

1. Einleitung

Ein menschlicher Körper besteht aus ungefähr 30 Billionen Zellen, die in einer komplexen Gemeinschaft zusammenleben. Damit ein solcher Organismus seine biologische Architektur, Funktion und Gesundheit erhalten kann, ist eine unaufhörliche, wechselseitige Zusammenarbeit und Kontrolle erforderlich. Im Laufe der Evolution hat sich in den Zellen ein komplexes Netzwerk von Signalkaskaden entwickelt, das eine starke Regulation von Überleben, Teilung und Differenzierung erlaubt. Das Versagen von Kontrollmechanismen innerhalb dieser Strukturen hat deshalb gravierende Auswirkungen. Ein wichtiges Sicherungssystem in diesem Zusammenhang ist das zelleigene Suizidprogramm, welches eine Zelle ausführt, wenn sie beschädigt ist oder ihre Kontrollinstanzen gestört sind, die Apoptose.

Eine unkontrollierte Teilung von Zellen, bedingt durch eine gestörte Apoptose verursacht die krankhafte Veränderung eines Organismus. Schadhafte Zellen sollten bis zur Reparatur ihres Schadens die Teilung einstellen oder sich bei nicht reparablen Defekten selbst zerstören. Eine Blockade der Apoptose erlaubt hingegen beschädigten Zellen eine unregulierte Proliferation. So werden viele Krankheiten wie Tumore, neurodegenerative Erkrankungen und Autoimmunkrankheiten durch das Ungleichgewicht zwischen Leben und Tod von Zellen verursacht.

1.1. Apoptose

Um dieses genetisch determinierte und stark konservierte Zelltodprogramm zu untersuchen, bedient man sich des Nematoden *Caenorhabditis elegans* als Modell. So konnten die drei wichtigsten Proteine des programmierten Zelltodes charakterisiert werden: Ced-3, Ced-4 und Ced-9 ^{1, 2, 3, 4}. Während es sich bei Ced-9 um ein regulatorisches Protein handelt, das oberhalb des Apoptoseweges von Ced-3 und Ced-4 wirkt ⁵, identifizierte man Ced-3 und Ced-4 als essentiell für die Ausführung der Apoptose ^{4, 2}. Mittlerweile sind die funktionellen Homologe dieser Proteine in Säugetierzellen identifiziert. Bei Ced-3 handelt es sich um ein Mitglied der Caspase-Familie ⁶. Diese Cystein-Proteinasen (mit Spezifität für Asparaginsäurereste) spalten eine ganze Reihe von Proteinen ⁷. Die Proteolyse von Schlüsselsubstraten führt letztendlich zum Tod der Zelle. Caspasen mit dieser Funktion gehören zu den exekutiven, den Effektor-Caspasen. Die Caspasen liegen in der Zelle als inaktives Zymogen vor. Durch proteolytische Spaltung in kleinere Untereinheiten werden sie in ihre

aktive Form überführt. Diese Spaltung kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen. Die exekutiven Caspasen werden durch die Aktivität einer anderen Proteinase, meist einer Initiator-Caspase, gespalten. Solche Initiator-Caspasen werden durch Bindung von Adapterproteinen an ihre Pro-Domäne aktiviert ⁸. Durch die Beteiligung von Adapterproteinen werden Apoptosesignale der Zelle mit der Exekution der Apoptose verknüpft. Diese Adapterproteine sind es, die die zwei unterschiedlichen Apoptosewege der Zelle definieren: Einen intrinsischen, mitochondrial und einen extrinsischen, durch Membranrezeptoren ausgelösten Weg der Apoptose ¹.

1.1.1. Der mitochondrial vermittelte Apoptoseweg

Der mitochondriale Apoptoseweg, dargestellt in Abbildung 1.1.1, wird durch die Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie, die Ced-9 Homologe, kontrolliert ⁹. Diese Proteinfamilie gliedert sich in Unterfamilien mit anti-apoptotischen Proteinen (Bcl-2-Familie) und pro-apoptotischen Proteinen (Bax-Familie), welche homo- oder heterodimerisieren und damit die jeweilige Funktion hemmen oder verstärken ¹⁰. Viele, wenn auch nicht alle, Proteine dieser Familie sind lose an die mitochondriale Außenwand gebunden. Als Antwort auf apoptotische Reize oligomerisieren die Proteine der Bax-Familie und insertieren die Mitochondrienmembran ¹¹.

