeptor (Ser-89) für eine CK2-vermittelte Phosphorylierung vermutet (Merck, Darmstadt, Datenblatt α -Casein #218683). Es ist anzunehmen, dass mehrere Domänen des α_{S1} -Caseins Affinität zu verschiedenen Domänen der CK2 zeigen. So könnte der N-terminale Teil des α_{S1} -Caseins direkten Kontakt mit dem aktiven Zentrum der CK2 haben und der untersuchte C-terminale Teil, v. a. die mit KP7 übereinstimmende Sequenz, eine Affinität zu einer Domäne der CK2, die außerhalb der Substratbindestelle liegt.

Synthetisches KP7 wurde im kapillarelektrophoretischen Verfahren auf mögliche CK2-Inhibition untersucht, bewirkte jedoch auch in einer Konzentration von 100 μ M keine Modulation der CK2-Aktivität. Offensichtlich bindet KP7 an eine Stelle der CK2, die keinen direkten Einfluss auf das aktive Zentrum und die Aktivität der CK2 hat. Für einen kompetitiven Inhibitor hängt seine Hemmwirkung mit der Affinität zusammen. Der umgekehrte Fall kann aber anhand dieses Experiments für die CK2 ausgeschlossen werden: Nicht jedes Molekül, das mittels Affinitätsuntersuchung identifiziert wird muss einen direkten Einfluss auf das Zielenzym haben.

Da KP7 keine inhibitorische Aktivität zeigte, wurde ein anderes Vorgehen gewählt, um mittels Autodisplay peptidische CK2-Inhibitoren zu identifizieren. Als Ausgangspunkt für weitere Affinitätsuntersuchungen wurde das kurze Substratpeptid DDDSDDD gewählt. Im Gegensatz zum α_{S1} -Casein ist wegen seiner geringen Größe lediglich eine Interaktion mit der Substratbindestelle der CK2 zu erwarten. Das Substratpeptid wurde so modifiziert, dass es nicht mehr durch die CK2 umgesetzt wird, aber seine grundsätzliche Affinität zur CK2 möglichst beibehält. Zu diesem Zweck wurde der Phosphatakzeptor Serin gegen Alanin ausgetauscht, sodass aus dem Substrat DDDSDDD das Pseudosubstrat DDDADDD entstand. Beide Peptidsequenzen wurden als Autodisplay-Passagiere untersucht. Eine Markierung entsprechender *E. coli*-Zellen mit CK2_F war jedoch weder über das Pseudosubstrat DDDADDD, noch über das Substrat DDDSDDD möglich. Bis auf die untersuchte Passagierdomäne stimmten die eingesetzten Autotransporter-Fusionsproteine mit den Konstrukten überein, die für die Oberflächenpräsentation von α_{S1} -Casein bzw. der Casein-Verkürzungen eingesetzt wurden. Die Länge des Peptids KP7 stimmte darüber hinaus mit der Länge des Passagiers überein, der für die Peptide DDDADDD und DDDSDDD konstruiert wurde. Auch das Markierungsprotokoll war in den Experimenten

identisch. Der erfolglose CK2_F-Markierungsversuch von Zellen, die das Substrat, bzw. das Pseudosubstrat präsentieren, muss also auf die Passagierdomäne zurückgeführt werden. Die Affinität der beiden Peptide war offensichtlich zu gering, um eine Bindung unter den Versuchsbedingungen nachweisen zu können. Als Maß für die Affinität des Substratpeptids DDDSDDD kann näherungsweise die Michaeliskonstante des Peptids RRRDDDSDDD von ca. 60 μM herangezogen werden. Ein Vergleich zu entsprechenden Daten des α_{S1} -Caseins ist aufgrund fehlender Literaturdaten ohne weitere Experimente nicht möglich und wegen des offensichtlich anderen Bindungsmodus nur begrenzt sinnvoll. Durch die artifizielle Sequenzumgebung innerhalb des Autotransporter-Fusionsproteins könnte sich zudem für das (Pseudo)Substratpeptid eine Sekundärstruktur ergeben, die inkompatibel mit einer affinen Bindung der CK2 ist. In der Literatur wird eine „ β -turn“-artige Struktur als Voraussetzung für die effektive Bindung mancher Substratpeptide diskutiert (Pinna, 1990). Diese störenden Einflüsse könnten den K_{M} Wert noch weiter vergrößern. Zum Vergleich: Der peptidische Cathepsin G-Inhibitor P15, der per Autodisplay präsentiert und erfolgreich mit Cathepsin G markiert wurde (Zangen, 2002; Betscheider, 2008), besaß eine Dissoziationskonstante von 0,25 μM (Yavin und Fridkin, 1998).

Obwohl keine peptidische Leitstruktur identifiziert wurde, konnten in dieser Arbeit wertvolle Erkenntnisse für weitere Affinitätsuntersuchungen von potentiellen CK2-Inhibitoren mittels Autodisplay gesammelt werden. So wurde gezeigt, dass es grundsätzlich möglich ist, die Affinität der CK2 zu einem auf *E. coli* präsentierten Autodisplay-Passagier nach Fluoreszenzkonjugation der CK2 durchflusszytometrisch zu bestimmen. Mit α_{S1} -Casein, bzw. der Teilsequenz KP7 steht nun erstmals eine essentiell benötigte Positivkontrolle für entsprechende Experimente zur Verfügung. Auf den gesammelten Erkenntnissen aufbauend wird eine neue Strategie zur Generierung peptidischer Inhibitoren vorgeschlagen: Statt eines fixen Startpunktes könnte eine eingeschränkt zufällige Peptidbibliothek nach CK2-affinen Varianten durchsucht werden. Diese sollte auf der bekannten Konsensussequenz für CK2-Substratpeptide basieren. Dafür böte sich das Autodisplay mit dem etablierten Markierungs- und Analyseverfahren an. *E. coli*-Zellen, die affine CK2-bindende Peptide tragen, könnten während der durchflusszytometrischen Analyse aussortiert werden. Die Peptidsequenz der aussortierten Variante wäre dann über DNA-Sequenzanalyse des Autotransporter-Fusionsgens einfach zugänglich. Eine erfolgreiche Strategie zur Generierung einer solchen eingeschränkten Zufallsbibliothek konnte demonstriert werden.

5. Ausblick

Diese Arbeit legt den Grundstein für eine Entwicklung potenter und selektiver CK2-Inhibitoren. Es konnten Lösungen für alle wesentlichen Engpässe der frühen Wirkstoffentwicklung aufgezeigt werden. Durch Autodisplay peptidischer Liganden in Kombination mit einer schnellen durchflusszytometrischen Durchmusterung werden CK2-affine Peptide identifiziert, die im nächsten Schritt auf Inhibition der CK2 untersucht werden können. Eine verlässliche quantitative Bewertung potentieller Inhibitoren wird durch das kapillarelektrophoretische Verfahren ermöglicht. Beim Einsatz dieses Inhibitionstests wurde der neue CK2-Inhibitor TF identifiziert, der in der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP zur Hemmung der endogenen CK2 und zur Induktion von Apoptose führte. Der dritte Engpass, die Verfügbarkeit des Zielenzym, wurde durch Autodisplay des humanen CK2 Holoenzym in *E. coli* gelöst. Durch eine Präsentation an der bakteriellen Oberfläche ist die CK2 einfach zugänglich und steht schnell und in nahezu unbegrenztem Ausmaß für Inhibitionstests zur Verfügung. Eine Kombination dieser drei Ansätze wird zukünftig eine effektive Entwicklung selektiver, substratkompetitiver Inhibitoren der CK2 ermöglichen.

V Literaturverzeichnis

- Ahmad, K.A., Wang, G., Unger, G., Slaton, J. und Ahmed, K. (2008) Protein kinase CK2-a key suppressor of apoptosis. *Adv Enzyme Regul* 48:179-87.
- Ahmed, K., Issinger, O.-G., R. Marshak, D. und Pyerin, W. (1994) Editorial. *Cell Mol Biol Res* 40:371-2.
- Allende, J.E. und Allende, C.C. (1995) Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J* 9:313-23.
- Allende-Vega, N., Dias, S., Milne, D. und Meek, D. (2005) Phosphorylation of the acidic domain of Mdm2 by protein kinase CK2. *Mol Cell Biochem* 274:85-90.
- Alves, R.A., Gleaves, J.T. und Payne, J.W. (1985) The role of outer membrane proteins in peptide uptake by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 27:333-8.
- Augustine, S.A.J., Kleshchenko, Y.Y., Nde, P.N., Pratap, S., Ager, E.A., Burns, J.M., Lima, M.F. und Villalta, F. (2006) Molecular cloning of a *Trypanosoma cruzi* cell surface casein kinase II substrate, Tc-1, involved in cellular infection. *Infect Immun* 74:3922-9.
- Barz, T., Ackermann, K., Dubois, G., Eils, R. und Pyerin, W. (2003) Genome-wide expression screens indicate a global role for protein kinase CK2 in chromatin remodeling. *J Cell Sci* 116:1563-77.
- Battistutta, R. (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: Structural bases of protein kinase CK2 inhibition. *Cell Mol Life Sci* 66:1868-89.
- Battistutta, R., Sarno, S., De Moliner, E., Papinutto, E., Zanotti, G. und Pinna, L.A. (2000) The replacement of ATP by the competitive inhibitor emodin induces conformational modifications in the catalytic site of protein kinase CK2. *J Biol Chem* 275:29618-22.
- Benítez, M.J., Cochet, C. und Jiménez, J.S. (2001) A surface plasmon resonance study of the interactions between the component subunits of protein kinase CK2 and two protein substrates, casein and calmodulin. *Mol Cell Biochem* 227:31-6.
- Benz, I. und Schmidt, M.A. (1989) Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 57:1506-11.
- Bethesda Research Labs (1986) BRL pUC host: *E. coli* DH5 α competent cells. *Focus* 8:9.
- Betscheider, D. (2008) Autodisplay von Peptidbibliotheken und Screening nach neuen Cathepsin G Inhibitoren mittels Durchflusszytometrie. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Beythien, J. und White, P.D. (2005) A solid phase linker strategy for the direct synthesis of EDANS-labelled peptide substrates. *Tetrahedron Lett* 46:101-4.

