

6. ERGEBNISSE

6.1 Untersuchungen zur Rolle von Cot in der klassischen zytoplasmatischen Kinasekaskade

Vorarbeiten haben gezeigt, daß Cot eine Rolle in der klassischen zytoplasmatischen Kinasekaskade spielt (→ 3.2). Um den Effekt von Cot auf die Aktivierung von ERK zu untersuchen, wurden 293-Zellen mit DNA von der wildtyp (Cotwt), der onkogenen (Cot Δ C) oder einer kinasetoten Form (Cot Δ C K/L) von Cot alleine oder

in Kombination mit HA-getagtem ERK-1 transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, ERK-1 wurde immunopräzipitiert und ihre Fähigkeit, MBP zu phosphorylieren, in einem Kinase-Assay gemessen. Coexpression von ERK-1 zusammen mit c-Raf-BXB, einer aktivierten Form von c-Raf-1, wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Wie in Abbildung 12 gezeigt, induziert onkogenes Cot eine ERK-1-Aktivierung. Eine Überexpression von Cotwt löst ebenfalls eine ERK-1-Aktivierung aus, die kinasetote Mutante von Cot hingegen zeigt

keinerlei aktivierende Effekte, was demonstriert, daß die Kinaseaktivität von Cot für die ERK-Aktivierung verantwortlich ist.

Um zu untersuchen, auf welcher Ebene Cot in die klassische Kinasekaskade eingreift, wurden Sf9-Zellen mit Baculovirus-Expressionskonstrukten für wildtyp oder onkogenes Cot zusammen mit rekombinantem MEK-1 Virus infiziert. 48 h nach der Infektion wurde MEK-1 immunopräzipitiert und ihre Kinaseaktivität mit GST-ERK-1 als Substrat getestet (Abb. 13). Sowohl die Expression von wildtyp Cot als auch die Expression von dem onkogenem Cot

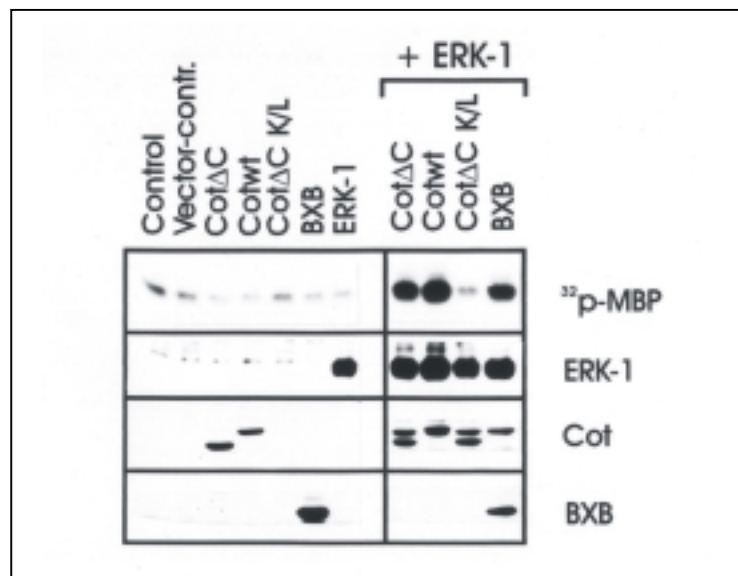


Abb. 12: Cot induziert ERK-Aktivierung

293-Zellen wurden mit den angegebenen Expressionskonstrukten transfiziert, ERK-1 wurde aus den Lysaten immunopräzipitiert und auf seine Fähigkeit, MBP *in vitro* zu phosphorylieren, überprüft. Coexpression von c-Raf-BXB wurde als Positivkontrolle verwendet. Die Expression der transfizierten Proteine wurde durch Western-Blots bestätigt. Die Expression von Cot in dem Cotransfektionsexperiment mit ERK war schwach und konnte nur nach längerer Exposition detektiert werden, was die unspezifische Bande erklärt, die oberhalb der Cot Δ -Bande zu sehen ist bzw. Cotwt als Doppelbande erscheinen läßt.

resultierte in eine starke Aktivierung von MEK-1. Unter Berücksichtigung der Cot-Expressionsstärke ergibt sich kein Unterschied zwischen Cotwt und der C-terminal verkürzten Form in ihrer Fähigkeit, MEK-1 zu aktivieren. Diese könnte dadurch erklärt werden, daß die

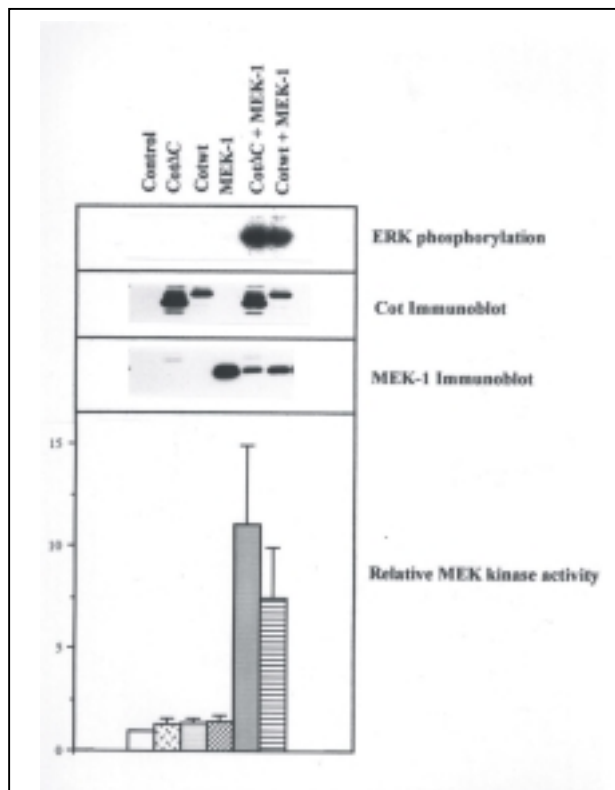


Abb. 13: Cot induziert MEK-1 Aktivierung

Sf9-Zellen wurden mit den angegebenen rekombinanten Baculoviren infiziert, MEK-1 wurde aus den Lysaten immunopräzipitiert und auf seine Fähigkeit, kinasetote GST-ERK-1 *in vitro* zu phosphorylieren, überprüft. Die Expression der Proteine wurde durch Western-Blots bestätigt. Dargestellt ist der Mittelwert (\pm Standardabweichung) von 6 unabhängigen Experimenten.

