

## Human Cytomegalovirus의 UL97 단백질 인산화 효소의 기질 특이성 연구를 위한 Peptide Library의 스크리닝

경북대학교 의과대학 분자의학교실

백 문 창

### Screening of Peptide Libraries to Investigate the Substrate Specificity of UL97 Protein Kinase from Human Cytomegalovirus

Moon-Chang Baek

*Department of Molecular Medicine, School of Medicine, Kyungpook National University,  
101 Dongin-Dong, Jung-Gu, Daegu 700-422, Korea*

Received : May 1, 2006

Accepted : June 8, 2006

Human cytomegalovirus encodes an unusual protein kinase UL97 which can phosphorylate exogenous substrates, including histone H2B and nucleoside analogs such as ganciclovir. The previous result interestingly showed that the peptides phosphorylated by UL97 have K/R at the 5 positions (P+5) downstream from the pSer. To confirm the importance of the basic residue in the position, we used two peptide libraries, 4S4K (MAXXXSXXXXKXANN) and 4S6N (MAXXXSXXXXXNNN). The activity of phosphorylation by UL97 was higher in the peptide library 4S4K than 4S6N, suggesting the importance of basic residue at P+5 position. The screening with a peptide library 4S4K showed slight tendencies for N in the P+1 and P+2, M in the P+2, K in the P+4 and P+6 positions and several amino acids in the other positions. This result will give information to develop an optimal peptide for screening a novel UL97 inhibitor.

**Key Words:** Human cytomegalovirus, Protein kinase UL97, Peptide substrate, Peptide library

## 서 론

단백질 인산화 효소 (Protein kinase)는 여러 가지 생물학적 과정을 조절하기 때문에 그 효소가 기질을 인식하기 위해서는 각 인산화 효소의 특이성이 있어, 이들 효소에 대한 연구는 아주 중요하다. 일반적으로 단백질 인산화 효소가 반응하는 방식은 상당히 유사하지만 세포 내에 수 많은 단백질 인산화 효소들이 특정 기질만을 인식한다는 보고에서 알 수 있듯이, 그 인산화 효소의 기질 특이성이 전체 생물학적 반응에 있어서 아주 중요함을 알 수 있다 (10,11,23). Human Cytomegalovirus (HCMV)는 신생아나 면역력이 약한 성인에

서 치명적인 질병을 일으키는 herpesvirus로서, 이 바이러스는 UL97이라고 알려진 특이한 단백질 인산화 효소를 생성해 낸다 (14,21,21). 이 효소에 대한 기질은 acyclovir (22), ganciclovir (14,21)와 같은 항바이러스제 핵산 유도체와, 단백질로서는 UL44 (13), histone H2B (2) 등이 밝혀졌다. UL97은 자가 인산화 작용이 있고 (1), 외부의 단백질과 펩타이드를 인산화 할 수 있다 (1,2). 이 효소는 HvUL 단백질 인산화 효소계에 속하여 있으며, 이는 전형적인 단백질 인산화 효소가 가지고 있는 여러 가지 모티프를 가지고 있음에도 불구하고, 여러 가지 부분에서 변형이 많이 되어 있다 (5,15). 특히 N 말단에는 300 잔기 이상의 긴 도메인이 존재한다. UL97은 바이러스 감염 시에 중요한 역할을 하고 있고, 항바이러스제의 타겟이 되기도 한다. 이 단백질 인산화 효소는 HCMV가 살아가는 데 필수적이지는 않지만, 세포 배양 시에 HCMV 복제 시에 중요하다 (16). UL97은 바이러스 복제에서 nucleocapsid가 핵으로부터 나가는 시기 (nuclear egress)

\*Corresponding author: Moon-Chang Baek. Department of Molecular Medicine, School of Medicine, Kyungpook National University, 101 Dongin-Dong, Jung-Gu, Daegu 700-422, Korea.  
Phone: 053-420-4948, Fax: 053-426-4944,  
e-mail: mcbaek@knu.ac.kr