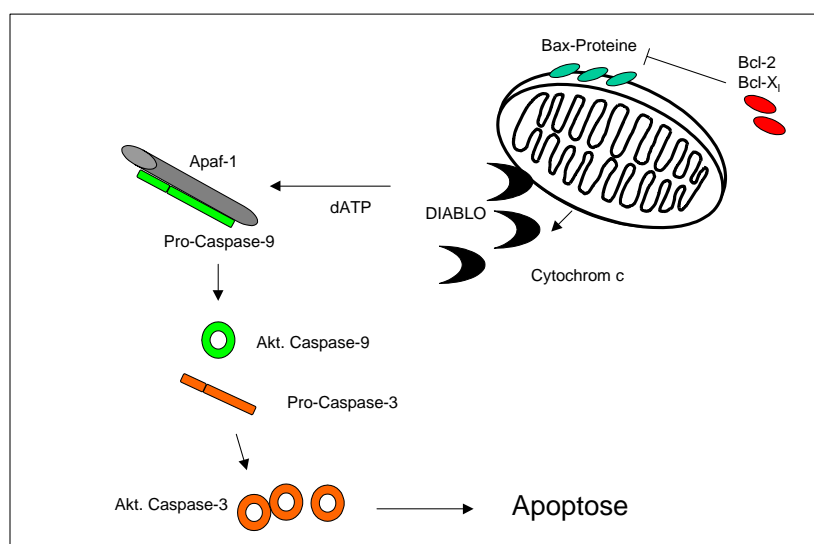


Abbildung 1.1.1. Der mitochondrial vermittelte Weg der Apoptose.

Infolgedessen wird Cytochrom *c* von den Mitochondrien freigesetzt ¹². Im Jahre 1997 wurde das Ced-4 Homolog Apaf-1 charakterisiert ¹³. Apaf-1 bildet aufgrund des freigesetzten Cytochrom *c* in

Gegenwart von dATP einen Komplex mit Pro-Caspase-9. Durch die Entstehung dieses sogenannten Apaf-1-Apoptosoms wird die Pro-Caspase-9 aktiviert und sorgt für die Spaltung und damit Aktivierung der Caspase-3, dem Exekutor der Apoptose ¹⁴.

1.1.2. Vermittlung der Apoptose über Mitglieder der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor (TNFR)-Familie

Die TNFR-Familie

Diese Rezeptorfamilie, von der bis jetzt 26 Mitglieder beschrieben werden konnten ¹⁵, gehört zu der TNF/NGF-Superfamilie. Sie spielt eine kritische Rolle in der Regulation von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und programmiertem Zelltod innerhalb des Immunsystems. Charakterisiert sind die Rezeptoren der Familie durch Cystein-reiche Wiederholungen von 40 Aminosäuren (As) innerhalb ihrer extrazellulären Domäne. Die cytoplasmatische Domäne ist weniger stark konserviert, enthält keine intrinsische katalytische Aktivität und variiert unter den Familienmitgliedern deutlich in ihrer Länge. Die Bindung ihres trimeren Liganden an die extrazelluläre Domäne induziert eine Trimerisierung der Rezeptoren und bildet so die Grundlage der Signalleitung ¹⁶. Dieses führt nachfolgend zur Rekrutierung von cytoplasmatischen Proteinen, die dann für die Weiterleitung des Signals sorgen. Aufgrund von Aminosäure-Motiven innerhalb der cytoplasmatischen Anteile lassen sich diese Rezeptoren in zwei Gruppen unterteilen.

Die Todesrezeptoren

Diese Rezeptoren enthalten eine homologe Sequenz innerhalb ihres cytoplasmatischen Anteils, die sogenannte Todesdomäne ^{1, 17, 18} (engl. death domain, DD), welche sie in die Lage versetzt, Apoptose auszulösen. Von dieser Gruppe von Rezeptoren können allerdings auch andere als apoptotische Signale ausgehen oder solche, die der Apoptose entgegenwirken. Zu den DD-enhaltenden Rezeptoren gehören Fas (CD 95, Apo-1), TNFR1 (CD 120a, p55), DR3 (Apo-3, TRAMP), DR-4 und die TRAIL-Rezeptoren.

Die Todesrezeptoren bewirken die Aktivierung der Exekutor-Caspasen mit Hilfe eines anderen Apoptosoms. Dieser Rezeptor-proximale Vorgang ist bisher am besten für das Fas-Antigen charakterisiert und wird im Folgenden an dessen Beispiel beschrieben. Aufgrund der Rezeptorstimulation kommt es zu einer Aggregation der Fas-Rezeptoren und damit ihrer DD. Diese Anordnung führt über die Bindung zweier Schlüsselsignalproteine an den Rezeptor zu der Ausbildung des sogenannten DISC-Komplexes (engl. death-inducing signaling complex) ¹⁹. Das Fas-assoziierte DD-Protein (FADD/MORT-1) ^{20, 21} bindet über eine eigene DD an die DD des aggregierten Rezeptors. Über seine N-terminal gelegene Todeseffektordomäne (engl. death effector domain, DED) rekrutiert FADD wiederum das Protein FLICE (Caspase-8, MACH1) ^{22, 23}. Die DISC-Formation führt nun über die Aktivierung von FLICE zu einer kaskadenartigen Aktivierung weiterer Caspasen an dessen Ende die Effektor-Caspase (Caspase-3) steht ^{24, 25}.

