

1.1 Proteinkinasen

Die *reversible kovalente Modifikation* von Proteinen stellt einen wichtigen Mechanismus zur Aufrechterhaltung physiologischer Bedingungen (Homöostase) dar. Besonders bedeutsam ist in diesem Zusammenhang die regulierende Funktion durch Proteinkinasen. Proteinkinasen sind Enzyme, die zur Klasse der Transferasen gezählt werden (EC 2.7)¹ und spezifisch die Phosphorylierung von Aminosäureseitenketten (z. B. Serin, Threonin, Tyrosin) im Zielprotein katalysieren. Als Phosphat-Donor dienen dabei die γ -Phosphatgruppen des Co-substrates Adenosin-5'-triphosphat (ATP) und / oder in Einzelfällen auch anderer Nukleotide (z. B. GTP). Die Reaktionen der Proteinkinasen werden durch *Proteinphosphatasen* umgekehrt, welche die Hydrolyse der gebundenen Phosphatgruppe katalysieren (siehe Bild 1.1) [1, 2].

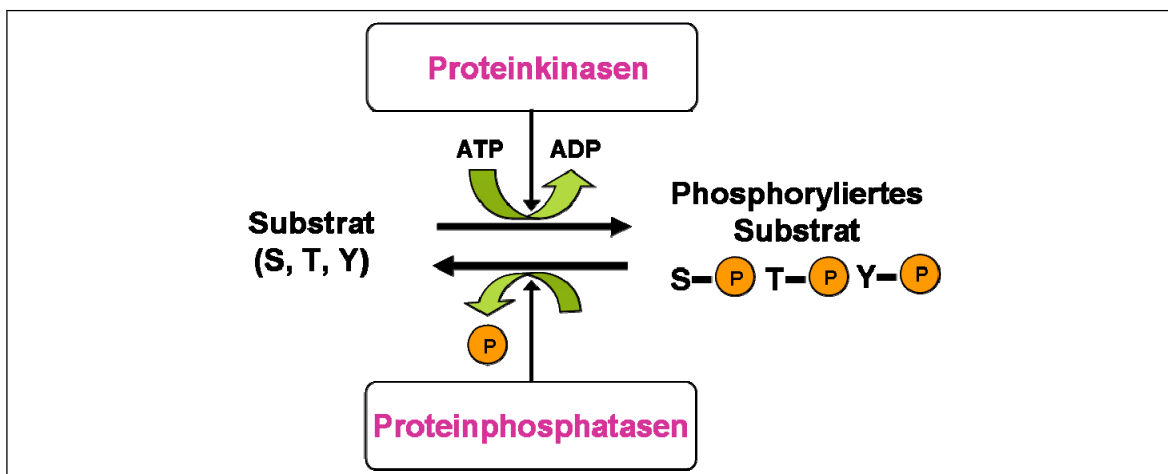


Bild 1.1: Katalysierte Reaktionen von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen.

¹ EC-Nummer: Enzyme werden aufgrund des Typs der von ihnen katalysierten Reaktion in sechs Hauptklassen eingeteilt, innerhalb dieser Hauptklassen erfolgt eine Einteilung in weitere Untergruppen bezüglich der jeweils umgesetzten chemischen Bindung. Jedem Enzym wird hier ein Klassifizierungscode (EC-Nummer) aus vier Ziffern zugeteilt, wobei die erste Ziffer die Hauptklasse bezeichnet.

Proteinkinaseaktivität wurde zum ersten Mal 1954 von G. KENNEDY bei einer Phosphorylierung des *in vitro*-Substrates Casein beobachtet. Mit der Entdeckung der Glykogenphosphorylase-Kinase (PhK) im Jahr 1955 durch E. Krebs und E. FISCHER konnte zum ersten Mal einer Proteinkinase eine spezifische biologische Funktion zugeordnet werden. In den folgenden 13 Jahren wurde zunächst die Phosphorylierung von Serin-Resten als eine spezifische Eigenschaft des Glykogen-Metabolismus angesehen. Ein Durchbruch in der Proteinkinaseforschung fand aber erst 1968 durch Entdeckung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (cAPK; EC 2.7.11.11) statt. Diese aktiviert die PhK, leitet dadurch die Glykogenolyse ein und war somit das erste Beispiel für die Teilnahme einer Proteinkinase an einem kaskadenartigen Signalübertragungsprozess. In der Folgezeit stellte sich zudem heraus, dass cAPK mit einem außergewöhnlich breitem Substratspektrum (Pleiotropie) ausgestattet ist. Sie ebnete den Weg für die Identifizierung einer unglaublichen Vielfalt an Proteinkinasen. Wegen ihrer überragenden Bedeutung wird sie auch als Proteinkinase A (PKA, PKA-C) bezeichnet [3].