에 역할을 하는 것으로 알려져 있고 (12,24), 이 과정을 억제하는 항바이러스제는 잘 알려져 있지 않고 있다. 여러 가지 약들이 HCMV 감염을 치료하는 데 승인되어 왔지만, 이들은 약물 동력학, 독성, 저항성 등과 같은 문제점들에 의해 사용이 제한되고 있다 (8). UL97의 특이한 성질과 바이러스 복제 시의 중요한 역할 때문에, 새로운 약 개발에 중요한 타겟이 된다. 실제로, maribavir라고 불리는 새로운 약은 UL97 효소의 활성을 특이적으로 억제하고, HCMV 복제를 강력하게 억제하고 있다 (3,17). 이는 maribavir에 저항성을 갖는 바이러스는 UL97 단백질에 돌연변이가 있음을 통해 확인할 수 있다 (4). 최근에 특정 단백질 인산화 효소가 효과적으로 인식하는 아미노산 서열을 빠르게 결정할 수 있는 oriented peptide library가 개발되었다 (18,19). 이 방법을 통하여 PDX domain, SH domain, protein tyrosine kinase C를 포함한 여러 가지 단백질 인산화 효소가 인식하는 아미노산 서열이 밝혀졌다.

본 연구에서는, 펩타이드에 대한 UL97의 기질 특이성을 알아보기 위하여, oriented peptide library를 이용하여 펩타이드에 대한 UL97의 기질 특이성을 연구하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 세포 및 바이러스

*Spodoptera frugiperda* 9 cells (Sf9)은 American Type Culture Collection으로부터 구입하였고, 10% fetal bovine serum (Atlanta Biologicals, laurenceville, GA, USA), 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin B를 포함하는 Grace's insect medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 배양하였다. 정상과 돌연변이 K355Q glutathione S-transferase (GST)-UL97을 발현시키는 baculovirus는 일반적인 방법에 따라 배양 및 이용을 하였다 (6).

### 2. Baculovirus 발현 GST-UL97 과 GST-UL97K355Q의 정제

모든 컬럼용 시약은 Amersham Bioscience로부터 구입되었다. Baculovirus에 의해 발현된 GST-UL97과 GST-UL97K355Q는 전에 보고한 방법처럼 정제되었다 (2). 간략히, 먼저 glutathione-Sepharose affinity 컬럼을 이용하고, 다음으로 Q-Sepharose 컬럼과 phenyl-Sepharose 컬럼을 이용하였고, 이를 Centricon-30를 이용하여 농축하고 투석을 하였다. 최종 얻어진 단백질은 SDS-PAGE를 통하여 순수하게 분리되었음을 확인하였고, amino acid analysis를 통하여 단백질 농도를 결정하였다.

### 3. Peptide library 합성

Degenerate 펩타이드 합성은 미국의 Tufts 대학의 Peptide BioSynthesizer (Milipore Model)를 이용한 BOP/HOBt 커플링 방법에 따라 수행되었다 (18,19). Degenerate peptide library로 4S6N : MAXXXSXXXXXXNNN과 4S4K : MAXXXSXXXXXK-XANNN이 이용되었다. X는 Cys, Trp, Ser, Thr, Tyr을 제외한 모든 아미노산을 포함하고 있다.

### 4. Protein kinase assay

GST-UL97 (3 mg/ml) 5 µl를 1 mg의 degenerate peptide library, 100 µM ATP, [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP (약  $6 \times 10^6$  cpm)을 포함하는 mixture에 넣고 30°C에서 2시간 동안 반응을 시킨다. 반응은 acetic acid를 최종 15%가 되도록 넣어 끝낸다.

