

6. Zusammenfassung

Zusammenfassung

Das COP9 Signalosom (CSN) ist von Hefe bis zum Menschen konserviert und besteht aus acht Untereinheiten (CSN1-8). Der aus humanen Erythrocyten gereinigte CSN-Komplex besitzt Kinaseaktivität und phosphoryliert Proteine wie c-Jun und p53 mit Konsequenzen für ihren Ubiquitin-abhängigen Abbau. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Proteinkinase CK2 und die Proteinkinase D (PKD) mit dem CSN-Komplex co-purifizieren. Die Bindung der beiden Kinasen an den Komplex konnte mit Immunopräzipitationen und Far-Westernblots sowohl *in vitro* als auch in Zellkultur nachgewiesen werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit einem gold-markierten ATP-Analogon weisen darauf hin, dass mindestens 10% der Komplexe mit Kinasen assoziiert sind. CK2 bindet an Δ CSN3(111-403) und CSN7, während PKD nur CSN3 bindet. Die PKD ist in der Lage CSN7 zu phosphorylieren, während die CK2 zusätzlich CSN2 phosphorylieren kann. In Kinase-Assays konnte gezeigt werden, dass c-Jun und p53 Substrate der beiden Kinasen sind. Durch die CK2-abhängige Phosphorylierung von p53 an Threonin 155 wird der Tumorsuppressor verstärkt über das Ubiquitin(Ub)/26S-Proteasom-System abgebaut. Curcumin, Emodin, DRB und Resveratrol blockieren die Komplex-assoziierte Kinaseaktivität und hemmen sowohl die CK2 als auch die PKD.

Das Mdm2, eine Ubiquitin-Ligase, ist für den Abbau des Tumorsuppressors p53 verantwortlich. Immunopräzipitationen, Far-Westernblots und Immunofluoreszenzanalysen zeigen, dass das Onkoprotein an den CSN-Komplex bindet. Darüber hinaus wird das Mdm2 am Komplex phosphoryliert, höchstwahrscheinlich durch die CK2. Die Phosphorylierung wird dabei durch Curcumin inhibiert. Ferner konnte sowohl in Ubiquitylierungs-Assays als auch in MCF-7-Zellen gezeigt werden, dass Curcumin die Bildung von hochmolekularen Mdm2-Ubiquitin-Konjugaten induziert. Basierend auf diesen Daten kann ein Modell aufgestellt werden, in dem die Ubiquitin-Ligase Mdm2 und der p53-Abbau durch die CSN-assoziierten Kinasen reguliert werden. Durch Hemmung der gebundenen Kinasen wird das Mdm2 ubiquityliert, wahrscheinlich durch eine Stimulierung der Auto-Ubiquitylierungsaktivität, und dies führt in der Folge zu einem proteasomalen Abbau von Mdm2. Mit anderen Worten: Die Phosphorylierung von Mdm2 hemmt die Auto-Ubiquitylierung. Das COP9 Signalosom dient somit

als Plattform für die Regulation von Ubiquitin-Ligasen und des Proteinabbaus durch das Ubiquitin/26S-Proteasom-System.

Stichwörter: COP9 Signalosom; Proteinkinase D; Proteinkinase CK2; p53; Mdm2; Phosphorylierung; Ubiquitylierung.

Summary

The COP9 signalosome (CSN) is conserved from yeast to man and consists of eight subunits (CSN1-8). The purified CSN complex from human erythrocytes possesses kinase activity that phosphorylates proteins such as c-Jun and p53 with consequences for their ubiquitin (Ub) dependent degradation. In this study it is shown that the protein kinase CK2 and the protein kinase D (PKD) co-purify with the CSN. The association of these kinases with the complex was demonstrated by far-western blots and by immunoprecipitation in vitro and in cell culture experiments. As indicated by electron microscopy with a gold-labelled ATP-analogue, at least 10% of CSN particles are associated with kinases. CK2 binds to Δ CSN3(111-403) and CSN7, whereas PKD interacts only with full-length CSN3. The PKD modifies CSN7 while the CK2 also phosphorylates the CSN2 subunit. In kinase assays both kinases phosphorylate recombinant c-Jun and p53. The phosphorylation of p53 at Thr155 by the CK2 targets the tumour suppressor to degradation by the Ub/26S proteasome system. Curcumin, emodin, DRB and resveratrol block CSN-associated kinases and also inhibit the CK2 and PKD.

The oncoprotein Mdm2, a RING finger ubiquitin ligase, is responsible for the ubiquitylation of the tumour suppressor p53. By far-western blots, immunoprecipitation experiments and immunofluorescence analysis it is shown that Mdm2 binds to the CSN complex in vitro and in cell culture experiments. Mdm2 is phosphorylated by the CSN-associated kinases, most likely by the CK2. The phosphorylation is inhibited by curcumin. In addition, curcumin induces the formation of high molecular weight Mdm2 ubiquitin conjugates in vitro and in MCF-7 cells. Based on these data we propose a model in which the Ub ligase Mdm2 and the degradation of p53 are regulated by the CSN-associated kinases. Inhibition of the kinases causes Mdm2 ubiquitin conjugate formation, most likely by stimulation of the auto-ubiquitylation activity, followed by the degradation of Mdm2. In other words, the phosphorylation by the CSN-associated

kinases prevents the auto-ubiquitylation of Mdm2. Thus the COP9 signalosome serves as a scaffolding platform that regulates ubiquitin ligases and protein degradation via the Ub/26S proteasome system.

Keywords: COP9 signalosome; protein kinase D; protein kinase CK2; p53; Mdm2; phosphorylation; ubiquitylation