

3. Ergebnisse

3.1. *Das COP9 Signalosom besitzt eine Kinaseaktivität*

Erste Hinweise auf eine Kinaseaktivität lieferten die Aufreinigung des CSN-Komplexes und erste Kinase-Assays (Seeger et al., 1998). Daraufhin wurden Phosphopeptidanalysen der CSN-Substrate c-Jun, p53, ICSBP (Interferon **C**onsensus **S**equence **B**inding **P**rotein) und I κ B α durchgeführt. Tabelle 2 zeigt die identifizierten radioaktiven Phosphopeptide der jeweiligen Substrat-Proteine mit den möglichen phosphorylierten Aminosäuren und den korrespondierenden Konsensussequenzen der Kinasen (soweit bekannt). Die wahrscheinlichen Phosphorylierungsstellen sind hierbei Serin (Ser) und Threonin (Thr), was klar auf Ser/Thr-Kinasen hindeutet.

Tabelle 2: Phosphopeptid-Analyse der Peptide aus dem Kinase-Assay mit dem aufgereinigten CSN-Komplex und verschiedenen Substrat-Proteinen. ICSBP: Interferon Consensus Sequence Binding Protein; JNK: Jun-N-terminal Kinase.

Protein	Radioaktive Peptide	Putative P-Stellen	Konsensus
c-Jun	36 52 QSMTLNLDADPVG SLKPH	Ser48	PKC
	53 69 LRAKNSDLLT SPDV GLL	Ser63 Thr62	JNK CK2
	58 79 SDLLT SPDV GLLKLAS PE LERL	Ser63 Ser73 Thr62	JNK CK2 CK2
	80 97 IIQSSNGHITTTPTPTQF	?	non
	98 114 LCPKNVTDEQEGFAEGF	?	non
	115 135 VRALAE L HSQNTLPSVTSAAQ	?	non
	151 177 GGSGSGGFSASLHSEPPVYANLSNF	?	non
p53	94 103 SSSV PSQ KTY	Ser99	PKC
	142 159 PVQLWVDSTPPP G TRVRA	Ser149 Thr150 Thr155	non
	384 393 MFKTEGP DS D	Ser392	CK2
ICSBP	93 108 EEVTDR SQ L D ISEPYK	Ser99	CK2

	253	269		
	PPADAIP SER QRQVTRK		Ser260	PKC
I κ B α	271	296	Ser283	CK2
	QLTLENLQMLPE SEDEE SYD TESE FT		Thr291	CK2

Die Tatsache, dass die CSN-Untereinheiten keinerlei Homologien mit bekannten Kinasen besitzen, war der erste Hinweis darauf, dass es sich um assoziierte Kinasen handeln muss. Ein weiteres und bedeutsames Indiz für (eine) gebundene Kinase(n) lieferte die Elektronenmikroskopie, die in Kooperation mit Dr. Barbara Kapelari am MPI für Biochemie in Martinsried durchgeführt wurde. Hier wurde ein ATP-Analogon an Goldpartikel gebunden und zu dem aufgereinigten Komplex gegeben. Etwa 10-15% aller CSN-Partikel waren mit markiertem ATP assoziiert. Abbildung 9 zeigt, dass jeweils nur ein ATP-Goldpartikel an der Peripherie des Komplexes gebunden wurde. Aus der Tatsache, dass keines der CSN-Untereinheiten eine Konsensussequenz für eine ATP-Bindungsstelle besitzt, ergibt sich eine mögliche Assoziation mit ATP-bindenden Proteinen, höchstwahrscheinlich mit Kinasen.

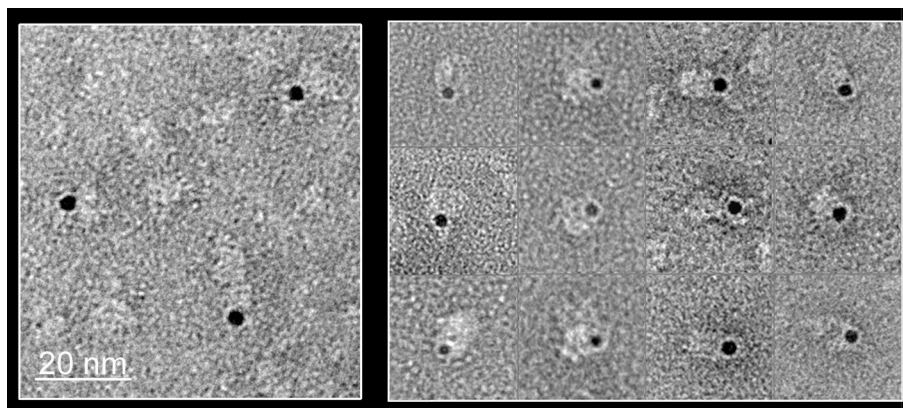


Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CSN-Partikeln, die zuvor mit Gold-markierten ATP-Analoga inkubiert wurden. Die Fotogalerie (rechte Seite) zeigt typische Positionen der ATP-Goldcluster. Die Aufnahmen wurden in Kooperation mit Dr. Barbara Kapelari am MPI für Biochemie in Martinsried gemacht.

3.2. Identifizierung der Kinasen während der Komplexisolierung

Zur Identifizierung möglicher Kinasen wurden Westernblot-Analysen durchgeführt. Mehrere Antikörper gegen Kinasen wurden getestet, u.a. gegen die JNK-Familie und

gegen die PKC-Isoformen α , β , γ und Θ . Dabei konnten keine detektierbaren Mengen dieser Kinasen im aufgereinigten Komplex erkannt werden. Auch eine von Wilson et al. beschriebene assoziierte Kinase, die Inositol-1,4,5-trisphosphat-5/6-kinase (IP-5/6-Kinase) (Wilson et al., 2001), wurde in meiner CSN-Präparation aus humanen Erythrocyten nicht gefunden. Allerdings konnten zwei andere Kinasen aufgespürt werden: Die Proteinkinasen CK2 und PKC μ (der neue Name ist PKD bzw. PKD1, da sie zu einer neuen Proteinkinase-Familie gehört; siehe Abschnitt „Struktur, Funktion und Regulation der PKD (PKD1)“ in der Einleitung.). Zur Untersuchung einer tatsächlichen Co-Purifizierung wurde während der Präparation nach jedem Aufreinigungsschritt eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Abbildung 10 zeigt das Ergebnis für die Kinasen PKD, IP-5/6-Kinase und CK2 (α -Untereinheit). Dargestellt ist ein Westernblot mit Fraktionen von der DEAE-Säule, einem Anionenaustauscher für die erste (grobe) Aufreinigung (Abbildung 10A). Der Nachweis des CSN-Komplexes während der Aufreinigung erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Untereinheit CSN5. In den Fraktionen, die den Komplex enthielten, konnten die Kinasen nachgewiesen werden, auch die IP-5/6-Kinase. Für die weitere Präparation wurden die Fraktionen 30-40 gepoolt.

Es folgte eine Dichtegradienten-Zentrifugation mit einem Glycerolgradienten von 10-40%. Auch hier co-sedimentierten der CSN-Komplex, die PKD, die CK2 und die IP-5/6-Kinase in gleichen Fraktionen (Abbildung 10B).