Menge an MEK, die als Substrat zur Verfügung steht, *in vivo* limitierend ist und sowohl in der Gegenwart von Cotwt wie auch von onkogenem Cot eine vollständige Phosphorylierung des vorhandenen Substrates erfolgt. Eine Verdoppelung der MEK-1 Expression in Sf9-Zellen macht den Unterschied zwischen wildtyp und

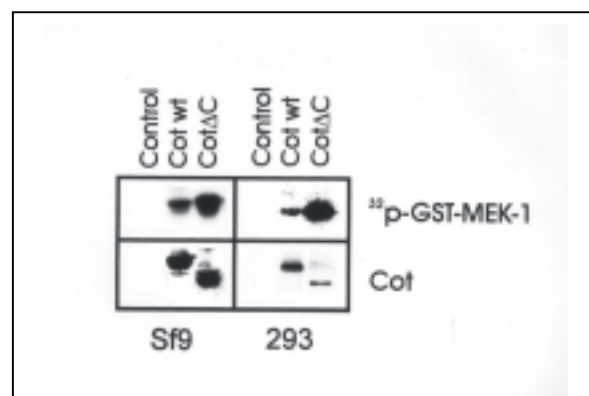


Abb. 14: MEK-1 ist ein direktes Substrat von Cot

Überexprimiertes Cot wurde aus 293-, bzw. Sf-9 Zell-Lysaten immunopräzipitiert und auf seine Fähigkeit, *in vitro* GST-MEK-1 zu phosphorylieren, untersucht. Die Expression der Proteine wurde durch einen Western-Blot bestätigt.

onkogenem Cot in der MEK-Aktivierung sichtbar, was die Hypothese unterstützt (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse demonstrieren, daß MEK in der Cot-induzierten ERK-Aktivierung involviert ist und daß Cotwt nach Überexpression aktiv ist.

Um festzustellen, ob MEK ein direktes Substrat von Cot ist, wurde überexprimiertes Cotwt oder CotΔC aus Sf9- oder 293-Zellen immunopräzipitiert und zusammen mit kinaseinaktivem GST-MEK in einem *in vitro* Kinaseassay inkubiert. Wie in Abbildung 14 gezeigt wird, ist MEK ein direktes Substrat von Cot. Onkogenes Cot phosphoryliert MEK hierbei wesentlich stärker als Cotwt, obwohl die Menge an immunopräzipitiertem CotΔC besonders

in dem Transfektionsexperiment in 293-Zellen wesentlich geringer war als die der wildtyp Form.

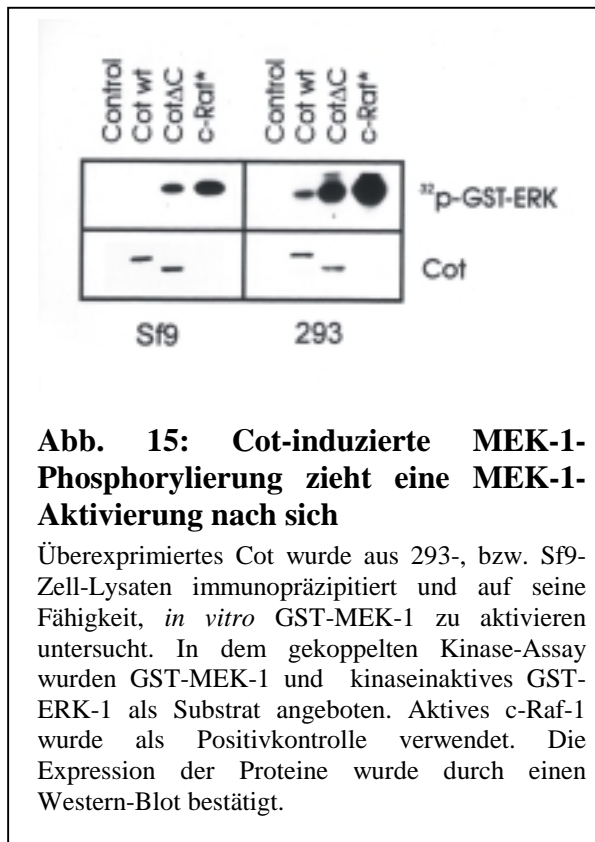


Abb. 15: Cot-induzierte MEK-1-Phosphorylierung zieht eine MEK-1-Aktivierung nach sich

Überexprimiertes Cot wurde aus 293-, bzw. Sf9-Zell-Lysaten immunopräzipitiert und auf seine Fähigkeit, *in vitro* GST-MEK-1 zu aktivieren untersucht. In dem gekoppelten Kinase-Assay wurden GST-MEK-1 und kinaseinaktives GST-ERK-1 als Substrat angeboten. Aktives c-Raf-1 wurde als Positivkontrolle verwendet. Die Expression der Proteine wurde durch einen Western-Blot bestätigt.

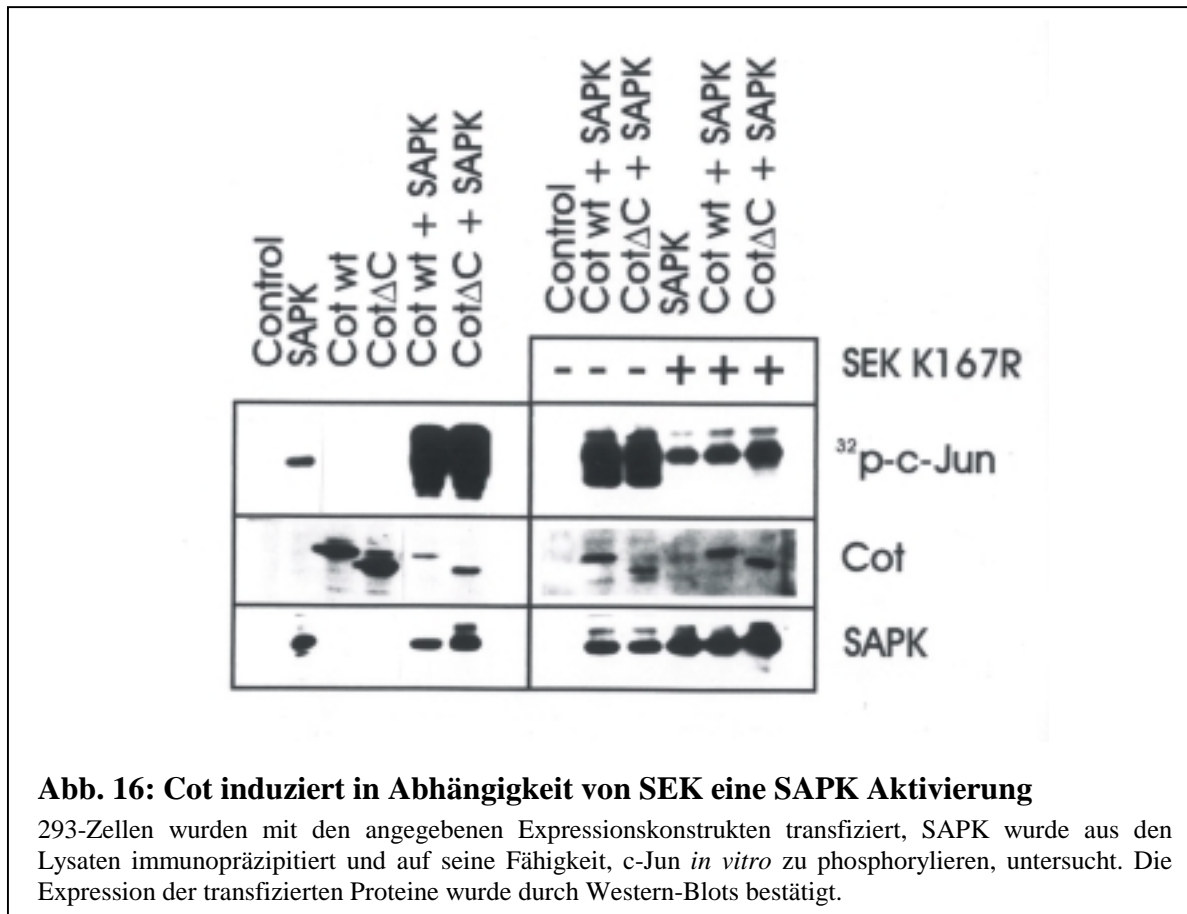
Um zu testen, ob diese Cot-induzierte MEK-Phosphorylierung auch zu einer Aktivierung von MEK führt, wurde ein gekoppelter Kinase-Assay durchgeführt. Dazu wurde überexprimiertes Cot aus Sf9- oder 293-Zellen immunopräzipitiert und in einem *in vitro* Kinase-Assay zusammen mit bakteriell exprimierter und aufgereinigter wildtyp MEK und einer kinasetoten GST-ERK als Substrate inkubiert. Als Positivkontrolle wurde aktives c-Raf-1 verwendet (Abb. 15). MEK-1 wurde nach Inkubation mit immunopräzipitiertem Cot aktiviert und konnte nun GST-ERK phosphorylieren. Die onkogene Form von Cot hatte im Vergleich zum Wildtyp eine 4,5 mal höhere