- Bibby, A.C. und Litchfield, D.W. (2005) The multiple personalities of the regulatory subunit of protein kinase CK2: CK2 dependent and CK2 independent roles reveal a secret identity for CK2beta. *Int J Biol Sci* 1:67-79.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-23.
- Blanquet, P.R. (2000) Casein kinase 2 as a potentially important enzyme in the nervous system. *Prog Neurobiol* 60:211-46.
- Blasshofer, F. (2008) Autodisplay funktioneller Antikörperfragmente in *Escherichia coli*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Blume-Jensen, P. und Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411:355-65.
- Bollig, R. (2007) Neue cytostatisch wirksame Reaktionsprodukte der erweiterten Nenitzescu-Reaktion. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Bortolato, A., Cozza, G. und Moro, S. (2008) Protein kinase CK2 inhibitors: emerging anticancer therapeutic agents? *Anti-Cancer Agents Med Chem* 8:798-806.
- Bretner, M., Najda-Bernatowicz, A., Łebska, M., Muszyńska, G., Kilanowicz, A. und Sapota, A. (2008) New inhibitors of protein kinase CK2, analogues of benzimidazole and benzotriazole. *Mol Cell Biochem* 316:87-9.
- Brown, C.J., Lain, S., Verma, C.S., Fersht, A.R. und Lane, D.P. (2009) Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat Rev Cancer* 9:862-73.
- Buchdunger, E., Cioffi, C.L., Law, N., Stover, D., Ohno-Jones, S., Druker, B.J. und Lydon, N.B. (2000) Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 295:139-45.
- Buchou, T., Vernet, M., Blond, O., Jensen, H.H., Pointu, H., Olsen, B.B., Cochet, C., Issinger, O.-G. und Boldyreff, B. (2003) Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 23:908-15.
- Burlingham, B.T. und Widlanski, T.S. (2003) An intuitive look at the relationship of K_i and IC_{50} : A more general use for the dixon plot. *J Chem Educ* 80:214-8.
- Burnett, G. und Kennedy, E.P. (1954) The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem* 211:969-80.
- Caples, M.J., Clements, J.E. und Barber, S.A. (2006) Protein kinase CK2 phosphorylates the Nef protein from a neurovirulent simian immunodeficiency virus. *Virology* 348:156-64.

- Card, A., Caldwell, C., Min, H., Lokchander, B., Xi, H., Sciabola, S., Kamath, A.V., Clugston, S.L., Tschantz, W.R., Wang, L. und Moshinsky, D.J. (2009) High-throughput biochemical kinase selectivity assays: panel development and screening applications. *J Biomol Screen* 14:31-42.
- Carpenter, G., King, L. und Cohen, S. (1979) Rapid enhancement of protein phosphorylation in A-431 cell membrane preparations by epidermal growth factor. *J Biol Chem* 254:4884-91.
- Chalhoub, N. und Baker, S.J. (2009) PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol* 4:127-50.
- Chang, C.D. und Meienhofer, J. (1978) Solid-phase peptide synthesis using mild base cleavage of N alpha-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids, exemplified by a synthesis of dihydrosomatostatin. *Int J Pept Protein Res* 11:246-9.
- Cheek, S., Ginalski, K., Zhang, H. und Grishin, N.V. (2005) A comprehensive update of the sequence and structure classification of kinases. *BMC Struct Biol* 5:6.
- Cheek, S., Zhang, H. und Grishin, N.V. (2002) Sequence and structure classification of kinases. *J Mol Biol* 320:855-81.
- Chen, J., Gao, C., Shi, Q., Wang, G., Lei, Y.-J., Shan, B., Zhang, B., Dong, C., Shi, S., Wang, X., Tian, C., Han, J. und Dong, X.-P. (2008) Casein kinase II interacts with prion protein in vitro and forms complex with native prion protein in vivo. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40:1039-47.
- Cheng, Y.-C. und Prusoff, W.H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22:3099-108.
- Chien, W.M., Parker, J.N., Schmidt-Grimminger, D.C., Broker, T.R. und Chow, L.T. (2000) Casein kinase II phosphorylation of the human papillomavirus-18 E7 protein is critical for promoting S-phase entry. *Cell Growth Differ* 11:425-35.
- Chilin, A., Battistutta, R., Bortolato, A., Cozza, G., Zanatta, S., Poletto, G., Mazzorana, M., Zagotto, G., Uriarte, E., Guiotto, A., Pinna, L.A., Meggio, F. und Moro, S. (2008) Coumarin as attractive casein kinase 2 (CK2) inhibitor scaffold: an integrate approach to elucidate the putative binding motif and explain structure-activity relationships. *J Med Chem* 51:752-9.
- Chua, P., Pierre, F. und Whitten, J.P. (2008) Serine-threonine protein kinase and PARP modulators. International Patent Nummer: WO 2008/028168
- Cohen, P. (1999) The development and therapeutic potential of protein kinase inhibitors. *Curr Opin Chem Biol* 3:459-65.
- Cohen, P. (2002a) The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol* 4:E127-30.
- Cohen, P. (2002b) Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* 1:309-15.

- Cole, S.T., Bremer, E., Hindennach, I. und Henning, U. (1982) Characterisation of the promoters for the *ompA* gene which encodes a major outer membrane protein of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 188:472-9.
- Copeland, R.A. (2005) Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA).
- Cozza, G., Bonvini, P., Zorzi, E., Poletto, G., Pagano, M.A., Sarno, S., Donella-Deana, A., Zagotto, G., Rosolen, A., Pinna, L.A., Meggio, F. und Moro, S. (2006) Identification of ellagic acid as potent inhibitor of protein kinase CK2: a successful example of a virtual screening application. *J Med Chem* 49:2363-6.
- Cozza, G., Bortolato, A. und Moro, S. (2010) How druggable is protein kinase CK2? *Med Res Rev* 30:419-62.
- Cozza, G., Mazzorana, M., Papinutto, E., Bain, J., Elliott, M., di Maira, G., Gianoncelli, A., Pagano, M.A., Sarno, S., Ruzzene, M., Battistutta, R., Meggio, F., Moro, S., Zagotto, G. und Pinna, L.A. (2009) Quinalizarin as a potent, selective and cell-permeable inhibitor of protein kinase CK2. *Biochem J* 421:387-95.
- Cranenburgh, R.M. (2004) An equation for calculating the volumetric ratios required in a ligation reaction. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:200-2.
- Dancey, J.E. (2009) Kinase inhibitor 4 minisymposium summary. *Expert Rev Anticancer Ther* 9:891-4.
- Daya-Makin, M., Sanghera, J.S., Mogentale, T.L., Lipp, M., Parchomchuk, J., Hogg, J.C. und Pelech, S.L. (1994) Activation of a tumor-associated protein kinase (p40TAK) and casein kinase 2 in human squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res* 54:2262-8.
- Deana, A.D., Meggio, F., Pinna, L.A. und Moret, V. (1978) Different susceptibility of whole casein components to enzymatic phosphorylation by two forms of rat liver 'casein kinase'. *Biochim Biophys Acta* 524:316-26.
- Delorme, V., Cayla, X., Faure, G., Garcia, A. und Tardieux, I. (2003) Actin dynamics is controlled by a casein kinase II and phosphatase 2C interplay on *Toxoplasma gondii* Toxofilin. *Mol Biol Cell* 14:1900-12.
- DePaoli-Roach, A.A., Roach, P.J., Pham, K., Kramer, G. und Hardesty, B. (1981) Phosphorylation of glycogen synthase and of the beta subunit of eukaryotic initiation factor two by a common protein kinase. *J Biol Chem* 256:8871-4.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B. und Martinou, J.C. (2001) Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell* 8:601-11.
- Detzel, C., Maas, R. und Jose, J. (2010) Autodisplay of the nitrilase from *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of enantiomerically pure (R)-mandelic acid. *eingereicht*.