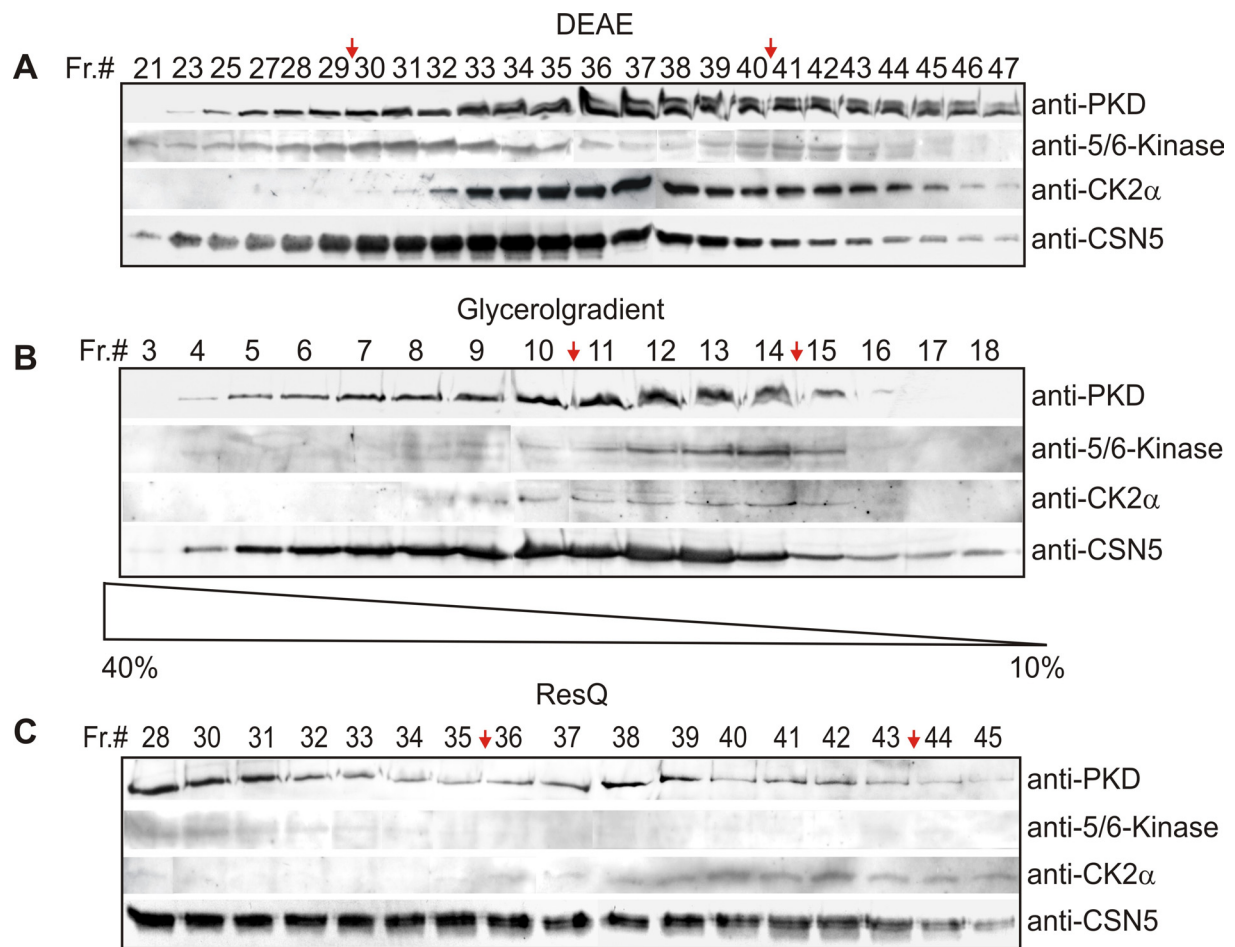


Abbildung 10: Die Proteinkinasen CK2 und PKD (PKD1) co-purifizieren mit dem CSN-Komplex während der Präparation aus humanen Erythrocyten. **(A)** Westernblots der Fraktionen 21 bis 47 nach der DEAE-Säule. Die Blots wurden mit den Antikörpern anti-PKD, anti-5/6-Kinase, anti-CK2 α und anti-CSN5 getestet. Fraktionen 30 bis 40 (Pfeile) wurden gepoolt und die spezifische Curcumin-sensitive Kinaseaktivität bestimmt (siehe Tabelle 3 und „Material und Methoden“). **(B)** Westernblots der Fraktionen 3 bis 18 nach einem 10-40% Glycerolgradienten mit den Antikörpern wie in (A). Fraktionen 11 bis 14 (Pfeile) wurden zur weiteren Aufreinigung gepoolt. **(C)** Westernblots der Fraktionen 28 bis 45 nach der ResourceQ-Säule mit den Antikörpern wie in (A). Fraktionen 36 bis 43 wurden gepoolt.

Westernblots mit Fraktionen aus der ResourceQ-Säule sind in Abbildung 10C dargestellt. Die PKD konnte in den gleichen Fraktionen wie der Komplex detektiert werden. Die Proteinkinase CK2 wurde in den CSN-Fraktionen mit hoher Salzkonzentration detektiert, während die IP-5/6-Kinase schon bei niedriger Salzkonzentration eluierte. Für die weitere Aufreinigung wurden die Fraktionen 36-43 vereinigt.

Der finale Schritt läuft über die MonoQ-Säule, eine sehr fein trennende Anionenaustausch-Säule. Der aufgereinigte CSN-Komplex eluierte in den Fraktionen 11 und 12 (Abbildung 11, Coomassie-Färbung). Im Westernblot sind die PKD und die CK2 nachweisbar, nicht aber die IP-5/6-Kinase.

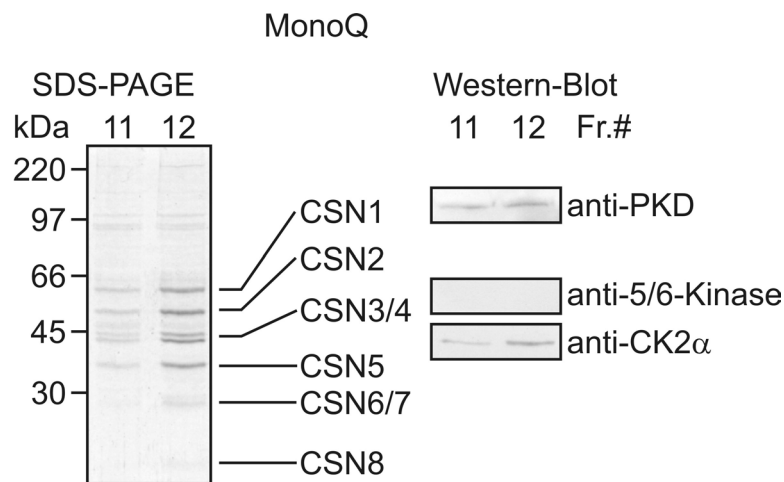


Abbildung 11: Die Proteinkinasen CK2 und PKD co-purifizieren mit dem CSN-Komplex während der Präparation aus humanen Erythrocyten. SDS-PAGE eines 20- μ l-Aliquots der Fraktionen 11 und 12 nach der MonoQ-Säule. Die CSN-Untereinheiten sind angezeigt. Westernblots der gleichen Fraktionen mit Antikörpern gegen PKD, CK2 α und IP-5/6-Kinase zeigen die Anwesenheit der CK2 α und der PKD, nicht aber der IP-5/6-Kinase in der finalen CSN-Präparation an.

Während der Signalosom-Aufreinigung wurde in Kinase-Assays die spezifische Curcumin-sensitive Phosphorylierung von c-Jun als Substrat durch die CSN-Fractionen gemessen, die im späteren Verlauf für die weitere Aufreinigung gepoolt wurden. Curcumin ist als ein Inhibitor der CSN-assoziierten Kinasen beschrieben (Henke et al., 1999). Somit wurde die spezifische (massenbezogene) Curcumin-sensitive Kinaseaktivität als Maß für eine Co-Purifizierung von (assoziierten) Kinasen herangezogen. Die Daten sind in der Tabelle 3 zusammengefasst. Die spezifische Aktivität im Lysat wurde als Richtwert auf Eins gesetzt. Schon nach der DEAE-Säule war die Curcumin-sensitive Kinaseaktivität (pro μ g Protein) 1500-fach höher in den gepoolten Fraktionen. Eine weitere signifikante Anreicherung wurde durch die Dichtegradienten-Zentrifugation im Glycerolgradienten erzielt. Nach der MonoQ-Säule gab es im Vergleich zur ResourceQ keine weitere Erhöhung der spezifischen Curcumin-sensitiven Kinaseaktivität (nicht gezeigt).

Tabelle 3: Spezifische Aufreinigungsfaktoren der Curcumin-sensitiven Kinaseaktivität. Die Kinaseaktivität im Lysat wurde auf „1“ gesetzt. Nach der ResourceQ-Säule gab es keine weitere Erhöhung des Aufreinigungsfaktors.

Präparationsschritt	Aufreinigungs-Faktor
Lysat	1
DEAE-Säule	1.500
Glycerol-Gradient	12.000
ResourceQ	18.000

3.3. CK2 und PKD binden an das COP9 Signalosom

Um nun neben der Co-Purifizierung auch eine Bindung zwischen dem CSN-Komplex und den Kinasen mit anderen Methoden nachzuweisen, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Hierbei wurde zuerst der Nachweis am isolierten Komplex mit Hilfe des CSN7-Antikörpers erbracht. In Abbildung 12A ist klar zu erkennen, dass die katalytisch aktive CK2 α -Untereinheit mit dem COP9 Signalosom co-immunopräzipitiert. Der Nachweis des Komplexes erfolgte wiederum mit dem Antikörper gegen die CSN5-Untereinheit. Die PKD konnte hier nicht detektiert werden, vermutlich aufgrund zu geringer Proteinmengen. Wurde aber der aufgereinigte Komplex mit rekombinanter Myc-getaggter PKD vorinkubiert, so konnte auch hier die PKD im Immunpräzipitat nachgewiesen werden (Abbildung 12B). Immunpräzipitationen aus HeLa-Zelllysaten bestätigten die vorherigen Versuche, dass die Proteinkinasen CK2 und PKD am endogenen CSN-Komplex assoziiert sind (Abbildung 12C).

