

4. Diskussion

4.1. Die Kinaseaktivität des COP9 Signalosoms

4.1.1. Die Proteinkinasen CK2 und PKD sind mit dem COP9 Signalosom assoziiert

In der vorliegenden Studie konnte ein weiterer Schritt zum Verständnis der komplexen Vorgänge am COP9 Signalosom erbracht werden. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Präparation des Komplexes aus humanen Erythrocyten gemeinsam mit der Curcumin-sensitiven Kinaseaktivität auch die Proteinkinasen CK2 und PKD copurifiziert werden. Darüber hinaus konnte anhand der Daten aus Immunopräzipitation und Far-Westernblot-Analyse eine Assoziation der Kinasen mit dem COP9 Signalosom klar gezeigt werden. Die CK2 und die PKD sind deshalb zumindest für einen Teil der Kinaseaktivität des COP9 Signalosoms verantwortlich.

Aus den Ergebnissen der Elektronenmikroskopie geht hervor, dass mindestens 10% der Komplexpartikel mit ATP-bindenden Proteinen, höchstwahrscheinlich Kinasen, assoziiert vorliegen. Allerdings ist nicht sicher, ob unter den vorliegenden Bedingungen alle ATP-Bindungsstellen abgesättigt wurden. Daher könnte auch eine höhere Anzahl an Komplexen vorliegen, die Kinasen gebunden haben. Überdies ist vorstellbar, dass sich Kinasen während der Aufreinigung des CSN-Komplexes und der aufwendigen Probenvorbereitung abgelöst haben. Die Beobachtung nur eines Goldpartikels pro Komplex deutet nicht zwangsläufig auf nur eine gebundene Kinase hin, sondern könnte vielmehr auf sterische Behinderung der Goldpartikel untereinander zurückzuführen sein (Die Gold-Cluster haben eine Größe von etwa 3 nm.).

Während der CSN-Aufreinigung aus humanen Erythrocyten konnte die Co-Purifizierung der Proteinkinasen CK2 und PKD mit dem COP9 Signalosom gezeigt werden (Abbildung 10 und Abbildung 11). Gleichzeitig wurde versucht, ein Maß für die Co-Purifizierung der Kinaseaktivität während der Aufreinigung zu errechnen. In einer früheren Untersuchung wurde Curcumin als Inhibitor der Kinaseaktivität des COP9 Signalosoms beschrieben (Henke et al., 1999). Dieser Befund wurde nun während der Präparation genutzt, und die Fraktionen der einzelnen Aufreinigungsschritte

wurden jeweils auf ihre Kinaseaktivität und deren Inhibition mit Curcumin getestet (siehe auch Material und Methoden). Auf diese Weise konnte zusätzlich eine Co-Purifizierung der Curcumin-sensitiven Kinaseaktivität mit dem CSN-Komplex gezeigt werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine CSN-assoziierte Kinaseaktivität zurückzuführen ist.

In Immunopräzipitations-Studien konnte dargestellt werden, dass sowohl in Erythrocyten als auch in HeLa-Zellen die Proteinkinasen CK2 und PKD mit dem Signalosom assoziiert vorliegen (Abbildung 12). Das Immunopräzipitat besitzt Kinaseaktivität und phosphoryliert I κ B α , c-Jun und CSN7, nicht aber CSN6 (Abbildung 14). Diese Aktivität stammt sehr wahrscheinlich von den beiden identifizierten Kinasen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass hier noch andere gebundene Kinasen an der Phosphorylierung der eingesetzten Substrate beteiligt sein könnten.

Die Bindung der CK2 und der PKD an das Signalosom scheint über die CSN3-Untereinheit vermittelt zu werden (Abbildung 13). Interessanterweise interagiert Rpn3/S3, die orthologe Untereinheit von CSN3 im 26S Proteasom, ebenfalls mit der CK2 in Hefe (für einen Überblick siehe Ferrell et al., 2000). Unsere Untersuchungen ergaben auch eine Bindung der CK2 an die CSN7-Untereinheit. Für beide Kinasen müssen allerdings die genauen Bindungsstellen im CSN3 und CSN7 noch aufgeklärt werden.

Das Molekulargewicht des aufgereinigten Komplexes wurde in einer früheren Studie experimentell auf etwa 450.000 bestimmt (Seeger et al., 1998). Rechnet man aber das Molekulargewicht der acht Untereinheiten zusammen, ergibt sich ein Molekulargewicht von nur 320.000. Die Proteinkinase CK2 besitzt als Holoenzym ($\alpha_2\beta_2$) ein Molekulargewicht von 140.000, während die PKD eine Größe von 115.000 hat. Daraus würde hervorgehen, dass am isolierten CSN-Komplex jeweils nur eine Kinase assoziiert sein könnte. Allerdings ist im Glycerolgradienten ein deutliches „Schmier“ des Komplexes bis zu Molekulargewichten von 700.000 zu beobachten. Es ist also vorstellbar, dass nicht nur beide Kinasen zur gleichen Zeit, sondern auch andere Proteine gleichzeitig am Komplex gebunden vorliegen können.

Darüber hinaus weisen elektronenmikroskopische Aufnahmen des aufgereinigten CSN-Komplexes auf eine hohe Heterogenität der Komplex-Partikel hin (Kapelari et

al., 2000). Hier konnten nur 50% der Komplex-Partikel in vier Klassen aufgeteilt werden. Das heterologe Erscheinungsbild ist, neben der (zwangsläufig) auftretenden unterschiedlichen Orientierung der Partikel auf dem Gitter und der Dissoziation von CSN-Untereinheiten während der Präparation und Probenvorbereitung, auch auf eine Bindung von assoziierten Proteinen zurückzuführen.

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die hier gezeigte Assoziation der CK2 und der PKD an den CSN-Komplex eine mögliche Interaktion mit anderen Kinasen nicht ausschließen kann. So gibt es eine Untersuchung von der Gruppe um Majerus über die Assoziation einer Kinase, der sogenannten Inositol-1,3,5-trisphosphat-5/6-Kinase (IP-5/6-Kinase) (Sun et al., 2002; Wilson et al., 2001). Unsere Beobachtungen decken sich nur zum Teil mit dieser Gruppe. Während der CSN-Präparation aus humanen Erythrocyten ist diese Kinase nur bis zur ResourceQ-Säule nachweisbar. Danach wurde ein CSN-Pool gewählt, der keine detektierbaren Mengen an IP-5/6-Kinase mehr enthielt. Daher kann sie nicht für die Aktivitäten verantwortlich sein, die in dieser Arbeit gezeigt werden.