- Di Maira, G., Brustolon, F., Pinna, L.A. und Ruzzene, M. (2009) Dephosphorylation and inactivation of Akt/PKB is counteracted by protein kinase CK2 in HEK 293T cells. *Cell Mol Life Sci* 66:3363-73.
- Di Maira, G., Salvi, M., Arrigoni, G., Marin, O., Sarno, S., Brustolon, F., Pinna, L.A. und Ruzzene, M. (2005) Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death Differ* 12:668-77.
- Dominguez, I., Sonenshein, G.E. und Seldin, D.C. (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: CK2 and its role in Wnt and NF-kappaB signaling: linking development and cancer. *Cell Mol Life Sci* 66:1850-7.
- Druker, B.J. (2009) Perspectives on the development of imatinib and the future of cancer research. *Nat Med* 15:1149-52.
- Eglen, R.M. und Reisine, T. (2009) The current status of drug discovery against the human kinome. *Assay Drug Dev Technol* 7:22-43.
- Escalier, D., Silvius, D. und Xu, X. (2003) Spermatogenesis of mice lacking CK2alpha': failure of germ cell survival and characteristic modifications of the spermatid nucleus. *Mol Reprod Dev* 66:190-201.
- Farah, M., Parhar, K., Moussavi, M., Eivemark, S. und Salh, B. (2003) 5,6-Dichlororibifuranosylbenzimidazole- and apigenin-induced sensitization of colon cancer cells to TNF-alpha-mediated apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285:G919-28.
- Faust, M., Kartarius, S., Schwindling, S. und Montenarh, M. (2002) Cyclin H is a new binding partner for protein kinase CK2. *Biochem Biophys Res Commun* 296:13-9.
- Faust, M. und Montenarh, M. (2000) Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function? *Cell Tissue Res* 301:329-40.
- Faust, R.A., Niehans, G., Gapany, M., Hoistad, D., Knapp, D., Cherwitz, D., Davis, A., Adams, G.L. und Ahmed, K. (1999) Subcellular immunolocalization of protein kinase CK2 in normal and carcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 31:941-9.
- Filhol, O. und Cochet, C. (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: Cellular functions of protein kinase CK2: a dynamic affair. *Cell Mol Life Sci* 66:1830-9.
- Fischer, E.H. (1993) Protein Phosphorylation and Cellular Regulation II (Nobel Lecture). *Angew Chem, Int Ed Engl* 32:1130-7.
- Förster, T. (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys* 2:55-75.
- Fu, L. und Lee, C.C. (2003) The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nat Rev Cancer* 3:350-61.
- Glatz, Z. (2006) Determination of enzymatic activity by capillary electrophoresis. *J Chromatogr, B, Anal Technol Biomed Life Sci* 841:23-37.

- Glover, C.V. (1998) On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 59:95-133.
- Graham, K.C. und Litchfield, D.W. (2000) The regulatory beta subunit of protein kinase CK2 mediates formation of tetrameric CK2 complexes. *J Biol Chem* 275:5003-10.
- Grankowski, N., Boldyreff, B. und Issinger, O.-G. (1991) Isolation and characterization of recombinant human casein kinase II subunits alpha and beta from bacteria. *Eur J Biochem* 198:25-30.
- Graziani, Y., Erikson, E. und Erikson, R.L. (1983) Characterization of the Rous sarcoma virus transforming gene product. *J Biol Chem* 258:6344-51.
- Guerra, B. (2006) Protein kinase CK2 subunits are positive regulators of AKT kinase. *Int J Oncol* 28:685-93.
- Guerra, B. und Issinger, O.-G. (1999) Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis* 20:391-408.
- Guerra, B. und Issinger, O.-G. (2008) Protein kinase CK2 in human diseases. *Curr Med Chem* 15:1870-86.
- Guerra, B., Niefind, K., Ermakova, I. und Issinger, O.-G. (2001) Characterization of CK2 holoenzyme variants with regard to crystallization. *Mol Cell Biochem* 227:3-11.
- Hanahan, D. und Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hantke, K. (1981) Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol Gen Genet* 182:288-92.
- Harvey, E.J., Li, N. und Ramji, D.P. (2007) Critical role for casein kinase 2 and phosphoinositide-3-kinase in the interferon-gamma-induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other key genes implicated in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:806-12.
- Hastie, C.J., McLauchlan, H.J. und Cohen, P. (2006) Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol. *Nat Protoc* 1:968-71.
- Hathaway, G.M. und Traugh, J.A. (1982) Casein kinases-multipotential protein kinases. *Curr Top Cell Regul* 21:101-27.
- He, Y. und Yeung, E.S. (2003) High-throughput screening of kinase inhibitors by multiplex capillary electrophoresis with UV absorption detection. *Electrophoresis* 24:101-8.
- Herzenberg, L.A. und Sweet, R.G. (1976) Fluorescence-activated cell sorting. *Sci Am* 234:108-17.
- Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S. und Sasaki, Y. (1984) Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* 23:5036-41.

- Homma, M.K. und Homma, Y. (2008) Cell cycle and activation of CK2. *Mol Cell Biochem* 316:49-55.
- Hora, R., Bridges, D.J., Craig, A. und Sharma, A. (2009) Erythrocytic casein kinase II regulates cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *J Biol Chem* 284:6260-9.
- Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Chu, T.M., Wajzman, Z.L., Friedman, M., Papsidero, L., Kim, U., Chai, L.S., Kakati, S., Arya, S.K. und Sandberg, A.A. (1980) The LNCaP cell line-a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res* 37:115-32.
- Hung, M.-S., Xu, Z., Lin, Y.-C., Mao, J.-H., Yang, C.-T., Chang, P.-J., Jablons, D.M. und You, L. (2009) Identification of hematein as a novel inhibitor of protein kinase CK2 from a natural product library. *BMC Canc* 9:135.
- Jaquet, K., Korte, K., Schnackerz, K., Vyska, K. und Heilmeyer, L.M. (1993) Characterization of the cardiac troponin I phosphorylation domain by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 32:13873-8.
- Jia, Y., Quinn, C.M., Kwak, S. und Talanian, R.V. (2008) Current in vitro kinase assay technologies: the quest for a universal format. *Curr Drug Discov Technol* 5:59-69.
- Jose, J. (2006) Autodisplay: efficient bacterial surface display of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:607-14.
- Jose, J., Bernhardt, R. und Hannemann, F. (2001) Functional display of active bovine adrenodoxin on the surface of *E. coli* by chemical incorporation of the [2Fe-2S] cluster. *ChemBioChem* 2:695-701.
- Jose, J., Bernhardt, R. und Hannemann, F. (2002) Cellular surface display of dimeric Adx and whole cell P450-mediated steroid synthesis on *E. coli*. *J Biotechnol* 95:257-68.
- Jose, J., Betscheider, D. und Zangen, D. (2005) Bacterial surface display library screening by target enzyme labeling: Identification of new human cathepsin G inhibitors. *Anal Biochem* 346:258-67.
- Jose, J., Chung, J.-W., Jeon, B.-J., Maas, R.M., Nam, C.-H. und Pyun, J.-C. (2009) *Escherichia coli* with autodisplayed Z-domain of protein A for signal amplification of SPR biosensor. *Biosens Bioelectron* 24:1324-9.
- Jose, J. und Handel, S. (2003) Monitoring the cellular surface display of recombinant proteins by cysteine labeling and flow cytometry. *ChemBioChem* 4:396-405.
- Jose, J., Jähnig, F. und Meyer, T.F. (1995) Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol Microbiol* 18:378-80.
- Jose, J. und Meyer, T.F. (2007) The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:600-19.

- Jose, J., Park, M. und Pyun, J.-C. (2010) *E. coli* outer membrane with autodisplayed Z-domain as a molecular recognition layer of SPR biosensor. *Biosens Bioelectron* 25:1225-8.
- Jose, J. und von Schwichow, S. (2004) Autodisplay of active sorbitol dehydrogenase (SDH) yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars. *ChemBioChem* 5:491-9.
- Jose, J. und Zangen, D. (2005) Autodisplay of the protease inhibitor aprotinin in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 333:1218-26.
- Kaessler, A., Nourrisson, M.-R., Duflos, M. und Jose, J. (2008) Indole carboxamides inhibit bovine testes hyaluronidase at pH 7.0 and indole acetamides activate the enzyme at pH 3.5 by different mechanisms. *J Enzyme Inhib Med Chem* 23:719-27.
- Kaessler, A., Olgen, S. und Jose, J. (2010) Autodisplay of catalytically active human hyaluronidase hPH-20 and testing of enzyme inhibitors. *Europ J Pharm Sci*, under review.
- Keller, D.M. und Lu, H. (2002) p53 serine 392 phosphorylation increases after UV through induction of the assembly of the CK2.hSPT16.SSRP1 complex. *J Biol Chem* 277:50206-13.
- Kelliher, M.A., Seldin, D.C. und Leder, P. (1996) Tal-1 induces T cell acute lymphoblastic leukemia accelerated by casein kinase II alpha. *EMBO J* 15:5160-6.
- Kennedy, E. und Smith, S. (1954) The isolation of radioactive phosphoserine from phosphoprotein of the Ehrlich ascites tumor. *J Biol Chem* 207:153-63.
- Kim, J.S., Eom, J.I., Cheong, J.-W., Choi, A.J., Lee, J.K., Yang, W.I. und Min, Y.H. (2007) Protein kinase CK2alpha as an unfavorable prognostic marker and novel therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 13:1019-28.
- Kjeldsen, F., Savitski, M.M., Nielsen, M.L., Shi, L. und Zubarev, R.A. (2007) On studying protein phosphorylation patterns using bottom-up LC-MS/MS: the case of human alpha-casein. *Analyst* 132:768-76.
- Klebba, P.E. (2005) The porinologist. *J Bacteriol* 187:8232-6.
- Klumpp, S. und Krieglstein, J. (2005) Reversible phosphorylation of histidine residues in vertebrate proteins. *Biochim Biophys Acta* 1754:291-5.
- Knight, Z.A., Lin, H. und Shokat, K.M. (2010) Targeting the cancer kinome through polypharmacology. *Nat Rev Cancer* 10:130-7.
- Knight, Z.A. und Shokat, K.M. (2005) Features of selective kinase inhibitors. *Chem Biol* 12:621-37.