Kinaseaktivität. Diese Ergebnisse zeigen, daß Cot eine Aktivierung der klassischen zytoplasmatischen Kinasekaskade auslöst, indem es MEK direkt phosphoryliert und aktiviert und somit eine ERK-Aktivierung hervorruft.

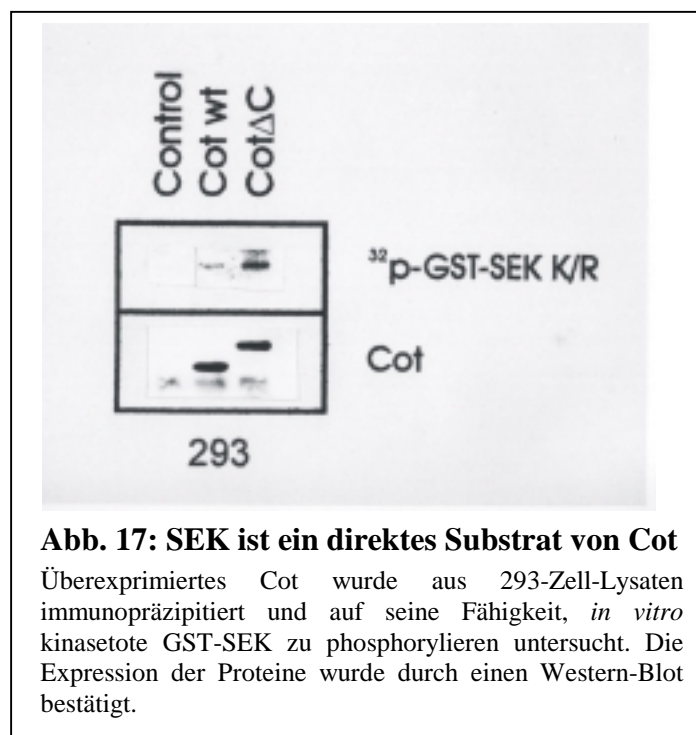
6.2 Die Rolle von Cot in Streß-Kinasekaskaden

Um die Beteiligung von Cot an weiteren Signaltransduktionswegen zu untersuchen, wurden 293-Zellen mit Plasmiden cotransfiziert, die für Cot und für HA-getaggte SAPK β codieren. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, SAPK β immunopräzipitiert und in einem *in vitro* Kinase-Assay überprüft, ob GST-c-Jun als Substrat phosphoryliert wird (Abb. 16, links). Sowohl wildtyp als auch C-terminal verkürztes Cot konnten eine Aktivierung von SAPK β hervorrufen. In einem weiteren Experiment wurden 293-Zellen noch zusätzlich mit einer kinaseinaktiven Mutante von SEK transfiziert [209, 146], um zu untersuchen, auf welcher Ebene Cot in die Streß-Kinasekaskade eingreift (Abb. 16, rechts). Ein Überschuß an

dominant negativer SEK konnte die Cot-induzierte SAPK-Aktivierung inhibieren, was darauf hinweist, daß Cot oberhalb oder auf dem Level von SEK in der Kinasekaskade agiert.



Um zu überprüfen, ob SEK als direktes Substrat für Cot fungieren kann, wurde in 293-Zellen überexprimiertes Cot immunopräzipitiert und in einem *in vitro* Kinase-Assay mit bakteriell exprimierter und aufgereinigter kinaseinaktiver GST-SEK K167R inkubiert. Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, wird SEK direkt durch Cot phosphoryliert, während mit immunopräzipitiertem aktiven c-Raf-1 keine SEK-Phosphorylierung beobachtet werden konnte (Daten



nicht gezeigt). Die onkogene Form von Cot weist hierbei im Vergleich zu Cotwt eine größere Phosphorylierungsaktivität auf.

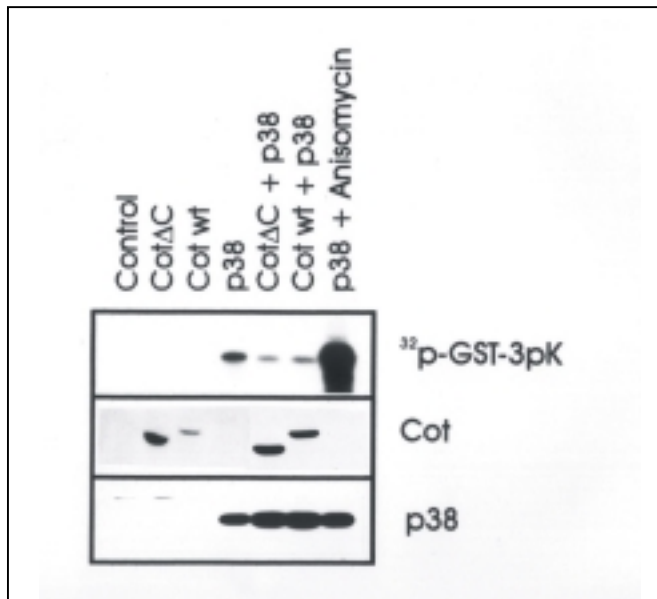


Abb. 18: Cot hat keinen Effekt auf die p38-Aktivierung.