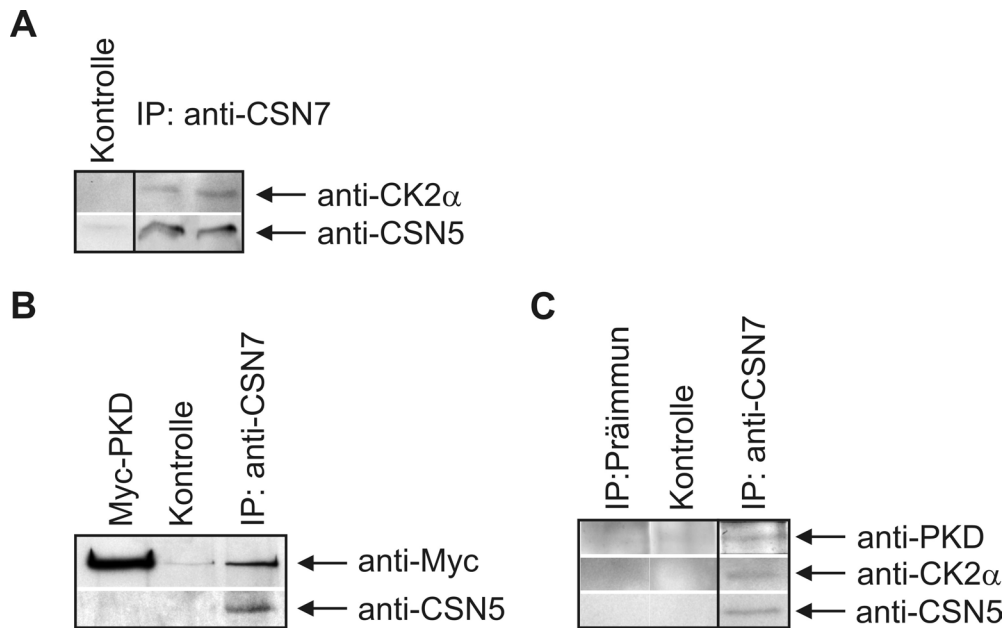


Abbildung 12: Die Proteinkinasen CK2 und PKD sind mit dem CSN assoziiert. **(A)** Der aufgereinigte CSN-Komplex wurde immunopräzipitiert (IP: anti-CSN7). Der Westernblot zeigt in zwei parallelen Immunopräzipitationen die gleichzeitige Anwesenheit von CSN5 (anti-CSN5) und CK2 α (anti-CK2 α) im Präzipitat. In der Kontrolle wurde die Immunopräzipitation ohne den anti-CSN7-Antikörper durchgeführt, um unspezifische Bindungen an die Protein-A-Sepharose zu dokumentieren. **(B)** Das aufgereinigte CSN und die rekombinante Myc-PKD wurden vermengt, und das Gemisch wurde immunopräzipitiert (IP: anti-CSN7). Die Westernblotanalyse zeigt die gemeinschaftliche Anwesenheit von CSN5 (anti-CSN5) und Myc-PKD (anti-Myc) im Präzipitat. Die Kontrolle wurde ohne anti-CSN7-Antikörper durchgeführt. **(C)** Immunopräzipitation des endogenen CSN-Komplexes aus HeLa-Zelllysat. Der Immunoblot des Präzipitats (IP: anti-CSN7) wurde mit den Antikörpern anti-PKD, anti-CK2 α und anti-CSN5 inkubiert. Die Kontrolle erfolgte wie in (B). Eine Immunopräzipitation mit Präimmunserum (IP: Präimmun) zeigt die Spezifität der Immunopräzipitation.

Als nächstes galt die Frage zu klären, an welche der CSN-Untereinheiten die Kinasen binden. Deswegen wurden Filterbindungs-Assays (Far-Westernblots) mit dem aufgereinigten Komplex, rekombinanten CSN-Untereinheiten und den beiden rekombinanten Kinasen durchgeführt (Abbildung 13). Die PKD (Myc-Tag) interagierte mit der CSN3-Untereinheit des isolierten Komplexes, jedoch nur sehr schwach mit dem rekombinanten CSN3-Fragment 111-403. Die Proteinkinase CK2 lag in ihrer typischen tetrameren Form als $\alpha_2\beta_2$ vor und interagierte mit der rekombinanten Untereinheit CSN7 und dem CSN3-Fragment. Dabei zeigte der anti-CK2 α -Antikörper ein starkes Signal bei der rekombinanten CSN7-Untereinheit und ein schwaches mit dem CSN3-Fragment. Im Gegensatz dazu detektierte der CK2 β -Antikörper nur eine schwache Wechselwirkung mit CSN7, jedoch eine stärkere mit dem CSN3-Fragment.

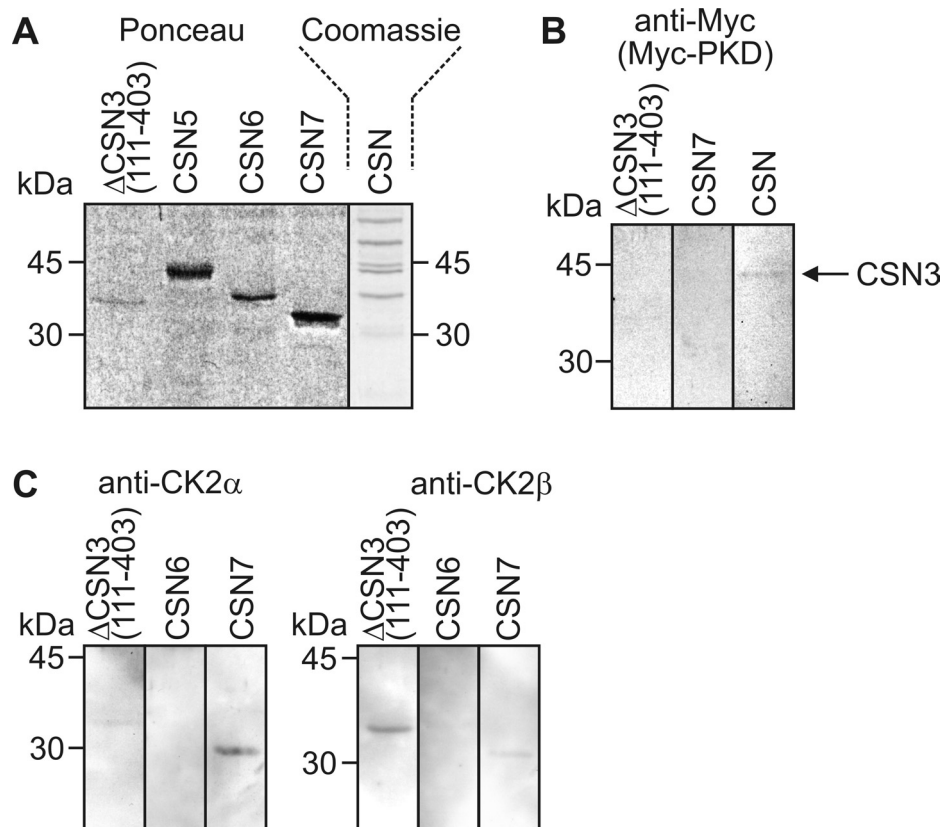


Abbildung 13: Far-Westernblots dokumentieren die Bindung der CK2 und PKD an Untereinheiten des CSN. **(A)** Die Ponceaufärbung der Nitrocellulose zeigt ausgewählte rekombinante CSN-Untereinheiten, die für den Far-Western-Bindungstest verwendet wurden. Die Coomassie-Färbung des SDS-PA-Gels verdeutlicht den aufgereinigte CSN-Komplex, der ebenfalls immobilisiert wurde. **(B)** Die rekombinante Myc-PKD bindet an CSN3 des gereinigten CSN, aber nur sehr schwach an das rekombinante CSN3-Fragment Δ CSN3(111-403). Das rekombinante CSN7 ist als negative Kontrolle gezeigt. **(C)** Immobilisierte rekombinante CSN-Untereinheiten wurden mit rekombinanter CK2 ($\alpha_2\beta_2$ -tetramere Form) inkubiert. Nach dem Waschen wurde mit Antikörpern gegen CK2 α (links) oder CK2 β (rechts) getestet. CSN6 ist als Negativkontrolle gezeigt. Beide Antikörper zeigen eine Bindung der CK2 an die rekombinante CSN-Untereinheit CSN7 und an das CSN3-Fragment Δ CSN3(111-403).

