

1. Einleitung

1.1. Das COP9 Signalosom

1.1.1. Vorkommen und Struktur des COP9 Signalosoms (CSN)

Der COP9 Komplex wurde zuerst in *Arabidopsis thaliana* beschrieben (COP = **C**onstitutive **P**hotomorphogenesis), wo er während der Samenentwicklung an der Licht-abhängigen Signaltransduktion beteiligt ist (Wei et al., 1994). Der Komplex konnte unabhängig voneinander aus *Arabidopsis* (Wei & Deng, 1998) und aus der Präparation des humanen 26S Proteasoms isoliert werden (Seeger et al., 1998). Aufgrund seines universellen Vorkommens und seiner Funktion wird es heute einheitlich als COP9 Signalosom (CSN) bezeichnet (Deng et al., 2000).

In der Dichtegradientenzentrifugation und in der Gelfiltration fraktioniert das CSN als ein Komplex mit einem Molekulargewicht von 450.000 - 550.000. Er besteht aus 8 Untereinheiten, die als CSN1 bis CSN8 bezeichnet werden, und ist in dieser Anordnung in *Arabidopsis*, *Drosophila*, Maus und Mensch konserviert. Dabei sind die Untereinheiten CSN2 und CSN5/Jab1 (**J**un **A**ctivation domain **B**inding protein **1**) mit einer Identität von über 60% zwischen Pflanzen und Mammalia am stärksten konserviert. Die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* weist auch den Komplex auf (Mundt et al., 1999). Allerdings konnten hier die Untereinheiten CSN6 und CSN8 nicht nachgewiesen werden. Vor kurzem wurde ein dem CSN ähnlicher Komplex in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Maytal-Kivity et al., 2002; Wee et al., 2002).

Ein charakteristisches Merkmal der CSN-Untereinheiten ist das Vorhandensein zweier Proteindomänen: der PCI- (**P**roteasome, **C**OP9 signalosome, **I**nitiation factor 3) und der MPN- (**M**pr1-**P**ad1-**N**-terminal) Domäne (Ponting et al., 1999; Aravind & Ponting, 1998; Hofmann & Bucher, 1998). Diese sind vorrangig in den drei großen Proteinkomplexen Signalosom, eukaryontischer Translations-Initiationsfaktor-3-Komplex (eIF3-Komplex) und 19S Lid-Subkomplex des 26S Proteasoms zu finden (Glickman et al., 1998; Hofmann & Bucher, 1998; Wei et al., 1998). Für das CSN, den 26S Proteasom-Lid-Komplex und den eIF3-Komplex vermutet man deshalb einen gemeinsamen Ursprung in der Evolution. Die Konsequenzen der Sequenzhomologien für die Struktur und die Funktion der drei Komplexe sind allerdings noch immer unbekannt.

Alle Untereinheiten des CSN zeigen signifikante Sequenzhomologien zu den Untereinheiten des 19S Lid-Komplexes (siehe Abbildung 1 und Tabelle 1).

Die PCI-Domäne besitzt zahlreiche α -helikale Bereiche, und in vielen Fällen konnte gezeigt werden, dass sie für die Interaktion der CSN-Untereinheiten notwendig ist (Tsuge et al., 2001; Freilich et al., 1999). Die MPN-Domäne scheint vielfältige Funktionen zu besitzen, denn sie ist nicht ausschließlich in den drei genannten Komplexen zu finden und wurde auch in Prokaryonten beschrieben (Maytal-Kivity et al., 2002; Ponting et al., 1999). Neueste Untersuchungen spürten innerhalb dieser Domäne ein Metalloproteasemotiv auf, das als JAMM (**J**ab1(CSN5)/**M**PN Domain **M**etalloenzyme) oder MPN+-Motiv bezeichnet wird (Cope et al., 2002; Maytal-Kivity et al., 2002; Verma et al., 2002). Dieses Motiv bildet offenbar das katalytische Zentrum für die Abspaltung von Nedd8 und/oder Ubiquitin (s.u.). Allerdings besitzen innerhalb der PCI-Komplexe nur das CSN5 im CSN-Komplex und das RPN11 im 19S Lid-Komplex dieses Motiv.

Tabelle 1: Die Untereinheiten des COP9 Signalosoms (CSN). Dargestellt sind die jeweiligen orthologen Lid-Untereinheiten und die Proteindomänen.

CSN-Untereinheiten (alte Bezeichnungen)	Orthologe im Lid (alte Bezeichnungen)	Domäne
CSN1 (Gps1, COPS1, COP11/FUS6)	S10a/Rpn7 (p44)	PCI
CSN2 (Trip15, COPS2)	S9/Rpn6 (p44.5)	PCI
CSN3 (COPS3, LC15)	S3/Rpn3 (p58)	PCI
CSN4 (COPS4, COS41.8)	p55/Rpn5	PCI
CSN5 (JAB1, COPS5)	S13/Rpn11 (Pad1)	MPN (MPN+)
CSN6 (MOV34-34KD, COPS6)	S12/Rpn8 (p40)	MPN
CSN7 (ACOB, COPS7a u. b)	S11/Rpn9 (p40.5)	PCI
CSN8 (COPS8)	S14/Rpn12 (p31)	PCI

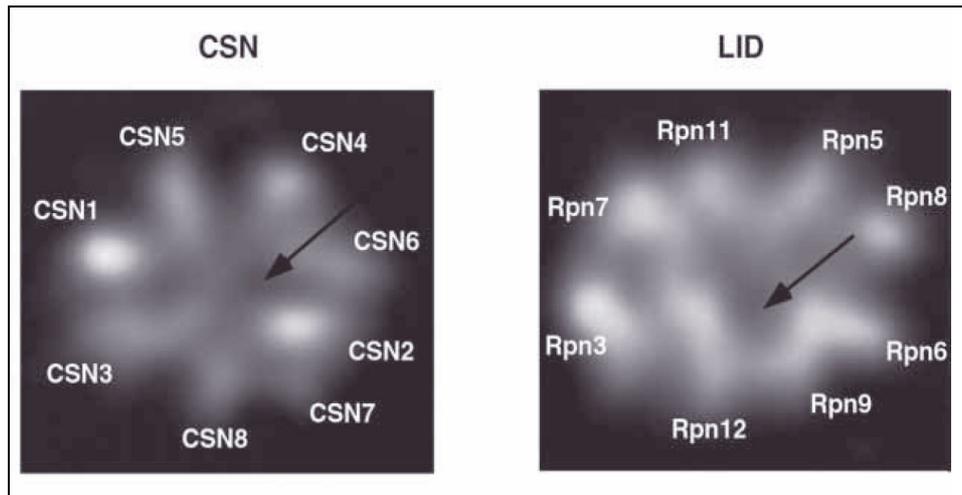


Abbildung 1: 2D-Elektronenmikroskopische Aufnahme des CSN- und des Lid-Komplexes. Eine mögliche Anordnung der CSN-Untereinheiten konnte anhand der Interaktionsstudien zwischen den Untereinheiten vorgenommen werden (Kapelari et al., 2000). Die Anordnung der Untereinheiten im Lid-Komplex wurde aus der Homologie zu den CSN-Untereinheiten abgeleitet. Der Pfeil markiert die zentrale Furche. (Aus Bech-Otschir et al., 2002.)

1.1.2. Funktionen des CSN

Erste Befunde in *Arabidopsis* zeigten, dass Mutationen von CSN-Untereinheiten in Samen zu einem konstitutiven photomorphogenetischen Phänotyp sowohl in der Dunkelheit als auch in Anwesenheit von Licht führen. Das deutet darauf hin, dass der CSN-Komplex ein negativer Regulator der photomorphogenetischen Entwicklung von Samen ist (Chamovitz et al., 1996; Wei et al., 1994). Es ist bekannt, dass COP1, ein CSN-bindendes Protein, in der Dunkelheit im Kern lokalisiert ist und bei Licht ins Cytoplasma transportiert wird. Das CSN ist dabei am Licht-abhängigen Transport von COP1 beteiligt (Osterlund et al., 1999). Das COP1 bindet den HY5-Transkriptionsfaktor, der die photomorphogenetischen Gene im Licht reguliert (Ang et al., 1998; Ang & Deng, 1994). COP1 besitzt eine RING-Finger-Domäne (s.u.) und ubiquityliert HY5 in vitro (Osterlund et al., 2000). Über diesen Weg wird letztendlich die HY5-Aktivität bzw. dessen Konzentration über den proteasomalen Abbau reguliert (für einen Überblick siehe Hardtke & Deng, 2000).