Heute weiß man, dass die reversible Phosphorylierung von Proteinen ubiquitär verbreitet ist und nahezu alle Prozesse im zellulären Leben (und Tod) beeinflusst. Durch die Modifizierung der biologischen Aktivität eines Substrats werden zelluläre Prozesse wie Metabolismus, Transkription, Zellzyklus, Bewegung des Zytoskeletts, Apoptose und Differenzierung reguliert. Proteinkinasen gehören zu den größten Proteinfamilien höherer Zellen, wobei ca. 2% aller Gene in Eukaryoten Abschnitte für Proteinkinasen enthalten. Man nimmt an, dass 30% der menschlichen Proteine einer Phosphorylierung unterliegen, und daher überrascht es nicht, dass das menschliche Genom für 518 Proteinkinasen zur Durchführung dieser vielfältigen Aufgaben kodiert. Die Gesamtheit (Komplement) aller Proteinkinasen, die im Genom einer bestimmten Spezies kodiert sind, wird als „Kinom“ bezeichnet [3-5].

1.1.1 Einteilung der Proteinkinasen

Basierend auf der Einteilung von S. K. HANKS und T. HUNTER in fünf Gruppen mit Familien und Subfamilien wurden von G. MANNING et al. im Jahr 2002 478 der 518 humanen Proteinkinasen in neun Gruppen (acht Hauptgruppen: AGC, CAMK, CMGC, RGC, TK TKL, STE und CK1; eine Gruppe „Andere“) eingeteilt. Die Klassifizierung basiert in erster Linie auf einem Sequenzvergleich der hochkonservierten, ca. 250 bis 300 Aminosäuren umfassenden, katalytischen Domänen. Diese 478 Proteinkinasen werden einer einzelnen Superfamilie, den so genannten „eukaryotischen Proteinkinasen“² (ePKs) zugeordnet. Mit Hilfe eines Dendrogramms³ der humanen ePKs lässt sich die „Verwandtschaft“ der katalytischen Domänen und deren Einteilung verdeutlichen (siehe Bild 1.2).

Die übrigen 40 Proteinkinasen werden der Gruppe der „atypischen“ Proteinkinasen (aPKs) zugeteilt. Sie sind zwar biochemisch als Kinasen aktiv, zeigen aber eine zu geringe Sequenzhomologie zu den katalytischen Domänen der anderen „typischen“ Proteinkinasen. Zudem ist die Gruppe „Andere“ eingeführt worden, die verschiedene Proteinkinasefamilien enthält, welche allen anderen Gruppen nicht zugeordnet werden können [5, 6].

² Der in der Praxis häufig benutzte Begriff „eukaryotische Proteinkinasen“ wurde in den 1990er Jahren v. a. durch die Arbeiten von S. K. HANKS und T. HUNTER zur Klassifizierung der Proteinkinasen geprägt. Streng genommen ist diese Benennung allerdings falsch, da ePKs ubiquitär verbreitet sind. Trotzdem wird sie in der Literatur noch immer als eine Art „Arbeitsname“ verwendet.

³ Dendrogramm (griech. δένδρον Baum) dient der Darstellung einer statistischen Clusteranalyse. Objekte werden nach Ähnlichkeit der Merkmalsausprägung zu so genannten Clustern gruppiert.