Eine weitere Fragestellung war, ob das COP9 Signalosom mit aktiven Kinasen assoziiert ist. Um dies zu klären, wurde der endogene Komplex aus HeLa-Zelllysat präzipitiert, und anschließend wurde das Immunpräzipitat im Kinase-Assay eingesetzt. Als Substrat wurden die rekombinanten Proteine I κ B α und c-Jun benutzt. Beide wurden phosphoryliert und die Phosphorylierung konnte durch 50 μ M Curcumin inhibiert werden. Bei der Phosphorylierung von I κ B α betrug die Inhibition bis zu 80%, wie durch densitometrische Auswertung errechnet wurde. Einige CSN-Untereinheiten, wie etwa CSN7, sind selbst Substrate der assoziierten Kinasen; dagegen die CSN6-Untereinheit nicht (Henke et al., 1999). Um die Spezifität der Phosphorylierung nachzuweisen, wurde das Experiment auch für die rekombinanten Untereinheiten CSN7

und CSN6 als Substrate durchgeführt. Abbildung 14 zeigt, dass das anti-CSN7-Immunopräzipitat CSN7 phosphoryliert, nicht aber CSN6.

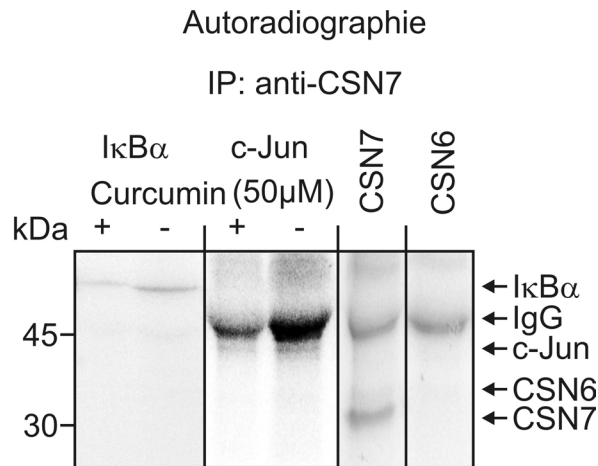


Abbildung 14: Das CSN ist mit aktiven Kinasen assoziiert. Das aus HeLa-Zelllysat gewonnene anti-CSN7-Immunopräzipitat wurde mit I κ B α oder c-Jun als Substrat in Anwesenheit von [γ - 32 P]-ATP, mit und ohne Curcumin, inkubiert (1h bei 37°C). Der Reaktionsansatz wurde über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Autoradiographie zeigt die Substrat-Phosphorylierung. Um die Spezifität der Kinasereaktion zu demonstrieren, wurde die Fähigkeit des anti-CSN7-Immunopräzipitats getestet, rekombinantes CSN7 (Positivkontrolle) oder CSN6 (Negativkontrolle) zu phosphorylieren. In Abhängigkeit von der Expositionszeit ist die unspezifische Phosphorylierung der schweren Kette des Kaninchen-Antikörpers zu sehen (IgG).

3.4. CK2 und PKD phosphorylieren CSN-Untereinheiten, p53 und c-Jun

Frühere Untersuchungen ergaben, dass die am CSN-Komplex gebundenen Kinasen die Transkriptionsfaktoren p53 und c-Jun phosphorylieren und auch einige CSN-Untereinheiten modifiziert werden (für einen Überblick siehe Bech-Otschir et al., 2002). Aus diesem Grunde wurden der aufgereinigte Komplex und rekombinante CSN-Untereinheiten als Substrate für die rekombinanten Kinasen CK2 und PKD im Kinase-Assay eingesetzt (Abbildung 15). Die Proteinkinase CK2 modifiziert die Untereinheiten CSN2 und CSN7 sowohl als rekombinante Proteine als auch im aufgereinigten Komplex. Die PKD zeigte eine schwache Phosphorylierung der rekombinanten Untereinheiten CSN2, CSN5 und CSN7, jedoch konnte eine starke Modifizierung der CSN7-Untereinheit im aufgereinigten Komplex beobachtet werden. Die eingesetzten Substrate haben unterschiedliche Effekte auf die Autophosphorylierung der rekombinanten Kinasen. Zur Kontrolle, dass gleiche Mengen an Kinase eingesetzt wurden, ist deshalb für die PKD die Coomassie-Färbung dargestellt.

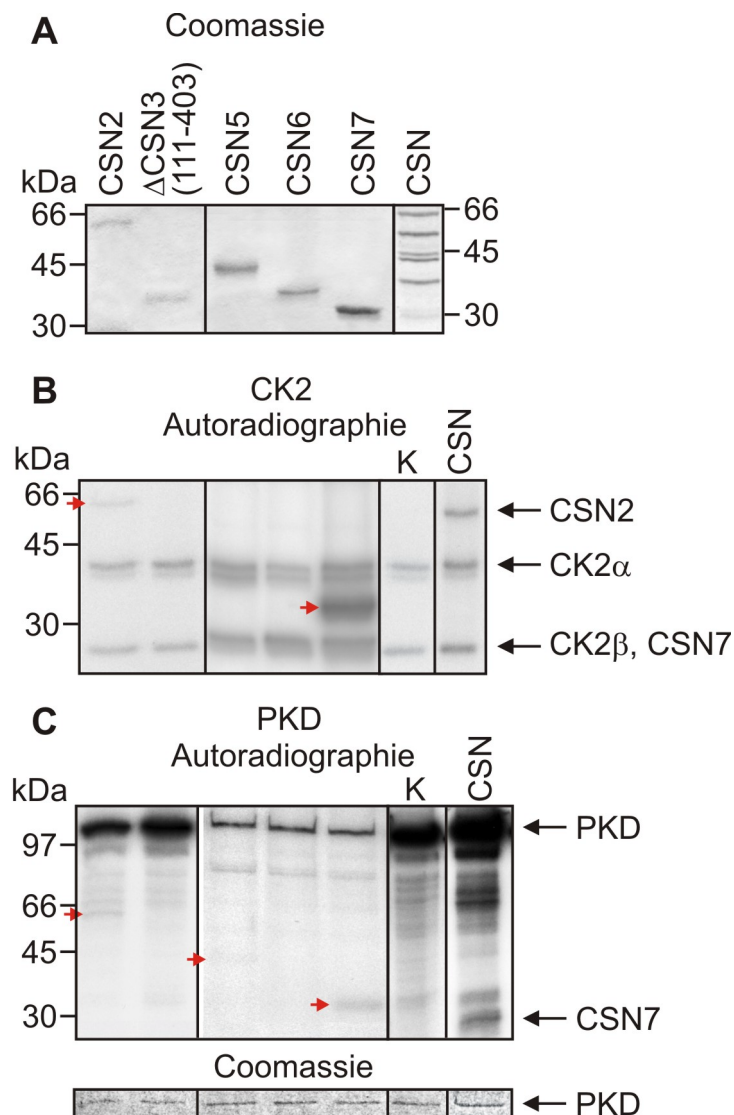


Abbildung 15: Die Proteinkinasen CK2 und PKD phosphorylieren CSN-Untereinheiten. **(A)** In-vitro-Kinase-Assays wurden mit den dargestellten rekombinanten CSN-Untereinheiten und dem aufgereinigten CSN-Komplex als Substrate durchgeführt (Coomassie-Färbung). **(B)** Jede der rekombinanten CSN-Untereinheiten oder der aufgereinigte CSN-Komplex wurde mit der rekombinanten CK2 ($\alpha_2\beta_2$ -tetramere Form) inkubiert. Die Autoradiographie zeigt die phosphorylierten CSN-Untereinheiten. Die rekombinanten His₆-markierten CSN-Untereinheiten migrieren während der SDS-PAGE etwas langsamer als die Untereinheiten des aufgereinigten Komplexes. In der Kontrolle (K) wurde die rekombinante Kinase ohne Substrat inkubiert. **(C)** Der Kinase-Assay wurde wie in (B) mit der rekombinanten PKD durchgeführt. Die Autoradiographie zeigt die phosphorylierten rekombinanten CSN-Untereinheiten sowie die Phosphorylierung der CSN7-Untereinheit im aufgereinigten Komplex. Die Kontrolle (K) erfolgte wie in (B). Die Coomassie-Färbung des SDS-PA-Gels (unten) verdeutlicht, dass gleiche Mengen der rekombinanten PKD eingesetzt wurden.