- Kramerov, A.A., Saghizadeh, M., Caballero, S., Shaw, L.C., Li Calzi, S., Bretner, M., Montenarh, M., Pinna, L.A., Grant, M.B. und Ljubimov, A.V. (2008) Inhibition of protein kinase CK2 suppresses angiogenesis and hematopoietic stem cell recruitment to retinal neovascularization sites. *Mol Cell Biochem* 316:177-86.
- Krebs, E.G. (1993) Protein Phosphorylation and Cellular Regulation I (Nobel Lecture). *Angew Chem, Int Ed Engl* 32:1122-9.
- Krebs, E.G. und Fischer, E. (1956) The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 20:150-7.
- Kuckländer, U. und Töberich, H. (1982) Zur Umsetzung von 2-(Aminomethylen)cyclohexanon-Derivaten mit Dichlorchinonen. *Chem Ber* 116:152-8.
- Kuenzel, E.A., Mulligan, J.A., Sommercorn, J. und Krebs, E.G. (1987) Substrate specificity determinants for casein kinase II as deduced from studies with synthetic peptides. *J Biol Chem* 262:9136-40.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Landesman-Bollag, E., Channavajhala, P.L., Cardiff, R.D. und Seldin, D.C. (1998) p53 deficiency and misexpression of protein kinase CK2alpha collaborate in the development of thymic lymphomas in mice. *Oncogene* 16:2965-74.
- Landesman-Bollag, E., Romieu-Mourez, R., Song, D.H., Sonenshein, G.E., Cardiff, R.D. und Seldin, D.C. (2001a) Protein kinase CK2 in mammary gland tumorigenesis. *Oncogene* 20:3247-57.
- Landesman-Bollag, E., Song, D.H., Romieu-Mourez, R., Sussman, D.J., Cardiff, R., Sonenshein, G. und Seldin, D.C. (2001b) Protein kinase CK2: signaling and tumorigenesis in the mammary gland. *Mol Cell Biochem* 227:153-65.
- Lane, D.P. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-6.
- Laramas, M., Pasquier, D., Filhol, O., Ringeisen, F., Descotes, J.-L. und Cochet, C. (2007) Nuclear localization of protein kinase CK2 catalytic subunit (CK2alpha) is associated with poor prognostic factors in human prostate cancer. *Eur J Cancer* 43:928-34.
- Laudet, B., Barette, C., Dulery, V., Renaudet, O., Dumy, P., Metz, A., Prudent, R., Deshiere, A., Dideberg, O., Filhol, O. und Cochet, C. (2007) Structure-based design of small peptide inhibitors of protein kinase CK2 subunit interaction. *Biochem J* 408:363-73.
- Laudet, B., Moucadel, V., Prudent, R., Filhol, O., Wong, Y.-S., Royer, D. und Cochet, C. (2008) Identification of chemical inhibitors of protein-kinase CK2 subunit interaction. *Mol Cell Biochem* 316:63-9.

- Li, C., Liu, X., Lin, X. und Chen, X. (2009) Structure-activity relationship of 7 flavonoids on recombinant human protein kinase CK2 holoenzyme. *J Cent S Univ Med Sci* 34:20-6.
- Li, P.-F., Li, J., Müller, E.-C., Otto, A., Dietz, R. und von Harsdorf, R. (2002) Phosphorylation by protein kinase CK2: a signaling switch for the caspase-inhibiting protein ARC. *Mol Cell* 10:247-58.
- Lin, J., Kilman, V.L., Keegan, K., Paddock, B., Emery-Le, M., Rosbash, M. und Allada, R. (2002) A role for casein kinase 2alpha in the Drosophila circadian clock. *Nature* 420:816-20.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B. und Feeney, P. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Del Rev* 46:3-26.
- Litchfield, D.W. (2003) Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* 369:1-15.
- Litchfield, D.W., Bosc, D., Canton, D.A., Saulnier, R.B., Vilks, G. und Zhang, C. (2001) Functional specialization of CK2 isoforms and characterization of isoform-specific binding partners. *Mol Cell Biochem* 227:21-9.
- Llobet, D., Eritja, N., Encinas, M., Llecha, N., Yeramian, A., Pallares, J., Sorolla, A., Gonzalez-Tallada, F.J., Matias-Guiu, X. und Dolcet, X. (2008) CK2 controls TRAIL and Fas sensitivity by regulating FLIP levels in endometrial carcinoma cells. *Oncogene* 27:2513-24.
- López-Ramos, M., Prudent, R., Moucadel, V., Sautel, C.F., Barette, C., Lafanechère, L., Mouawad, L., Grierson, D., Schmidt, F., Florent, J.-C., Filippakopoulos, P., Bullock, A.N., Knapp, S., Reiser, J.-B. und Cochet, C. (2010) New potent dual inhibitors of CK2 and Pim kinases: discovery and structural insights. *FASEB J* DOI: 10.1096/fj.09-143743.
- Lorenz, P., Pepperkok, R. und Pyerin, W. (1994) Requirement of casein kinase 2 for entry into and progression through early phases of the cell cycle. *Cell Mol Biol Res* 40:519-27.
- Lou, D.Y., Dominguez, I., Toselli, P., Landesman-Bollag, E., O'Brien, C. und Seldin, D.C. (2008) The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development. *Mol Cell Biol* 28:131-9.
- Lozeman, F.J., Litchfield, D.W., Piening, C., Takio, K., Walsh, K.A. und Krebs, E.G. (1990) Isolation and characterization of human cDNA clones encoding the alpha and the alpha' subunits of casein kinase II. *Biochemistry* 29:8436-47.
- Ma, H., Deacon, S. und Horiuchi, K. (2008) The challenge of selecting protein kinase assays for lead discovery optimization. *Expert Opin Drug Discov* 3:607-21.
- Maier, B., Wendt, S., Vanselow, J.T., Wallach, T., Reischl, S., Oehmke, S., Schlosser, A. und Kramer, A. (2009) A large-scale functional RNAi screen reveals a role for CK2 in the mammalian circadian clock. *Genes Dev* 23:708-18.

- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. und Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-34.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. und Balkwill, F. (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436-44.
- Marin, O., Meggio, F., Sarno, S., Cesaro, L., Pagano, M.A. und Pinna, L.A. (1999) Tyrosine versus serine/threonine phosphorylation by protein kinase casein kinase-2. A study with peptide substrates derived from immunophilin Fpr3. *J Biol Chem* 274:29260-5.
- Maurer, J., Jose, J. und Meyer, T.F. (1997) Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:794-804.
- Maurer, J., Jose, J. und Meyer, T.F. (1999) Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *J Bacteriol* 181:7014-20.
- McDonnell, M.A., Abedin, M.J., Melendez, M., Platikanova, T.N., Ecklund, J.R., Ahmed, K. und Kelekar, A. (2008) Phosphorylation of murine caspase-9 by the protein kinase casein kinase 2 regulates its cleavage by caspase-8. *J Biol Chem* 283:20149-58.
- Medina-Palazon, C., Gruffat, H., Mure, F., Filhol, O., Vingtdeux-Didier, V., Drobecq, H., Cochet, C., Sergeant, N., Sergeant, A. und Manet, E. (2007) Protein kinase CK2 phosphorylation of EB2 regulates its function in the production of Epstein-Barr virus infectious viral particles. *J Virol* 81:11850-60.
- Meggio, F., Boldyreff, B., Marin, O., Pinna, L.A. und Issinger, O.-G. (1992) Role of the beta subunit of casein kinase-2 on the stability and specificity of the recombinant reconstituted holoenzyme. *Eur J Biochem* 204:293-7.
- Meggio, F., Marchiori, F., Borin, G., Chessa, G. und Pinna, L.A. (1984) Synthetic peptides including acidic clusters as substrates and inhibitors of rat liver casein kinase TS (type-2). *J Biol Chem* 259:14576-9.
- Meggio, F., Marin, O. und Pinna, L.A. (1994) Substrate specificity of protein kinase CK2. *Cell Mol Biol Res* 40:401-9.
- Meggio, F. und Pinna, L.A. (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J* 17:349-68.
- Meggio, F., Shugar, D. und Pinna, L.A. (1990) Ribofuranosyl-benzimidazole derivatives as inhibitors of casein kinase-2 and casein kinase-1. *Eur J Biochem* 187:89-94.
- Merrifield, R.B. (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc* 85:2149-54.
- Montenarh, M. (1997) Das Wachstumssuppressorprotein p53, seine zellulären Partner und das Prostatakarzinom. *Aktuel Urol* 28:371-6.

- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Mottet, D., Ruys, S., Demazy, C., Raes, M. und Michiels, C. (2005) Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity. *Int J Cancer* 117:764-74.
- Müller, D., Benz, I., Tapadar, D., Buddenborg, C., Greune, L. und Schmidt, M.A. (2005) Arrangement of the translocator of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence on the bacterial surface. *Infect Immun* 73:3851-9.
- Münstermann, U., Fritz, G., Seitz, G., Lu, Y.P., Schneider, H.R. und Issinger, O.G. (1990) Casein kinase II is elevated in solid human tumours and rapidly proliferating non-neoplastic tissue. *Eur J Biochem* 189:251-7.
- Nie, Z., Perretta, C., Erickson, P., Margosiak, S., Lu, J., Averill, A., Almasy, R. und Chu, S. (2008) 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* 18:619-23.
- Niefind, K., Guerra, B., Ermakova, I. und Issinger, O.-G. (2001) Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J* 20:5320-31.
- Niefind, K. und Issinger, O.-G. (2005) 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.
- Niefind, K., Pütter, M., Guerra, B., Issinger, O.-G. und Schomburg, D. (1999) GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2. *Nat Struct Biol* 6:1100-3.
- Niefind, K., Raaf, J. und Issinger, O.-G. (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: Protein kinase CK2: from structures to insights. *Cell Mol Life Sci* 66:1800-16.
- Noren, K.A. und Noren, C.J. (2001) Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. *Methods* 23:169-78.
- ole-MoiYoi, O.K. (1995) Casein kinase II in theileriosis. *Science* 267:834-6.
- Olgen, S., Götz, C. und Jose, J. (2007) Synthesis and biological evaluation of 3-(substituted-benzylidene)-1,3-dihydro-indolin derivatives as human protein kinase CK2 and p60(c-Src) tyrosine kinase inhibitors. *Biol Pharm Bull* 30:715-8.
- Olsen, B.B., Bjørling-Poulsen, M. und Guerra, B. (2007) Emodin negatively affects the phosphoinositide 3-kinase/AKT signalling pathway: a study on its mechanism of action. *Int J Biochem Cell Biol* 39:227-37.
- Olsen, B.B., Boldyreff, B., Niefind, K. und Issinger, O.-G. (2006) Purification and characterization of the CK2alpha'-based holoenzyme, an isozyme of CK2alpha: a comparative analysis. *Protein Expr Purif* 47:651-61.

- Olsten, M.E.K. und Litchfield, D.W. (2004) Order or chaos? An evaluation of the regulation of protein kinase CK2. *Biochem Cell Biol* 82:681-93.
- Olsten, M.E.K., Weber, J.E. und Litchfield, D.W. (2005) CK2 interacting proteins: emerging paradigms for CK2 regulation? *Mol Cell Biochem* 274:115-24.
- Pagano, M.A., Bain, J., Kazimierczuk, Z., Sarno, S., Ruzzene, M., Di Maira, G., Elliott, M., Orzeszko, A., Cozza, G., Meggio, F. und Pinna, L.A. (2008) The selectivity of inhibitors of protein kinase CK2: an update. *Biochem J* 415:353-65.
- Pagano, M.A., Marin, O., Cozza, G., Sarno, S., Meggio, F., Treharne, K.J., Mehta, A. und Pinna, L.A. (2010) Cystic fibrosis transmembrane regulator fragments with the Phe508 deletion exert a dual allosteric control over the master kinase CK2. *Biochem J* 426:19-29.
- Pagano, M.A., Meggio, F., Ruzzene, M., Andrzejewska, M., Kazimierczuk, Z. und Pinna, L.A. (2004) 2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole: a novel powerful and selective inhibitor of protein kinase CK2. *Biochem Biophys Res Commun* 321:1040-4.
- Pagano, M.A., Poletto, G., Di Maira, G., Cozza, G., Ruzzene, M., Sarno, S., Bain, J., Elliott, M., Moro, S., Zagotto, G., Meggio, F. und Pinna, L.A. (2007) Tetrabromocinnamic acid (TBCA) and related compounds represent a new class of specific protein kinase CK2 inhibitors. *ChemBioChem* 8:129-39.
- Pallares, J., Llobet, D., Santacana, M., Eritja, N., Velasco, A., Cuevas, D., Lopez, S., Palomar-Asenjo, V., Yeramian, A., Dolcet, X. und Matias-Guiu, X. (2009) CK2beta is expressed in endometrial carcinoma and has a role in apoptosis resistance and cell proliferation. *Am J Pathol* 174:287-96.
- Park, M., Jose, J. und Pyun, J.-C. (2010) Hypersensitive immunoassay by using *Escherichia coli* outer membrane with autodisplayed Z-domains. *Enzyme Microb Technol* 46:309-14.
- Perea, S.E., Reyes, O., Baladron, I., Perera, Y., Farina, H., Gil, J., Rodriguez, A., Bacardi, D., Marcelo, J.L., Cosme, K., Cruz, M., Valenzuela, C., López-Saura, P.A., Puchades, Y., Serrano, J.M., Mendoza, O., Castellanos, L., Sanchez, A., Betancourt, L., Besada, V., Silva, R., López, E., Falcón, V., Hernández, I., Solares, M., Santana, A., Díaz, A., Ramos, T., López, C., Ariosa, J., González, L.J., Garay, H., Gómez, D., Gómez, R., Alonso, D.F., Sigman, H., Herrera, L. und Acevedo, B. (2008) 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.
- Perea, S.E., Reyes, O., Puchades, Y., Mendoza, O., Vispo, N.S., Torrens, I., Santos, A., Silva, R., Acevedo, B., López, E., Falcón, V. und Alonso, D.F. (2004) Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide that impairs the phosphorylation by the protein kinase 2 (casein kinase 2). *Cancer Res* 64:7127-9.

- Perera, Y., Farina, H.G., Gil, J., Rodriguez, A., Benavent, F., Castellanos, L., Gómez, R.E., Acevedo, B.E., Alonso, D.F. und Perea, S.E. (2009) 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.
- Perrin, D., Frémaux, C. und Shutes, A. (2010) Capillary microfluidic electrophoretic mobility shift assays: Application to enzymatic assays in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 5:51-63.
- Pinna, L.A. (1990) Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation? *Biochim Biophys Acta* 1054:267-84.
- Pinna, L.A. (1994) A historical view of protein kinase CK2. *Cell Mol Biol Res* 40:383-90.
- Pinna, L.A. (2002) Protein kinase CK2: a challenge to canons. *J Cell Sci* 115:3873-8.
- Pinna, L.A. und Allende, J.E. (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: Protein kinase CK2: an ugly duckling in the kinome pond. *Cell Mol Life Sci* 66:1795-9.
- Poth, A.G., Deeth, H.C., Alewood, P.F. und Holland, J.W. (2008) Analysis of the human casein phosphoproteome by 2-D electrophoresis and MALDI-TOF/TOF MS reveals new phosphoforms. *J Proteome Res* 7:5017-27.
- Prowald, K., Fischer, H. und Issinger, O.G. (1984) Enhanced casein kinase II activity in human tumour cell cultures. *FEBS Lett* 176:479-83.
- Prudent, R. und Cochet, C. (2009) New protein kinase CK2 inhibitors: jumping out of the catalytic box. *Chem Biol* 16:112-20.
- Prudent, R., Moucadel, V., Laudet, B., Barette, C., Lafanechere, L., Hasenknopf, B., Li, J., Bareyt, S., Lacôte, E., Thorimbert, S., Malacria, M., Gouzerh, P. und Cochet, C. (2008) Identification of polyoxometalates as nanomolar noncompetitive inhibitors of protein kinase CK2. *Chem Biol* 15:683-92.
- Prudent, R., Sautel, C.F. und Cochet, C. (2010) Structure-based discovery of small molecules targeting different surfaces of protein-kinase CK2. *Biochim Biophys Acta* 1804:493-8.
- Ravi, R. und Bedi, A. (2004) NF-kappaB in cancer-a friend turned foe. *Drug Resist Updat* 7:53-67.
- Rodems, S.M., Hamman, B.D., Lin, C., Zhao, J., Shah, S., Heidary, D., Makings, L., Stack, J.H. und Pollok, B.A. (2002) A FRET-based assay platform for ultra-high density drug screening of protein kinases and phosphatases. *Assay Drug Dev Technol* 1:9-19.
- Roig, J., Krehan, A., Colomer, D., Pyerin, W., Itarte, E. und Plana, M. (1999) Multiple forms of protein kinase CK2 present in leukemic cells: *in vitro* study of its origin by proteolysis. *Mol Cell Biochem* 191:229-34.