### 5. Phosphopeptide의 분리

인산화 반응이 끝난 혼합물을 미리 30% acetic acid로 equilibrium시킨 1-ml DEAE-sephacel column에 넣고, 30% acetic acid를 넣어 처음 600 µL는 제거하고, 다음 1 ml을 모은다. 이 분획에는 [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP가 존재하지 않는다. 이를 Speed-Vac을 이용하여 건조시킨다. 두 개의 library의 상대적인 인산화 활성을 측정하기 위해 일부를 취해 LSC (Liquid Scintillation Counter)를 이용하여 확인하였다. 다음으로 ferric chelation column (IDA beads, Pierce)을 이용하여 phosphopeptide를 선택적으로 얻는다. 1 ml의 IDA beads를 5 ml의 20 mM ferric chloride로 활성을 시킨 다음, 8 ml의 물과 6 ml의 500 ml ammonium bicarbonate로 씻고, 다시 6 ml의 물로 씻는다. buffer A (50 mM MES, 1 M NaCl, pH 5.5)을 포함하는 버퍼로 equilibrate시키고, 앞에서 건조된 peptide/phosphopeptide mixture를 200 µl buffer A에 녹여 ferric 컬럼에 넣는다. 다음에 3 ml의 buffer A와 2 ml의 물로 씻고, 2 ml의 0.1% (NH<sub>4</sub>)OAc (pH 9.5)를 넣고, 다음으로 2 ml의 0.1% (NH<sub>4</sub>)OAc (pH 11.5)를 넣는다. 마지막으로 4 ml의 100 mM EDTA로 Fe<sup>3+</sup>를 얻어낸다.

### 6. 서열 결정 및 데이터 분석

약 1~2 nmol의 phosphopeptide mixture가 sequencer에 들어간다. UL97에 optimal한 peptide motif를 결정하기 위해서, degenerate position에 있는 각각의 아미노산의 양을 normalize 하고, control 실험과 kinase 실험군의 sequence를 normalize 한다. Kinase 실험군에서 control 실험값을 빼준다. 다음으로 상대적인 abundance를 계산해낸다. 다음으로 degenerate position에 포함된 전체 아미노산의 수로 normalize한다. 이를 그래프를 이용하여 그림으로 보여주었다. 펩타이드 라이브러리

리의 결과를 해석할 때, 그림을 보면 특정 위치 (예, cycle 9)의 특정 아미노산 잔기 (Methionine)가 전 (cycle 8) 후 (cycle 10)의 양에 비하여 증가가 있을 경우에 그 위치에서 특정 아미노산의 경향성이 있음으로 표현하였다 (각 cycle에서 가장 높은 아미노산으로 결정하는 것은 아님).

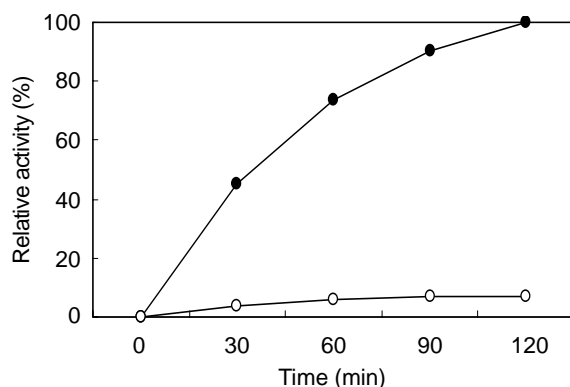
## 결과 및 고찰

### 1. GST-UL97의 순수 정제

HCMV UL97은 histone H2B를 인산화 시킬 수 있고, 이로 부터 얻어진 합성 펩타이드인 RKESYSVYVYKV를 인산화 시킬 수 있다는 것이 보고 되었다. 이 결과로부터 UL97 단백질 인산화 효소에 대해 가장 적절한 peptide의 순서를 밝히고자 하였다. 본 실험에서는 synthetic degenerate peptide library를 이용하여 이를 밝혀내고자 한다. GST-UL97을 순수하게 분리 정제하는 단계에 있어서 다른 단백질 인산화 효소의 활성 가능성을 제거하기 위하여, GST-UL97K355Q라는 돌연변이 단백질을 이용하였다 (9). 이 돌연변이 단백질은 효소 활성에 중요한 Lys-355 잔기를 Gln-355으로 치환시켜 그 활성이 없다. 정상 GST-UL97과 동일한 조건하에서 분리된 GST-UL97K355Q가 효소 활성이 없는 것으로 보아 정상 GST-UL97이 순수하게 분리 정제 되었음을 알 수 있었다 (2).