4.1.2. Die assoziierten Kinasen phosphorylieren Untereinheiten des COP9 Signalosoms

Die Bindung der Kinasen an das Signalosom ist mit einer Phosphorylierung von CSN2 und CSN7 durch die CK2 und von CSN7 durch die PKD verbunden (Abbildung 15: CSN als Substrat). Zusätzlich scheint die PKD auch die CSN5- und die CSN2-Untereinheit zu phosphorylieren. Da aber sowohl die rekombinante CSN5- als auch die rekombinante CSN2-Untereinheit im Vergleich zu der CSN7-Untereinheit nur sehr schwach phosphoryliert wurden und auch keine CSN2- bzw. CSN5-Phosphorylierung im aufgereinigtem CSN-Komplex detektiert werden konnte, kann die Modifizierung dieser CSN-Untereinheiten nicht klar belegt werden.

Im Falle der Proteinkinase CK2 ist bemerkenswert, dass zwar alle Untereinheiten des COP9 Signalosoms putative Konsensussequenzen einer CK2-Phosphorylierung besitzen, aber nur CSN2 und CSN7 spezifisch phosphoryliert werden.

Ferner konnten im Kinase-Assay die „Autophosphorylierungen“ der CSN2- und CSN7-Untereinheit des aufgereinigten CSN-Komplexes beobachtet werden

(Abbildung 16). Experimente mit Reticulocyten-Lysaten ergaben allerdings nur eine detektierbare Modifizierung von CSN2. Jedoch war immunopräzipitiertes Signalosom aus HeLa-Zellen in der Lage, die Untereinheit CSN7 zu phosphorylieren (Abbildung 14). Wahrscheinlich sind verschiedene spezifische Signale für die Regulation der Komplex-Phosphorylierung notwendig. Obschon die exakte physiologische Funktion der Modifizierung der Signalosom-Untereinheiten noch unbekannt ist, implizieren die Daten dennoch eine funktionelle Einheit zwischen den zwei Kinasen und dem CSN-Komplex. Schon in früheren Untersuchungen konnte eine Phosphorylierung von CSN2 und CSN7 gezeigt werden (Kapelari et al., 2000; Karniol et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit konnten aber zum ersten Mal die dafür verantwortlichen Kinasen identifiziert werden. Denkbar wäre beispielsweise, dass erst durch die Phosphorylierung von CSN2 und/oder CSN7 eine Bindungsstelle für Interaktionspartner bereitgestellt wird. Vorstellbar wäre auch, dass nur der phosphorylierte CSN-Komplex in der Lage ist, das ubiquitinähnliche Protein NEDD8 vom Cullin-E3-Ligase-Komplex abzuspalten, eine erst vor kurzem entdeckte Isopeptidase-Aktivität des COP9 Signalosoms (s.u.).

Ferner ist noch völlig unklar, wie die Assemblierung des CSN-Komplexes eingeleitet wird. Vielleicht bindet die CK2 oder die PKD erst an die einzelne oder in einem Teilkomplex vorhandene Untereinheit CSN7, und erst die CSN7-Phosphorylierung bewirkt einen Zusammenbau der einzelnen Untereinheiten bzw. der einzelnen Teilkomplexe. In diesem Falle wäre wohl die Phosphorylierung von CSN7 der ausschlaggebende Faktor und könnte demnach unabhängig von der CSN2-Modifizierung sein. Aus dem Befund, dass der aus Reticulocyten-Lysaten immunopräzipitierte CSN-Komplex nur eine CSN2-Modifizierung besitzt, könnte in der Tat auf eine zeitlich begrenzte und individuelle Phosphorylierung der beiden CSN-Untereinheiten in Zellen geschlossen werden.

4.1.3. Substrat-Phosphorylierung am COP9 Signalosom

Die Proteinkinase D (früher PKC μ) gehört zu einer neuen Familie von Ser/Thr-Kinasen, die sich von der PKC-Familie durch die Existenz einer PH-Domäne und durch eine andere Regulation und Substratspezifität unterscheidet. Die PKD (bzw. PKD1) ist sowohl im Zellkern, als auch im Cytoplasma, hier besonders an der Zellmembran, lokalisiert. Außerdem konnte sie im Golgi-Apparat und in den Mitochond-

rien detektiert werden. In der Tat besitzt die PKD regulatorische Funktionen am Golgi-Apparat und ist, wie auch die CK2, an der Regulation der Zellproliferation und der Apoptose beteiligt (für einen Überblick siehe Van Lint et al., 2002). Die Aktivierung der PKD erfolgt über den PKC-Weg durch Phosphorylierungen im Aktivierungsloop der katalytischen Domäne (Abbildung 5).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren p53 und c-Jun von der Proteinkinase D in vitro phosphoryliert werden (Abbildung 17). In früheren Untersuchungen konnten für das c-Jun im N-terminalen Bereich (Aminosäuren 1-89) mehrere PKD-Phosphorylierungsstellen nachgewiesen werden (Hurd et al., 2002). Diese unterscheiden sich klar von denen der JNK-Phosphorylierung. Die JNK bindet und modifiziert das c-Jun an Serin 63 und Serin 73, worauf die Transaktivierungsaktivität gesteigert wird (Derijard et al., 1994). Interessanterweise kann die über den PKC-Signalweg aktivierte PKD an die JNK binden und wirkt dadurch inhibierend auf den JNK-Signalweg (Hurd & Rozenfurt, 2001). Im Hinblick auf die Transaktivierungsaktivität von c-Jun könnte nun dieser inhibitorische Effekt nicht nur über eine Bindung der beiden Kinasen reguliert werden. Vielmehr ist vorstellbar, dass über eine PKD-Phosphorylierung von c-Jun die Phosphorylierung von Serin 63 und Serin 73 durch die JNK verhindert wird. Gegenwärtig ist aber die exakte Funktion der c-Jun-Phosphorylierung durch die PKD nicht geklärt. Ebenso ist in diesem Szenario die Rolle des COP9 Signalosoms unklar. In unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass durch die CSN-vermittelte Phosphorylierung von c-Jun der Transkriptionsfaktor gegenüber dem Ubiquitin/26S-Proteasom-System stabilisiert wird (Naumann et al., 1999). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass eine Inhibition der CSN-assoziierten Kinasen mit Curcumin die Bildung von c-Jun-Ubiquitinkonjugaten induziert und dies zum Abbau des Transkriptionsfaktors führt (Uhle et al., 2003).