- Ruzzene, M., Penzo, D. und Pinna, L.A. (2002) Protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) induces apoptosis and caspase-dependent degradation of haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) in Jurkat cells. *Biochem J* 364:41-7.
- Ruzzene, M. und Pinna, L.A. (2010) Addiction to protein kinase CK2: A common denominator of diverse cancer cells? *Biochim Biophys Acta* 1804:499-504.
- Ryu, M.Y., Kim, D.W., Arima, K., Mouradian, M.M., Kim, S.U. und Lee, G. (2008) Localization of CKII beta subunits in Lewy bodies of Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 266:9-12.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91.
- Sale, E.M. und Sale, G.J. (2008) Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. *Cell Mol Life Sci* 65:113-27.
- Salomoni, P. und Pandolfi, P.P. (2002) The role of PML in tumor suppression. *Cell* 108:165-70.
- Salvi, M., Sarno, S., Cesaro, L., Nakamura, H. und Pinna, L.A. (2009) Extraordinary pleiotropy of protein kinase CK2 revealed by weblogo phosphoproteome analysis. *Biochim Biophys Acta* 1793:847-59.
- Salvi, M., Sarno, S., Marin, O., Meggio, F., Itarte, E. und Pinna, L.A. (2006) Discrimination between the activity of protein kinase CK2 holoenzyme and its catalytic subunits. *FEBS Lett* 580:3948-52.
- Sambrook, J., Russell, D.W. und Laboratory, C.S.H. (2001) Molecular cloning : a laboratory manual / Joseph Sambrook, David W. Russell, 3rd. ed. edn (Cold Spring Harbor, N.Y. :, Cold Spring Harbor Laboratory).
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-7.
- Sarno, S., De Moliner, E., Ruzzene, M., Pagano, M.A., Battistutta, R., Bain, J., Fabbro, D., Schoepfer, J., Elliott, M., Furet, P., Meggio, F., Zanotti, G. und Pinna, L.A. (2003) Biochemical and three-dimensional-structural study of the specific inhibition of protein kinase CK2 by [5-oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-a)quinazolin-7-yl]acetic acid (IQA). *Biochem J* 374:639-46.
- Sarno, S., Moro, S., Meggio, F., Zagotto, G., Dal Ben, D., Ghisellini, P., Battistutta, R., Zanotti, G. und Pinna, L.A. (2002) Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors. *Pharmacol Therapeut* 93:159-68.
- Sarno, S., Reddy, H., Meggio, F., Ruzzene, M., Davies, S.P., Donella-Deana, A., Shugar, D. und Pinna, L.A. (2001) Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett* 496:44-8.

- Sarno, S., Ruzzene, M., Frascella, P., Pagano, M.A., Meggio, F., Zambon, A., Mazzorana, M., Di Maira, G., Lucchini, V. und Pinna, L.A. (2005a) Development and exploitation of CK2 inhibitors. *Mol Cell Biochem* 274:69-76.
- Sarno, S., Salvi, M., Battistutta, R., Zanotti, G. und Pinna, L.A. (2005b) Features and potentials of ATP-site directed CK2 inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1754:263-70.
- Sato, S., Fujita, N. und Tsuruo, T. (2000) Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10832-7.
- Scaglioni, P.P., Yung, T.M., Choi, S.C., Baldini, C., Konstantinidou, G. und Pandolfi, P.P. (2008) CK2 mediates phosphorylation and ubiquitin-mediated degradation of the PML tumor suppressor. *Mol Cell Biochem* 316:149-54.
- Schneider, C.C., Hessenauer, A., Götz, C. und Montenarh, M. (2009) DMAT, an inhibitor of protein kinase CK2 induces reactive oxygen species and DNA double strand breaks. *Oncol Rep* 21:1593-7.
- Schneider, C.C., Hessenauer, A., Montenarh, M. und Götz, C. (2010) p53 is dispensable for the induction of apoptosis after inhibition of protein kinase CK2. *Prostate* 70:126-34.
- Schultheiss, E., Weiss, S., Winterer, E., Maas, R.M., Heinzle, E. und Jose, J. (2008) Esterase autodisplay: enzyme engineering and whole-cell activity determination in microplates with pH sensors. *Appl Environ Microbiol* 74:4782-91.
- Schuster, N., Götz, C., Faust, M., Schneider, E., Prowald, A., Jungbluth, A. und Montenarh, M. (2001) Wild-type p53 inhibits protein kinase CK2 activity. *J Cell Biochem* 81:172-83.
- Seldin, D.C., Landesman-Bollag, E., Farago, M., Currier, N., Lou, D. und Dominguez, I. (2005) CK2 as a positive regulator of Wnt signalling and tumorigenesis. *Mol Cell Biochem* 274:63-7.
- Seldin, D.C. und Leder, P. (1995) Casein kinase II alpha transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle. *Science* 267:894-7.
- Seldin, D.C., Lou, D.Y., Toselli, P., Landesman-Bollag, E. und Dominguez, I. (2008) Gene targeting of CK2 catalytic subunits. *Mol Cell Biochem* 316:141-7.
- Shi, X., Potvin, B., Huang, T., Hilgard, P., Spray, D.C., Suadicani, S.O., Wolkoff, A.W., Stanley, P. und Stockert, R.J. (2001) A novel casein kinase 2 alpha-subunit regulates membrane protein traffic in the human hepatoma cell line HuH-7. *J Biol Chem* 276:2075-82.
- Shimoyama, Y., Sakamoto, R., Akaboshi, T., Tanaka, M. und Ohtsuki, K. (2001) Characterization of secretory type IIA phospholipase A2 (sPLA2-IIA) as a glycyrrhizin (GL)-binding protein and the GL-induced inhibition of the CK-II-mediated stimulation of sPLA2-IIA activity *in vitro*. *Biol Pharm Bull* 24:1004-8.

- Shin, S., Lee, Y., Kim, W., Ko, H., Choi, H. und Kim, K. (2005) Caspase-2 primes cancer cells for TRAIL-mediated apoptosis by processing procaspase-8. *EMBO J* 24:3532-42.
- Siemer, S., Stalter, G., Ziegler, M. und Issinger, O. (1996) Charakterisierung der Proteinkinase CK2 in menschlichen Nierentumoren. *Aktuel Urol* 27:1-5.
- Singh, N.N. und Ramji, D.P. (2008) Protein kinase CK2, an important regulator of the inflammatory response? *J Mol Med* 86:887-97.
- Slaton, J.W., Unger, G., Sloper, D., Davis, A. und Ahmed, K. (2004) Induction of apoptosis by antisense CK2 in human prostate cancer xenograft model. *Mol Cancer Res* 2:712-21.
- Smyth, L.A. und Collins, I. (2009) Measuring and interpreting the selectivity of protein kinase inhibitors. *J Chem Biol* 2:131-51.
- Sørensen, E.S., Møller, L., Vinther, M., Petersen, T.E. und Rasmussen, L.K. (2003) The phosphorylation pattern of human α 1-casein is markedly different from the ruminant species. *Eur J Biochem* 270:3651-5.
- Stalter, G., Siemer, S., Becht, E., Ziegler, M., Remberger, K. und Issinger, O.-G. (1994) Asymmetric expression of protein kinase CK2 subunits in human kidney tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 202:141-7.
- Studier, F.W. und Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189:113-30.
- Sugano, S., Andronis, C., Ong, M.S., Green, R.M. und Tobin, E.M. (1999) The protein kinase CK2 is involved in regulation of circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12362-6.
- Suzuki, Y., Cluzeau, J., Hara, T., Hirasawa, A., Tsujimoto, G., Oishi, S., Ohno, H. und Fujii, N. (2008) Structure-activity relationships of pyrazine-based CK2 inhibitors: synthesis and evaluation of 2,6-disubstituted pyrazines and 4,6-disubstituted pyrimidines. *Arch Pharm (Weinheim)* 341:554-61.
- Tawfic, S., Yu, S., Wang, H., Faust, R., Davis, A. und Ahmed, K. (2001) Protein kinase CK2 signal in neoplasia. *Histol Histopathol* 16:573-82.
- Thornburg, W. und Lindell, T.J. (1977) Purification of rat liver nuclear protein kinase NII. *J Biol Chem* 252:6660-5.
- Tiganis, T., House, C.M. und Kemp, B.E. (1993) Casein kinase II beta-subunit inhibits the activity of the catalytic alpha-subunit in the absence of salt. *Biochim Biophys Acta* 1203:282-9.
- Torres, J. und Pulido, R. (2001) The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem* 276:993-8.