Rezeptoren ohne Todesdomäne

Die anderen Rezeptoren - ohne dieses DD-Motiv - enthalten weniger stark konservierte Bereiche innerhalb der cytoplasmatischen Domäne. Mitglieder dieser Untergruppe sind der TNFR2, CD40, OX40 und CD30. Sie vermitteln vielfältige Signale, die zur Aktivierung und Proliferation der Zelle, aber auch zum Zelltod führen können. Die Signaltransduktionswege dieser TNF-Rezeptoren werden in Kapitel 1.2 näher ausgeführt.

1.1.3. Die Verbindung von Rezeptor- und Mitochondrien-vermittelter Apoptose

Das bisher beschriebene Modell der TNF-Rezeptor vermittelten Apoptose benötigt nicht die Einbeziehung der Mitochondrien, ist also ein von Bcl-2 unabhängiger Weg. Dennoch wurde vielfach publiziert, dass Bcl-2 oder Bcl-x_l die Fähigkeit besitzen, diesen Apoptoseweg zu inhibieren ²⁶, was zu kontroversen Diskussionen führte. Durch die Beobachtung, dass Zelltypen existieren, bei denen das Apoptosignal des Rezeptors durch Bcl-2 blockiert wird (Typ 2-Zellen) und andere bei denen das nicht der Fall ist (Typ 1-Zellen) ¹, wurde die Hypothese unterstützt, dass eine Verbindung zwischen beiden Apoptosewegen existiert. Die Identifikation eines neuen Mitgliedes der Bcl-2-Familie Bid ²⁷ stellt diese Verbindung her. Durch Rezeptor-vermittelte Aktivierung von FLICE wird Bid gespalten und die trunkierte Form translokalisiert zu den Mitochondrien ²⁸. Dort bewirkt es die Oligomerisierung von

Bax-Proteinen, die infolgedessen die Mitochondrienmembran insertieren und so für die Freisetzung von Cytochrom *c* und DIABLO sorgen ¹¹. Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass nicht nur FLICE, sondern auch Caspase-3 in der Lage ist, Bid zu spalten ²⁹. In einigen Zellen wird so das apoptotische Signal durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus verstärkt.

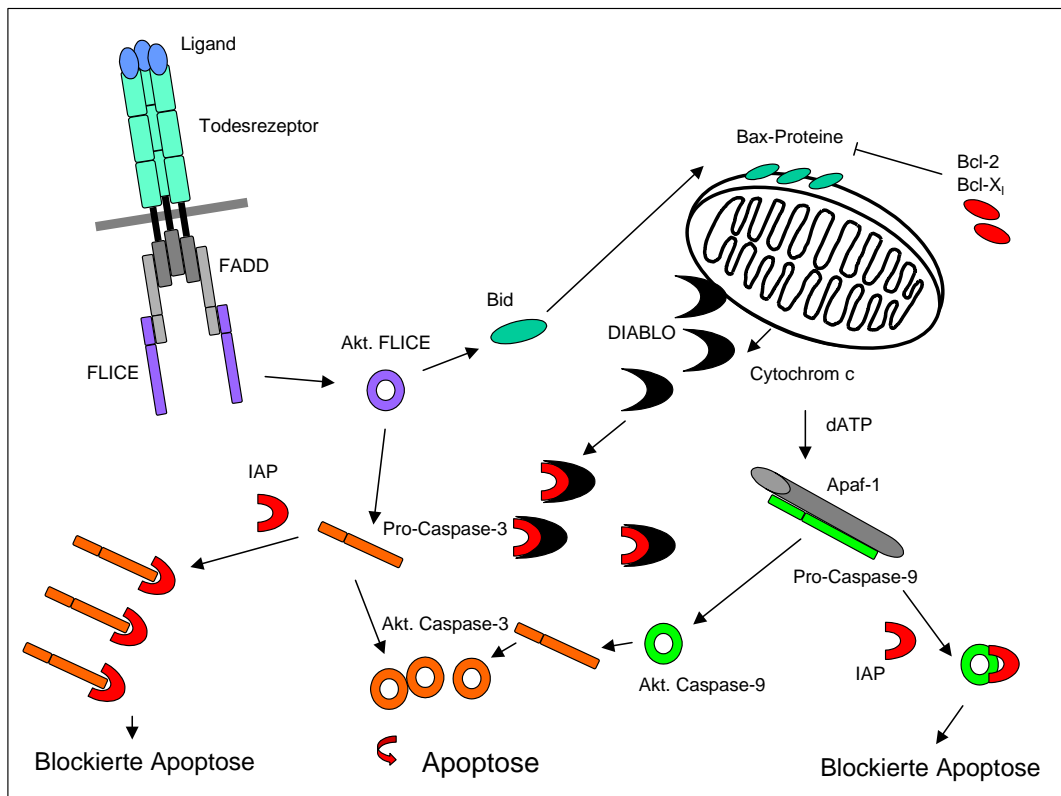


Abbildung 1.1.3. Ausführung und Regulation der Apoptose.