In *S.pombe* verursacht die Deletion der CSN-Untereinheit CSN1 eine verzögerte S-Phase während des Zellzyklus (Mundt et al., 1999). Diese Daten führten zu der Vermutung, dass der CSN-Komplex auch an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist. In *Drosophila* spielt das CSN bei der Zelldifferenzierung eine entscheidende Rolle. Die Deletion einzelner Untereinheiten führte zu drastischen Entwicklungsstörungen

sowohl während der Oogenese als auch während der Embryogenese und ist in einem späten Larvenstadium letal (Doronkin et al., 2002; Oron et al., 2002; Suh et al., 2002; Freilich et al., 1999). Auch während der Oogenese des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* spielt der CSN-Komplex eine wichtige Rolle. Dies konnte in einem CSN5-Knockdown gezeigt werden (Smith et al., 2002).

Obwohl keine der Untereinheiten des CSN-Komplexes Ähnlichkeiten zu bekannten Kinasen aufweist, besitzt der aus humanen Erythrozyten gereinigte Komplex eine Kinaseaktivität und phosphoryliert die Transkriptionsfaktoren c-Jun, I κ B α , p53 und p105 (Henke et al., 1999; Seeger et al., 1998). Dabei konnte in unserer Gruppe der Nachweis erbracht werden, dass die Phosphorylierung von p53 und c-Jun am Signalosom die Stabilität der beiden Transkriptionsfaktoren gegenüber dem 26S Proteasom-System beeinflusst (Bech-Otschir et al., 2001). Neuere Ergebnisse zeigen nun, dass das CSN unmittelbar mit dem Ubiquitin-(Ub)/26S-Proteasom-System kooperiert, indem es die Aktivität der Cullin-E3-Ligase-Komplexe reguliert (s.u.). Durch Abspaltung eines ubiquitinähnlichen Proteins, des NEDD8 (**N**eural precursor cell **E**xpressed, **D**evelopmentally **D**own-regulated **8**), wird die Ligaseaktivität dieser assoziierten Komplexe reguliert (Mundt et al., 2002; Lyapina et al., 2001; Wu et al., 2000). Zusätzlich zu dieser sogenannten Deneddylierungsaktivität konnte vor kurzem eine Deubiquitylierungsaktivität am Signalosom nachgewiesen werden (Zhou et al., 2003). Dies wird durch die Bindung des deubiquitylierenden Enzyms Ubp12 an den Komplex vermittelt. Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Kinaseaktivität des aufgereinigten CSN-Komplexes und den daraus resultierenden Konsequenzen für das Ubiquitin/26S-Proteasom-System.

1.2. Die Rolle des COP9 Signalosoms im Ubiquitin/26S-Proteasom-System

Das Ubiquitin(Ub)/26S-Proteasom-System kommt im Cytosol und im Zellkern aller eukaryontischer Zellen vor. Es ist an wichtigen zellulären Funktionen wie der Zellzyklusregulation, der Antigenprozessierung und der Transkriptionsregulation beteiligt (Hershko & Ciechanover, 1998). In eukaryontischen Zellen werden die meisten Proteine durch das Ub/26S-Proteasom-System abgebaut. Dieser selektive Proteinabbau läuft über das Ubiquitin-System zum 26S Proteasom-Komplex.

1.2.1. Aufbau und Funktion des 26S Proteasoms

Das 26S Proteasom besteht aus dem proteolytischen 20S Core-Komplex und dem regulatorischen 19S Komplex (auch als PA700 bezeichnet) (Rechsteiner et al., 1993). Die Aktivität des 20S Proteasoms wird im wesentlichen durch zwei Proteinkomplexe reguliert: durch den 11S Regulator (PA28) und den 19S Regulator (PA700).

Der 11S Regulator stimuliert den Abbau von Peptid-Substraten durch das 20S Proteasom. Der 19S Komplex bindet in Anwesenheit von ATP an einem oder an beiden distalen Enden des 20S Proteasoms. Das entstehende 26S Proteasom baut polyubiquitylierte Proteine in einer ATP-abhängigen Reaktion ab (Hershko & Ciechanover, 1998; Hochstrasser, 1996).

Der 19S Regulator besteht aus zwei Subkomplexen: dem Base- und dem Lid-Komplex. Der Base-Komplex besteht aus sechs ATPasen und drei Non-ATPasen. Für die Untereinheiten S5a/Rpn10 und S6a/Rpt5 wurden eine direkte Bindung mit polyubiquitylierten Substraten *in vitro* nachgewiesen (Lam et al., 2002; Deveraux et al., 1994). Allerdings ist ein Base-20S-Proteasom-Komplex allein nicht in der Lage, ubiquitylierte Proteine abzubauen (Braun et al., 1999; Glickman et al., 1998). Deshalb wird vermutet, dass auch der Lid-Komplex eine Funktion bei der Erkennung von Poly-Ubiquitin-Ketten hat.

Der Lid-Komplex besteht aus acht Non-ATPasen. Wie das COP9 Signalosom besitzen sechs von diesen Untereinheiten eine sogenannte PCI-Domäne in ihrem C-terminalen Bereich und zwei haben MPN-Domänen in der N-terminalen Region (Hofmann & Bucher, 1998). In diesen Domänen sind die Sequenzhomologien zwischen den Untereinheiten des Lid-Komplexes und denen des CSN besonders ausgeprägt.

1.2.2. Das Ubiquitin-System

Das Ub-System besteht aus drei aufeinanderfolgenden Komponenten: Dem Ub-aktivierenden Enzym E1, den Ub-konjugierenden E2-Enzymen und den E3 Ub-Ligasen. Das Ubiquitin, ein aus 76 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, wird durch das E1-Enzym in Anwesenheit von ATP über eine energiereiche kovalente Thi-

oesterbindung über seinen C-terminalen Glycinrest mit einem Cysteinrest des E1-Enzyms verknüpft. So aktiviert, wird das Ubiquitin anschließend auf ein E2-Enzym übertragen; in einigen wenigen Fällen kann nun das Ubiquitin vom E2-Enzym direkt an das Ziel-Protein (Target-Protein) übertragen werden. Die nachfolgenden E3-Enzyme sind für die Ub-Ligation an das Target-Protein verantwortlich und liegen entweder als einzelne Proteine oder als große Komplexe (u.a. mit den E2-Enzymen) vor. Neben diesen Ligasen wurde zudem ein Enzym identifiziert, welches für die Elongation von Ubiquitin-Ketten verantwortlich ist und als E4 bezeichnet wird (Koegl et al., 1999).

Die Verknüpfung der Ubiquitinmoleküle miteinander erfolgt über eine Isopeptidbindung an Lysin 48 (für einen Überblick siehe Thrower et al., 2000; Dubiel & Gordon, 1999). Diese Polyubiquitin-Ketten werden vom 26S Proteasom erkannt. Das ubiquitylierte Substratprotein kann nun abgebaut werden, während die Polyubiquitin-Ketten durch Isopeptidasen zerlegt werden (Hershko & Ciechanover, 1998). Das freigesetzte Ubiquitin kann wieder in den Kreislauf des Ub-Systems einfließen. Es gibt noch andere Polyubiquitin-Ketten, die z.B. über den Lysinrest 63 verknüpft sind, jedoch keinen proteolytischen Abbau initiieren (Dubiel & Gordon, 1999). Ferner können Proteine auch nur monoubiquityliert werden. Diese Modifikation dient allerdings der Regulierung unterschiedlicher zellulärer Prozesse, wie z.B. der Endocytose und der Transkription. Abbildung 2 zeigt eine vereinfachte Darstellung des Ubiquitin/26S-Proteasom-Systems.