293-Zellen wurden mit den angegebenen Vektoren transfiziert, p38 α wurde aus den Zell-Lysaten durch Immunopräzipitation isoliert und seine Fähigkeit, GST-3pK *in vitro* zu phosphorylieren überprüft. Die Expression von Cot und p38 wurde durch Western-Blot nachgewiesen. Anisomycin-stimulierte Zellen dienen als Positivkontrolle. Die Cot-induzierte Verminderung der p38-Aktivität ist nach den Ergebnissen von 3 unabhängigen Kinase-Assays nicht signifikant.

Eine weitere Protein-Kinasekaskade, die durch Streß aktiviert wird, ist der p38-Signalweg. Um die Beteiligung von Cot an dieser Kaskade zu untersuchen, wurden 293-Zellen entweder mit wildtyp oder onkogener Form von Cot alleine oder in Kombination mit p38 α transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und p38 α immunopräzipitiert. In einem Kinase-Assay wurde getestet, ob p38 α aktiviert wurde und somit in der Lage war, bakteriell exprimiertes und aufgereinigtes 3pK, ein Substrat von p38 [146], *in vitro* zu phosphorylieren. p38 α -transfizierte Zellen, die vor der Ernte 20 min mit Anisomycin stimuliert wurden, wurden als Positivkontrolle verwendet.

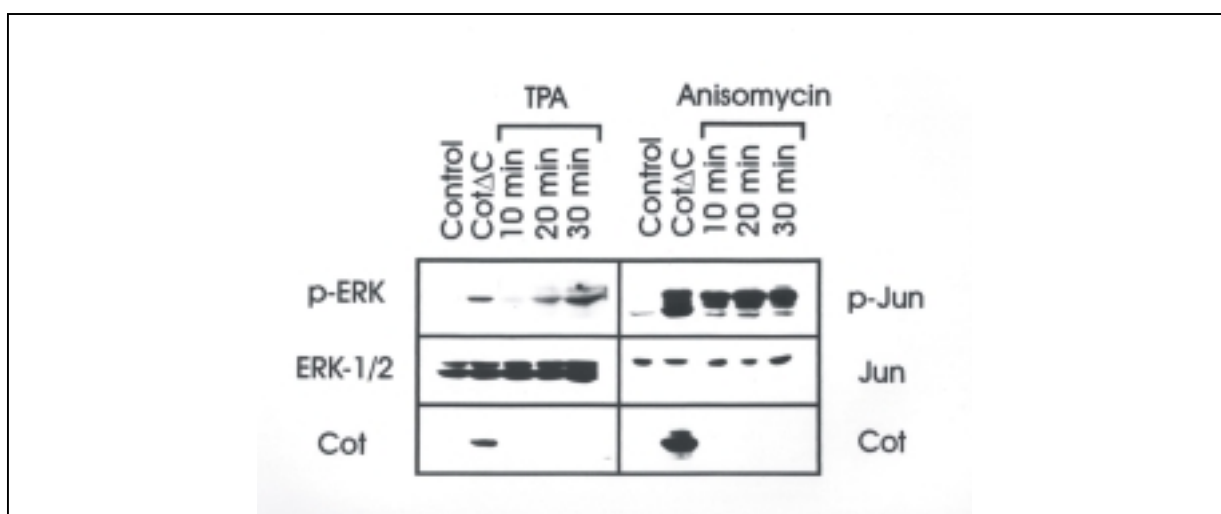


Abb. 19: Phosphorylierung von ERK1/2 und c-Jun durch Cot *in vivo*.

293-Zellen wurden mit onkogenem Cot transfiziert oder wie angegeben mit TPA bzw. Anisomycin stimuliert. Die Zell-Lysate wurden mit phosphospezifischen ERK- oder c-Jun-Antikörpern untersucht und die Expression von Cot, endogenem ERK und endogenem c-Jun durch Western-Blot nachgewiesen.

Cot ruft weder eine Aktivierung von p38 α hervor (Abb. 18), noch inhibiert überexprimiertes kinasetotes Cot die Aktivierung von p38 durch Anisomycin (Daten nicht gezeigt).

Die Fähigkeit von Cot, MAP-Kinasen *in vitro* zu stimulieren, wurde *in vivo* mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern untersucht. 293-Zellen wurden dafür mit onkogenem Cot transfiziert oder kurz vor der Ernte entweder mit TPA oder mit Anisomycin 10-30 min lang stimuliert (Abb. 19). Phosphoryliertes ERK (Abb. 19, links) oder phosphoryliertes c-Jun (Abb. 19, rechts) wurden schließlich in einem Western-Blot mittels phosphospezifischer Antikörper (\rightarrow 4.2.5) nachgewiesen. Überexprimiertes onkogenes Cot induziert in 293-Zellen sowohl eine Phosphorylierung von endogener ERK als auch von endogenem c-Jun.

MAP-Kinasen kooperieren oft in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. c-Jun, ein Bestandteil des AP-1-Komplexes, wird sowohl von dem ERK- als auch von dem JNK-Signalweg phosphoryliert, wobei aber nur ERK auch eine c-Jun-Expression induziert. Dieser zweifache Einfluß auf c-Jun ist nötig, um z.B. eine Differenzierung von PC12-Zellen auszulösen [142], so daß in diesem Fall unterschiedliche Signalwege trotz gleicher Substratspezifität auch unterschiedliche biologische Reaktionen hervorgerufen werden. Die TNF α -Promotoraktivierung scheint hingegen durch eine Kooperation zwischen ERK, JNK und p38-Signalwegen reguliert zu werden [99]. Ein weiteres Beispiel ist die Aktivierung des IL-2-Enhancers, die sowohl von ERK als auch von JNK kontrolliert wird [100].

Reportergen-Assays wurden daher benutzt, um den Einfluß von Cot auf Transkriptionsfaktoraktivierung zu untersuchen. Das Reportergenkonstrukt pB4X [24] beinhaltet 4 Kopien des ORE (oncogene responsive element) des Polyomavirus Enhancers. Dieser Enhancer befindet sich oberhalb eines minimalen β -Globin Promotors, der mit einem Luciferasegen (luc) fusioniert ist. Es ist bekannt, daß Expression von aktivem c-Raf-1 in NIH3T3-Zellen diesen Promotor stimuliert, der Ets- und AP-1-Bindestellen aufweist [24]. Transfektionsexperimente in 293-Zellen haben gezeigt, daß sowohl das onkogene als auch das wildtyp Cot starke Aktivatoren dieses Promotors sind (Abb. 20 A). Um zu analysieren, ob diese Cot-induzierte Promotoraktivierung vom ERK-Signalweg abhängig ist, wurden 293-Zellen zusätzlich zu Cot und dem Reportergenkonstrukt mit einer dominant negativen Mutante von ERK (ERKB3 K52/R52) transfiziert. Diese Mutante inhibierte die Cot-vermittelte Promotoraktivierung um 80 %, was auf eine Beteiligung der klassischen Kinasekaskade bei der Cot-induzierten Aktivierung von Ap-1- und Ets-kontrollierten Promotoren hindeutet.