Die Ausführung des programmierten Zelltods obliegt also einer komplexen zelleigenen „Maschinerie“, dargestellt in Abbildung 1.1.3. Beginnend bei der Initiierung durch apoptotische Reize, fortschreitend durch die Aktivierung von Exekutor-Caspasen, ausgeführt durch Proteolyse von Schlüsselproteinen, endet sie in der vollständigen Auflösung der Zelle und der Fragmentierung ihrer genetischen Information.

1.1.4. Die regulierenden Proteine

Da die Apoptose einen für den Erhalt eines mehrzelligen Organismus so wichtigen Mechanismus darstellt, existiert eine eng regulierte Balance zwischen der Ausführung und Repression des programmierten Zelltodes. Für beide Wege der Caspase-Aktivierung gibt es regulatorische Proteine. Diese können entweder schon primär die Aktivierung der Initiator-Caspasen verhindern oder aber auch sekundär bereits aktivierte Initiator- und Effektor-Caspasen inhibieren.

Das im Jahre 1997 von mehreren Arbeitsgruppen simultan charakterisierte FLIP/I-FLICE ist ein solcher primärer Inhibitor^{30, 31, 32}. FLIP existiert in zwei verschiedenen Splice-Varianten und bindet die Proteine FADD und FLICE im DISC. Durch diese Bindung verhindert es die Aktivierung von FLICE und ist somit ein Inhibitor der durch Todesrezeptoren vermittelten Apoptose.

Weitere primäre Inhibitoren sind die anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie. Bcl-2 und Bcl-x_l blockieren die mitochondrial vermittelte Apoptose durch Verhinderung der Freisetzung von Cytochrom *c* und intermembraner Proteine durch die Mitochondrien. Ist allerdings diese Freisetzung schon erfolgt, haben die anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder keinen Einfluss mehr auf die Ausführung des apoptotischen Signals^{33, 34}.

Die zellulären Inhibitoren der Apoptose Proteine (cIAPs) sind in der Lage, die Aktivierung von Caspasen als auch aktive Caspasen zu inhibieren und somit Apoptose zu verhindern³⁵. Bis heute sind fünf humane IAP-Familienmitglieder bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass XIAP³⁶, cIAP-1 und cIAP-2³⁷ mit Pro-Caspase-9 assoziieren und damit sowohl deren Aktivierung als auch die Aktivierung nachgeschalteter Effektor-Caspasen (z.B. Caspase-3) verhindern^{38, 39}. XIAP ist darüber hinaus ein Inhibitor der aktiven Caspase-9, während cIAP-1 und -2 Caspase-3 durch Anlagerung an diese inaktivieren^{40, 39}. Die Bindung und Inhibition der Caspasen wird durch ein Proteinmotiv vermittelt, über welches die Familie definiert ist. Diese sogenannte BIR (Baculovirus IAP repeat)-Domäne besteht aus ~ 70 Aminosäuren⁴¹. Obwohl XIAP, cIAP-1 und -2 drei dieser BIR-Domänen besitzen, konnte gezeigt werden, dass eine einzige für die Inhibition von Caspasen ausreichend ist⁴². Ein weiteres molekulares Motiv ist der C-terminal gelegene RING-Finger, eine evolutionär konservierte Struktur, die in mehr als 200 Proteinen auftritt. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass dieses Proteinmotiv spezifisch an der Ubiquitinierung von Proteinen beteiligt ist⁴³. Der Mechanismus und die Funktion der Ubiquitinierung von Proteinen werden in Kapitel 1.3 näher beleuchtet. Neueste

Studien belegen die Ubiquitin-Ligaseaktivität des in den IAPs enthaltenen RING-Fingers. So trägt dieses Motiv nicht nur zur Autoubiquitinierung der IAPs bei ⁴⁴, sondern, wie für cIAP-2 gezeigt werden konnte, katalysiert die Monoubiquitinierung von Caspase-3 und -7 ⁴⁵ und bewirkt damit deren Abbau über das 26S-Proteasom. Mit diesen Eigenschaften stellen die IAPs eine zentrale Regulationseinheit des apoptotischen Geschehens dar.

Im Jahre 2000 wurde das Protein DIABLO/Smac charakterisiert ^{46, 47}, welches in der Lage ist, sowohl die Caspase-Aktivierung über die Mitochondrien zu fördern als auch IAPs zu inhibieren. DIABLO wird zusammen mit Cytochrom *c* von den Mitochondrien freigesetzt und bildet einen Komplex mit dem Apaf-1-Apoptosom. Ist nun die im Apoptosom befindliche Pro-Caspase-9 durch IAPs inaktiviert, hebt DIABLO diese Inhibition auf, und die Apoptose schreitet voran ^{48, 49}.