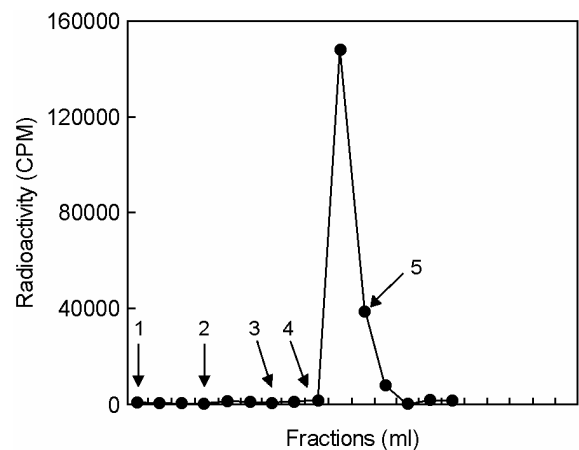
### 2. Degenerate peptide library의 제조

GST-UL97은 histone H2B를 인산화 시킬 수 있으며, 인산화 되는 위치를 밝혀 보고한 적이 있다. 더 나아가서 H2B로부터 유도된 합성 펩타이드가 UL97에 의해 인산화됨을 보

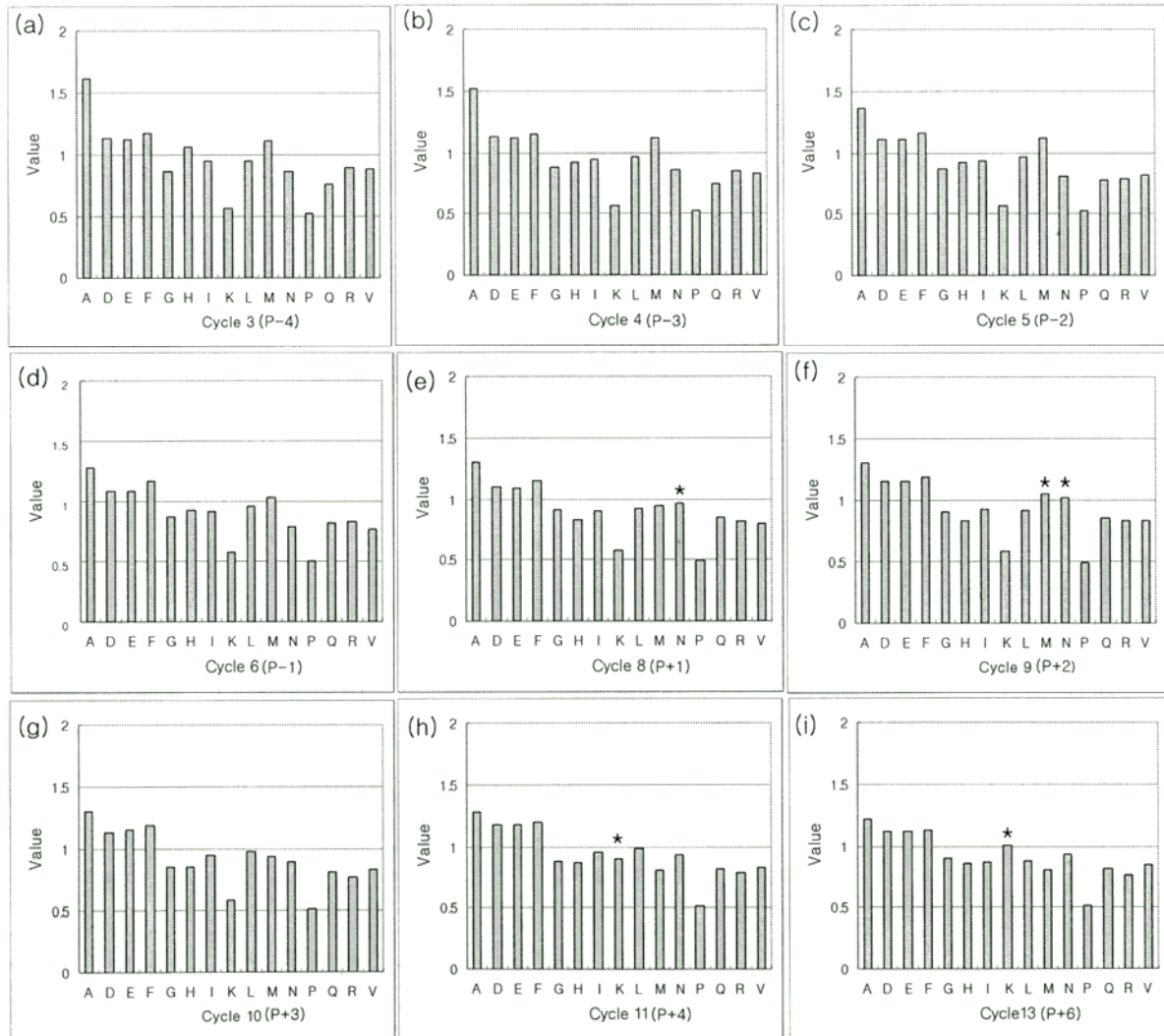


**Figure 1.** Time courses and relative activities of two peptide libraries by UL97. Two peptide libraries, 4S6N (Met-Ala-X-X-X-X-Ser-X-X-X-X-X-A-N-N-N) (○) and 4S4K (Met-Ala-X-X-X-X-Ser-X-X-X-X-X-K-X-A-N-N-N) (●), were phosphorylated by GST-UL97 in the presence of ATP, with aliquots at the indicated time. After separating the [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP from the peptides on a DEAE-sephacel column, the radioactivities were measured by using liquid scintillation counter (LSC).

고하였다 (2). 본 연구에서는 특이한 UL97의 기질 특이성을 degenerate peptide library를 이용하여 더 정확히 알아보하고자 한다. 