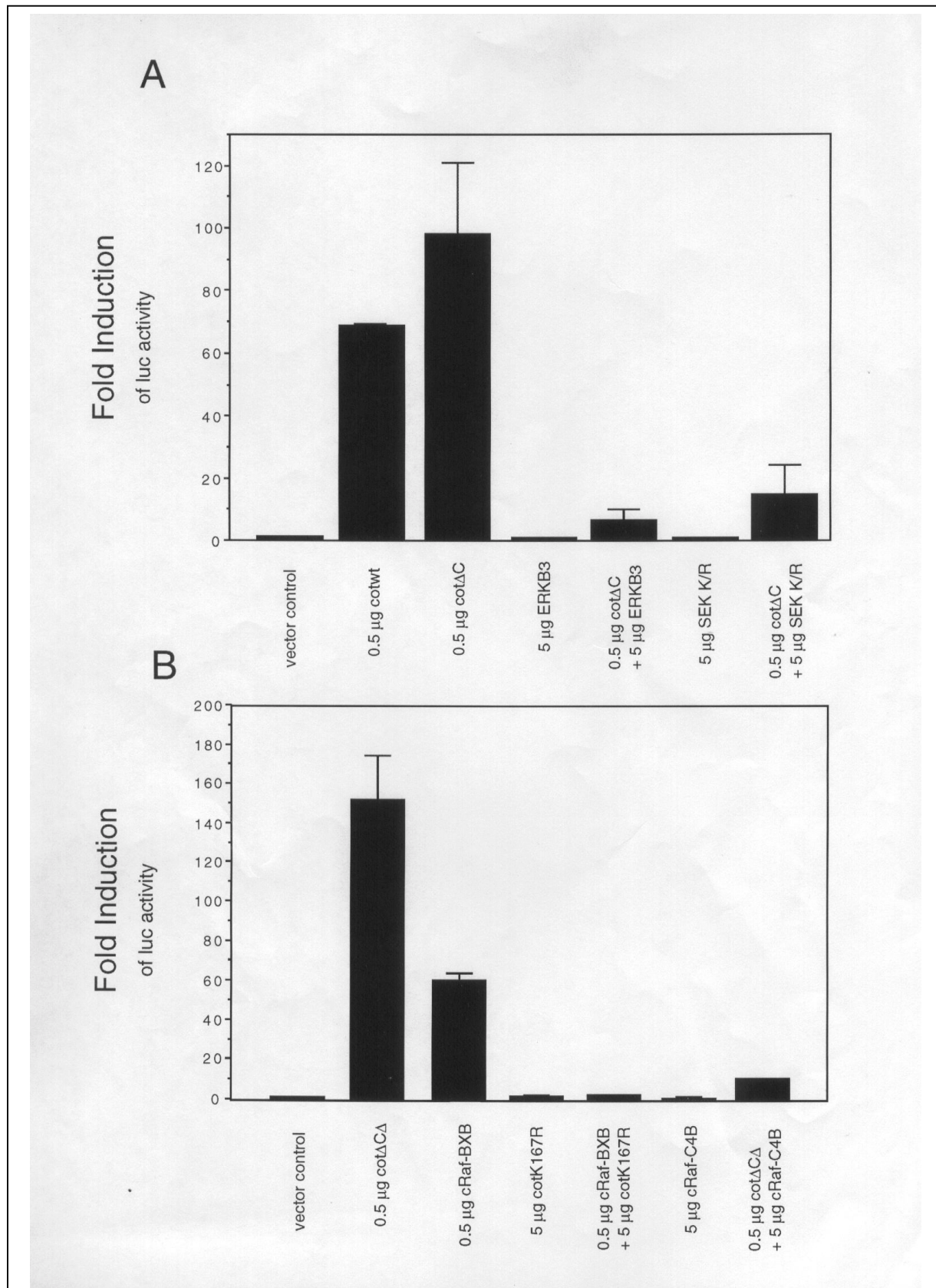


Abb. 20: pB4x-Promotoraktivierung durch Cot

293-Zellen wurden mit den angegebenen Expressionskonstrukten transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Expression mit einem Luminometer bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert (+/- Standardabweichung) von 3 unabhängigen Experimenten. Die Vektorkontrolle wurde gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte dementsprechend angepaßt. Details siehe Text.

Es wurde ebenfalls untersucht, ob der Streß-Kinaseweg in der Cot-vermittelten Ap-1- und Ets-kontrollierten Promotoraktivierung beteiligt ist. Dafür wurden 293-Zellen mit einem Überschuß der dominant negativen SEK-Mutante, Cot und dem pB4X-Reportergenkonstrukt transfiziert. Die SEK-Mutante konnte die Cot-induzierte Promotoraktivierung zu 80 % inhibieren, was darauf hindeutet, daß auch der SAPK-Signalweg von Cot benötigt wird, um den Ap-1- und Ets-kontrollierten Promotor zu aktivieren (Abb. 20 A).

Abbildung 20 B zeigt die Ergebnisse von Reporter-gen-Assays, die durchgeführt wurden, um die Beziehung von Cot und c-Raf-1 zu untersuchen. Für diese Experimente wurde eine C-terminal verkürzte Cot-Mutante (Cot Δ CA) eingesetzt, der die onkogen-spezifischen Sequenzen fehlen, um einen Einfluß dieses Anteils auszuschließen. Diese Deletionsmutante induziert eine 30 % höhere Luciferase-Aktivität im Vergleich zur onkogenen Form. Der C-Terminus könnte somit in einer Negativregulation der Kinaseaktivität von Cot involviert sein. Eine dominant negative Cot-Mutante kann die c-Raf-1-BXB-vermittelte Promotor-Aktivierung blockieren. Dieser Effekt könnte durch die Konkurrenz um das gemeinsame Substrat MEK bedingt sein. Die dominant negative Raf-C4B-Mutante, die mit der Ras-abhängigen c-Raf-1-Aktivierung konkurriert [24], reduziert die Cot Δ CA-induzierte Promotoraktivierung um 90 %. Dieser Effekt, der auch bei der Aktivierung von ERK durch Cot beobachtet wurde, deutet auf eine mögliche Ras-Beteiligung hin [233]. Raf-C4B bindet an die Effektor-domäne von Ras und verhindert somit seine Signalweiterleitung. Ob dies die Ras-Abhängigkeit der c-Raf-1-Aktivierung oder die Aktivierung von Cot betrifft bzw. ob Ras für die Signalüberleitung unterhalb von Cot notwendig ist, ist zur Zeit noch unbekannt. In der Cot/Raf-C4B-Coexpression wird aber auch die Cot-Aktivität inhibiert, woraus man schlußfolgern kann, daß aktives Ras für die Cot abhängige Reporter-genaktivierung wichtig ist.

Um die Raf-Cot-Beziehung weiter zu charakterisieren und zelluläre Effekte ihrer Wirkung zu vergleichen, wurden Transformations-, Differenzierungs- und Apoptoseexperimente durchgeführt.