Die CK2 wird in der Literatur als pleiotrope, ubiquitäre und konstitutiv aktive Kinase beschrieben (für einen Überblick siehe Litchfield, 2003; sowie Meggio & Pinna, 2003). Sie ist in zahlreichen Signalwegen, wie beispielsweise in der Entwicklung und Differenzierung, der Zellzyklusregulation, der Proliferation, aber auch in der Apoptose beteiligt. Die CK2 ist sowohl im Cytosol als auch im Zellkern lokalisiert. Auch beweist die gewaltige Zahl von bislang 307 identifizierten Substraten die immense Bedeutung der CK2 für die Zellentwicklung (Meggio & Pinna, 2003). Gleichwohl ist das Wissen über die Regulationsmechanismen der Kinaseaktivität in der Zelle noch sehr unvoll-

kommen. Im humanen Zellsystem besteht das Holoenzym aus zwei katalytischen Untereinheiten α und/oder α' und zwei regulatorischen β -Untereinheiten. In unseren Bindungsstudien besaß die rekombinante CK2 die tetramere $\alpha_2\beta_2$ -Form. Es kann daher nicht gesagt werden, ob auch die $\alpha'_2\beta_2$ -Form mit dem COP9 Signalosom interagiert. Ferner wäre es möglich, dass die katalytisch aktive α -Untereinheit alleine am Komplex gebunden vorliegt oder dass die Assoziation der β -Untereinheit durch die Bindung an die α -Untereinheit vermittelt wird.

In unserer Gruppe wurde in früheren Experimenten gezeigt, dass die Phosphorylierung von Threonin 155 ausschlaggebend für den proteasomalen Abbau von p53 in unbehandelten Zellen ist (Bech-Otschir et al., 2001). Außerdem reduzierte das p53-Peptid $\Delta p53(145-164)$ die Phosphorylierung von p53 und stabilisierte den Tumorsuppressor in vitro und in Zellexperimenten. In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass das Peptid durch die CK2 an Threonin 155 phosphoryliert wird (Abbildung 18). Damit wird erstmals nachgewiesen, dass die p53-Phosphorylierung durch die CK2 mitverantwortlich für die Instabilität des Tumorsuppressors unter normalen Zellwachstumsbedingungen ist. Dies deckt sich sowohl mit dem Befund einer erhöhten Aktivität der Kinase in soliden Tumoren und in Leukämien (für einen Überblick siehe Guerra & Issinger, 1999) als auch mit der Tatsache, dass durch die Inhibierung der CK2 die p53-abhängige Apoptose in humanen Colonicarcinomzellen getriggert wird (te Poele et al., 1999).

4.1.4. Curcumin – ein Inhibitor der CSN-assoziierten Kinasen

Wie bereits erwähnt, konnte in einer früheren Untersuchung Curcumin als Inhibitor der Kinaseaktivität des COP9 Signalosoms beschrieben werden (Henke et al., 1999). Curcumin wird aus der Wurzel der Pflanze *Curcuma longa* gewonnen und ist das gelbe Pigment in der Curry-Gewürzmischung. In der fernöstlichen und indischen Kultur wird Curcumin nicht nur als Gewürz benutzt, sondern gilt auch als traditionelles Heilmittel. Erste wissenschaftliche Studien in den frühen 70er Jahren konnten eine anti-inflammatorische Wirkung des Curcumins beschreiben (Arora et al., 1971). Bis heute sind in Tierexperimenten oder in Tumorzelllinien weitere medizinisch bedeutsame Wirkungen gezeigt worden: Neben einer anti-oxidativen Wirkung (Reddy & Lokesh, 1994; Sreejayan & Rao, 1994) wurde und wird besonders an der anti-

tumorigenen (Huang et al., 1994) und an der anti-angiogenen Wirkungsweise geforscht (Pollmann et al., 2001; Arbiser et al., 1998). Auf zellulärer Ebene und in In-vitro-Versuchen wurde vor allem die inhibitorische Wirkung auf Signalwege, besonders auf die darin beteiligten Proteinkinasen, untersucht. So zeigten Studien an stimulierten Zellen eine Inhibierung des JNK-Signalweges durch Curcumin (Chen & Tan, 1998). Hier konnte allerdings nicht der Wirkungsmechanismus aufgeklärt werden. In einer anderen In-vitro-Studie konnte für die Proteinkinasen PKC und PKA das Curcumin als Kinaseinhibitor beschrieben werden (Hasmeda & Poly, 1996).

Auch das Anti-CSN7-Immunopräzipitat aus unbehandelten HeLa-Zellen besitzt Kinaseaktivität und war beispielsweise in der Lage, das rekombinante Protein c-Jun zu phosphorylieren (Abbildung 14). Auch hier wurde die Kinaseaktivität durch Curcumin gehemmt. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Proteinkinasen CK2 und PKD den Transkriptionsfaktor auch in vitro phosphorylieren (Abbildung 17). Folglich ist die Kinaseaktivität des immunopräzipitierten COP9 Signalosoms am Beispiel des Transkriptionsfaktors c-Jun, jedenfalls zum Teil, auf die CSN-assoziierten Proteinkinasen CK2 und PKD zurückzuführen. Die Phosphorylierung von c-Jun ist hier nicht auf die Aktivität der evtl. am Komplex befindlichen JNK zurückzuführen, da diese Kinase in unstimulierten Zellen inaktiv ist. Dies wurde in einer früheren Untersuchung der c-Jun-Phosphorylierung am COP9 Signalosom gezeigt (Naumann et al., 1999). Somit kann auch die Inhibition der Kinaseaktivität durch Curcumin nicht auf die oben beschriebene Hemmung des JNK-Signalweges zurückgeführt werden.