1.2. Die Signaltransduktion der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor (TNFR) Familie ohne DD

Auch diese Rezeptoren vermitteln ihr Signal mit Hilfe von Adapterproteinen, die an ihre cytoplasmatischen Anteile rekrutiert werden. Durch eine Vielzahl direkt interagierender oder nachgeschalteter Signalproteine wird so aus dem von außen gegebenen Signal, der Ligandenbindung, eine Zellantwort generiert. Der Aufbau dieser Rezeptoren wird im Folgenden am Beispiel des CD30-Rezeptors beschrieben.

1.2.1. Der Rezeptor CD30

Erstmals charakterisiert wurde CD30 als ein Marker spezifisch für die Hodgkin- und Reed-Sternberg (HRS)-Zellen des Hodgkin-Lymphoms (HL) ^{50, 51}. Unter pathologischen Konditionen findet sich der Rezeptor auf den HRS-Zellen des HL, den Tumorzellen des Anaplastischen Großzelligen Lymphoms (ALCL), Zellen des Diffusen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphoms der anaplastischen Variante und auf Zellen des embryonalen Karzinoms des Hodens ⁵². Die Expression des Rezeptors ist im normalen lymphatischen Gewebe beschränkt auf aktivierte B- und T-Lymphozyten, kann aber durch Stimulation mit Mitogenen induziert werden. Auch die Infektion mit Viren, wie dem Epstein-Barr Virus (EBV), HIV ⁵³ oder dem Humanen T-Zell Leukämie Virus 1 und 2 (HTLV-1, -2), bewirkt die Expression des CD30-

Antigens⁵². Eine Vielzahl von Studien zeigt, dass in Abhängigkeit des jeweiligen Zelltyps die Signaltransduktion von CD30 unterschiedliche Zellantworten verursacht.

CD30 ist wie alle TNF-Rezeptoren, außer LMP-1, ein Typ1-Transmembranprotein. Die Analyse der CD30-Proteinstruktur zeigte, dass der Rezeptor von 120 kDa Größe - schematisch dargestellt in Abbildung 1.2.1 - folgendermaßen aufgebaut ist: Beginnend mit einem Leaderpeptid von 18 AS (Abb. 1.2.1, hellgrau) folgt die extrazelluläre Domäne mit 365 AS (Abb. 1.2.1, hellblau), dann eine 24 AS lange transmembrane Region (Abb. 1.2.1, dunkelgrau) und der cytoplasmatische Teil mit 188 AS (Abb. 1.2.1, hellgrün). Die extrazelluläre Domäne besitzt sechs der Cystein-reichen Wiederholungsmotive, die nach dem dritten durch eine bewegliche sogenannte hinge-Region unterbrochen sind. Des Weiteren lassen sich in ihr sechs potentielle Glycosylierungsstellen identifizieren⁵⁰. Die cytoplasmatische Domäne zeigt Motive, die der Rekrutierung von Adapterproteinen dienen⁵⁴.

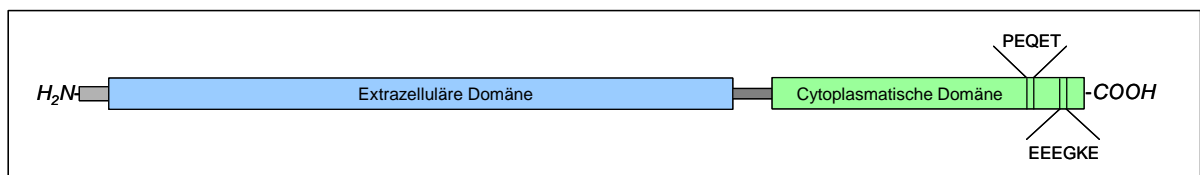


Abbildung 1.2.1. Schematischer Aufbau des CD30-Rezeptors.

Das Leaderpeptid ist in hellgrau dargestellt und die transmembrane Region in dunkelgrau. Die für die Bindung von Signalmittlerproteinen essentiellen Aminosäuremotive sind als Ausschnittsvergrößerung dargestellt.