6.3 Effekte von Cot auf Transformation, Differenzierung und Apoptose

Das C-terminal verkürzte Cot zeigt in Hamster-SHOK-Zellen wie auch in NIH3T3-Fibroblasten Transformationsaktivität [161]. Wie schon beschrieben, kann Cot-induzierte ERK-1-Aktivierung durch eine dominant negative c-Raf-1 Mutante inhibiert werden [233]. Um den Zusammenhang zwischen Raf- und Cot-induzierten Wegen der Transformation zu untersuchen, wurden Experimente mit CHP25-Zellen durchgeführt. CHP25 ist eine revertante Zelllinie, die durch EMS-Mutagenese und Selektion in cis-Hydroxyprolin aus *v-raf*-transformierten NIH3T3-Fibroblasten abgeleitet wurde. Diese Zelllinie exprimiert ein funktionelles *v-raf*-Gen, bildet aber in Soft-Agar-Assays keine Kolonien und ist nicht morphologisch transformiert [132]. Diese Zellen sind resistent gegenüber der Transformation durch *v-ras* und *v-sis*, die in der Signalweiterleitung oberhalb von c-Raf-1 funktionieren, aber auch gegenüber der Transformation durch *v-mos*, welches wie c-Raf-1 auch MEK phosphorylieren und aktivieren kann. Aus der Gruppe der nukleären Onkogene war nur *v-fos*

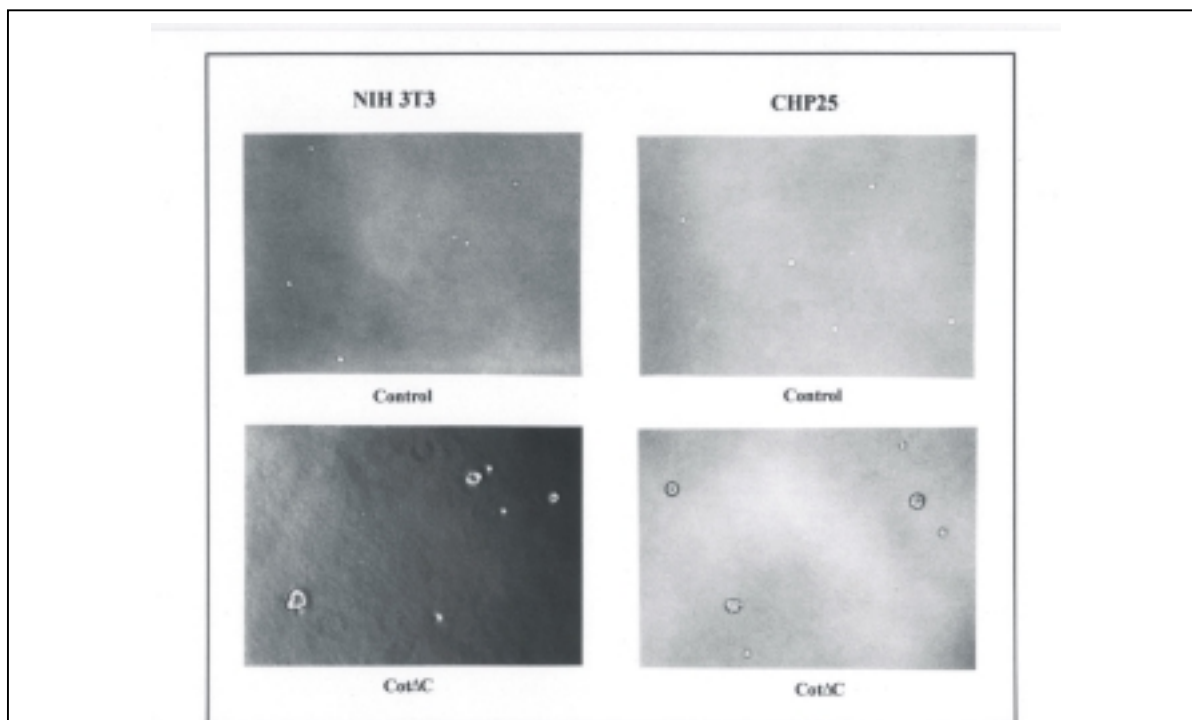


Abb. 21: Transformation von Raf-revertanten CHP25-Zellen durch Cot.

CHP25-Zellen wurden mit Retroviren infiziert, die onkogenes Cot (Cot Δ C) exprimieren. Cot-Virus infizierte und uninfizierte NIH3T3-Zellen wurden als Kontrollen eingesetzt. Nicht-infizierte NIH3T3- und CHP25-Zellen zeigen eine untransformierte Morphologie, während die mit Cot-infizierten Zellen Koloniewachstum in Soft-Agar aufweisen. Die Bilder wurden 14 Tage nach der Infektion aufgenommen.

in der Lage, diese Zellen zu re-transformieren. Daraus schloß man, daß entweder in diesen Zellen, ein einzelnes Gen mutiert ist, so daß es zum Verlust eines funktionellen, in der Raf-Transformation wichtigen Zielproteins kommt oder aber ein c-Raf-1-spezifischer Inhibitor konstitutiv aktiv ist [132].

Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, zeigen CHP25-Zellen, die mit einem Virus infiziert wurden, der konstitutiv aktives Cot exprimiert, Wachstum in Soft-Agar. Die Defekt in den CHP25-Zellen wirkt sich also nicht auf das Transformationspotential von Cot aus. Diese Ergebnisse demonstrieren, daß Cot in diesen Zellen unabhängig von einer aktiven c-Raf-1-Kinase arbeitet bzw., daß ein möglicherweise in den Zellen aktiver Raf-spezifischer Inhibitor auf Cot keinen Effekt hat.

PC12-Pheochromocytoma-Zellen werden häufig als Modellsystem für die Differenzierung von neuronalen Zellen verwendet. Untersuchungen mit PC12-Zellen gaben Hinweise, daß das dynamische Gleichgewicht zwischen den ERK- und SAPK/p38-Signalwegen für die Entscheidung über Leben oder Tod einer Zelle wichtig ist [256]. Nach NGF-Stimulation wird die klassische zytoplasmatische Kaskade aktiviert woraufhin die Zelle aufhört zu wachsen