In den Inhibitor-Studien konnte gezeigt werden, dass nicht nur Curcumin sondern auch DRB, Emodin (beide beschriebene CK2-Inhibitoren: Battistutta et al., 2000; Zandomeni, 1989) und Resveratrol (PKD-Inhibitor: Haworth & Avkiran, 2001) die CSN-assoziierte Kinaseaktivität inhibieren (Tabelle 4). Weiterhin konnte Curcumin auch als effektiver Inhibitor der beiden rekombinanten Proteinkinasen beschrieben werden. Dies bedeutet, dass die Inhibition der Kinaseaktivität des aufgereinigten COP9 Signalosoms durch Curcumin auf eine Inhibierung der assoziierten Proteinkinasen CK2 und PKD zurückzuführen ist. Unklar bleibt allerdings, ob noch andere Curcumin-sensitive Kinasen am Komplex assoziiert vorliegen können, die in der vorliegenden Arbeit nicht detektiert wurden. So scheint auch die von Sun et al. be-

schriebene IP-5/6-Kinase mit Curcumin *in vitro* hemmbar zu sein (Sun et al., 2002). Die Assoziation dieser Kinase mit dem CSN-Komplex konnte aber in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Gleichwohl kann eine Bindung der IP-5/6-Kinase oder anderer Proteinkinasen an das COP9 Signalosom nicht ausgeschlossen werden. So könnten assoziierte Kinasen während der CSN-Aufreinigung abdissoziieren und in der Folge getrennt eluiert werden. Auch andere Faktoren, wie z.B. die zell- und gewebespezifische Expression der CSN-assoziierten Proteine, können dabei eine entscheidende Rolle spielen. Für die Isolierung des Komplexes waren arbeitstechnische Fragestellungen, wie etwa die Verfügbarkeit des Ausgangsmaterials, ausschlaggebend. Aus diesem Grunde erfolgte die Isolierung des COP9 Signalosoms aus ausdienten Erythrozytenkonzentraten.

Interessanterweise sind die berechneten IC_{50} -Werte der am Komplex gebundenen Kinasen deutlich kleiner als die der getesteten freien rekombinanten Kinasen (mit Ausnahme der Inhibitor-Studien mit Resveratrol). Das würde bedeuten, dass die am COP9 Signalosom gebundenen Kinasen eine höhere Affinität zum Inhibitor haben als die in freier Form vorliegenden. In diesem Fall wäre das Curcumin tatsächlich ein spezifischer Inhibitor von CSN-assoziierten Kinasen. Unbeantwortet bleibt hier die Frage, ob die höhere Affinität der Inhibitoren gegenüber den assoziierten Kinasen auf eine Konformationsänderung der Kinasen als Folge der Bindung an den CSN-Komplex oder auf eine Konformationsänderung aufgrund einer Modifizierung (z.B. Phosphorylierung) am Komplex zurückgeführt werden kann.

Trotzdem ist Curcumin kein spezifischer Kinase-Inhibitor, da für etliche Kinasen ein inhibitorischer Effekt nachgewiesen werden konnte (s.o.). Typischerweise lag sowohl bei den hier vorliegenden als auch bei den beschriebenen Inhibitor-Studien die Hemmung im mikro-molaren Bereich. Für spezifische und hochaffine Inhibitoren liegt dagegen die Hemmung im nano-molaren Bereich.

Auch die Frage, an welcher Stelle Curcumin an die Kinasen bindet, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Dem Charakteristikum eines unspezifischen Inhibitors würde am ehesten eine kompetitive Bindung an die ATP-Bindungsstelle entsprechen. Allerdings besitzen beide Moleküle unterschiedliche funktionelle Gruppen und damit auch andere chemische Eigenschaften (Abbildung 25). Enzymkineti-

sche Studien zeigen jedoch für die Proteinkinasen PKC und PKA eine kompetitive Bindung des Inhibitors sowohl an die ATP-Bindungsstelle als auch an die Substratbindungsstelle (Hasmeda & Polya, 1996). Denkbar wäre, dass ein aromatischer Ring des Curcumins die hydrophobe Bindungstasche besetzt, an die normalerweise der Purin-Ring des ATP-Moleküls binden würde.

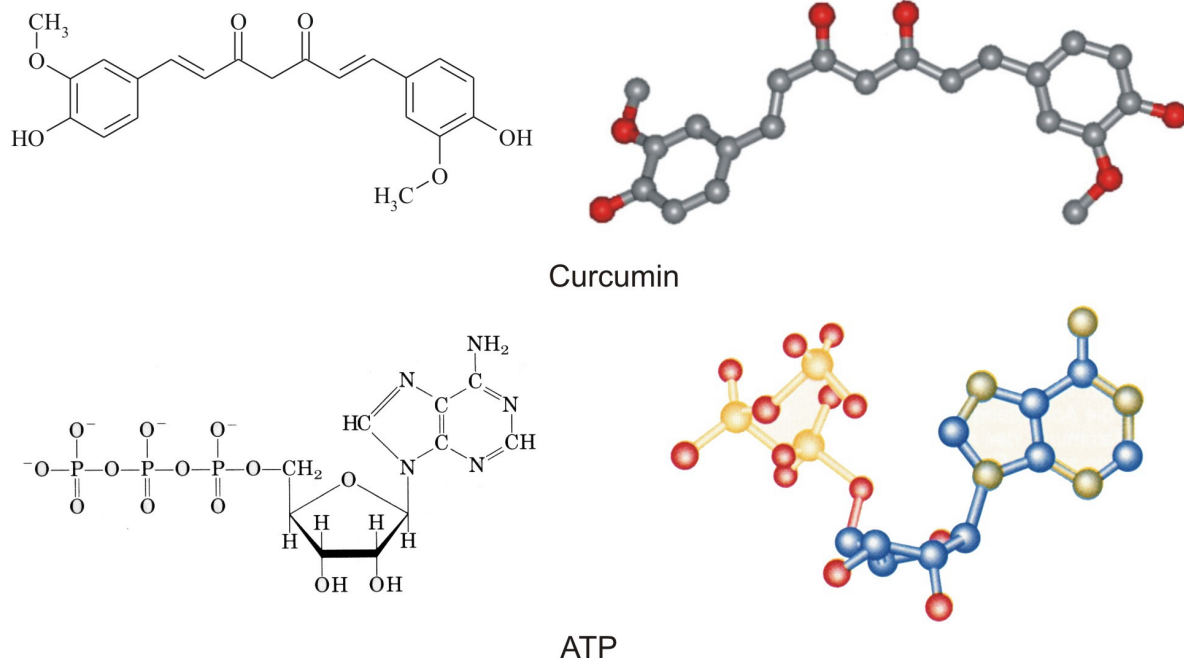


Abbildung 25: Vergleich der chemischen Strukturen von Curcumin und ATP. Auf der linken Seite sind die jeweiligen Strukturformeln dargestellt. Rechts sind dazu die räumlichen Kugel-Stab-Modelle abgebildet. Die H-Atome wurden zur besseren Darstellung ausgeblendet.