1.2.2. Die Adapterproteine der TNFR-Signaltransduktion

Im Gegensatz zu den Apoptose vermittelnden Signalabläufen der TNF-Rezeptoren sind die Signalwege, die das Überleben von Zellen sichern, wesentlich schlechter charakterisiert. In der Vergangenheit wurden Proteine charakterisiert, die über ihre Fähigkeit, mit TNF-Rezeptoren zu interagieren, definiert sind als Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziierte Faktoren (TRAFs). Die Moleküle dieser Familie verbindet ein gemeinsames Aminosäuremotiv innerhalb der C-terminalen Region, die TRAF-Domäne, über die sie mit den TNF-Rezeptoren interagieren. Bis auf TRAF1⁵⁵ enthalten alle weiteren TRAFs N-terminal gelegene RING-Finger Domänen. Sie zeigen unterschiedliche Interaktionen mit den jeweiligen Rezeptoren, sowie Homo- und Heterodimerisierungsverhalten. Die bekannten Interaktionen sind in den Tabellen 1.2.1 und 1.2.2 aufgezeigt.

	TRAF1	TRAF2	TRAF3	TRAF5	TRAF6
TRAF1	+				
TRAF2	+	+			
TRAF3			+		
TRAF5		+			
TRAF6					

Tabelle 1.2.1. Homo- und Heterodimerisierungsverhalten der TRAF-Proteinfamilie.

Der cytoplasmatische Teil der TNF-Rezeptoren enthält ein Proteinmotiv PXQX(T/S), von dem gezeigt werden konnte, dass es essentiell für die Rekrutierung der TRAFs ist ^{56, 54, 57}. Einige Rezeptoren, wie CD30, enthalten ein zusätzliches, weiter C-terminal gelegenes Motiv, zu dem TRAF1 eine höhere Affinität ausweist ⁵⁴. So kompetieren die TRAF-Proteine wahrscheinlich um die Bindung an dem jeweiligen Rezeptor.

	TRAF1	TRAF2	TRAF3	TRAF5	TRAF6
TNFR2	+	+			
CD30	+	+	+	+	
CD40		+	+	+	+
OX40	+	+	+	+	
4-1BB	+	+	+		
LMP-1	+	+	+	+	

Tabelle 1.2.2. Bekannte Interaktionen ausgewählter TNF-Rezeptoren mit den TRAF-Proteinen.

Durch Interaktion mit dem Rezeptor-interagierenden Protein (RIP) und dem TNFR-assoziierten DD-Protein (TRADD) können die TRAF-Moleküle auch an TNF-Rezeptoren mit DD rekrutiert werden.

Die TRAF-Proteine haben eine wichtige Funktion in der TNFR-vermittelten Aktivierung des Nukleären Faktor- κ B (NF- κ B) ^{58, 59}. Als ein mit TRAF2 interagierendes Protein wurde die NF- κ B-induzierende Kinase (NIK) identifiziert ⁶⁰. NIK wird durch RIP und TRAF2 aktiviert und bewirkt über Aktivierung von κ B-Kinasen (IKK) ⁶¹ die Induktion von NF- κ B. Obwohl mit NIK und den IKKs die exekutiven Bindeglieder zwischen den TRAFs und der Aktivierung von NF- κ B identifiziert wurden, konnte mittels gendefizienter Mäuse eine essentielle Rolle der TRAFs in der TNFR-vermittelten NF- κ B-Aktivierung

nicht bestätigt werden ^{62, 63}. Dennoch konnte gezeigt werden, dass dominant negative TRAF2-Formen die NF- κ B-Aktivierung durch die Rezeptoren TNFR2, CD40, CD30, 4-1BB und OX40 inhibieren ^{64, 65, 58}. Zahlreiche Untersuchungen zeigen auch die Aktivierung von Kinasen der Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) Familie infolge TRAF2-abhängiger Signaltransduktion ⁶⁶. Dieser Weg resultiert über eine Kinasekaskade in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1.

Die bisher beschriebenen Proteine bilden die erste Stufe der TNFR-vermittelten Signaltransduktion. Zu der zweiten Ebene gehören weitere Proteine, die die TNF-vermittelten Signalwege modulieren. Es sind Adapterproteine, die mit den TRAFs interagieren und über diese Wechselwirkung charakterisiert wurden. Tabelle 1.2.3 zeigt eine Übersicht der bekannten Interaktionen. Zu ihnen gehören A20 ⁶⁷, die cIAPs ³⁷, das TRAF interagierende Protein (TRIP) ⁶⁸ und der TRAF-Familie-assoziiierter NF- κ B Aktivator (TANK) ^{69, 70}.

	TRAF1	TRAF2	TRAF3	TRAF5	TRAF6
TRADD	+	+			
FADD	+	+			
TANK	+	+	+		
TRIP	+	+			
A20	+	+			
cIAP-1	+	+			
cIAP-2	+	+			
RIP	+	+	+		
NIK	+	+	+	+	+

Tabelle 1.2.3. Intrazelluläre Proteine und ihre Wechselwirkung mit den TRAF-Proteinen.