Die Selektivität des Ub/26S-Proteasom-Systems wird hauptsächlich durch die Aktivität der E2- und E3-Enzyme bestimmt. Dabei wird die Selektion der Substrate für das Ub/26S-Proteasom-System auch durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert (Hershko & Ciechanover, 1998). Für die Transkriptionsfaktoren c-Jun und p53 konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine CSN-vermittelte Phosphorylierung die Stabilität der beiden Proteine beeinflusst (Bech-Otschir et al., 2001). Dies war der erste Hinweis für eine mögliche funktionelle Kooperation zwischen dem CSN und dem Ub/26S-Proteasom-System.

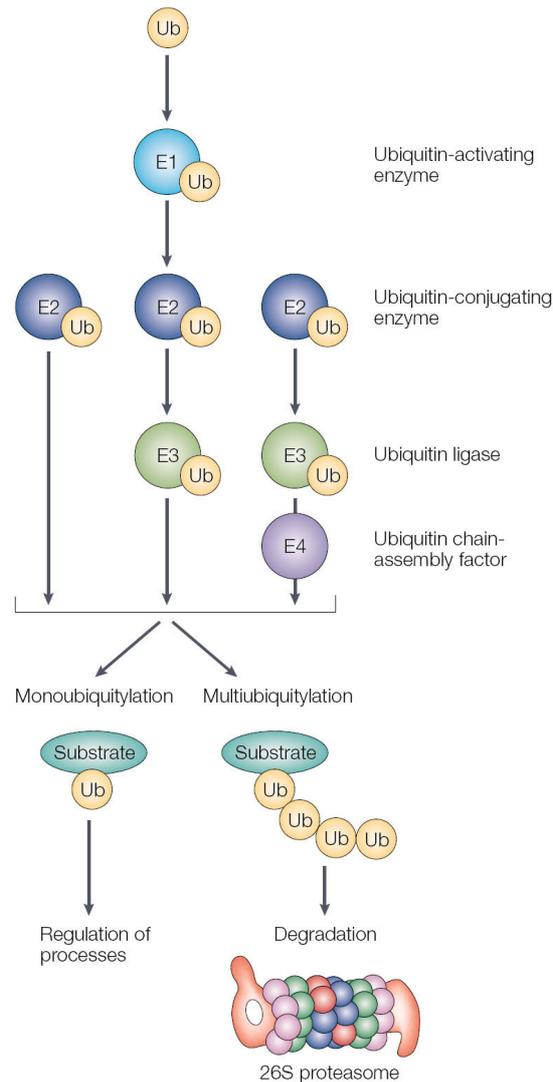


Abbildung 2: Das Ubiquitin/26S-Proteasom-System. Freies Ubiquitin (Ub) wird über das Ub-aktivierende Enzym (E1) ATP-abhängig aktiviert, indem es mit dem C-terminalen Glycinrest über eine energiereiche Thioester-Bindung an das E1 gebunden wird. Nachfolgend wird das Ub auf eines von vielen existenten Ub-konjugierenden Enzymen (E2s) übertragen (ebenfalls über eine Thioester-Bindung). In einigen Fällen kann das E2 direkt die Zielsubstrate ubiquitylieren. Normalerweise bedarf es aber noch der Hilfe der Ub-Ligasen (E3s). Über diesen Aktivierungsweg werden mehrere Ubiquitinmoleküle in Form von Polyubiquitin-Ketten gebildet. Manchmal wird dazu ein spezifischer Faktor (E4) benötigt. Die Polyubiquitylierung dient hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, als Substratmarkierung für den proteasomalen Abbau. Dagegen kann eine Monoubiquitylierung verschiedene Prozesse regulieren, wie z.B. die Endocytose, die DNA-Reparatur und die Transkription. (Aus Jesenberger & Jentsch, 2002.)

1.2.3. Wechselwirkung zwischen den Cullin-E3-Ligase-Komplexen und dem COP9 Signalosom

Die Familie der Cullin-E3-Ligase-Komplexe wurde erst Ende der 90er Jahre entdeckt (Feldman et al., 1997). Als Gerüst-Proteine besitzen sie die sogenannten Culline (Cul), verwandte Proteine aus einer konservierten Genfamilie (Kipreos et al., 1996).

Inzwischen konnten für die Culline Cul-1 bis Cul-5, unterschiedliche Ligase-Komplexe nachgewiesen werden (für einen Überblick siehe van den Heuvel, 2004; Zhong et al., 2003). Das RING-H2-Finger-Protein Rbx1/Roc1/Hrt1 ist in den Cullin-Komplexen die eigentliche Ubiquitin-Ligase und sorgt für die Assoziation mit den Ubiquitin-konjugierende Enzymen (E2s). Die Ligaseaktivität wird bei allen über die Konjugation der Culline mit dem Ubiquitin-ähnlichen Polypeptid NEDD8 reguliert. Für die spezifische Substraterkennung sind die sogenannten F-Box-Proteine zuständig (s.u.). Während dafür bei dem Cul-3-Komplex nur ein Protein zuständig ist, werden bei den E3-Ligase-Komplexen SCF (Cul-1) und VHL (Cul-2) variable Module aus zwei Proteinen benutzt (Skp1+F-Box-Proteine bzw. ElonginB/C + SOCS-Box-Proteine).

Eine wichtige Funktion des COP9 Signalosoms ist die Aktivitätsregulierung der Cullin-E3-Ligase-Komplexe. Maßgeblich beteiligt daran ist die Deneddylierungsaktivität des Signalosoms, d.h. die Abspaltung des Ubiquitin-ähnlichen Polypeptids NEDD8. Neuere Daten weisen indessen auf einen komplexen Regulationszyklus hin (für einen Überblick siehe Wolf et al., 2003). In diesem Szenario spielen sowohl der Zyklus der Neddylierung/Deneddylierung als auch der der Assemblierung/Reassemblierung der Cullin-E3-Ligase-Komplexe am Signalosom eine entscheidende Rolle. Andere assoziierte Proteine, wie etwa das de-ubiquitylierende Enzym Ubp12, können zusätzliche Regulatoren sein. Hier könnte das Ubp12 der Auto-Ubiquitylierung von Komponenten der Cullin-E3-Ligase-Komplexe (z.B. der F-Box-Proteine) entgegenwirken und die Komplexe vorübergehend stabilisieren (Wolf et al., 2003).

Die Substratspezifität der SCF-Komplexe wird, neben der Rekrutierung unterschiedlicher Ub-konjugierender Enzyme, über die verschiedenen F-Box-Proteine vermittelt. Dabei besteht die Besonderheit in der phosphorylierungsabhängigen Substraterkennung: Die für den proteasomalen Abbau bestimmten Proteine besitzen Phosphorylierungsstellen an Ser/Thr (pSer/Thr). Alle F-Box-Proteine besitzen ein pSer/Thr-Bindungsmotiv, entweder die sogenannte WD40-Domäne oder die LRR-Domäne (**L**euclin-**R**ich-**R**epeat). Bis jetzt konnte allerdings noch keine gemeinsame Konsensussequenz für eine pSer/Thr-Bindung dieser Domänen gefunden werden (für einen Überblick siehe Yaffe & Elia, 2001). Allerdings konnte für die Bindung von I κ B α bzw. β -Catenin an das F-Box-Protein β -TrCP (β -**T**ransducin repeat **C**ontaining **P**rotein, WD40-Domäne) ein korrespondierendes Phosphopeptid (DpSG Φ XpS) gefunden werden (Wu et al., 2003; Yaron et al., 1998; Yaron et al., 1997). Neben der Regulati-

on der Ligaseaktivität über die Neddylierung/Deneddylierung am CSN-Komplex gibt es also einen weiteren Regulationsmechanismus der Proteinstabilität: Über die Substraterkennung, die durch eine oder mehrere Phosphorylierungsstellen induziert wird.