따라서 다음과 같은 두 가지 degenerate peptide library를 이용하였다. 4S6N: Met-Ala-X-X-X-X-Ser-X-X-X-X-X-A-N-N-N과 4S4K: Met-Ala-X-X-X-X-Ser-X-X-X-X-X-K-X-A-N-N-N. 여기에서 X는 tryptophan, cysteine, tyrosine, serine, threonine을 제외한 모든 아미노산을 나타낸다. Tryptophan과 cysteine은 sequencing과 산화의 문제점을 피하기 위하여 생략되었고, tyrosine, serine, threonine이 제외된 이유는, 7번 위치의 Ser만이 인산화 될 수 있도록 하기 위한 것이다. 첫 번째 library의 경우는 UL97에 의해 인산화의 효율이 두 번째에 비하여 10배 이상 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 즉, P+5 위치의 K가 중요함을 알 수 있었다 (Fig. 1). 또한 37도에서 2시간 정도 반응 하였을 때, 인산화 반응이 정상에 도달하였다. 따라서 두 번째 library를 이용하여 실험을 진행하였다. 이 library의 전체 이론적인 degeneracy는  $15^9$  (38 443 359 375)이다. 네 개의 degenerate 잔기는 인산화되는 잔기의 N말단에 있고, 5개는 C말단에 있다. N말단의 Met-Ala은 아미노산 서열 결정 시 이 mixture로부터 얻어진 펩타이드들을 확인시켜 주기 위하여 넣어준 것이다. 이들 두 잔기들의 서열 결정은 또한 존재하는 펩타이드들의 정량값을 제공해 준다. 비슷하게, 14번 Ala은 두 번째 정량값을 줄 수 있고,