Von TRIP und TANK wird vermutet, dass sie direkt durch ihre Interaktion mit den TRAFs die Aktivierung von NF- κ B vermitteln. Während TRIP die NF- κ B-Aktivierung inhibiert, zeigt TANK sowohl aktivierende als auch inhibierende Effekte auf NF- κ B. Diese Funktion scheint je nach zellulärem Kontext moduliert zu sein ^{69, 70, 71}. Das durch NF- κ B induzierte Zink-Finger Protein A20 wurde als ein anti-apoptisches Protein beschrieben und charakterisiert ^{72, 73}. Es konnte gezeigt werden, dass A20 die p53-medierte Apoptose blockieren kann ⁷⁴. Dennoch wirkt es als negativer Regulator der NF- κ B-Aktivierung entgegen ⁷⁵. Für die anti-apoptischen Proteine cIAP-1 und -2 konnten Interaktionen mit dem TRAF1/TRAF2-Heterokomplex nachgewiesen werden. Die nachfolgende Abbildung (Abb. 1.2.2.)

fasst die hier dargestellten Zusammenhänge am Beispiel des CD30-Rezeptors noch einmal zusammen.

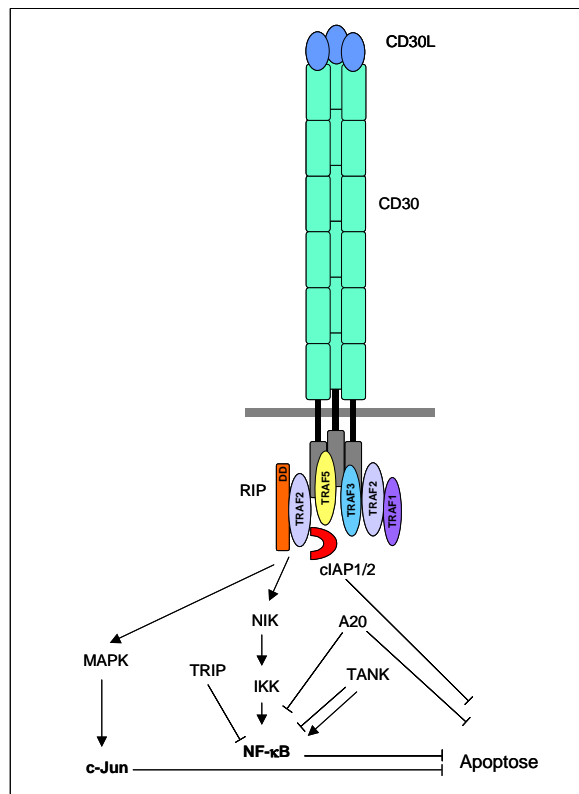


Abbildung 1.2.2. Die Signaltransduktion der TNF-Rezeptoren ohne DD am Beispiel des CD30-Rezeptors.

1.3. Die posttranslationale Modifikation als regulatorischer Mechanismus von Apoptose und Zellproliferation

Die Regulation von Proteinkonzentrationen in der Zelle, die Aktivität von Proteinen, deren Lokalisation oder ihre Fähigkeit mit anderen Proteinen zu interagieren wird zum Teil durch konstitutive oder reversible posttranslationale Modifikation bestimmt. Neben Acetylierungen, Methylierungen, Phosphorylierungen und Glycosillierungen gehört auch die Verknüpfung von Proteinen oder ganzen Proteinketten zu diesen Modifikationen, wie die 1987 entdeckte Ubiquitinierung ^{76, 77}.

Die Konjugation von Ubiquitin an ein Protein benötigt ein Enzymsystem und erfolgt in aufeinanderfolgenden Schritten (Abbildung 1.3.1). Obwohl die Verknüpfung von Polyubiquitinketten an ein Protein meist zu seiner Degradation führt, gibt es Beispiele einer kontrollierten Aktivierung durch limitierte

Proteolyse. Im Gegensatz dazu führt die Monoubiquitinierung eines Proteins nicht zu seinem Abbau, sondern spielt eine Rolle in der rezeptorvermittelten Endozytose ⁷⁸.