Nun stellte sich die Frage, ob die Phosphorylierung der Untereinheiten auch in Zellen auftritt. Dazu wurde Lysat von Reticulocyten mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP inkubiert und anschließend das Signalosom mit dem anti-CSN7-Antikörper präzipitiert (Abbildung 16). Die Autoradiographie zeigt eine schwache Bande direkt unter der IgG-Bande, die mit ho-

her Wahrscheinlichkeit identisch mit der CSN2-Untereinheit ist. Unter diesen Bedingungen konnte eine signifikante CSN7-Phosphorylierung nicht erfasst werden. Die Kontrolle (CSN) zeigt die „Autophosphorylierungen“ der CSN2- und CSN7-Untereinheit im aufgereinigten Komplex. Hier wurde das Signalosom mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ inkubiert und dann mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

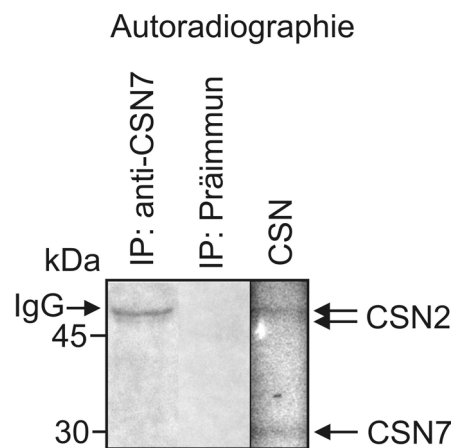


Abbildung 16: Die CSN-Untereinheiten CSN2 und CSN7 werden von den assoziierten Kinasen phosphoryliert. Reticulocyten-Lysat wurde mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ inkubiert (30min bei 37°C). Danach wurde das endogene CSN immunopräzipitiert (anti-CSN7) und das Präzipitat wurde mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Autoradiographie zeigt das phosphorylierte CSN2 kurz unterhalb der unspezifischen IgG-Phosphorylierung der schweren Kette (IP: anti-CSN7). Kontrolle (CSN): Der aufgereinigte CSN-Komplex wurde mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ inkubiert (1h bei 37°C) und anschließend über SDS-PAGE und Autoradiographie ausgewertet. Die „Autophosphorylierungen“ der CSN2- und CSN7-Untereinheiten sind angegeben.

Als nächstes wurde untersucht, ob die rekombinanten Proteine p53 und c-Jun von den rekombinanten Kinasen modifiziert werden (Abbildung 17). Beide Kinasen phosphorylieren sowohl p53 als auch c-Jun im Kinase-Assay. Zusätzlich ist auch die Autophosphorylierung der Kinasen zu beobachten.

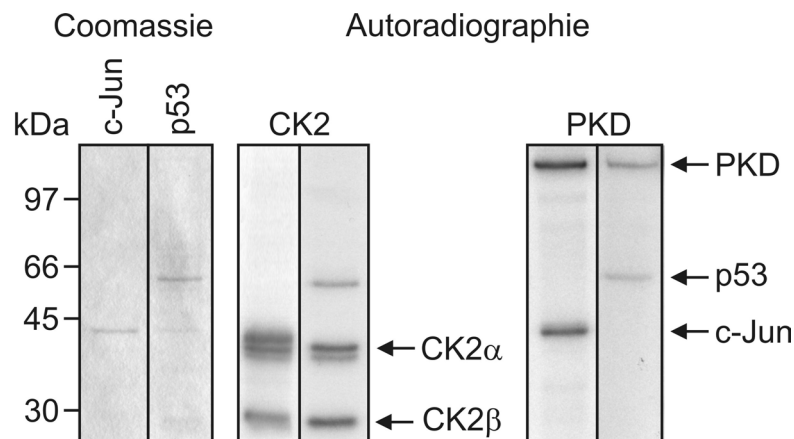


Abbildung 17: Die Proteinkinasen CK2 und PKD phosphorylieren p53 und c-Jun. Rekombinantes c-Jun und p53 (siehe Coomassiefärbung) wurden als Substrate im Kinase-Assay benutzt. Die Substrate wurden entweder mit der CK2 oder der PKD und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ inkubiert (1h bei 37°C) und anschließend über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Autoradiographien zeigen, dass beide Kinasen die rekombinanten Proteine p53 und c-Jun phosphorylieren können. Die Autophosphorylierungen der CK2 (CK2 α und CK2 β) und der PKD sind ebenfalls zu erkennen.

In früheren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass p53 durch die CSN-assoziierten Kinasen an Threonin 155 phosphoryliert wird, und dass diese Modifikation für den proteasomalen Abbau von p53 ausschlaggebend ist (Bech-Otschir et al., 2001). Es galt nun zu klären, welche der beiden identifizierten Kinasen verantwortlich ist für die p53-Phosphorylierung, die den Tumorsuppressor zum proteasomalen Abbau dirigiert. Ferner konnte in der Studie gezeigt werden, dass das p53-Peptid $\Delta\text{p53}(145\text{-}164)$ als ein spezifischer Kompetitor wirkt, indem es die Phosphorylierung von p53 inhibiert und somit den Tumorsuppressor vor dem Abbau über das Ubiquitin/26S-Proteasom-System schützt (Bech-Otschir et al., 2001). Dies konnte sowohl in vitro als auch in Zellkultur-Experimenten nachgewiesen werden. Deswegen wurde der Einfluss dieses Peptids auf die p53-Phosphorylierung durch die Proteinkinasen CK2 und PKD in einem Kinase-Assay untersucht. Für die folgenden Experimente wurde ein modifiziertes Peptid benutzt, in dem Ser/Thr-Stellen durch Phospho-Ser/Thr ersetzt wurden. Dieses Phospho-Peptid hatte keinen Einfluss auf die p53-Phosphorylierung durch die PKD (nicht gezeigt). Dagegen konnte bei der CK2 eine konzentrationsabhängige Inhibition der p53-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Abbildung 18A).

Nun wurde untersucht, ob das Threonin 155 von der Proteinkinase CK2 phosphoryliert wird. Dafür wurde das Peptid modifiziert und ausgesuchte Ser/Thr-Stellen durch Phospho-Ser/Thr ersetzt (Serin 149, Threonin 150, Threonin 155). Abbildung 18B veranschaulicht diese Modifikationen. Diese Peptide wurden nun als Substrate der

CK2 in Phosphorylierungs-Assays eingesetzt. Das Peptid 3 mit dem einzigen freien Phospho-Akzeptor Threonin 155 wurde tatsächlich von der Ser/Thr-Kinase CK2 phosphoryliert. Ebenso wurden die Stellen Serin 149 und/oder Threonin 150 im Peptid 2 phosphoryliert. Diese Daten bestätigen unsere früheren Untersuchungen mit den p53-Mutanten p53(S149A, T150V) und p53(T155V) (Bech-Otschir et al., 2001).