1.2.4. Die RING E3 Ligase Mdm2

Murine Double Minute Clone 2 (Mdm2) wurde ursprünglich als eine Genamplifikation in Form von extrachromosomalen, paarweise vorliegenden Chromatinfragmenten, sogenannten „double minutes“, entdeckt (Cahilly-Snyder et al., 1987). Klonierungsexperimente in Nacktmäusen lieferten bald darauf erste Hinweise für einen onkogenen Charakter des Mdm2 (Fakharzadeh et al., 1991). Unabhängig davon konnte ein Protein isoliert werden, das an den Tumorsuppressor p53 bindet und so möglicherweise an der p53-Regulation beteiligt ist (Momand et al., 1992). Das humane Homologe (auch als Hdm2 bezeichnet) konnte auf Chromosom 12q13-14 identifiziert werden und Untersuchungen an Weichgewebs- und Osteosarcoma-Tumoren ergaben, dass in etwa 30% eine Amplifizierung des Mdm2-Gens vorliegt (Oliner et al., 1992). Bis jetzt konnte das Gen in Mammalia (Mensch, Maus, Ratte), im Zebrafisch und Krallenfrosch *Xenopus laevis*, sowie im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* sequenziert werden. Auch die genetischen Studien zeigten eine besondere Bedeutung von Mdm2 in der Regulation des Tumorsuppressors p53. Während die Deletion von *Mdm2* für Mäuseembryos letal ist, kann durch die zusätzliche Deletion von *p53* die Letalität wieder aufgehoben werden (Jones et al., 1995; Montes de Oca Luna et al., 1995).

1.2.4.1. Genstruktur und Protein-Domänen von Mdm2

Sowohl das murine als auch das humane Mdm2-Gen (Locus: 12q15) bestehen aus 12 Exons und können von zwei aufeinanderfolgenden Promotoren aktiviert werden, wobei nur der zweite Promotor p53 abhängig reguliert wird (Olson et al., 1993). Abbildung 3 zeigt schematisch die Proteinstrukturen von p53 und Mdm2. p53 bindet mit seiner N-terminalen transaktivierenden Domäne an den N-Terminus von Mdm2. Dabei scheint sowohl für die Bindung als auch für eine optimale Ubiquitylierung die Oligomerisierung von p53 notwendig zu sein (Maki, 1999; Kubbutat et al., 1998). Durch die N-terminale Bindung von Mdm2 innerhalb der transaktivierenden Domäne

von p53 wird seine Transkriptionsaktivität negativ beeinflusst (Oliner et al., 1993). Damit kann die Ub-Ligase Mdm2 schon durch die Assoziation mit dem Tumorsuppressor dessen Aktivität blockieren. Für den Transfer vom Cytosol in den Zellkern und vice versa besitzt das Mdm2 eine NLS bzw. eine NES. Dadurch könnte das an Mdm2 gebundene p53 aus dem Kern heraus transportiert und vom 26S Proteasom abgebaut werden. In der Tat wird in der Literatur eine solche Regulation des Transkriptionsfaktors diskutiert (Freedman & Levine, 1998; Roth et al., 1998), wobei neuere Daten auch einen proteasomalen p53-Abbau im Kern beschreiben (Shirangi et al., 2002). Weiterhin existiert eine NoLS für den Transfer in den Nucleolus, wenngleich noch wenig darüber bekannt ist (Lohrum et al., 2000). Eine zentrale acidische Domäne ist für die Bindung anderer interagierender Proteine erforderlich, beispielsweise des ribosomalen Proteins L5 (Elenbaas et al., 1996) und des p300/CBP (**CREB-Binding Protein**) (Grossman et al., 1998). Das RING-Finger-Motiv am C-Terminus ist für die Ub-Ligase-Aktivität verantwortlich und, wie schon erwähnt, eine verbreitete Domäne innerhalb der E3 Ub-Ligasen. Es bindet zwei Zn^{2+} Ionen in einem definierten Oktett von Cystein- und Histidinresten. Das Ubiquitin wird, anders als bei den HECT E3 Ligasen, nicht kovalent an die RING E3 Ligasen gebunden, sondern sie vermitteln die Übertragung von dem E2 an das gebundene Substratprotein. Deswegen vermutet man, dass die RING-Domäne für die Bindung der E2-Enzyme verantwortlich ist. Eine weitere Zink-bindende Domäne (Zn-Finger) mit noch unbekannter Funktion besteht zwischen den Aminosäuren 301 und 332.

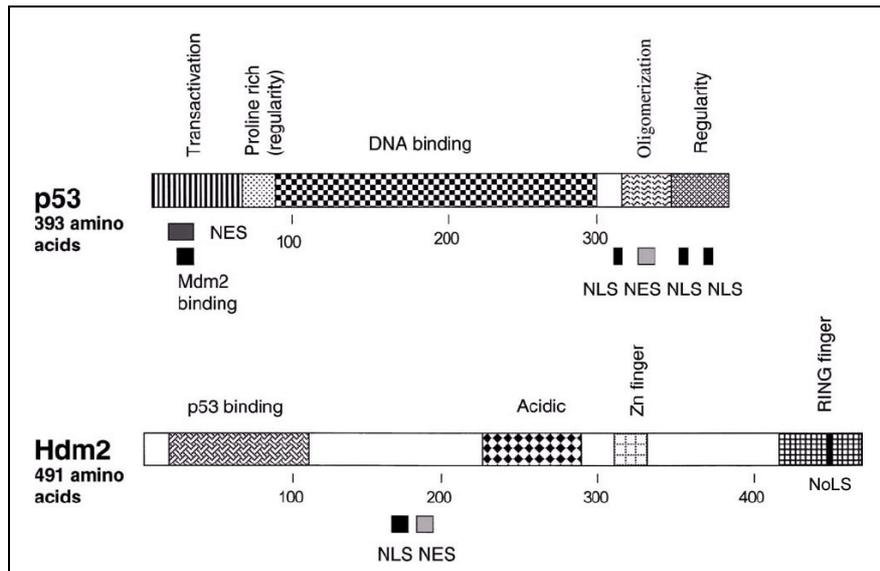


Abbildung 3: Strukturelle Merkmale von p53 und Hdm2. NLS: nuclear localization sequence (Kernlokalisationssequenz), NES: nuclear export sequence (Kernexportsequenz), NoLS: nucleolar localization sequence (Nucleoluslokalisationssequenz). (Aus Michael & Oren, 2002.)

1.2.4.2. Feedback-Regulation von Mdm2 und p53

Die besondere und wichtige Rolle des Onkoproteins als Ubiquitin-Ligase für den Tumorsuppressor p53 wurde erstmals 1997 beschrieben (Haupt et al., 1997; Honda et al., 1997; Kubbutat et al., 1997; Midgley & Lane, 1997). In unstimulierten Zellen kann so die Menge an p53 niedrig gehalten werden. Neben der Übertragung von Ubiquitin auf verschiedene Lysinreste des p53 hat das Mdm2 auch die Fähigkeit sich selbst zu ubiquitylieren (Fang et al., 2000; Honda & Yasuda, 2000). Eine gegenseitige Wechselwirkung von p53 und Mdm2 geschieht aber auch auf der transkriptionellen Ebene. Wie schon erwähnt, besitzt das Mdm2-Gen einen p53-abhängigen Promotor. So induziert das p53 die Expression seiner eigenen E3 Ligase, daraus resultiert ein negativer Feedbackmechanismus der p53-Regulation (Barak et al., 1993; Wu et al., 1993). Der Tumorsuppressor p53 spielt für die Zellintegrität eine wichtige Rolle (Abbildung 4). Unter Zellstressbedingungen (DNA-Schädigung) kommt es zu einer massiven p53-Expression und daraufhin zu einem Zellzyklus-Arrest und zu einer DNA-Reparatur, oder aber zur Induktion der Apoptose (für einen Überblick siehe Haupt et al., 2003; Oren et al., 2002). Einer der wichtigsten Gründe für diesen p53-Anstieg ist die Blockierung der Mdm2-vermittelten Ubiquitylierung (für einen Überblick siehe Giaccia & Kastan, 1998). Im folgenden werden hierfür wichtige Regulationsmechanismen vorgestellt.