4.2. Die CSN-assoziierten Proteinkinasen CK2 und PKD regulieren den Proteinabbau über das Ubiquitin/26S-Proteasom-System

Die Regulation des Proteinabbaus am COP9 Signalosom fasst Abbildung 26 zusammen: Das Signalosom bindet (Substrat-)Proteine wie das c-Jun oder p53, die hier durch eine Phosphorylierung von den CSN-assoziierten Kinasen entweder stabilisiert (c-Jun) oder verstärkt über das Ubiquitin/26S-Proteasom-System abgebaut werden (p53) (Uhle et al., 2003; Bech-Otschir et al., 2001).

Die Funktion des COP9 Signalosoms als eine regulatorische Plattform für den proteasomalen Proteinabbau beschränkt sich aber nicht nur auf die Substratphosphorylierung. Wie im weiteren Verlauf der Diskussion noch am Beispiel der Ubiquitin-

Ligase Mdm2 erläutert wird, gibt es auch am COP9 Signalosom eine Modifizierung und Aktivitätsregulierung der E3-Ligasen bzw. E3-Ligase-Komplexe. Für die Aktivitätsmodulierung der Cullin-E3-Ligase-Komplexe ist eine erst vor kurzem entdeckte neuartige Funktion des COP9 Signalosoms, die sogenannte Deneddylierungsaktivität, verantwortlich (Lyapina et al., 2001). Dabei wird das Ubiquitin-ähnlichen Polypeptid NEDD8 von dem Gerüst-Protein Cullin abgespalten und so die Ligaseaktivität des E3-Komplexes moduliert. Innerhalb der MPN-Domäne der CSN5-Untereinheit wurde ein Metalloprotease-Motiv (JAMM) gefunden. Dieses Motiv scheint das aktive Zentrum für die Spaltung der Isopeptidbindung zu sein (Cope et al., 2002; Verma et al., 2002).

Für die Aktivitätsregulierung der Cullin-E3-Ligase-Komplexe wird indes ein komplexerer Zyklus aus Cullin-Neddylierung zusammen mit einer Assemblierung bzw. Reassemblierung des Ligase-Komplexes am COP9 Signalosom und anschließender Cullin-Deneddylierung diskutiert (Wolf et al., 2003). Die Fragestellung, ob eine CSN-assoziierte Kinase auch hier regulierend einzugreifen vermag, konnte bis jetzt noch nicht geklärt werden. Die CSN-vermittelte Phosphorylierung der Ubiquitin-Ligase von p53, Mdm2, wird nachfolgend ausführlich diskutiert.

Einige Fragen bleiben indes unbeantwortet: Wie werden die Bindung und die Aktivitäten der unterschiedlichen Interaktionspartner am CSN-Komplex reguliert? Welche der assoziierten Kinasen phosphoryliert welches Substratprotein unter welchen Umständen und was sind die daraus resultierenden Konsequenzen? Wie werden die verschiedenen Aktivitäten am COP9 Signalosom reguliert und vernetzt?

zeigten Phosphorylierung durch die assoziierten Kinasen reguliert wird. So wurde als erstes untersucht, ob die Ubiquitin-Ligase von p53, das Mdm2, am CSN-Komplex gebunden ist.

In Immunofluoreszenz-Studien wurde eine Co-Lokalisation in MCF-7-Zellen besonders in den Nucleoli beobachtet (Abbildung 20). Beide Interaktionspartner, das COP9 Signalosom und das Mdm2, sind vorrangig, aber nicht ausschließlich, im Zellkern lokalisiert. Der Transfer von Mdm2 in den Nucleolus wird über das ARF-Protein vermittelt (Weber et al., 1999; Zhang & Xiong, 1999), wobei auch ein ARF-unabhängiger Transfer beschrieben ist (Poyurovsky et al., 2003). Interessanterweise kann das p53 nicht nur über die Translokation von Mdm2 in den Nucleolus stabilisiert werden, sondern auch über die Bindung von ARF an das Mdm2 innerhalb des Zellkerns (Midgley et al., 2000; Honda & Yasuda, 1999). Insofern scheint das ARF-Protein bei der Regulation der p53-Stabilität eine redundante Funktion zu besitzen.

Neben ARF konnte kürzlich auch eine Interaktion des Mdm2 mit dem ribosomalen Protein L11 nachgewiesen werden (Lohrum et al., 2003). Ähnlich der Bindung an ARF, führt die Assoziation mit L11 unter bestimmten Bedingungen zu einer Translokation in den Nucleolus, was hier ebenfalls zu einer erhöhten p53-Aktivität führt. Des Weiteren wird der Transfer in den Nucleolus auch als eine Zwischenstation für den Export aus dem Zellkern diskutiert. Ribosomale Komponenten werden über den CRM1-Weg ins Cytoplasma befördert (Ho et al., 2000), der auch für den Export von Mdm2 und von p53 verantwortlich ist (Geyer et al., 2000).

Für das COP9 Signalosom ist sowohl der Transfermechanismus als auch die Funktion im Nucleolus noch völlig ungeklärt. Da die Co-Lokalisation in nur etwa 15-20% der unbehandelten Zellen beobachtet wurde, könnte die Lokalisation abhängig vom Zellstadium zu sein. Dies ließe sich beispielsweise mit Zellsynchronisationsexperimenten und anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Analysen experimentell nachweisen.