**Figure 2.** Quantitative separation of non-phosphorylated and phosphorylated peptides. A peptide library (Met-Ala-X-X-X-X-Ser-X-X-X-X-X-K-X-A-N-N-N) was phosphorylated by GST-UL97. After separating the [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP from the peptides on a DEAE-sephacel column, the peptide mixture was loaded on a column of ferric-IDA beads. The column was eluted with 3 ml of Buffer A (50 mM MES, 1 M NaCl, pH 5.5) (Arrow 1), 2 ml of water (Arrow 2), 2 ml of 0.1% (NH<sub>4</sub>)OAc pH 9.5 (Arrow 3) and 2 ml of 0.1% (NH<sub>4</sub>)OAc pH 11.5 (Arrow 4), 4 ml of 100 mM EDTA, pH 8.0 (Arrow 5); Solutions were added at the positions indicated by the arrows. All elutions were at 0.5 ml/min and 1 ml fractions were collected. The radioactivities at each fraction were expressed as c.p.m.



**Figure 3.** Substrate specificity of UL97 detected by the degenerate peptide library. The phosphopeptides produced by phosphorylating the serine-kinase substrate library with UL97 were sequenced. Each panel indicates the relative abundance of the 15 amino acids at a given cycle of sequencing. For example, (a) is cycle 3, the first degenerate position in the library mixture. Cycle 7 (not shown) is the site of phosphorylation (phosphoserine) and cycle 12 (not shown) is the site of lysine. Thus, (a-d) indicate amino acid preferences at positions -4, -3, -2, -1 amino terminal to the phosphorylation site, respectively, and (e-i) indicate, respectively preferences at positions +1, +2, +3, +4, +6 carboxy-terminal to the phosphorylation site. Value at y-axis indicates the relative amount of each amino acid at each cycle. The single-letter amino-acid code is used: A, Ala; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; Y, Tyr.

서열 결정하는 동안 얼마나 많은 양의 펩타이드들이 소실되었는지를 예상하도록 해준다. C말단의 poly asparagine은 전체적인 안정화에 기여한다.

### 3. Phosphopeptide의 분리

이 실험의 중요한 단계는 library에 과량의 non-phosphopeptide로부터 적은 양의 phosphopeptides를 정량적으로 분리하는 것이다. Phosphopeptide의 분리는 ferric iminodiacetic acid (IDA) 컬럼을 이용하여 수행되었다 (Fig. 2). Buffer A과

**Table 1.** Comparison of the conserved sequences of typical protein kinases with UL97 protein kinase

Kinases	Conserved Sequences
Cyclin-dependent kinase	XXXS/TPXKX
Protein kinase A	RRXS/TX
Protein kinase C	RXXS/TXRX
UL97 protein kinase	XXXXS/TXXXXK

물은 non-phosphorylated peptide의 99.9% 이상을 제거하면서도,  $^{32}\text{P}$ -labeled phosphopeptide에는 거의 영향이 없다. 90% 이상의 phosphopeptide가 0.1%  $(\text{NH}_4)\text{OAc}$  (pH 11.5)로 용출되어 나왔다. 그래서 nonphosphorylated peptide의 혼입없이 phosphopeptide mixture가 분리되어 나왔다.