- Trembley, J.H., Wang, G., Unger, G., Slaton, J. und Ahmed, K. (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: CK2: a key player in cancer biology. *Cell Mol Life Sci* 66:1858-67.
- Tsuchiya, Y., Akashi, M., Matsuda, M., Goto, K., Miyata, Y., Node, K. und Nishida, E. (2009) Involvement of the protein kinase CK2 in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Sci Signal* 2:ra26.
- Ubersax, J.A. und Ferrell, J.E. (2007) Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:530-41.
- Unger, G., Davis, A.T., Slaton, J.W. und Ahmed, K. (2004) Protein kinase CK2 as regulator of cell survival: implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Tar* 4:77-84.
- Valero, E., De Bonis, S., Filhol, O., Wade, R.H., Langowski, J., Chambaz, E.M. und Cochet, C. (1995) Quaternary structure of casein kinase 2. Characterization of multiple oligomeric states and relation with its catalytic activity. *J Biol Chem* 270:8345-52.
- van Brussel, J.P., van Steenbrugge, G.J., Romijn, J.C., Schröder, F.H. und Mickisch, G.H. (1999) Chemosensitivity of prostate cancer cell lines and expression of multidrug resistance-related proteins. *Eur J Cancer* 35:664-71.
- Vilk, G., Weber, J.E., Turowec, J.P., Duncan, J.S., Wu, C., Derksen, D.R., Zien, P., Sarno, S., Donella-Deana, A., Lajoie, G., Pinna, L.A., Li, S.S.C. und Litchfield, D.W. (2008) Protein kinase CK2 catalyzes tyrosine phosphorylation in mammalian cells. *Cell Signal* 20:1942-51.
- Villar-Palasi, C. und Kumon, A. (1981) Purification and properties of dog cardiac troponin T kinase. *J Biol Chem* 256:7409-15.
- Walsh, D.A., Perkins, J.P. und Krebs, E.G. (1968) An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 243:3763-5.
- Wang, G., Unger, G., Ahmad, K., Slaton, J.W. und Ahmed, K. (2005) Downregulation of CK2 induces apoptosis in cancer cells-a potential approach to cancer therapy. *Mol Cell Biochem* 274:77-84.
- Wang, L., Lin, L. und Ye, B. (2006) Electrochemical studies of the interaction of the anticancer herbal drug emodin with DNA. *J Pharm Biomed Anal* 42:625-9.
- Wang, S. und Jones, K.A. (2006) CK2 controls the recruitment of Wnt regulators to target genes *in vivo*. *Curr Biol* 16:2239-44.
- Weimer, S., Oertel, K. und Fuchsbaue, H.-L. (2006) A quenched fluorescent dipeptide for assaying dispase- and thermolysin-like proteases. *Anal Biochem* 352:110-9.
- Werné, H. und Ståhl, S. (2004) Biotechnological applications for surface-engineered bacteria. *Biotechnol Appl Biochem* 40:209-28.

- Willert, K., Brink, M., Wodarz, A., Varmus, H. und Nusse, R. (1997) Casein kinase 2 associates with and phosphorylates dishevelled. *EMBO J* 16:3089-96.
- Xu, X., Landesman-Bollag, E., Channavajhala, P.L. und Seldin, D.C. (1999a) Murine protein kinase CK2: gene and oncogene. *Mol Cell Biochem* 191:65-74.
- Xu, X., Toselli, P.A., Russell, L.D. und Seldin, D.C. (1999b) Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit. *Nat Genet* 23:118-21.
- Yamada, M., Katsuma, S., Adachi, T., Hirasawa, A., Shiojima, S., Kadowaki, T., Okuno, Y., Koshimizu, T.-a., Fujii, S., Sekiya, Y., Miyamoto, Y., Tamura, M., Yumura, W., Nihei, H., Kobayashi, M. und Tsujimoto, G. (2005) Inhibition of protein kinase CK2 prevents the progression of glomerulonephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7736-41.
- Yan, J.X., Packer, N.H., Gooley, A.A. und Williams, K.L. (1998) Protein phosphorylation: technologies for the identification of phosphoamino acids. *J Chromatogr A* 808:23-41.
- Yang, Y., Cheng, P. und Liu, Y. (2002) Regulation of the *Neurospora* circadian clock by casein kinase II. *Genes Dev* 16:994-1006.
- Yavin, E.J. und Fridkin, M. (1998) Peptides derived from human C-reactive protein inhibit the enzymatic activities of human leukocyte elastase and cathepsin G: use of overlapping peptide sequences to identify a unique inhibitor. *J Pept Res* 51:282-9.
- Yenice, S., Davis, A.T., Goueli, S.A., Akdas, A., Limas, C. und Ahmed, K. (1994) Nuclear casein kinase 2 (CK-2) activity in human normal, benign hyperplastic, and cancerous prostate. *Prostate* 24:11-6.
- Yim, H., Lee, Y.H., Lee, C.H. und Lee, S.K. (1999) Emodin, an anthraquinone derivative isolated from the rhizomes of *Rheum palmatum*, selectively inhibits the activity of casein kinase II as a competitive inhibitor. *Planta Med* 65:9-13.
- Zandomeni, R., Zandomeni, M.C., Shugar, D. und Weinmann, R. (1986) 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* 261:3414-9.
- Zangen, D. (2002) Autodisplay von Enzyminhibitoren. Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Zien, P., Duncan, J.S., Skierski, J., Bretner, M., Litchfield, D.W. und Shugar, D. (2005) Tetrabromobenzotriazole (TBBt) and tetrabromobenzimidazole (TBBz) as selective inhibitors of protein kinase CK2: evaluation of their effects on cells and different molecular forms of human CK2. *Biochim Biophys Acta* 1754:271-80.

VI Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 20: Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	„Volume per volume“ (Volumenanteil)
(w/v)	„Weight per volume“ (Massenanteil)
Amp ^R	Ampicillinresistenz
aph	Gen für Aminoglycosidphosphotransferase (Kanamycinresistenz)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AT	Autotransporter
ATP	Adenosintriphosphat
bla	Gen für β -Lactamase (Ampicillinresistenz)
BSA	„Bovine serum albumin“ (Rinderserum Albumin)
cDNA	„Copy“-DNA
CE	„Capillary electrophoresis“ (Kapillarelektrophorese)
CK2 _F	Fluorescein-konjugiertes aufgereinigtes CK2-Holoenzym
CK2 α -FP	Fusionsprotein aus Autotransporter und CK2 α als Passagier
CK2 β -FP	Fusionsprotein aus Autotransporter und CK2 β als Passagier
cpm	„Counts per minute“ (Ereignisse pro Minute)
CSNK2A1	Gen für CK2 α
CSNK2B	Gen für CK2 β
DABCYL	(4-[[4-(Dimethylamino)-phenyl] azo]-benzoesäure)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Deoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Nukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EDANS	(5-[[2-Aminoethyl]amino]naphthalin-1-sulfonsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„Enzyme-linked immunosorbent assay“ (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
FACS	„Fluorescence activated cell sorting“ (fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie und -sortierung)
FP	Fusionsprotein
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer
FSC	„Forwardscatter“
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	„High performance liquid chromatography“ (Hochleistungsflüssigchromatographie)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Km ^R	Kanamycinresistenz
lacI	Gen für lac-Repressor
LB	„Lysogeny broth“
MW	Mittelwert
MWCO	Molecular weight cut-off (Ausschlussgrenze)
Omp	„Outer membrane protein“ (Außenmembranprotein)
ORF	„Open reading frame“ (offener Leserahmen)

p.a.	<i>Pro analysi</i> (für die Analyse)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	„Phosphate buffered saline“ (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	„Polymerase chain reaction“ (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PK	Proteinkinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RA	Rheumatoide Arthritis
Rpm	„Revolutions per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SOB	„Super optimal broth“ (Optimalmedium)
SOC	„Super optimal broth with catabolite repression“ (Optimalmedium mit Katabolitrepession)
SP	Signalpeptid
SSC	„Sidescatter“
TAE	Tris-Acetat-Elektrophoresepuffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBB	4,5,6,7-Tetrabrombenzotriazol
TBS	„Tris-buffered saline“ (Trisgepufferte Salzlösung)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	Über Nacht

Nicht standardkonforme Abkürzungen für Nukleinsäuren:

R – A oder G (Purin)

Y – C oder T (Pyrimidin)

B – C, G oder T

V – A, C oder G

N – beliebige Base

2. Sequenzen

Die Passagiersequenzen der in pET-RAA und pKP003, sowie pKP007 codierten Autotransporter-Fusionsproteine sind im folgenden aufgeführt:

1) α_{S1} -Casein (UniProt: P47710, prozessiertes Protein, 170 AS):

```
RPKLPLRYPERLQNPSESSEPIPLESREEYMNGMNRQRNILREKQTDEIKDTRNEST
QNCVVAEPEKMESSISSSEEMSLSKCAEQFCRLNEYNQLQLQAAHAQEIQIRRMNE
NSHVQVPFQQLNQLAAYPYAVWYYPQIMQYVFPFPPFSDISNPTAHENYEKNNVML
QW
```

2) KP3 (N-terminal verkürztes α_{S1} -Casein, 66 AS):

```
QEIQIRRMNENSHVQVPFQQLNQLAAYPYAVWYYPQIMQYVFPFPPFSDISNPTAHE
NYEKNNVMLQW
```