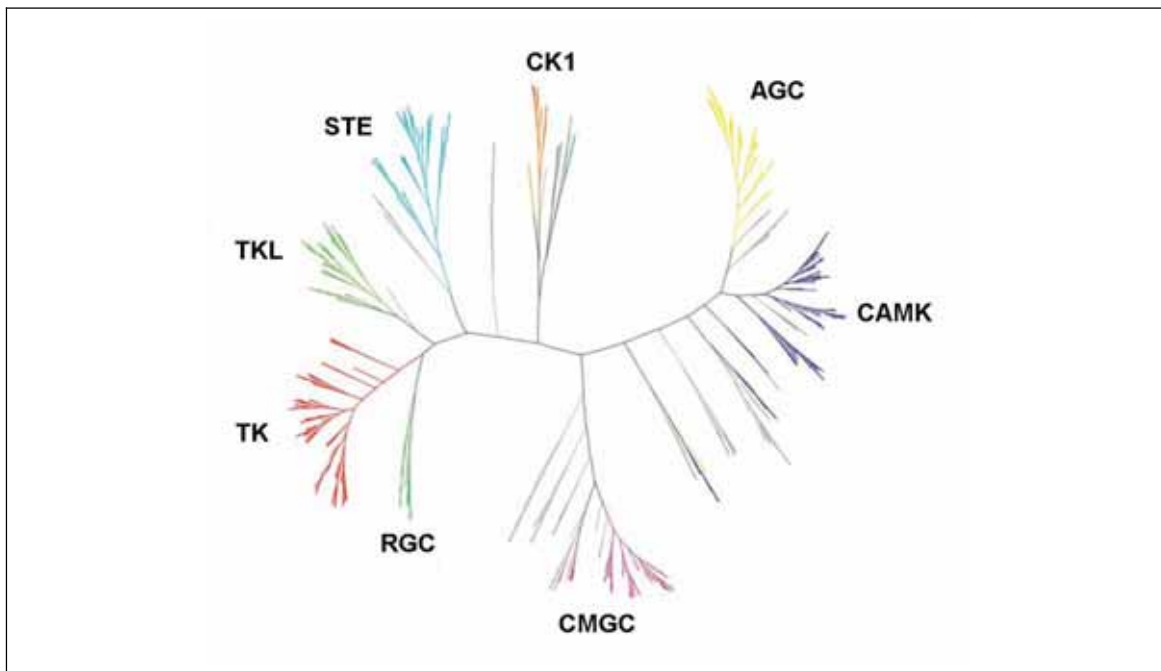


Bild 1.2: Dendrogramm der ePK-Sequenzdomänen aus den 478 Proteinkinasegenen des Human-genoms. Hauptgruppen: CK1 (casein kinase 1), AGC (PKA, PKG und PKC), CAMK (Calcium/Calmodulin-regulated), CMGC (CDK, MAPK, GSK und CLK), RGC (receptor guanylate cyclase), TK (tyrosine kinase), TKL (tyrosine kinase like), STE (MAPK cascade kinases STE7, STE11, STE20). Modifiziert nach [5]. Abkürzungen: CDK, cyclin dependant kinase; MAPK, mitogen activated protein kinase; GSK, glycogen synthase 3 kinase; CLK, CDC like kinase; STE, sterile protein.

Ausgehend von ihrer Substratspezifität lassen sich die Proteinkinasen in Serin/Threonin- und Tyrosinkinasen unterscheiden. Die meisten Tyrosinkinasen existieren als Teil transmembranärer Rezeptoren (Rezeptor-Tyrosinkinasen, RTK), während die anderen Familien frei im Zytosol oder in einigen Fällen auch im Zellkern vorliegende nicht-rezeptorgebundene Tyrosinkinasen (NRTK) darstellen. Die Tyrosinkinasen bilden eine eigenständige Gruppe, da sie ausschließlich Tyrosinreste phosphorylieren. Dagegen phosphorylieren Proteinkinasen aller anderen Gruppen primär Serin- und Threoninreste, sind aber teilweise auch in der Lage, Tyrosinreste zu phosphorylieren [7, 8].

Ausgenommen von der Klassifizierung in ePKs und aPKs sind die erst in den 80er Jahren des vorigen Jahrhunderts beschriebenen Protein-Histidinkinasen. Diese werden überwiegend in Prokaryoten, aber auch in Pilzen und Pflanzen gefunden und stellen mit inzwischen über 500 Vertretern eine eigene „Superfamilie“ dar [9].

1.1.2 Die katalytischen Domänen der ePKs

Die katalytischen Domänen (auch: Kinasedomänen) der ePKs beheimaten das katalytische Zentrum und vermitteln somit die katalytische Aktivität des Enzyms. Drei wichtige grundsätzliche Funktionen können diesen Domänen zugeschrieben werden [7]:

- 1.) Bindung und Orientierung des Cosubstrats ATP (oder seltener GTP) als Phosphatdonor im Komplex mit einem zweiwertigen Kation (gewöhnlich Mg^{2+} oder Mn^{2+})
- 2.) Bindung und Orientierung des Protein- oder Peptidsubstrates
- 3.) Übertragung der γ -Phosphatgruppe von ATP (oder GTP) auf den Akzeptor, sprich die Hydroxylgruppe von Serin, Threonin oder Tyrosin des jeweiligen Proteins.