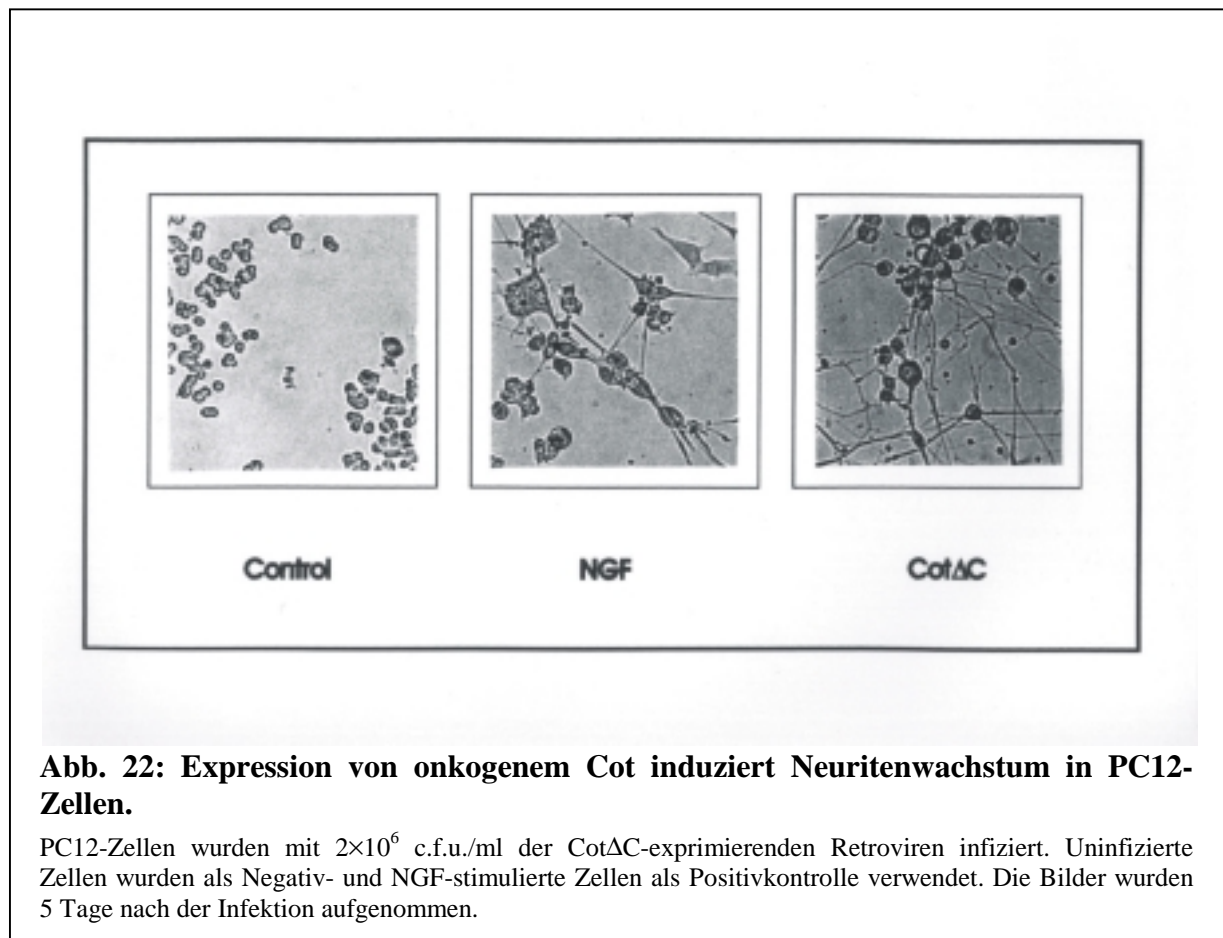


Abb. 22: Expression von onkogenem Cot induziert Neuritenwachstum in PC12-Zellen.

PC12-Zellen wurden mit 2×10^6 c.f.u./ml der CotΔC-exprimierenden Retroviren infiziert. Uninfizierte Zellen wurden als Negativ- und NGF-stimulierte Zellen als Positivkontrolle verwendet. Die Bilder wurden 5 Tage nach der Infektion aufgenommen.

und sich zu differenzieren beginnt. Überexpression der MEK-Aktivatoren c-Raf-1 oder Mos zeigen den gleichen Effekt. NGF-Entzug führt hingegen zur Aktivierung der Streß-Signalkaskaden und inhibiert den ERK-Weg [256], so daß die Zellen durch Apoptose sterben.

Da Cot in den bisher untersuchten Zellsystemen sowohl den ERK- als auch den SAPK-Signalweg aktiviert, wurde getestet, welche Kaskade Cot in PC12-Zellen aktiviert und ob Cot Apoptose oder Differenzierung auslöst. Dazu wurden PC12-Zellen mit Retroviren infiziert, die aktives Cot exprimieren. Nach 5 Tagen zeigten die Zellen eine Neuritenauswuchs ähnlich wie nach NGF-Stimulation, was als Positivkontrolle in diesem Experiment verwendet wurde (Abb. 22).

Um zu untersuchen, welche MAPK-Signalwege in diesen Zellen angeschaltet sind, wurde die Phosphorylierung von ERK und c-Jun mittels phosphospezifischer Antikörper bestimmt (Abb. 23). Verursacht durch die Cot-Überexpression waren ERK1/2 in den PC12-Zellen stark phosphoryliert. Im Fall von c-Jun erhöhte sich sowohl die Expression als auch das Ausmaß