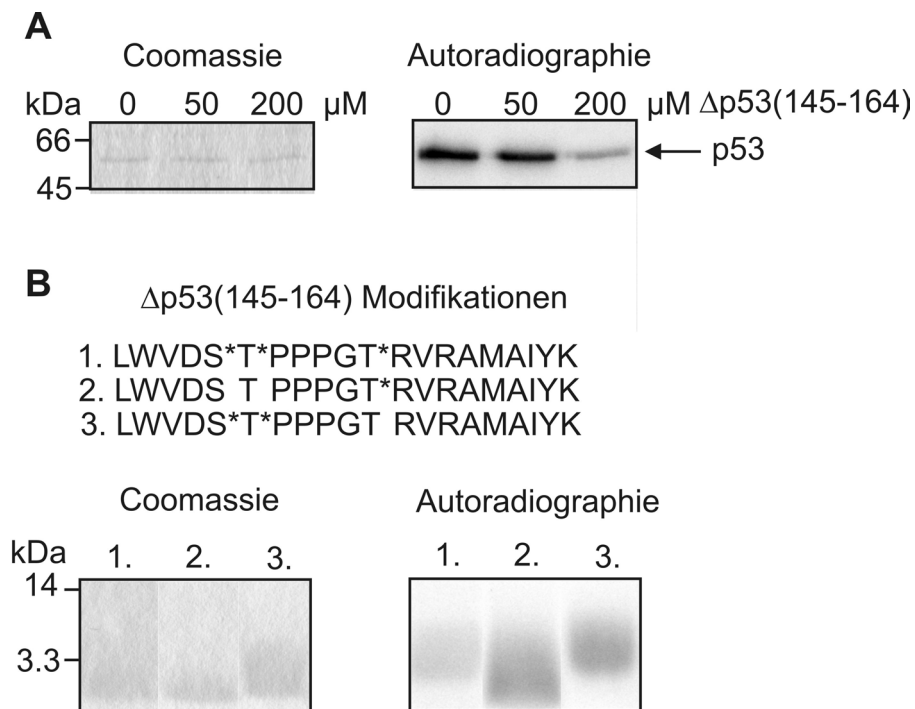


Abbildung 18: Die Proteinkinase CK2 ist für die p53-Phosphorylierung an Threonin 155 verantwortlich. **(A)** Die kompetitive Inhibition der CK2-vermittelten Phosphorylierung von p53 durch das phosphorylierte Peptid $\Delta\text{p53}(145-164)$. Rekombinantes p53 wurde mit der rekombinanten Proteinkinase CK2 wie in Abbildung 17 inkubiert. Das phosphorylierte Peptid $\Delta\text{p53}(145-164)$ wurde in unterschiedlichen Konzentrationen dem Reaktionsgemisch zugesetzt. **(B)** Drei unterschiedliche Modifikationen des Peptids $\Delta\text{p53}(145-164)$ wurden mit der rekombinanten Kinase im Kinase-Assay getestet. Nach der Reaktion wurden die Proben mittels 15%iger SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Neben dem Peptid 3 (Thr155) wurde auch Peptid 2 phosphoryliert (Ser149/Thr150). Die Sterne in der Peptidsequenz weisen auf phosphoryliertes Serin (S*) oder Threonin (T*) hin.

3.5. Inhibitoren der Kinasen

Eine andere wichtige Fragestellung war, ob Curcumin die Kinaseaktivität der CK2 und der PKD inhibieren kann, und ob bekannte Inhibitoren der beiden Kinasen die CSN-assoziierte Kinaseaktivität beeinflussen können. Die IC_{50} -Werte in Tabelle 4 wurden aus Kinase-Assays mit c-Jun als Substrat erhalten. Die getesteten Inhibitoren wurden im Konzentrationsbereich von 0 bis 100 μM zu den rekombinanten Kinasen und zum aufgereinigten Komplex zugegeben. Mittels densitometrischer Auswer-

tung und einer anschließenden Solver-Optimierung wurden die IC_{50} -Werte errechnet. Curcumin ist in der Lage, sowohl die Kinaseaktivität der assoziierten als auch die der rekombinanten Proteinkinasen mit vergleichbarer Effektivität zu inhibieren. Zu den Inhibitoren der CK2 gehören DRB und Emodin (Battistutta et al., 2000; Zandomeni, 1989), während das Resveratrol als Inhibitor der PKD beschrieben wurde (Haworth & Avkiran, 2001). Alle diese Substanzen konnten die Kinaseaktivität des Komplexes im mikromolaren Bereich wirkungsvoll blockieren. Interessanterweise konnte eine höhere Affinität der Inhibitoren Curcumin, Emodin und DRB zu den komplexgebundenen Kinasen als zu den (freien) rekombinanten Kinasen nachgewiesen werden.

Tabelle 4: IC_{50} -Werte (μ M) für die Inhibierung der CSN-assoziierten Kinasen, der rekombinanten CK2 und der PKD mit Curcumin, Emodin, DRB und Resveratrol. DRB: 5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol.

Inhibitor	CSN	CK2	PKD
Curcumin	2,6	11,8	4,1
Emodin	4,4	22,7	94,5
DRB	12,0	97,9	75,5
Resveratrol	32,1	51,0	17,6

3.6. Humanes Mdm2 wird durch die CSN-assoziierten Kinasen phosphoryliert

Der Abbau von p53 in der Zelle ist sehr effizient und geschieht hauptsächlich über die Ubiquitin-Ligase Mdm2 und das 26S Proteasom (Honda et al., 1997). Da die Stabilität von p53 durch das COP9 Signalosom reguliert wird, wurde der Einfluss des CSN-Komplexes auf das Mdm2 untersucht. Zuerst wurde geprüft, ob Mdm2 ein Substrat der CSN-assoziierten Kinasen ist. In Abbildung 19A ist die Autoradiographie der Phosphorylierung des rekombinanten humanen Mdm2 durch den isolierten Komplex gezeigt. Auch hier kam es durch Zugabe von 50 μ M Curcumin zu einer fast vollständigen Blockierung der Kinaseaktivität. Daraufhin wurde das rekombinante Mdm2 als Substrat in Kinase-Assays mit den rekombinanten Proteinkinasen CK2 und PKD ein-

gesetzt (Abbildung 19B). Mdm2 wird sehr effizient von der Proteinkinase CK2 phosphoryliert, jedoch nur in sehr geringem Maße von der PKD. Dieses Ergebnis wird durch frühere Untersuchungen zur posttranslationalen Modifikation von Mdm2 bestätigt (Hjerrild et al., 2001; Götz et al., 1999).

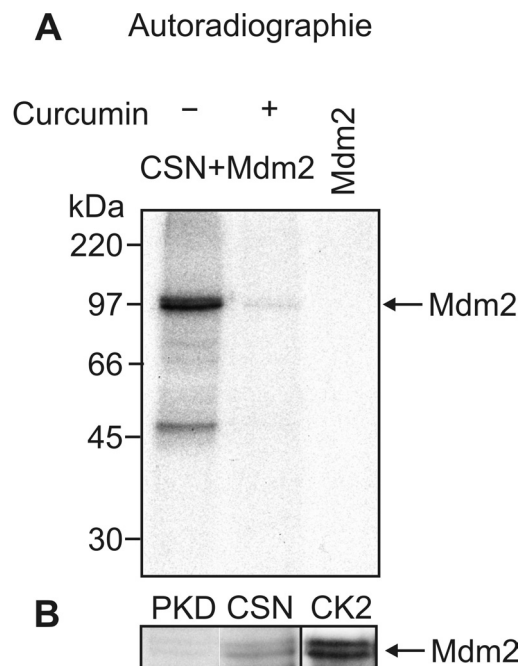


Abbildung 19: Mdm2 wird vom aufgereinigten CSN-Komplex phosphoryliert. **(A)** In-vitro-Kinase-Assays wurden mit rekombinatem Mdm2 als Substrat und dem aufgereinigten CSN-Komplex in Anwesenheit von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ mit und ohne Curcumin durchgeführt (1h bei 37°C). Durch Zugabe von $50\ \mu\text{M}$ Curcumin wird die Phosphorylierung von Mdm2 fast vollständig inhibiert. Kontrolle (Mdm2): Kinase-Assay ohne Komplex. **(B)** Rekombinantes Mdm2 wurde als Substrat im Kinase-Assay benutzt und mit den rekombinanten Kinasen CK2 oder PKD sowie dem aufgereinigten CSN-Komplex (als Kontrolle) inkubiert. Anschließend wurden die Proben über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Autoradiographien zeigen eine starke CK2-abhängige Phosphorylierung von Mdm2, während die PKD das rekombinante Mdm2 nur sehr schwach phosphoryliert.

3.7. Mdm2 bindet an das COP9 Signalosom

Die ersten Hinweise auf eine mögliche Assoziation von Mdm2 mit dem COP9 Signalosom lieferten Immunfluoreszenz-Studien mit der MCF-7-Zelllinie, einer humanen Mammacarcinom-Zelllinie. Aufgrund der erhöhten Mdm2-Expression (Okumura et al., 2002) ist diese Zelllinie für Studien an dem Onkoprotein besonders geeignet. In etwa 15-20% der unbehandelten Zellen konnte eine Co-Lokalisation des Mdm2 mit dem CSN im Nucleolus nachgewiesen werden. Abbildung 20 zeigt hierfür typische Fluoreszenzbilder. In der Hellfeld-Mikroskopie sind die Nucleoli als dunkle Flecken zu erkennen. Eine Inkubation der Zellen mit $50\ \mu\text{M}$ Curcumin vor der Zellfixierung er-

brachte leider keine auswertbaren Ergebnisse, da eine unerwartete Eigenfluoreszenz des Curcumins, trotz mehrmaligen Waschens der Zellen, im grün-roten Fluoreszenzspektrum auftrat (in diesem Bereich wurden die Fluoreszenzsignale detektiert: FITC: grün, TxRed: rot).