Die hohe Homologie unter den einzelnen Kinasedomänen spiegelt sich darin wider, dass sie alle in topologisch gleichartige dreidimensionale „Kern“-Strukturen gefaltet sind. Zudem ist den ePKs der Mechanismus der Phosphatübertragung gemein. Mit Hilfe der Kristallstruktur der katalytischen Untereinheit der cAPK (PKA-C α) im Jahr 1991 konnte zum ersten Mal die Struktur einer PK aufgeklärt und daraus funktionelle Eigenschaften abgeleitet werden. Kristallstrukturen von ePKs (z. B. CDK2, ERK2 und CK1) in den folgenden Jahren bestätigten einen grundsätzlich ähnlichen strukturellen Aufbau der katalytischen Domäne [10]. Die cAPK gilt auch heute noch als „Musterbeispiel“ einer Proteinkinase, daher werden im Folgenden auf sie Bezug nehmend die strukturellen Eigenschaften von Proteinkinasen vorgestellt.

Die Kinasedomänen stellen „zweiblättrige“ Strukturen aus einem kleineren N-terminalen (*N-terminal lobe*) und einem größerem C-terminalen Bereich (*C-terminal lobe*) dar (siehe Bild 1.3). Der N-terminale Bereich wird dominiert von antiparallelen β -Faltblattstrukturen ($\beta 1$ bis $\beta 5$) und einer langen α -Helix (αC),

während der C-terminale Bereich bis auf wenige Ausnahmen α -helikal ist. Beide Bereiche werden durch die so genannte *hinge*⁴ *region* miteinander verbunden, welche Teil des katalytischen Zentrums ist.