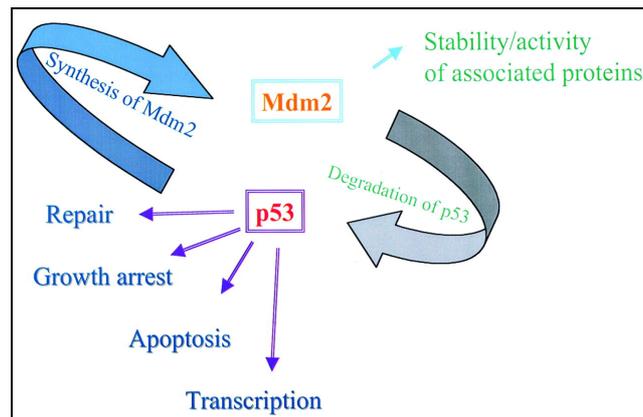


Abbildung 4: Das Wechselspiel zwischen p53 und Mdm2. Dargestellt sind die wichtigsten regulatorischen Funktionen von p53. Jenseits der p53-Regulation hat Mdm2 auch einen Einfluss auf die Aktivität und Stabilität anderer regulatorischer Proteine. (Aus Alarcon-Vargas & Ronai, 2002.)

1.2.4.3. Posttranslationale Modifikationen von Mdm2 und p53

Posttranslationale Modifikationen sind für schnelle und reversible Reaktionen auf Signale besonders gut geeignet. So können die Ligaseaktivität von Mdm2, die Bindung von p53 an das Mdm2 oder die zelluläre Verteilung der beiden Proteine beeinflusst werden. An erster Stelle muss für beide Proteine die Phosphorylierung genannt werden. Inzwischen wurden eine Vielzahl von Signalwegen aufgedeckt, die unter bestimmten Bedingungen und an bestimmten Stellen beide Proteine modifizieren (für einen Überblick siehe Alarcon-Vargas & Ronai, 2002). p53 wird unter Zellstressbedingungen am N-terminalen Bereich (Bindungsstelle für das Mdm2) phosphoryliert, sodass Mdm2 nicht mehr binden kann und p53 stabilisiert wird (Chehab et al., 2000; Hirao et al., 2000; Banin et al., 1998; Shieh et al., 1997). Im Gegensatz dazu ist die COP9-Signalosom-vermittelte Phosphorylierung in der zentralen Domäne von p53 ein Signal für dessen proteasomalen Abbau (Bech-Otschir et al., 2001). Dies war ein erster Hinweis für eine mögliche Kooperation zwischen dem COP9 Signalosom und dem Ubiquitin/26S-Proteasom-System. Dieser Sachverhalt wird in der hier vorliegenden Arbeit noch eingehender untermauert werden.

Neben Phosphorylierung wurde für p53 auch eine Acetylierung beschrieben, die eine Erhöhung der transkriptionellen Aktivität induziert (Pearson et al., 2000).

Zusätzlich zur stressinduzierten p53-Phosphorylierung konnte auch die Phosphorylierung von Mdm2 bei DNA-Schädigung gezeigt werden (durch die ATM-Kinase an Serin 395). Dadurch wird der Abbau von p53 über Mdm2 verhindert und außerdem der

Export von p53 aus dem Zellkern blockiert (Michael & Oren, 2002). Auch andere Signalwege führen zu einer Phosphorylierung von Mdm2, die eine Bindung zwischen Mdm2 und p53 verhindert und so p53 stabilisiert (Goldberg et al., 2002; Mayo et al., 1997). Unter mitogener Stimulierung (z.B. Serumstimulation) wird Mdm2 an Serin 166 und Serin 186 modifiziert, was in der Folge zu einer erhöhten Lokalisation im Zellkern und damit zu einem verstärkten p53-Abbau führt (Mayo & Donner, 2001). Weitere Phosphorylierungen konnten innerhalb der acidischen Domäne von Mdm2 nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte nach ionisierender Bestrahlung von Zellen eine Reduzierung der Phosphorylierung in diesem Bereich festgestellt werden, während gleichzeitig p53 in den Zellen akkumuliert wird (Blattner et al., 2002).

Für das Mdm2 ist noch eine weitere posttranslationale Modifikation bekannt: Die kovalente Verknüpfung mit SUMO1 (**S**mall **U**biquitin-related **M**odifier **1**, auch als Pic1, Ubl1, hSmt3 oder Sentrin bezeichnet). SUMO1 wird, ähnlich dem Ubiquitin-System, mit Hilfe einer Enzymkaskade reversibel an Target-Proteine gebunden. Durch diese Verknüpfung wird das Mdm2 vor seiner Auto-Ubiquitylierung geschützt und die E3 Ligaseaktivität erhöht (Buschmann et al., 2000). Eine zusammenfassende Darstellung der Modifikationen von Mdm2 ist kürzlich von Meek und Knippschild publiziert worden (Meek & Knippschild, 2003).

1.2.4.4. Regulation durch andere interagierende Proteine

Nicht nur posttranslationale Modifikationen können die Aktivität und Stabilität von Proteinen beeinflussen. Sowohl für p53 als auch für Mdm2 existiert eine stetig wachsende Liste von Bindungsproteinen, die entweder regulatorische Funktionen besitzen oder durch ihre Bindung selbst reguliert werden. Solch ein Modulator ist das MdmX (auch als Mdm4 oder Hdm4 bezeichnet, Locus: 1q32.1), ein Mitglied der Mdm2 Familie (Stad et al., 2001). Obwohl es strukturell identisch ist (p53-Bindungsdomäne, acidische Region, RING-Domäne) und p53 binden kann, wurde bis jetzt keine Ubiquitin-Ligaseaktivität nachgewiesen. Mdm2 und MdmX können über ihre RING-Domäne Hetero-Oligomere bilden (Tanimura et al., 1999). Interessanterweise stabilisierte die Überexpression von MdmX sowohl das p53 als auch Mdm2 (Stad et al., 2001; Sharp et al., 1999). Die Aufklärung der genauen Regulationsmechanismen ist, besonders

aufgrund dieser divergenten Ergebnisse, Gegenstand gegenwärtiger Untersuchungen (siehe z.B. Linares et al., 2003).

Andere Proteine greifen in die p53-Regulation ein, indem sie die subzelluläre Verteilung von Mdm2 beeinflussen. Ein Beispiel hierfür ist das Protein p19^{ARF}/p14^{ARF} oder kurz ARF (**A**lternative **R**eading **F**rame) (Kurokawa et al., 1999; Pomerantz et al., 1998; Zhang et al., 1998). ARF verhindert den Abbau von p53, indem es an den N-terminalen Bereich von Mdm2 bindet und es in den Nucleolus führt (Tao & Levine, 1999; Weber et al., 1999; Zhang & Xiong, 1999). Interessanterweise wird die ARF-Expression von p53 herunter reguliert, was für die p53-Regulation einen zusätzlichen Feedbackmechanismus darstellen könnte (Stott et al., 1998).

Neben dem Einfluss auf die p53-Stabilität gibt es noch andere Signalwege, die über Mdm2 reguliert werden können. Interaktionspartner hierfür sind beispielsweise der Tumorsuppressor pRb (**R**etinoblastoma **p**rotein) und der Transkriptionsfaktor E2F1, die funktionell eng miteinander verbunden sind, das ribosomale Protein L5 und CBP/p300 (für einen Überblick siehe Iwakuma & Lozano, 2003; Daujat et al., 2001).

1.3. Die Proteinkinasen PKD und CK2

Proteinkinasen sind innerhalb der Zelle für die Signaltransduktion von entscheidender Bedeutung. Durch die kovalente Bindung eines Phosphatrestes können die Funktion und die zelluläre Verteilung eines Proteins sowie seine Halbwertszeit schnell und effizient beeinflusst werden, da dies posttranslational erfolgt. Für die Abspaltung der Phosphatreste sind die Protein-Phosphatasen verantwortlich, auf die aber im folgenden nicht näher eingegangen wird.