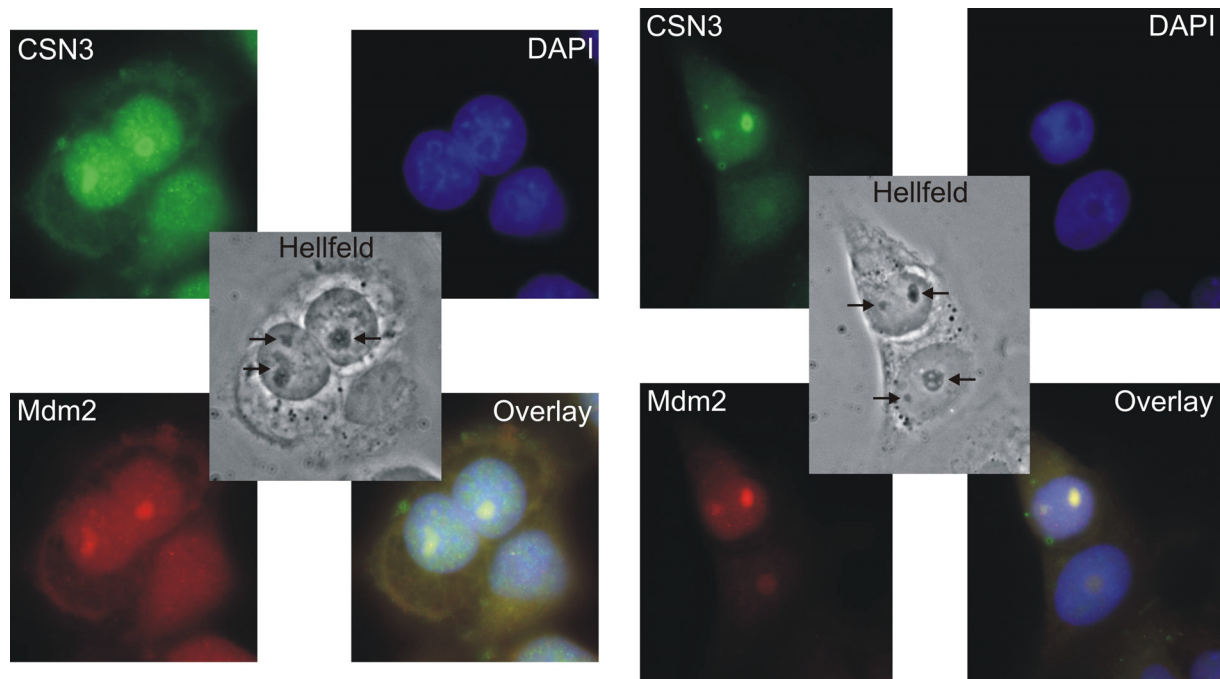


Abbildung 20: Co-Lokalisation des endogenen Mdm2 mit dem CSN-Komplex in unbehandelten humanen MCF-7-Zellen. Die ausgewählten Beispiele zeigen eine auffällige Co-Lokalisation von Mdm2 und dem CSN-Komplex im Nucleolus (etwa 15 bis 20% der unbehandelten Zellen). Die Zellstruktur konnte mit Hilfe der Hellfeld-Mikroskopie sichtbar gemacht werden. FITC (grün): anti-CSN3, TxRed (rot): anti-Mdm2 und DAPI (blau): DNA-Färbung. Die Pfeile markieren die im Hellfeld sichtbaren Nucleoli.

Als nächstes wurden In-vitro-Bindungsstudien durchgeführt. Humanes, rekombinantes Mdm2 wurde mit dem aufgereinigten COP9 Signalosom inkubiert, und anschließend wurde der Komplex mit dem anti-CSN7-Antikörper immunopräzipitiert. Im Westernblot (Abbildung 21A) ist klar zu erkennen, dass mit dem CSN-Komplex auch das Mdm2 im Präzipitat nachzuweisen war. Nun sollte dieser Befund auch am endogenen Komplex belegt werden. Hierzu wurde eine Immunopräzipitation mit dem anti-CSN7-Antikörper aus dem Lysat von MCF-7-Zellen durchgeführt. Abbildung 21B zeigt die Mdm2-Bindung auch am endogenen CSN-Komplex. Parallel wurde der Einfluss von Curcumin auf die Bindung während der Immunopräzipitation untersucht

(IP+). Dabei konnte in mehreren Versuchen kein signifikanter Unterschied in der Bindung detektiert werden.

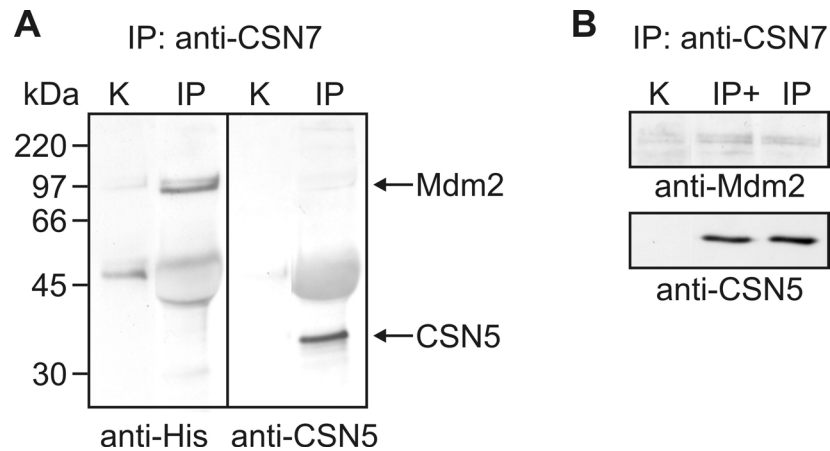


Abbildung 21: Mdm2 bindet an das CSN. **(A)** Der aufgereinigte CSN-Komplex wurde zusammen mit dem rekombinanten His₆-Mdm2 inkubiert (30min bei 37°C) und der Komplex wurde immunopräzipitiert (IP: anti-CSN7). Der Westernblot zeigt die gleichzeitige Anwesenheit von CSN5 und von Mdm2 im Präzipitat. In der Kontrolle (K) wurde die Immunopräzipitation ohne den anti-CSN7-Antikörper durchgeführt, um eine unspezifische Bindung an die Protein-A-Sepharose zu dokumentieren. **(B)** Immunopräzipitation des endogenen CSN-Komplexes aus MCF-7-Zelllysaten. Der Immunoblot des Präzipitates (IP: anti-CSN7) wurde mit den Antikörpern anti-Mdm2 oder anti-CSN5 inkubiert. IP+: Die Immunopräzipitation wurde in Anwesenheit von 50 μ M Curcumin durchgeführt (Inhibition der CSN-assoziierten Kinasen). Kontrolle (K): Die Immunopräzipitation mit Präimmunsereum dokumentiert die Spezifität des Antikörpers.

Um die Frage zu klären, an welche CSN-Untereinheiten das Mdm2 bindet, wurden Filterbindungs-Assays (Far-Westernblots) mit dem aufgereinigten Komplex und rekombinanten CSN-Untereinheiten durchgeführt (Abbildung 22). An den getesteten rekombinanten Untereinheiten konnte keine Bindung detektiert werden. Nur im aufgereinigten Komplex konnte eine Bindung nachgewiesen werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit über die Untereinheit CSN3 vermittelt wird.