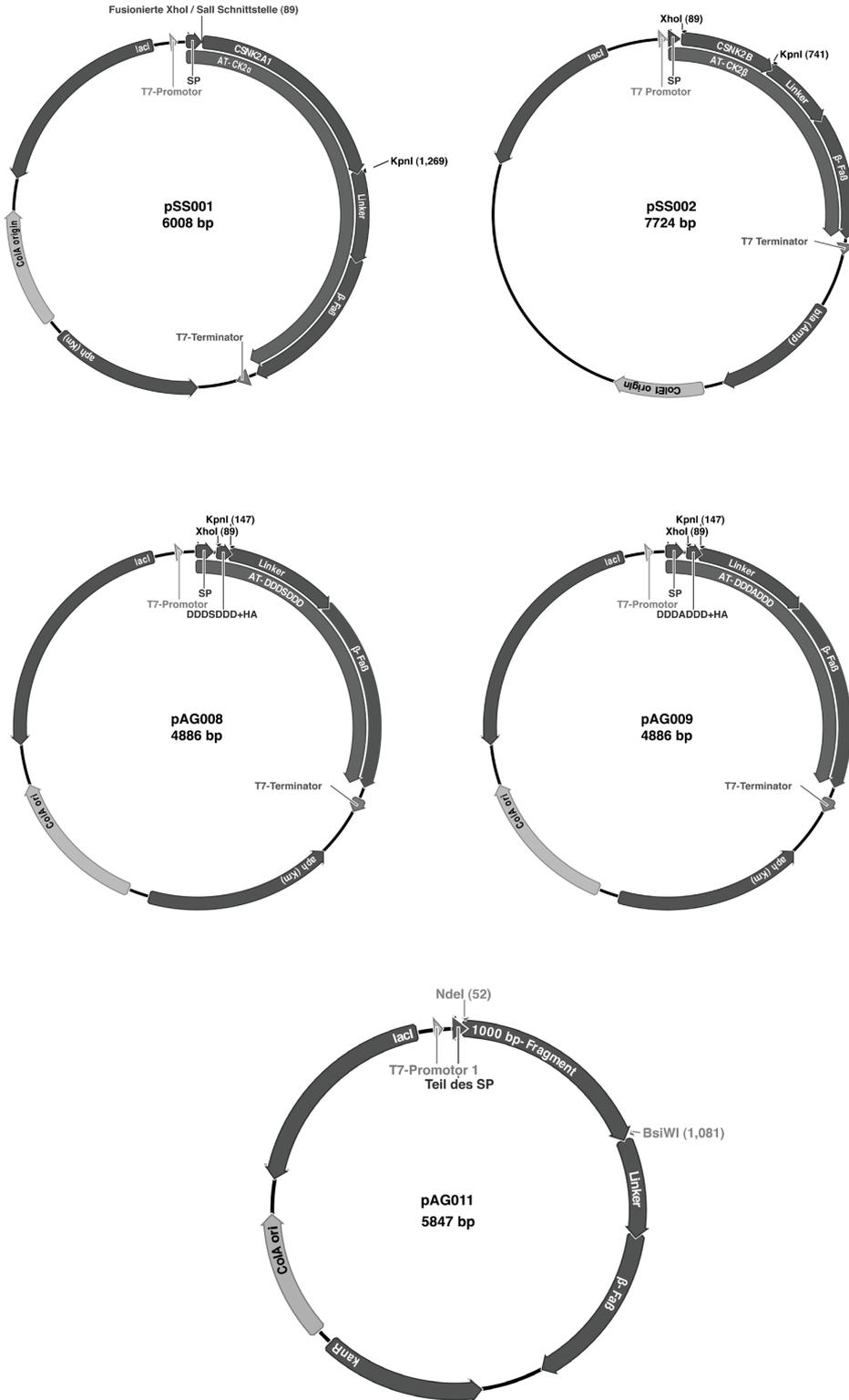
3) KP7 (N-terminal verkürztes α_{S1} -Casein, 16 AS):

```
PTAHENYEKNNVMLQW
```

4) Nitrilase aus *Alcaligenes faecalis* (UniProt: P20960, 358 AS)

```
EQTRKIVRAAAVQAASPNYDLATGVDKTIELARQARDEGC DLIVFGETWLPGYPFH
VWLGAPAWSLKYSARYYANSLSDSAEFQRIAQAARTLGIFIALGYSERSSGSLYLGG
CLIDDKGQMLWSRRKLPPTHVERTVFGEGYARDLIVSDTELGRV GALCCWEHLSPL
SKYALYSQHEAIIHAAWPSFSLYSEQAHALSAKVNMAASQIYSVEGQCFTIAASSVVT
QETLDMLEVGEHNASLLKVGSSMIFAPDGRTLAPYLP HDAEGLIADLNMEEIAF
AKAINDPVGHYSKPEATRLVLDLGHREPMTRVH SKSVIQEEAPEPHVQSTAAPVAV
SQTQSDTLLVQEPS
```

3. Plasmidkarten



4. Veröffentlichungen

Zeitschriftenbeiträge

Götz, C., Gratz, A., Kuckländer, U., Jose, J. TF, a selective inhibitor of human protein kinase CK2 induces apoptosis in prostate cancer cells. (Manuskript in Vorbereitung).

Gratz, A., Stephan, S., Götz, C., Jose, J. Functional surface display of heterotetrameric human protein kinase CK2 in *Escherichia coli*. (Manuskript in Vorbereitung).

Kuckländer, U., Bollig, R., Frank, W., Gratz, A., Jose, J. (2010) Antitumor products from DDQ as electrophile in the Nenitzescu reaction. *Bioorg Med Chem* (eingereicht)

Zouhair B., Samar I., Le Borgne M., Jose J., Gratz A., Götz C., Di Pietro A., Falson P. Arnaud O. (2010) Targeting casein kinase 2 in drug discovery: identification of new chemical entities. *Bull Cancer* 97:S68-9.

Gratz, A., Götz, C., Jose, J. (2010) A CE-based assay for human protein kinase CK2 activity measurement and inhibitor screening. *Electrophoresis* 31:634-40.

Gratz, A., Götz, C., Jose, J. (2010) A FRET-based microplate assay for human protein kinase CK2, a target in neoplastic disease. *J Enzyme Inhib Med Chem* 25:234-9.

Gratz, A. and Jose, J. (2008) Protein domain library generation by overlap extension (PDLGO): a tool for enzyme engineering. *Anal Biochem* 378:171-6.

Buchkapitel

Gratz, A., Jose, J. Focussing mutations within random libraries to distinct areas: Protein domain library generation by overlap extension (PDLGO). In *Methods in Molecular Biology: cDNA Libraries: Methods and Applications*, Browse, J., Lu, C. and Wallis, J.G. (Eds.), Humana Press, 2010 (im Druck).

Erfindungsmeldung

Jose, J., Gratz, A., Götz, C., Kuckländer, U. (2010) Anwendung eines substituierten Benzofurans als hochpotenter Kinaseinhibitor zum Einsatz als Tumordiagnostikum und -therapeutikum.

Tagungsbeiträge

Vorträge

Development of a CE based assay for evaluation of human protein kinase CK2 inhibitors. DPhG Doktorandentagung 18.-21. November 2009, Pichlarn, Österreich.

A novel *in vitro* assay for human protein kinase CK2 inhibitors based on capillary electrophoresis with UV detection. (Ref.: R5) XVIIIth European Conference of GP2A, 3.-4. September 2009, Trinity College Dublin, Irland.

A new method for directed evolution: protein domain library generation by overlap extension (PDLGO). (Ref.: V2.7) **(1. Preis)**

DPhG Doktorandentagung 6.-8. September 2006, Nürnberg-Heroldsberg

Poster

Zouhair B., Samar I., Le Borgne M., Jose J., Gratz A., Götz C., Di Pietro A., Falson P. Arnaud O. (2010) Targeting casein kinase 2 in drug discovery: identification of new chemical entities. (Ref.: A735ZB)

5^{èmes} Journées Scientifiques du CLARA, 30.-31. März 2010, Lyon, Frankreich.

Gratz, A., Bollig, R. Kuckländer, U., Jose, J. (2010) Identification of novel human protein kinase CK2 inhibitors. (Ref.: HMC59)

Frontiers in Medicinal Chemistry (GDCh), 14.-17. März 2010, Münster.

Gratz A., Götz C., Jose J. (2009) A non-radiometric inhibitor test for human protein kinase CK2 based on capillary electrophoresis with UV detection. (Ref.: A93)

DPhG Jahrestagung 28. September-01. Oktober 2009, Jena.

Gratz A., Götz C., Maas R., Jose J. (2008) Peptides on a bug: fluorescence activated cell screening of potential human protein kinase CK2 inhibitor libraries. (Ref.: A28)

DPhG Jahrestagung 8.-11. Oktober 2008, Bonn.

Gratz A., Jose J. (2007) Ein neues Werkzeug für die gerichtete Evolution von Protein-domänen: Protein Domain Library Generation by Overlap extension (PDLGO).

(Ref.: P1.5.10)

Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses, 26. Juni 2007, HHU Düsseldorf.

Gratz A., Jose J. (2006) PDLGO: A novel method for directed evolution of protein domains. (Ref.: C32)

DPhG Jahrestagung 4.-7. Oktober 2006, Marburg.