1.3.1. Struktur, Funktion und Regulation der PKD (PKD1)

Die erste Beschreibung der Protein Kinase D (frühere Bezeichnung: PKC μ) erfolgte über eine konventionelle PCR-Klonierungsstrategie aus einer murinen cDNA-Bibliothek (Valverde et al., 1994). Zunächst wurde die PKD als ein Mitglied einer neuen Untergruppe der PKC-Familie angesehen (Johannes et al., 1994). Allerdings bestand und besteht die einzige Gemeinsamkeit nur in der Bindung von und der Stimulierbarkeit durch Diacylglycerol (DAG). Spätere Klonierungsexperimente konnten

zwei weitere Isoformen der PKD beschreiben und wiesen damit auf eine neue Familie von Proteinkinasen hin, die über „Second Messenger“ stimuliert werden können (Sturany et al., 2001; Hayashi et al., 1999).

Abbildung 5 zeigt die bis jetzt bekannten drei Formen der PKD-Familie mit ihren typischen aus der Proteinsequenz analysierten Strukturmotiven (Strukturdaten aus NMR- oder Röntgenstrukturanalysen sind noch nicht vorhanden). Die PKD (PKD1) besitzt neben der katalytischen Domäne im C-terminalen Bereich mehrere unterschiedliche regulatorische Domänen. Beginnend mit einer apolaren Region (AP, hauptsächlich Alanin und Prolin) am N-Terminus, schließen sich zwei Zn-Finger-Motive (CYS1 und CYS2), eine acidische Region (AC) und eine PH-Domäne (**P**leckstrin **H**omology) an. Diese verschiedenen regulatorischen Proteindomänen sind für die vielfältigen Funktionen der PKD, wie die Golgi-Organisation und der Vesikeltransport zur Plasmamembran, Immunantwort, Apoptose und Zellproliferation, verantwortlich. Auch die Kinaseaktivität wird intramolekular über die N-terminalen regulatorischen Domänen beeinflusst: Beide Zn-Finger-Motive und die PH-Domäne üben einen inhibitorischen Effekt auf die katalytische Domäne aus (Vertommen et al., 2000).

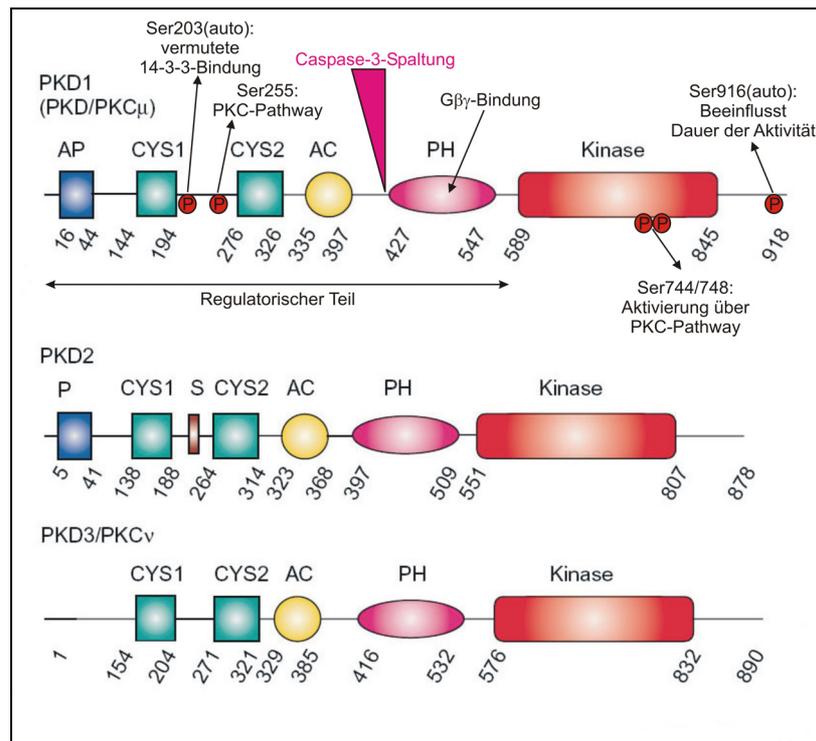


Abbildung 5: Die PKD-Familie mit Proteindomänen. AP: Alanin- u. Prolinreich; P: Prolinreich; S: Serinreich; CYS1 u. CYS2: Cysteinreiche Zn-finger Domänen; AC: Acidische Domäne; PH: Pleckstrin Homology Domäne; Kinase: Katalytische Domäne. Für die PKD1 sind die über den PKC-Pathway und über die Autophosphorylierung modifizierten Serine angegeben. Die PH-Domäne der PKD1 bindet keine Lipide.

Die PKD kann über die sequentielle Aktivierung der Phospholipase C γ (PLC γ) und der daraus resultierenden Freisetzung von DAG stimuliert werden. Dabei wird über die Bindung von DAG an das Zn-Finger-Motiv CYS1 bzw. an CYS2 die Translokation der Kinase an den Golgi-Apparat bzw. an die Zellmembran vermittelt (Baron & Malhotra, 2002; Maeda et al., 2001; Matthews et al., 1999). Parallel dazu wird die PKD durch eine Ser/Thr-Phosphorylierung im Aktivierungs-Loop (katalytische Domäne) über den PKC-Signalweg aktiviert. Tatsächlich spielt die Phosphorylierung von Serin 744 und Serin 748 im Aktivierungs-Loop eine entscheidende Rolle. Bis jetzt wurden dafür drei PKC-Kinasen (PKC ϵ , PKC η und PKC θ) identifiziert (Yuan et al., 2002; Waldron et al., 2001; Iglesias et al., 1998). Zusätzlich konnten neuere Untersuchungen den Einfluss einer etwas langsameren Autophosphorylierung von Serin 748 auf die Aktivierung der PKD nachweisen (Waldron & Rozengurt, 2003) (Abbildung 5: zwei weitere Autophosphorylierungsstellen sind bekannt: das Serin 203 und das C-terminale Serin 916). Des Weiteren kann die PKD-Aktivität durch die Bindung an den G $\beta\gamma$ -Subkomplex stimuliert werden. Dies ist insbesondere für die Funktion bei der Golgi-Organisation und dem Vesikeltransport zur Plasmamembran ein ausschlagge-

bender Faktor (Jamora et al., 1999; Jamora et al., 1997). Dabei ist die PH-Domäne der PKD für die direkte Bindung der G $\beta\gamma$ -Untereinheiten verantwortlich (Waldron & Rozengurt, 2003). Ein dritter Aktivierungsmechanismus wird bei der Apoptoseinduktion über die Abspaltung eines Teils der regulatorischen Domäne durch Caspase 3 vermittelt (Endo et al., 2000). Abbildung 6 veranschaulicht noch einmal die zellulären Regulationsmechanismen der PKD (für einen ausführlichen Überblick siehe Van Lint et al., 2002).

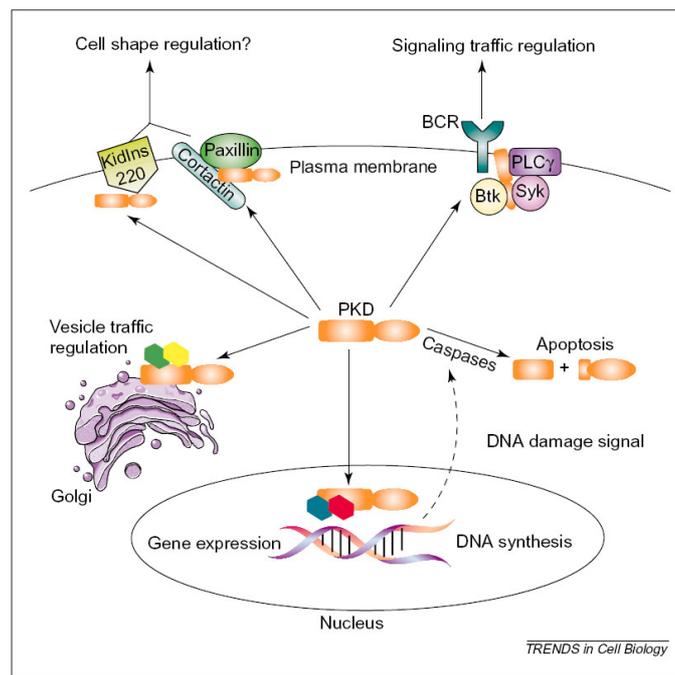


Abbildung 6: Zusammenfassende Darstellung der PKD-Aktivität an unterschiedlichen Orten innerhalb der Zelle. BCR: B-Zellrezeptor; Btk u. Syk: Tyrosin-Kinasen; Kidlns 220: Kinase D interacting substrate of 220 kDa. (Aus Van Lint et al., 2002.)