#### 4. UL97을 위한 optimal peptide sequence

UL97에 대한 optimal peptide sequence는 뚜렷하게 나타나는 것 없이 일부 위치에서 약간의 경향성이 보였다 (Fig. 3). P+1 과 P+2 위치에 N에 대한 약간의 경향성을 보이고, P+2 위치에는 M에 대한 약간의 경향이 보인다. 그리고, P+4와 P+6에 K에 대한 약간의 경향성을 보인다. 기존에 발견된 인산화되는 펩타이드들과 비교하면 (Table 1) P+5 위치가 중요하다 하는 것을 제외하고는 크게 conserve된 sequence는 찾아보기 힘들었다. 펩타이드 라이브러리로부터 얻은 결과에서도 P-1과 P-2 위치에서 몇몇 아미노산에 대한 약간의 선호도를 보일 뿐 크게 conserve된 아미노산을 요구하지는 않는 것 같다. 이들 결과로부터 UL97은 P+5 위치의 K가 가장 conserve된 아미노산으로 추정된다. 이는 UL97이 Ganciclovir와 단백질을 동시에 기질로 이용할 수 있는 성질로 보아서 기질 특이성에 대해서 넓은 스펙트럼을 가지고 있는 것으로 보여진다. 일반적으로, 대부분의 단백질 인산화 효소는 P-3에서 P+3 위치의 특정 아미노산 잔기들이 기질 특이성에 중요하다 (20). 하지만 본 연구결과로부터 UL97에 의해서 인산화되는 펩타이드는 P+5 위치에 K를 포함하고 있을 경우 인산화가 잘 되는 것을 확인하였다. P+5 위치가 중요하는 점은 UL97이 다른 단백질 인산화 효소에 존재하는 기질을 인식하는 subdomain이 없다는 점과 관계가 있음을 보여준다. 특히 UL97은 P-3 위치에 basic 잔기를 안정화시키는 것으로 알려진 subdomain V와 VI 위치에 acidic 잔기가 결핍되어 있다. 그리고, 다른 단백질 인산화 효소의 P+1과 결합하는 subdomain VIII를 가지고 있지 않다 (7,20). 현재까지는, P+5 위치와 작용을 하는 단백질 인산화 효소는 잘 알려져 있지 않다. 따라서 이 특이한 UL97에 대한 구조 분석을 통하여, 효소의 어떤 부위가 기질의 P+5 위치와 작용을 하는지를 알아내는 것은 이 단백질 인산화 효소의 성질을 이해하는 데 도움을 줄 수 있을 것이다.

#### 감사의 글

이 논문은 2005년도 범석학술장학재단 연구비의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

## 참 고 문 헌

- 1) **Baek MC, Krosky PM, Coen DM:** Relationship between autophosphorylation and phosphorylation of exogenous substrates by the human cytomegalovirus UL97 protein kinase. *J Virol* **76**: 11943-11952, 2002.
- 2) **Baek MC, Krosky PM, He Z, Coen DM:** Specific phosphorylation of exogenous protein and peptide substrates by the human cytomegalovirus UL97 protein kinase. Importance of the P+5 position. *J. Biol. Chem* **277**: 29593-29599, 2002.
- 3) **Biron KK, Harvey RJ, Chamberlain SC, Good SS, Smith AA 3rd, Davis MG, Talarico CL, Miller WH, Ferris R, Dornsife RE, Stanat SC, Drach JC, Townsend LB, Koszalka GW:** Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-riboside with a unique mode of action. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 2365-2372, 2002.
- 4) **Biron KK, Harvey RJ, Chamberlain SC, Good SS, Smith AA 3rd, Davis MG, Talarico CL, Miller WH, Ferris R, Dornsife RE, Stanat SC, Drach JC, Townsend LB, Koszalka GW:** Interactions of 1263W94 with other antiviral agents in inhibition of human cytomegalovirus replication. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1468-1471, 2003.
- 5) **Chee MS, Lawrence GL, Barrell BG:** Alpha-, beta- and gammaherpesviruses encode a putative phosphotransferase. *J Gen Virol* **70**: 1151-1160, 1989.
- 6) **Crossen, R., and Gruenwald, S:** *In* Baculovirus Expression Vector System Manual, 5th ed. Pharmingen, San Diego, 1998.
- 7) **Hanks SK, Hunter T:** Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* **9**: 576-596, 1995.
- 8) **Hayden FG:** Antiviral agents (nonretroviral), pp. 1313-1347. *In* Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics, 10th ed, J.G. Hardman, L.E. Limbird, and A. G. Gilman (Ed.), McGraw-Hill, New York, N.Y. 2001.
- 9) **He Z, He YS, Kim Y, Chu L, Ohmstede C, Biron KK, Coen DM:** The human cytomegalovirus UL97 protein is a protein kinase that autophosphorylates on serines and threonines. *J Virol* **71**: 405-411, 1997.
- 10) **Johnson LN, Lowe ED, Noble ME, Owen DJ:** The Eleventh Datta Lecture. The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS Lett* **430**: 1-11, 1998.