In den Immunopräzipitations-Studien konnte eine Assoziation des Mdm2 an das COP9 Signalosom klar belegt werden (Abbildung 21). Dies konnte sowohl in vitro mit dem aufgereinigten CSN-Komplex und dem rekombinanten Mdm2 als auch in MCF-7-Zellen am endogenen Komplex gezeigt werden. In den Immunopräzipitations-Studien aus den MCF-7-Zelllysaten sollte auch der Einfluss von Curcumin auf die

Bindung untersucht werden. Hier wurde während der Immunopräzipitation in einem parallelen Ansatz mit dem Kinaseinhibitor inkubiert. In diesen Versuchen konnte kein verändertes Bindungsverhalten durch Zugabe von Curcumin nachgewiesen werden. Für die Assoziation der Ubiquitin-Ligase scheint also die Aktivität der CSN-assoziierten Kinasen keine Rolle zu spielen. In dieser Arbeit konnte nun erstmals für eine Nicht-Cullin-E3-Ligase eine Interaktion mit dem COP9 Signalosom nachgewiesen werden.

Die Bindung von Mdm2 an das COP9 Signalosom wird höchstwahrscheinlich über die CSN3-Untereinheit vermittelt. Die Assoziation scheint im N-terminalen Bereich lokalisiert zu sein, da für das C-terminale CSN3-Fragment 111-403 keine Bindung im Far-Westernblot nachgewiesen werden konnte (Abbildung 22).

In Phosphorylierungsstudien wurde das Mdm2 vom aufgereinigten CSN-Komplex phosphoryliert, wobei diese Modifizierung durch Curcumin fast vollständig inhibiert werden konnte (Abbildung 19). Überdies zeigte der Kinase-Assay mit der rekombinanten Proteinkinase CK2, dass das Mdm2 in der Tat ein Substrat dieser Kinase ist. Dies bestätigen frühere Untersuchungen, in denen eine Phosphorylierung von Serin 269 durch die CK2 nachgewiesen werden konnte (Hjerrild et al., 2001; Götz et al., 1999). In unseren Versuchen wurde das rekombinante Mdm2 sehr effizient von der CK2 phosphoryliert, nicht aber von der PKD. All dies deutet auf eine wichtige Rolle der CK2 in der p53-Regulation am COP9 Signalosom hin. Interessant dabei ist, dass am CSN-Komplex sowohl p53 als auch das Mdm2 von der CK2 phosphoryliert werden können. Im nächsten Abschnitt wird dieser Befund ausführlicher diskutiert.

4.3.2. Regulierung der Ubiquitin-Ligaseaktivität von Mdm2 durch Auto-Ubiquitylierung am COP9 Signalosom

Neben dem Mechanismus der p53-abhängigen Induktion des Mdm2-Gens, gibt es für das Mdm2 noch einen weiteren Regulationsmechanismus: Die Fähigkeit zur Auto-Ubiquitylierung, was letztlich zum Abbau durch das 26S Proteasom führt (Fang et al., 2000; Honda & Yasuda, 2000). Deshalb wurde der Frage nachgegangen, ob dieser Regulationsmechanismus am Signalosom stattfinden kann, und ob noch andere Faktoren darauf Einfluss nehmen. In Ubiquitylierungs-Assays und in Zellexperimenten konnte gezeigt werden, dass Curcumin eine erhöhte Bildung von hochmolekularen

Mdm2-Konjugaten bewirkt, vermutlich durch eine Inhibierung der CSN-assoziierten Kinasen (Abbildung 23 und Abbildung 24). Diese hochmolekularen Mdm2-Formen konnten als Ubiquitin(Ub)-Konjugate identifiziert werden, da sie in Gegenwart des Proteasom-Inhibitors MG132 akkumulierten und auch der anti-Ub-Antikörper eine erhöhte Menge an hochmolekularen Ub-Konjugaten detektierte. Die durch Curcumin-Behandlung gebildeten Mdm2-Ub-Konjugate könnten also als Folge der Auto-Ubiquitylierung entstanden sein. Dies würde im Umkehrschluss bedeuten, dass die CSN-vermittelte Phosphorylierung von Mdm2 eine Auto-Ubiquitylierung verhindert oder wenigstens verzögert.

Aufgrund der besonderen Rolle der Proteinkinase CK2 in der Regulation der p53-Stabilität am COP9 Signalosom, wäre hier eine redundante Funktion der CK2 vorstellbar: Zum einen wird p53 am Threonin 155 phosphoryliert, zum anderen Mdm2, vermutlich an Position Serin 269 (Hjerrild et al., 2001; Götz et al., 1999). Beide Signale forcieren den p53-Abbau, einerseits durch eine mögliche Verstärkung der Bindung an Mdm2 (siehe unten und Bech-Otschir et al., 2001), andererseits durch einen mutmaßlichen Schutz vor einer Auto-Ubiquitylierung der Ubiquitin-Ligase. Damit kann am Beispiel der Ubiquitin-Ligase Mdm2 zum ersten Mal eine direkte Verknüpfung zwischen Phosphorylierung und Regulation der Substrat-Ubiquitylierung am COP9 Signalosom beschrieben werden. Darüber hinaus bietet die Regulation des p53-Abbaus ein interessantes Beispiel einer Komplex-vermittelten Signalverknüpfung und -weiterleitung innerhalb der Zelle.

Interessanterweise ist vor kurzem in einer anderen Studie eine entgegengesetzte Wirkung einer Phosphorylierung von Mdm2 beschrieben worden (Stommel & Wahl, 2004). Es wurde gezeigt, dass über den DNA-Reparaturmechanismus mehrere Kinasen der PI-3-Kinasen-Familie (z.B. ATM und DNA-PK) aktiviert werden, die daraufhin das Mdm2 phosphorylieren. Dies wiederum führte zu einer verstärkten Auto-Ubiquitylierung von Mdm2 und in der Folge zum proteasomalen Abbau der E3-Ligase und zur Akkumulation von p53 in gestressten Zellen. Darüber hinaus wird auch das p53 von der ATM-Kinase an der Aminosäure Serin 15 phosphoryliert (Mdm2-Bindungsdomäne). Auf diese Weise wird eine Bindung an das Mdm2 verhindert und p53 damit stabilisiert.