1.3.2. Substrate und Interaktionspartner der PKD

Nur wenige Substratproteine der PKD konnten bis jetzt identifiziert werden. Mittels Peptidphosphorylierungsexperimenten konnte jedoch eine minimale Konsensussequenz ermittelt werden: Hiernach werden an der -5 Position ein Lysin und an der -3 Position ein Arginin bevorzugt (LXRXXS/T) (Nishikawa et al., 1997). Neben dem neuronalen Membranprotein Kidins220 (**K**inase **d** interacting **s**ubstrate of **220** kDa) (Iglesias et al., 2000) wird auch der Transkriptionsfaktor c-Jun an einer Position phosphoryliert, die nicht von der Jun N-terminalen Kinase (JNK) modifiziert wird (Hurd et al., 2002). Ein drittes Substrat ist der Ras-Effektor RIN1 (**R**as **I**nterference)

(Wang & Colicelli, 2001). Die kompetitive Bindung von RIN1 an die Raf-Bindungsstelle des Ras-Proteins, wirkt es der Raf-Kinase-Aktivierung durch Ras entgegen. Wird das RIN1 jedoch durch die PKD an Serin 351 phosphoryliert, induziert dies die Bindung an das Phosphoserin-bindende Protein 14-3-3 τ und führt zur Dissoziation des RIN1 von Ras. Interessanterweise konnte auch für die PKD eine Interaktion mit dem 14-3-3 τ -Protein nachgewiesen werden (Hausser et al., 1999). Das durch Autophosphorylierung modifizierte Serin 203 befindet sich in der Bindungsstelle, die genau dem Bindungsmotiv des 14-3-3 τ -Proteins (RSXpSXP) entspricht.

Neben der besonderen Rolle in dem mitogen-aktivierten Raf-MEK-ERK-Signalweg spielt die PKD auch in der Immunregulation eine Rolle. Hierbei ist, neben der PKD-Aktivierung durch das „Crosslinking“ der B- oder T-Zellrezeptoren, die Assoziation der Tyrosinkinase Btk (**B**ruton's **t**yrosine **k**inase) mit der PKD notwendig (Hausser et al., 1999).

Die Rekrutierung der PKD an die Membranen des Trans-Golgi-Netzwerkes (TGN) ist ausschlaggebend für eine Einflussnahme auf die Abspaltung der Transportvesikel vom TGN. In dieser Hinsicht wird die Interaktion der PKD mit den beiden Lipidkinasen PI-4-Kinase und PI-4,5-Kinase als eine notwendige Bedingung zur Abknospung der Vesikel diskutiert (Nishikawa et al., 1998).

1.3.3. Struktur, Funktion und Regulation der CK2

Seit der Entdeckung im Jahre 1954 von Burnett und Kennedy scheint die CK2 (früher Casein Kinase II) noch immer rätselhaft und ungewöhnlich zu sein (Burnett & Kennedy, 1954). Ungewöhnlich unter den Ser/Thr-Proteinkinasen ist die konstitutive Kinaseaktivität und rätselhaft blieb für lange Zeit (bis in die 90er Jahre) ihre physiologische Rolle in der Zelle. Die CK2 kommt üblicherweise in einer tetrameren Form vor: Ein Dimer aus zwei β -Untereinheiten bindet zwei katalytische α - und/oder α' -Untereinheiten. Allerdings besitzt die katalytische α -Untereinheit alleine auch Kinaseaktivität. Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse konnte die tetramere Anordnung der Untereinheiten bis ins Detail untersucht werden (Abbildung 7, (Niefind et al., 2001).

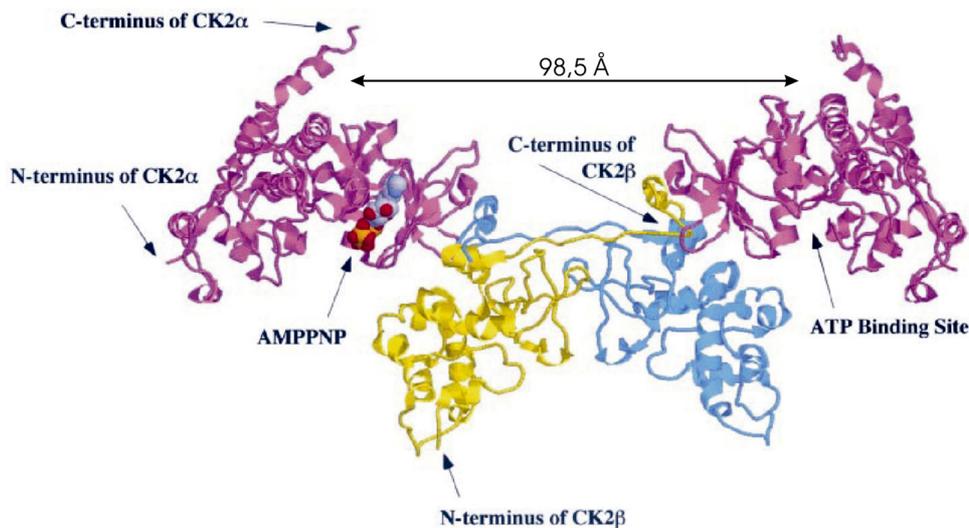


Abbildung 7: Bändermodell der tetrameren CK2 (aus einer Kristallstruktur mit einer Auflösung von 3,1 Å (Niefind et al., 2001)). Die katalytischen CK2 α Untereinheiten sind in Magenta illustriert. Eine regulatorische CK2 β Untereinheit ist in Gelb dargestellt, die andere in Blau. Das ATP-Analogon Adenosin-5'-[$\beta\gamma$ -imido]triphosphat (AMP-PNP) ist nur an einer ATP-Bindungsstelle gebunden. Die Bedeutung dieses Befundes ist noch ungeklärt. 1 Å = 0,1 nm. (Aus Litchfield, 2003.)

Eine dritte katalytische α -Untereinheit (α'') wurde erst später entdeckt (Shi et al., 2001) und ist wahrscheinlich über alternatives Splicing aus dem CK2 α -Gen entstanden. Erstaunlicherweise entstammen die katalytischen Untereinheiten CK2 α und CK2 α' aus zwei unterschiedlichen Genen (Wirkner et al., 1994; Yang-Feng et al., 1994). In Hefen gibt es noch eine zweite β -Untereinheit (Glover, 1998). Obwohl die Bindung der α - an die β -Untereinheiten in vitro recht stabil ist, deutet die Kristallstruktur auf eine vergleichsweise lockere Assoziation hin (Niefind et al., 2001). Dies stützt Beobachtungen, dass beide Untereinheiten getrennt in unterschiedlichen Subkompartimenten der Zelle vorkommen und so getrennte Aufgaben haben können (Martel et al., 2001; Krek et al., 1992). Dennoch spielt die β -Untereinheit für die Kinaseaktivität eine wichtige Rolle, indem sie die Stabilität der CK2 erhöht und die Substratspezifität modulieren kann (Canton et al., 2001; Graham & Litchfield, 2000; Marin et al., 1999; Meggio et al., 1992). Bemerkenswert ist, dass die CK2 evolutionär gesehen eine der am stärksten konservierten Proteinkinasen ist. Ferner führt eine gleichzeitige Deletion der katalytischen Untereinheiten α und α' zur Letalität (Padmanabha et al., 1990).