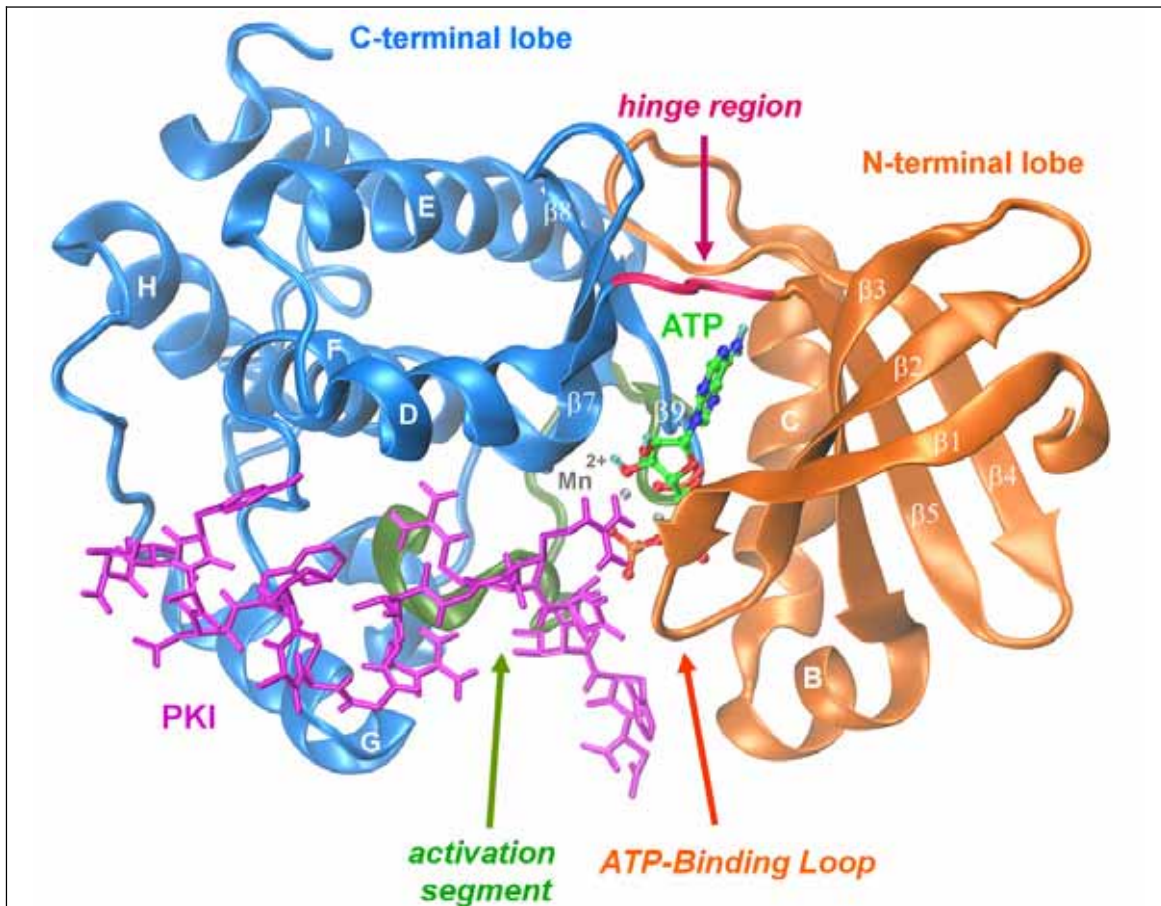


Bild 1.3: Kristallstruktur der katalytischen Domäne der cAMP-abhängigen Proteinkinase cAPK (pdb code⁵: 1atp; Aminosäuren 40-300) im ternären Komplex mit 2 Mn^{2+} -Ionen, dem Co-substrat ATP und dem Pseudosubstrat-Peptidinhibitor PKI (5-24; an Position 21 ist Ser durch Ala substituiert) [11]

Während ATP im Komplex mit zwei Mn^{2+} -Ionen in der *Active Site* bindet, liegt die Bindungsstelle des Substratpeptids in der Peripherie der Bindungstasche an Aminosäureresten des C-terminalen Bereiches. Der N-terminale Bereich ist primär an der Verankerung und Orientierung von ATP beteiligt. Der C-terminale

⁴ hinge, engl.: Scharnier

⁵ pdb code = Identifizierungscode der Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB)

Bereich ist dagegen verantwortlich für die Substratbindung und für die Initiierung des Phosphat-Transfers. Besondere Bedeutung kommt den β -Strängen $\beta 1$ und $\beta 2$ zu, da sie als eine „Klappe“ (*flap*) fungieren, durch die der ATP-Mg²⁺-Komplex in der Bindungstasche eingeschlossen wird. $\beta 1$ und $\beta 2$ werden durch einen glycinreichen *Loop*⁶ (Sequenzmotiv: G-X-G-X-X-G-X-V) verbunden, welcher hochflexibel ist und einen engen Kontakt des Nukleotids mit den Protein-*Backbone*⁷-Atomen in diesem Bereich ermöglicht (dieser *Loop* wird auch als *ATP-Binding Loop* oder *P-Loop* bezeichnet) [7].

Die Adenin-Base liegt im hydrophoben Bereich der Bindungstasche, in dem auch z. B. Met120 liegt. Außerdem wechselwirkt sie via Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren Glu121 und Val123 der *hinge region*. Die Ribose bildet Wasserstoffbrücken mit variablen Aminosäuren der N- und C-terminalen Domäne (z. B. Glu127) aus. Der $\beta 3$ -Strang enthält ein hochkonserviertes Lysin (Lys72 in cAPK), welches durch Wechselwirkung mit den α - und β -Phosphatgruppen zur Orientierung und Verankerung von ATP in der Bindungstasche beiträgt (siehe Bild 1.4). Diese Wechselwirkungsgeometrie wird durch Ausbildung einer Salzbrücke zwischen Lys72 und der Aminosäure Glu91 von Helix C stabilisiert. Man nimmt an, dass diese Salzbrücke in den katalytischen Wechselwirkungsgeometrien aller ePKs konserviert ist und die Orientierung der α C-Helix essentiell für die Aktivität von Ser/Thr-Kinasen ist. In Ser/Thr-Kinasen, die sowohl in aktiver als auch in inaktiver Form vorliegen können, wie im Fall von cAPK oder CDK2, wurde die α C-Helix in jeweils verschiedener Anordnung gefunden [7, 12, 13].

⁶ loop, engl.: Schleife

⁷ backbone, engl.: Rückgrat