- 11) **Johnson LN, Noble ME, Owen DJ:** Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**: 149-158, 1996.
- 12) **Krosky PM, Baek MC, Coen DM:** The human cytomegalovirus UL97 protein kinase, an antiviral drug target, is required at the stage of nuclear egress. *J Virol* **77**: 905-914, 2003.
- 13) **Krosky PM, Baek MC, Jahng WJ, Barrera I, Harvey RJ, Biron KK, Coen DM, Sethna PB:** The human cytomegalovirus UL44 protein is a substrate for the UL97 protein kinase. *J Virol* **77**: 7720-7727, 2003.
- 14) **Littler E, Stuart AD, Chee MS:** Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature* **358**: 160-162, 1992.
- 15) **McGeoch DJ, Coulter LJ, Moss HWM:** Vol. 1, pp. 391-393, In *The Protein Kinase Facts Book*, Hardie, G., and Hanks, S.(Ed), Academic Press, London, 1995.
- 16) **Prichard MN, Gao N, Jairath S, Mulamba G, Krosky P, Coen DM, Parker BO, Pari GS:** A recombinant human cytomegalovirus with a large deletion in UL97 has a severe replication deficiency. *J Virol* **73**: 5663-5670, 1999.
- 17) **Selleseth DW, Talarico CL, Miller T, Lutz MW, Biron KK, Harvey RJ:** In vitro activities of benzimidazole D- and L-ribonucleosides against herpesviruses. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2186-2192, 2003.
- 18) **Songyang Z, Blechner S, Hoagland N, Hoekstra MF, Pwnica-Worms H, Cantley LC:** Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Curr Biol* **4**: 973-982, 1994.
- 19) **Songyang Z, Cantley LC:** The use of peptide library for the determination of kinase peptide substrates. *Methods Mol Biol* **87**: 87-98, 1998.
- 20) **Songyang Z, Lu KP, Kwon YT, Tsai L-H, Filhol O, Cochet C, Brickey DA, Soderling TR, Bartleson C, Graves DJ, Demaggio AJ, Hoekstra MF, Blenis J, Hunter T, Cantley LC:** A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk. *Mol. Cell. Biol* **16**: 6486-6493, 1996.
- 21) **Sullivan V, Talarico CL, Stanat SC, Davis M, Coen DM, Biron KK:** A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature* **358**: 162-164, 1992.
- 22) **Talarico CL, Burnette TC, Miller WH, Smith SL, Davis MG, Stanat SC, Ng TI, He Z, Coen DM, Roizman B, Biron KK:** Acyclovir is phosphorylated by the human cytomegalovirus UL97 protein. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 1941-1946, 1999.
- 23) **Taylor SS, Radzio-Andzelm E, Hunter T:** How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase. *FASEB J* **9**: 1255-1266, 1995.
- 24) **Wolf DG, Courcelle CT, Prichard MN, Mocarski ES:** Distinct and separate roles for herpesvirus-conserved UL97 kinase in cytomegalovirus DNA synthesis and encapsidation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**: 1895-1900, 2001.