In diesen Versuchen kam es durch die Induktion bestimmter Signalwege des DNA-Reparaturmechanismus zu einer Akkumulation von p53. Da diese Signalwege aber in meinen Zellexperimenten nicht aktiviert wurden, können diese Regulationsmechanismen auf die hier vorliegenden Ergebnisse nicht übertragen werden. Dennoch gibt die Studie von Stommel und Wahl einen weiteren Hinweis auf eine direkte Verknüpfung zwischen Phosphorylierung und Regulation der Proteinstabilität. Außerdem zeigen diese Daten, dass ein Signalweg durch Modifizierung auf verschiedenen Ebenen auf vielfältige Weise die Stabilität von p53 beeinflussen kann.

Im System der p53-Regulation über den proteasomalen Abbau konnten unlängst zwei weitere Ubiquitin-Ligasen beschrieben werden (Dornan et al., 2004; Leng et al., 2003). Sowohl das murine Pirh2 (p53-induced protein with a **RING-H2** domain) als auch das humane COP1 wurde als RING-E3-Ligase beschrieben, die p53 unabhängig von Mdm2 ubiquitylieren kann. In beiden Fällen besitzen die genomischen Sequenzen eine p53-Bindungsstelle, und genau wie beim Mdm2 aktiviert das p53 die Transkription beider Gene. Aufgrund der funktionellen Gemeinsamkeiten von Mdm2, Pirh2 und COP1 stellt sich die Frage, ob die redundante Regulation des p53-Abbaus über das Ubiquitin-Proteasom-System als allgemeines Modell auch auf andere Proteine übertragen werden kann: Möglicherweise gibt es generell verschiedene Abbauewege für essentielle Proteine innerhalb der Zelle, die unter entsprechenden Bedingungen an- oder abgeschaltet werden.

4.4. Das COP9 Signalosom als Plattform für die Bildung von Ubiquitinkonjugaten

In meiner Arbeit konnte die Bedeutung der Rekrutierung der Proteinkinasen CK2 und PKD durch das COP9 Signalosom herausgestellt werden. Es wurde gezeigt, dass die CK2 das Threonin 155 des Tumorsuppressors p53 phosphoryliert. Daraufhin wird das p53 über das Ubiquitin/26S-Proteasom-System verstärkt abgebaut (Bech-Otschir et al., 2001). Hier konnte mit Hilfe von konformationsspezifischen p53-Antikörpern gezeigt werden, dass der proteasomale Abbau von p53 mit einer sogenannten Wildtyp-Konformation verbunden ist. Wurde nun die CSN-spezifische Phosphorylierung durch den Kinase-Inhibitor Curcumin unterbunden und in der Folge p53 stabilisiert, zeigte

sich eine sogenannte Mutanten-Konformation. Interessanterweise wird diese Konformation auch durch DNA-schädigende Substanzen bzw. DNA-schädigende Strahlung induziert, durch die eine Akkumulation von p53 hervorgerufen wird (Chehab et al., 2000; Webley et al., 2000).

In Bezug auf die Mdm2-vermittelte Ubiquitylierung von p53 am COP9 Signalosom und dem anschließenden proteasomalen Abbau wäre es somit vorstellbar, dass die Wildtyp-Konformation notwendig für die Bindung an das am CSN-Komplex assoziierte Mdm2 ist. Alternativ könnte die Wildtyp-Konformation auch das Übertragen der Ubiquitin-Moleküle auf das p53 erst ermöglichen. Die p53-Phosphorylierung am CSN-Komplex durch die Proteinkinase CK2 würde damit ein entscheidender Regulationsmechanismus für den Abbau über das Ubiquitin/26S-Proteasom-System sein. In diesem Falle könnte man in der Tat von einem Signalosom-Ubiquitin-Proteasom-System sprechen.

Zusammenfassend sei hier ein Modell des Komplex-vermittelten p53-Abbaus erläutert. Hierbei können zwei Szenarien beschrieben werden: Zum Einen der über die Phosphorylierung regulierte p53-Abbauweg, und zum Zweiten der durch Blockierung der Kinasen induzierte Mdm2-Abbau und die daraus resultierende p53-Stabilisierung (Abbildung 27). p53 bindet an das COP9 Signalosom und wird phosphoryliert. Durch die Assoziation von Mdm2 am CSN-Komplex kann nun Ubiquitin von einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) auf das p53 übertragen werden. Die durch weitere Zyklen entstandene Poly-Ubiquitinkette wird vom 26S Proteasom erkannt, und in der Folge wird das p53 abgebaut. Wird die Phosphorylierung am Signalosom jedoch unterbunden und werden sowohl p53 als auch Mdm2 nicht modifiziert, kann das Ubiquitin nicht mehr auf das p53 übertragen werden. Anstelle dessen wird das Ubiquitin nun an das Mdm2 kovalent verknüpft und Mdm2 wird so für den proteasomalen Abbau markiert; p53 akkumuliert darauf in der Zelle. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die anti-carcinogene Wirkung von Curcumin sein (Mehta et al., 1997). Die Frage, wie das Ubiquitin-konjugierende System (E1- und E2-Enzyme) im Falle des CSN-vermittelten Abbaus von p53 mit eingebunden wird, kann hier allerdings nicht beantwortet werden. Denkbar wäre eine Abfolge kurzzeitiger Interaktionszyklen des E2-Enzyms an den Komplex und die Übertragung der Ubiquitin-Moleküle an das p53 mit Hilfe des gebundenen Mdm2 („hit and run“).