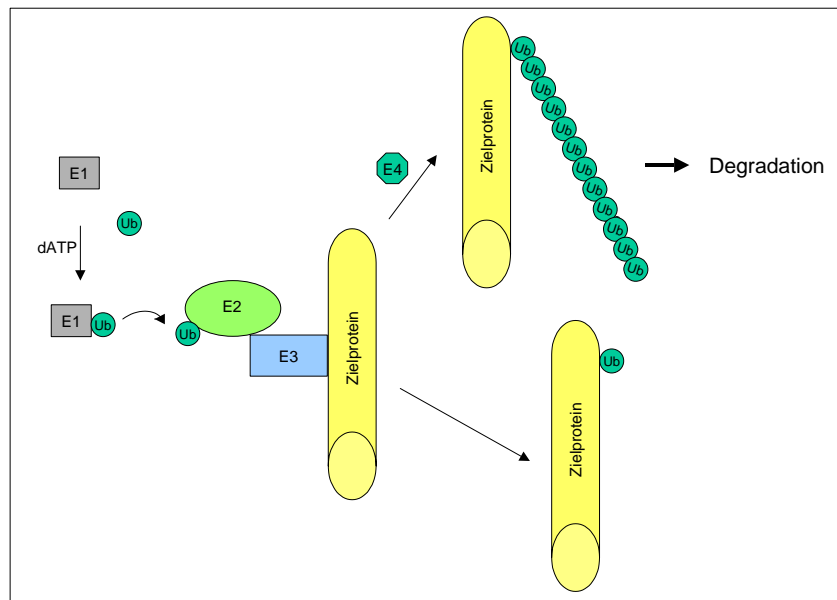


Abbildung 1.3.1. Schematischer Ablauf der Poly- und Monoubiquitinierung von Proteinen.

E1, Ubiquitin-aktivierendes Enzym; E2, Ubiquitin-konjugierendes Enzym; E3, Ubiquitin-Ligase ^{76,79}; E4, Enzym zur Bildung von Poly-Ubiquitinketten ⁸⁰.

Eine Vielzahl von Proteinen, die mit Ubiquitin verwandt sind, wurde in den letzten Jahren charakterisiert. Zu ihnen gehört das Protein SUMO (engl. small ubiquitin-related modifier, auch als Sentrin, GMP, SMT3 bezeichnet) ⁸¹, von dem in Säugetierzellen drei homologe Formen bekannt sind. Als das für die Konjugation von SUMO-1 verantwortliche E2-Enzym (konjugierendes Enzym) wurde UBC-9 (engl. Ubiquitin-conjugating enzyme-9) identifiziert ⁸². Mit der Charakterisierung der E1-Proteine (aktivierende Enzyme) für die SUMO-1-Aktivierung SAE1 und 2 (SUMO-aktivierendes Enzym1/2) ⁸³ wurde ein weiteres Analogon zu dem Ubiquitinierungsprozess gefunden, im Gegensatz dazu wird die Frage nach der Existenz eines E3-Äquivalentes (ligierendes Enzym) im Prozess der Sumotylierung kontrovers diskutiert ⁸³.

Während die Ubiquitinierung von Proteinen meist den ersten Schritt auf ihrem Weg zur Degradation darstellt, scheint die Sumotylierung diese Funktion nicht zu haben. So kann SUMO-1 sogar als Antagonist zu Ubiquitin dem Abbau von Proteinen entgegenwirken. Ein Beispiel dafür ist die Regulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B. NF- κ B bezeichnet eine Familie heterodimerer Transkriptionsfaktoren (NF- κ B/Rel), die im Cytoplasma inaktiviert als heterotrimere Komplexe mit

einem Inhibitor- κ B-Protein ($I\kappa$ B) vorliegen^{84, 85}. Zum Abbau wird $I\kappa$ B α an den Serinresten 32 und 36 phosphoryliert, an dem Lysinrest 21 ubiquitiniert und somit über die Proteasomen degradiert^{86, 87, 88, 89}. Infolgedessen sind die NF- κ B-Dimere aktiv und translozieren in den Kern⁹⁰. Auf der Suche nach dem für den Ubiquitinierungsprozess verantwortlichen E2-Protein entdeckte man die Interaktion von UBC-9 mit $I\kappa$ B α ⁹¹. Tatsächlich jedoch katalysiert UBC-9 die Sumotylierung von $I\kappa$ B α am Lysinrest 21⁹². Diese Sumotylierung von $I\kappa$ B α verhindert dessen Abbau, somit die Aktivierung von NF- κ B und wirkt als Antagonist zu Ubiquitin.

Auch der Transkriptionsfaktor c-Jun und p53 werden über den Ubiquitin-Proteasomen-Abbauweg reguliert und gehören zu der Vielzahl von Proteinen, die mit UBC-9 interagieren^{93, 94}. Nun konnte gezeigt werden, dass beide Proteine auch sumotyliert werden. Im Gegensatz zu der Modifikation von $I\kappa$ B α verhindert aber die Sumotylierung von c-Jun nicht seine Ubiquitinierung, sondern scheint dessen Transkriptionsfaktor-Aktivität negativ zu regulieren⁹⁵. Noch nicht geklärt werden konnte die Funktion der Sumotylierung von p53, aber viel spricht dafür, dass sie zur vollen Aktivität des Proteins beiträgt⁹⁵.

Die bis hier beschriebenen Beispiele zeigen SUMO-1 in einer Rolle, die stark mit dem Ubiquitin-Proteasomen-Abbauweg verknüpft ist. Es existieren jedoch auch eine ganze Reihe von Untersuchungen, die belegen, dass SUMO-1 seine Funktion in der Regulation von Protein-Protein-Interaktionen und deren subzellulärer Lokalisation hat.