Innerhalb der Zelle ist die CK2 sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma lokalisiert und liegt an spezifischen Strukturen oder Organellen wie der Plasmamembran, dem

endoplasmatischen Retikulum (ER), dem Golgi und den Ribosomen assoziiert vor (Faust & Montenarh, 2000; Sarrouilhe et al., 1998; Mauxion et al., 1996; Issinger, 1977). Es ist somit nicht überraschend, dass die CK2 eine globale Rolle in der Zellregulation (Signaltransduktion, Genexpression und Zellteilung/Apoptose) spielt. Umso erstaunlicher ist, dass die CK2 nicht, wie bei Kinasen üblich, über Signalwege aktiviert/deaktiviert wird, sondern konstitutiv aktiv vorliegt. Abbildung 8 gibt einen Einblick der möglichen vielfältigen Funktionen der CK2 innerhalb der zellulären Signalwege. Überdies ist die CK2 an der Zellzyklusregulation beteiligt: In *S. cerevisiae* ist sie erforderlich für den G₁/S- und G₂/M-Übergang (Glover, 1998). Systematische Phosphoproteom-Analysen in Hefe belegen die Bedeutung der CK2 als einen pleiotropen Wechselspieler (Ficarro et al., 2002). Dabei machen etwa ein Viertel (!) des gesamten eukaryontischen Phosphoproteoms CK2-Phosphorylierungsstellen aus. In Übereinstimmung mit der Rolle als pleiotroper Wechselspieler legte eine weitere systematische Studie zu Protein-Protein-Interaktionen in Hefe die Beteiligung von zwei oder mehreren CK2-Untereinheiten an sieben Proteinkomplexen offen (Gavin et al., 2002). Dabei haben vier Komplexe einen Einfluss auf Transkription/DNA-Reparatur/Chromatin-Strukturierung, einer auf den RNA-Metabolismus, ein weiterer auf den Protein/RNA-Transport und der letzte auf die Signalweitergabe innerhalb der Zelle.

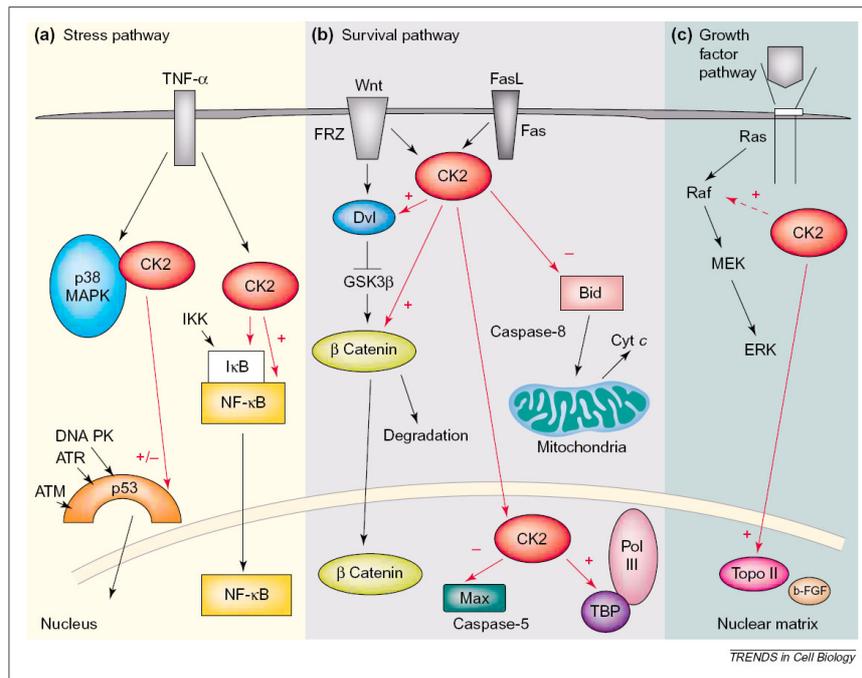


Abbildung 8: Die CK2 als möglicher Regulator im Hintergrund. Die Pfeile zeigen die Enzym-Substrat-Beziehungen und die Wirkungen der Phosphorylierung auf die Funktionen der einzelnen Substrate (+ oder -). Die schematische und vereinfachte Darstellung verdeutlicht die vielfältigen Möglichkeiten der CK2 als Regulator innerhalb der gezeigten Signalwege. (Aus Ahmed et al., 2002.)

1.3.4. Substrate der CK2

Obwohl die CK2 über die Phosphorylierung des Caseins entdeckt wurde, spielt dies physiologisch keine Rolle. Nachdem erst in den 80er Jahren etliche neue Substrate beschrieben werden konnten, ist die Zahl nunmehr auf über 300 Substrate angestiegen (für einen Überblick siehe Meggio & Pinna, 2003). Während metabolische Enzyme nur einen kleinen Teil der Substratproteine darstellen, machen Signalproteine wie Transkriptionsfaktoren, Proteine des Transkriptions- und Translationsapparates und auch virale Proteine einen Großteil der Substrate aus. Für die CK2-Phosphorylierung ist die minimale Konsensussequenz **S/TXXE/D/pS/pY** (Meggio et al., 1994). Somit gehört die CK2 auch zur Klasse der Proteinkinasen, deren Target-Sequenzen durch andere vorgeschaltete Kinasen erstellt werden können (Roach, 1991) (In PROSITE ist dieser Sachverhalt bedauerlicherweise noch immer nicht aufgenommen.). In Abbildung 8 ist ein Beispiel für die Rolle der CK2 in der Apoptose dargestellt. Bid, ein pro-apoptotisches Protein der Bcl-2-Familie, wird von der CK2 phosphoryliert und kann dadurch nicht mehr von der Caspase 8 geschnitten (prozessiert) werden und bleibt inaktiv (Desagher et al., 2001). Es konnte hierbei gezeigt werden, dass die Phosphorylierungsstelle in unmittelbarer Nachbarschaft zur Spal-

tungsstelle der Caspase, somit also zielgerichtet, vorliegt. Diese anti-apoptotische Rolle der CK2 konnte durch weitere Befunde, wie der Phosphorylierung des Proteins Max (Transkriptionspartner des Proto-Onkoproteins c-myc) und dem damit einhergehenden Schutz vor einer Caspase-vermittelten Degradation, erhärtet werden (für drei weitere Beispiele siehe Ahmed et al., 2002; Krippner-Heidenreich et al., 2001).

Ein weiterer bedeutsamer, jedoch noch dürftig untersuchter Aspekt der CK2-Phosphorylierung ist die Generierung von Phospho-S/T-Bindungsmotiven, beispielsweise für das Bindungsmotiv der 14-3-3-Proteine oder die WD40-Domäne (s.o.). In der Tat kann das Bindungsmotiv der 14-3-3-Proteine (R(S/Φ)XpSXP oder RX(S/Φ)XpSXP) von der CK2 generiert werden: Das Motiv RXX(X)pS konnte in 25 CK2-Phosphorylierungsstellen gefunden werden inklusive eines „perfekten“ Bindungsmotives beim Transkriptionsfaktor CSX (...**RYLpSAPERD**...) (für einen Überblick siehe Meggio & Pinna, 2003; Kasahara & Izumo, 1999). Während diese Daten noch experimentell bestätigt werden müssen, zeigen andere Befunde die CK2-abhängige Generierung der Phospho-S/T-Bindungsmotive für die WD40-Domäne (UBC3, UBC3B, Vpu und IκBα). Bemerkenswert hierbei ist, dass IκBα an Serin 32 und Serin 36 in vitro von der CK2 phosphoryliert wird (Taylor et al., 1999), jedoch auch, nach TNFα-Stimulation, von dem IKK-Komplex (Winston et al., 1999 und Referenzen darin). Dadurch wird der NFκB-Inhibitor an das F-Box-Protein β-TrCP (Teil des Cullin-E3-Ligase-Komplexes SCF) gebunden, an diesem SCF-Komplex ubiquityliert und anschließend proteasomal abgebaut (Fuchs et al., 1999; Winston et al., 1999; Yaron et al., 1998). Somit könnte auch die Proteinkinase CK2 als ein konstitutiv aktiver Regulator im Ubiquitin/26S-Proteasom-System fungieren. In der vorliegenden Arbeit wird diese Verknüpfung von Phosphorylierung und Regulierung der Proteininstabilität am Beispiel des COP9 Signalosoms und dessen enge Verbindung zum Ubiquitin/26S-Proteasom-System gezeigt werden.