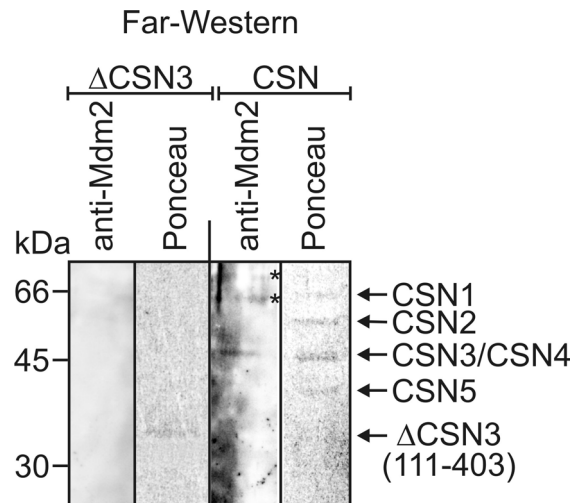


Abbildung 22: Far-Westernblot mit rekombinantem Mdm2, dem aufgereinigtem CSN-Komplex und rekombinanten CSN-Untereinheiten (dargestellt ist nur das CSN3-Fragment Δ CSN3(111-403)). Der aufgereinigte Komplex und die rekombinanten Untereinheiten wurden nach der SDS-PAGE auf Nitrocellulose immobilisiert und mit dem Mdm2 inkubiert (1h bei RT). Die mit dem anti-Mdm2-Antikörper detektierte Bande im aufgereinigtem Komplex ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die Untereinheit CSN3. An den rekombinanten CSN-Untereinheiten konnte keine Bindung detektiert werden. Die Sterne kennzeichnen Kreuzreaktionen des Antikörpers.

3.8. Curcumin induziert die Auto-Ubiquitylierung von Mdm2

Die Stabilität von Mdm2 kann über die Auto-Ubiquitylierung reguliert werden (Fang et al., 2000; Honda & Yasuda, 2000). Normalerweise vermittelt Mdm2 als RING-E3-Ligase die Ubiquitylierung von Substraten, ohne jedoch selbst die Ubiquitinketten kovalent zu binden. Bei der Auto-Ubiquitylierung kommt es aber zur kovalenten Verknüpfung des Ubiquitins an die Ubiquitin-Ligase. Um zu klären, ob dieser Mechanismus am COP9 Signalosom und über die assoziierten Kinasen geregelt wird, wurde der Einfluss von Curcumin auf die Auto-Ubiquitylierung in einem Ubiquitylierungs-Assay untersucht. In einem ATP-regenerierenden In-vitro-System wurde rekombinantes Mdm2 mit HeLa-Lysat inkubiert (siehe Material und Methoden). Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und im Westernblot analysiert. Parallel wurde in einem zweiten Ansatz durch Zugabe von rekombinantem Ubiquitin ein zusätzlicher Vorrat an frei verfügbarem (Mono-)Ubiquitin bereitgestellt. Der zeitliche Verlauf ist in Abbildung 23 zu sehen. Ohne Curcumin wurden nur wenige hochmolekulare Mdm2-Konjugate gebildet, obwohl die Menge an Ubiquitinkonjugaten insgesamt zunahm (dieses wurde über den anti-Ubiquitin-Antikörper nachgewiesen). Dagegen kam es durch Zugabe von 50 μ M Curcumin zu einer dramatischen Zunahme von hochmolekularen Mdm2-Konjugaten.

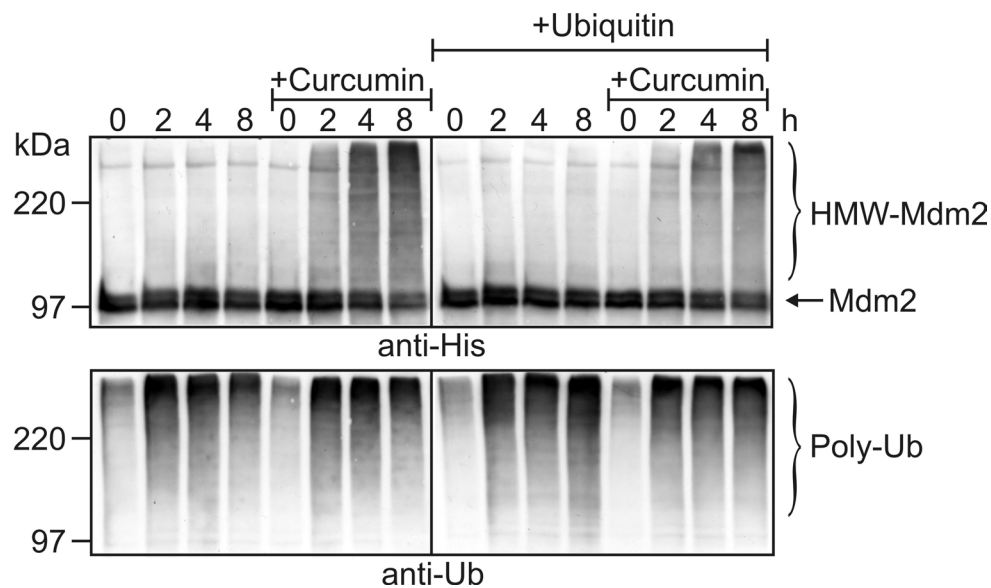


Abbildung 23: Curcumin induziert die Bildung von hochmolekularen Mdm2-Konjugaten in vitro. Ubiquitylierungs-Assay mit dem rekombinanten His₆-Mdm2 und HeLa-Lysat (als Lieferant für das Ubiquitin-System) in An- oder Abwesenheit von Curcumin (50 μ M). In einem parallelen Experiment wurde zusätzlich Ubiquitin (je 9 μ g) hinzugegeben. Zu definierten Zeiten wurden Aliquots entnommen, auf ein 7,5%iges SDS-PA-Gel aufgetragen und im Westernblot analysiert. Die hochmolekularen Mdm2-Konjugate wurden mit dem Anti-His-Antikörper detektiert. Als Kontrolle wurde der Westernblot auch mit einem anti-Ubiquitin-Antikörper inkubiert.

Um den Einfluss des Kinaseinhibitors Curcumin auf die Auto-Ubiquitylierung von Mdm2 und damit auf dessen Stabilität auch im Zellsystem untersuchen zu können, wurden MCF-7-Zellen mit dem Inhibitor für vier Stunden inkubiert. Ferner wurde der proteasomale Inhibitor MG132 zugegeben, um Ubiquitinkonjugate im Zellsystem besser detektieren zu können. Die Zellen wurden lysiert und in gleichen Mengen auf ein 7,5% SDS-PA-Gel aufgetragen. Die anschließende Westernblot-Analyse ist in Abbildung 24 dargestellt. Auch hier sind durch gleichzeitige Zugabe von Curcumin und MG132 hochmolekulare Mdm2-Konjugate detektierbar, wenngleich der Effekt auf zellulärer Ebene nicht ganz so dramatisch ausfällt. Gleichzeitig wird durch Curcumin die Bildung von Ubiquitinkonjugaten insgesamt gesteigert und durch die Inhibition des 26S Proteasoms mit MG132 noch verstärkt.

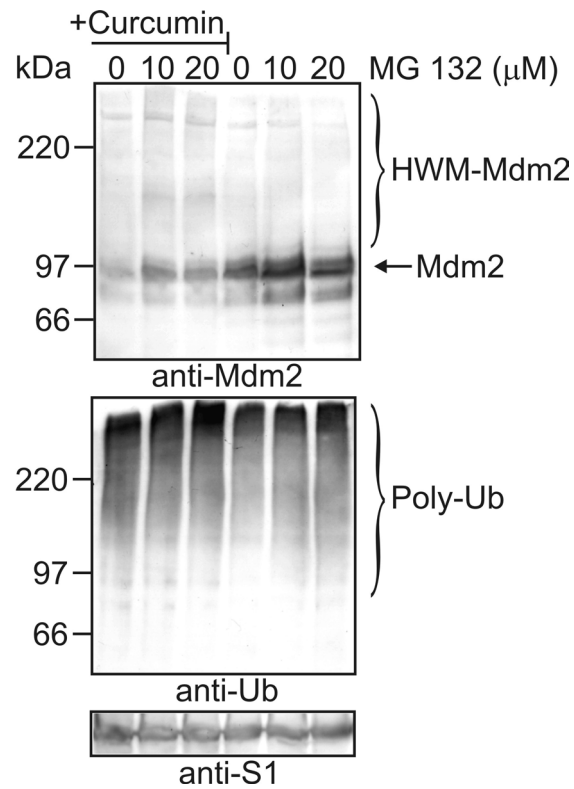


Abbildung 24: Curcumin induziert die Bildung von hochmolekularen Mdm2-Konjugaten in MCF-7-Zellen. Pro Ansatz wurden 10^6 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des proteasomalen Inhibitors MG132 in An- oder Abwesenheit von Curcumin ($50 \mu\text{M}$) für 4h inkubiert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden wie in Abbildung 23 auf ein 7,5%iges SDS-PA-Gel aufgetragen und im Westernblot analysiert. Der anti-S1-Antikörper diente als Kontrolle für gleiche Proteinmengen (S1: Untereinheit des 19S-Base-Komplexes).