

**„Identifizierung und Charakterisierung von Enzymen,
die mit dem COP9 Signalosom assoziiert sind“**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin**



vorgelegt von:

STEFAN UHLE
aus Herzberg/Elster

Juni, 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Mathias Ziegler
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Dubiel

Disputation am 23.09.2004

Gewidmet
meinem Biologie-Lehrer
Günter Benedix

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1. Einleitung.....	1
1.1. Das COP9 Signalosom.....	1
1.1.1. Vorkommen und Struktur des COP9 Signalosoms (CSN).....	1
1.1.2. Funktionen des CSN.....	3
1.2. Die Rolle des COP9 Signalosoms im Ubiquitin/26S- Proteasom-System	4
1.2.1. Aufbau und Funktion des 26S Proteasoms	5
1.2.2. Das Ubiquitin-System	5
1.2.3. Wechselwirkung zwischen den Cullin-E3-Ligase-Komplexen und dem COP9 Signalosom	7
1.2.4. Die RING E3 Ligase Mdm2	9
1.2.4.1. Genstruktur und Protein-Domänen von Mdm2.....	9
1.2.4.2. Feedback-Regulation von Mdm2 und p53	11
1.2.4.3. Posttranslationale Modifikationen von Mdm2 und p53.....	12
1.2.4.4. Regulation durch andere interagierende Proteine.....	13
1.3. Die Proteinkinasen PKD und CK2	14
1.3.1. Struktur, Funktion und Regulation der PKD (PKD1)	14
1.3.2. Substrate und Interaktionspartner der PKD	17
1.3.3. Struktur, Funktion und Regulation der CK2	18
1.3.4. Substrate der CK2	21
2. Zielsetzung	23
3. Ergebnisse.....	24
3.1. Das COP9 Signalosom besitzt eine Kinaseaktivität	24
3.2. Identifizierung der Kinasen während der Komplexisolierung.....	26

3.3. CK2 und PKD binden an das COP9 Signalosom	30
3.4. CK2 und PKD phosphorylieren CSN-Untereinheiten, p53 und c-Jun.....	33
3.5. Inhibitoren der Kinasen.....	37
3.6. Humanes Mdm2 wird durch die CSN-assoziierten Kinasen phosphoryliert.....	38
3.7. Mdm2 bindet an das COP9 Signalosom	39
3.8. Curcumin induziert die Auto-Ubiquitylierung von Mdm2.....	42
4. Diskussion.....	45
4.1. Die Kinaseaktivität des COP9 Signalosoms.....	45
4.1.1. Die Proteinkinasen CK2 und PKD sind mit dem COP9 Signalosom assoziiert	45
4.1.2. Die assoziierten Kinasen phosphorylieren Untereinheiten des COP9 Signalosoms	47
4.1.3. Substrat-Phosphorylierung am COP9 Signalosom.....	48
4.1.4. Curcumin – ein Inhibitor der CSN-assoziierten Kinasen	50
4.2. Die CSN-assoziierten Proteinkinasen CK2 und PKD regulieren den Proteinabbau über das Ubiquitin/26S- Proteasom-System	53
4.3. Das COP9 Signalosom beeinflusst die Aktivität der Ubiquitin- Ligase Mdm2.....	55
4.3.1. Die Ubiquitin-Ligase Mdm2 ist mit dem COP9 Signalosom assoziiert und wird phosphoryliert.....	55
4.3.2. Regulierung der Ubiquitin-Ligaseaktivität von Mdm2 durch Auto- Ubiquitylierung am COP9 Signalosom.....	57
4.4. Das COP9 Signalosom als Plattform für die Bildung von Ubiquitinkonjugaten.....	59
5. Material und Methoden.....	63

5.1. Molekularbiologische Methoden	63
5.1.1. Klonierung des humanen Mdm2 (Hdm2)	63
5.1.2. Anzucht von <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) Stämmen	63
5.1.3. Die schnelle DNA-Isolierung	63
5.1.4. Plasmidisolierung	64
5.1.5. Plasmide	64
5.1.6. Agarosegele	64
5.1.7. Gelreinigung von DNA-Fragmenten	64
5.1.8. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	65
5.1.9. Ligation	65
5.1.10. PCR (Polymerase Chain Reaction)	65
5.1.11. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (Elektrotransformation)	65
5.1.12. Transformation mittels TA-cloning Kit von Invitrogen	66
5.1.13. Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen (XL-1, DH5 α)	66
5.1.14. Elektrotransformation	66
5.2. Proteinbiochemische Methoden	67
5.2.1. Proteinbestimmung	67
5.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	67
5.2.3. Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	68
5.2.4. Westernblot und Immunodetektion	68
5.2.5. Ponceau S-Färbung von Nitrocellulose-Membranen	69
5.2.6. Präparation des COP9 Signalosoms	69
5.2.6.1. Erythrocyten-Lyse	69
5.2.6.2. DEAE-Ionenaustauschchromatographie	69
5.2.6.3. Suc-LLVY-AMC-Spaltungs-Assay (Proteaseaktivitätstest)	70
5.2.6.4. Ammoniumsulfatfällung	70
5.2.6.5. Dichtegradientenzentrifugation I	71
5.2.6.6. FPLC: ResourceQ-Säule	71

5.2.6.7.	FPLC: MonoQ-Säule.....	71
5.2.6.8.	Dichtegradientenzentrifugation II („Kleiner Gradient“).....	72
5.2.7.	Kinase-Assay (in vitro).....	72
5.2.8.	Berechnung der spezifischen Curcumin-sensitiven Kinaseaktivität.....	73
5.2.9.	Berechnung der Kinase-Inhibition (IC ₅₀ -Werte)	73
5.2.10.	Peptidsynthese	73
5.2.11.	Phosphopeptid-Analyse.....	73
5.2.12.	Elektronenmikroskopische Untersuchung des aufgereinigten CSN-Komplexes.....	74
5.2.13.	Präparation rekombinanter Proteine	74
5.2.14.	Immunofluoreszenzmikroskopie	75
5.2.15.	Immunopräzipitation (IP).....	75
5.2.16.	Far-Westernblot-Analyse (Filterbindungs-Assay)	76
5.2.17.	Ubiquitylierungs-Assay	76
5.3.	Zellkultur	77
6.	Zusammenfassung	79
	Zusammenfassung	79
	Summary	80
7.	Referenzen.....	82
8.	Abkürzungen	94
9.	Appendix.....	97
9.1.	Danksagung	97
9.2.	Lebenslauf.....	98
9.3.	Publikationen.....	99