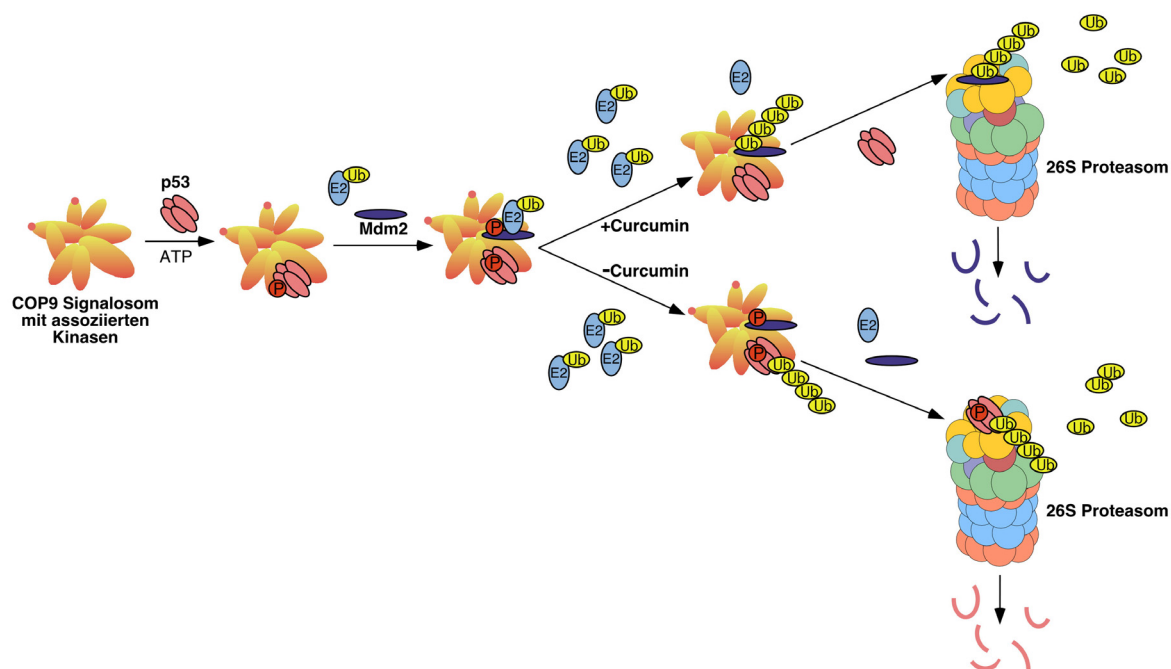


Abbildung 27: Modell des CSN-Komplex-vermittelten proteasomalen Abbaus von p53 über das gebundene Mdm2. Ohne Curcumin: Die Bindung von p53 an den CSN-Komplex und die anschließende Phosphorylierung an Threonin 155 durch die assoziierte Proteinkinase CK2 induziert den proteasomalen Abbau von p53 (Uhle et al., 2003; Bech-Otschir et al., 2001). Dies wird über die gleichzeitige Bindung von Mdm2 an den Komplex und damit einhergehender Ubiquitylierung von p53 vermittelt. Das gebundene Mdm2 und die CSN-Untereinheiten CSN2 und CSN7 werden ebenfalls phosphoryliert. Mit Curcumin: Durch Blockierung der Kinaseaktivität der assoziierten Kinasen wird zum einen die für den p53-Abbau notwendige Phosphorylierung von Threonin 155 inhibiert. Gleichzeitig kommt es zu einer verstärkten Auto-Ubiquitylierung des Mdm2, was in der Folge zum Abbau durch das 26S Proteasom führt. Die Komplex-vermittelte Phosphorylierung von Mdm2 könnte somit ein Schutz vor der Auto-Ubiquitylierungsaktivität und dem damit einhergehenden proteasomalen Abbau sein.

Die regulierende Funktion des COP9 Signalosoms im Ubiquitin/26S-Proteasom-System konnte jüngst am Beispiel der wachsenden Gruppe der Cullin-E3-Ligasen bestätigt werden (für einen Überblick siehe Wolf et al., 2003). Des weiteren gibt es in der Literatur auch Hinweise zu einer dem p53-Abbau vergleichbaren, wenn auch entgegengesetzten Regulation über eine Ubiquitin-Ligase: In Pflanzen wird der Transkriptionsfaktor HY5 von der CK2 phosphoryliert und dies vermindert, anders als bei p53, die Bindung an die RING-E3-Ligase COP1 in vitro (Hardtke et al., 2000). Dabei könnte das COP1 möglicherweise über das E2-Enzym COP10 am Signalosom gebunden sein (Suzuki et al., 2002). Neuere Befunde zeigen allerdings eine Assoziation von COP1 an zwei unterschiedliche Cullin-E3-Ligase-Komplexe (Nateri et al.,

2004; Wertz et al., 2004), sodass eine mögliche Bindung an den CSN-Komplex über die Cullin-E3-Ligase-Komplexe vermittelt werden könnte.

Auffallend ist, dass es sich in den hier beschriebenen Beispielen für E3-Ligasen immer um Ubiquitin-Ligase-Komplexe handelt. In der Tat müssen, zumindest bei den RING-E3-Ligasen, sowohl das Substrat als auch das E2-Enzym für kurze Zeit mit der Ligase gemeinsam assoziiert vorliegen, da die RING-E3-Ligasen die kovalente Verknüpfung der Ubiquitin-Moleküle an das Substrat nur vermitteln können (Jackson et al., 2000). Somit wäre es vorstellbar, dass der Signalosom-Mdm2-Komplex ein spezifischer E3-Ligase-Komplex ist. Dieser Ligase-Komplex könnte sich in der Aktivität und der Substratbindung vom nicht am Komplex gebundenen Mdm2 unterscheiden. Dies würde aber nicht eine mögliche Komplex-unabhängige Ligaseaktivität von Mdm2 ausschließen, wie sie in vielen In-vitro-Versuchen nachgewiesen wurde (siehe z.B. Honda et al., 1997).

Eine andere Art der Regulation des Mdm2 am COP9 Signalosom könnte, neben der Regulierung der Auto-Ubiquitylierung, auch eine Modifizierung der Ligaseaktivität sein. In einer In-vitro-Ubiquitylierungs-Studie mit einem E2-Enzym, Mdm2 und p53 als Substrat wurden vorwiegend Mono-Ubiquitin-Konjugate detektiert (Lai et al., 2001). Daher wurde und wird in der Literatur darüber diskutiert, ob das Mdm2 für die Bildung von Poly-Ubiquitin-Ketten einen zusätzlichen „Helfer“ benötigt. Vielleicht dient ja die Assoziation des Mdm2 mit dem CSN-Komplex dazu, dass die Ligase das p53 effektiver polyubiquitylieren kann.

Auf diesen Daten basierend, kann eine allgemeine Hypothese für die Rolle des COP9 Signalosoms im Ubiquitin-Proteasom-System beschrieben werden: Das Signalosom fungiert als eine Plattform oder ein Gerüst, an das, neben den assoziierten (Substrat-) Proteinen und den regulierenden Kinasen, auch das jeweils spezifische Ubiquitin-System (E2, E3) rekrutiert und daraufhin möglicherweise modifiziert werden kann.