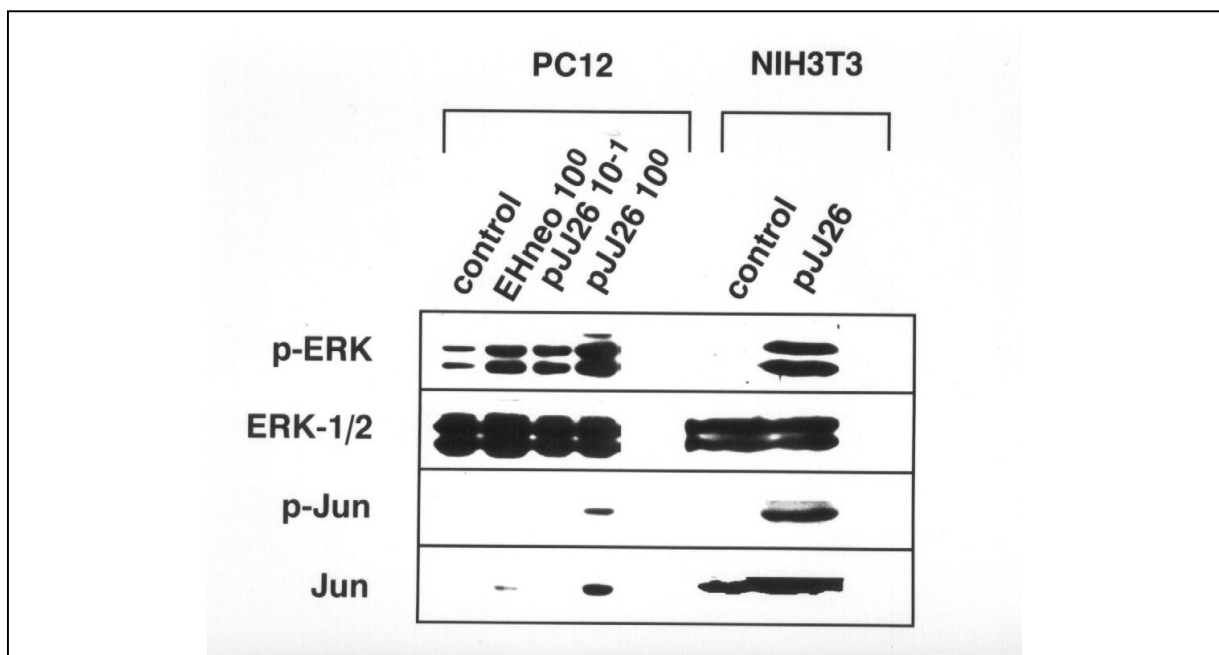
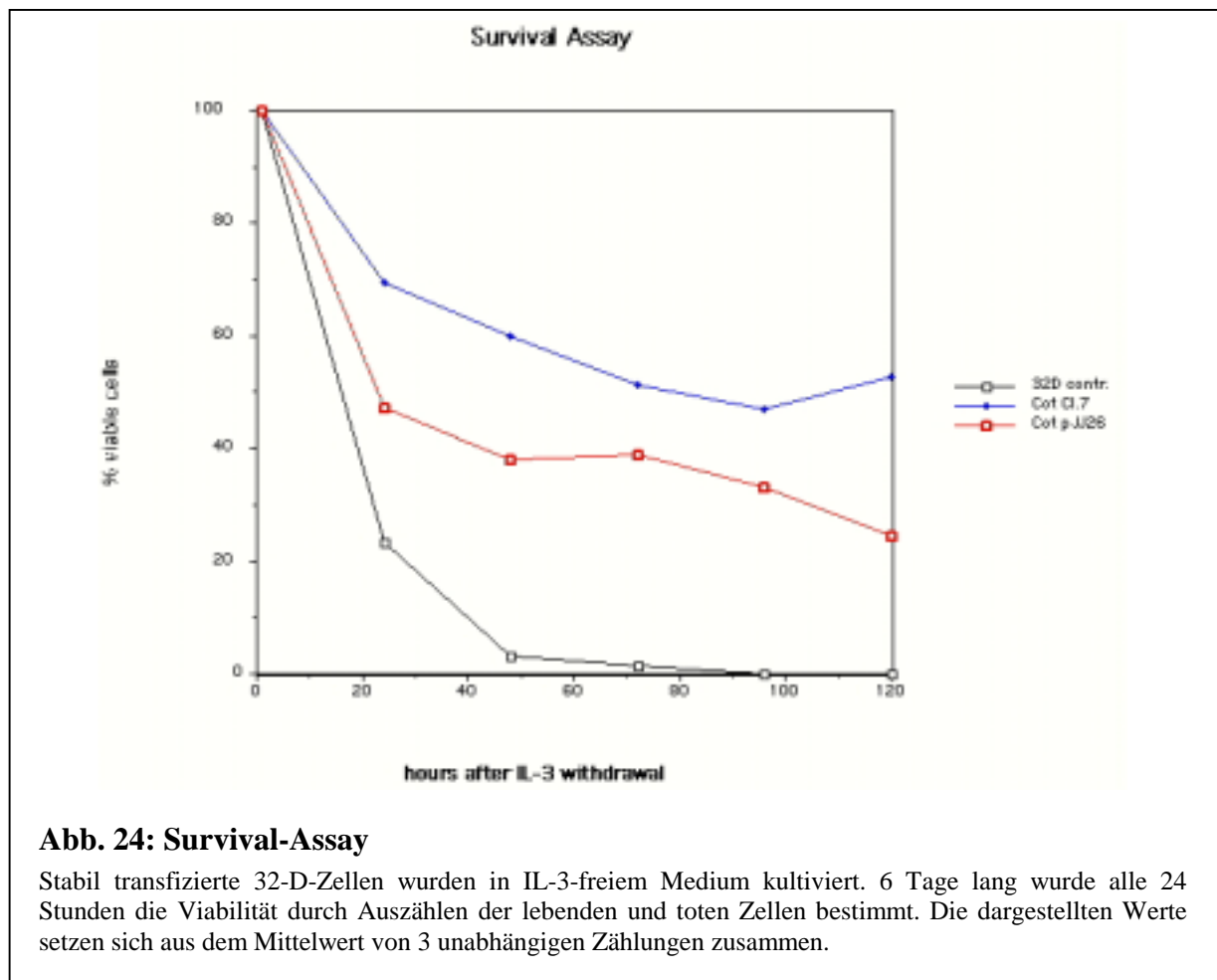


Abb. 23: ERK1/2- und JNK-Aktivierung in Cot-exprimierenden PC12- und NIH3T3-Zellen

PC12-Zellen wurden mit Retroviren infiziert, die konstitutiv aktives Cot (pJJ26) oder c-Raf-1 (EHneo) exprimieren. Im Fall der Cot-Infektion wurden zwei verschiedene Virusverdünnungen verwendet (10^0 , 10^{-1}). 48 h nach der Infektion wurden die Zell-Lysate auf phosphoryliertes ERK oder c-Jun untersucht. Die Expression von endogenem ERK und c-Jun wurde durch Western-Blot bestimmt. Im Fall der NIH3T3-Fibroblasten wurde eine stabil transfizierte Zelllinie verwendet, die das gleiche retrovirale Cot-Konstrukt exprimiert. Die Effektivität des Virus-Transfers wurde bei den PC12-Zellen 120 h nach der Infektion durch Untersuchung des Neuritenwachstums bestimmt. Etwa 90 % der Cot- und 60 % der EHneo-infizierten Zellen zeigten eine differenzierte Morphologie. Bei infizierten NIH3T3-Zellen diente die morphologische Transformation als Indikator der Expression von aktivem Cot.

der Phosphorylierung. In stabil transfizierten NIH3T3-Fibroblasten induzierte onkogenes Cot ERK1/2- und c-Jun-Phosphorylierung, wobei keine Änderung in der c-Jun-Expression zu beobachten war. Wie auch schon in 293-Zellen zu beobachten war (Abb. 19.), resultiert aus einer Cot-Überexpression auch in PC12-Zellen eine *in vivo* Aktivierung von JNK und ERK.

Die bisher beschriebenen Ergebnisse identifizieren Cot als Aktivator von MEK und deuten darauf hin, daß Cot in der klassischen zytoplasmatischen Kaskade auf der gleichen Ebene wie c-Raf-1 arbeitet. Mit aktiviertem c-Raf-1 zu vergleichen ist auch der Effekt, den Cot auf 32D-Zellen hat, wenn diesen IL-3 entzogen wird. Normalerweise unterlaufen diese Zellen bei IL-3-Mangel einen apoptotischen Zelltod. Onkogenes c-Raf-1 kann die Apoptose in diesen Zellen unterdrücken und ihr Überleben verlängern [39]. Auch Cot Δ C hat eine antiapoptotische Wirkung auf diese Zellen nach IL-3-Entzug (Abb. 24). Das retrovirale onkogene Cot-pJJ26 Konstrukt wurde in 32D-Zellen elektroporiert und die stabile Zelllinie 2 Wochen mit Neomycin selektiert (in Zusammenarbeit mit Roland Houben). Dem daraus entstandenen Cot-pJJ26-Zellpool wurde 7 Tage IL-3 entzogen und die Zellen danach wieder



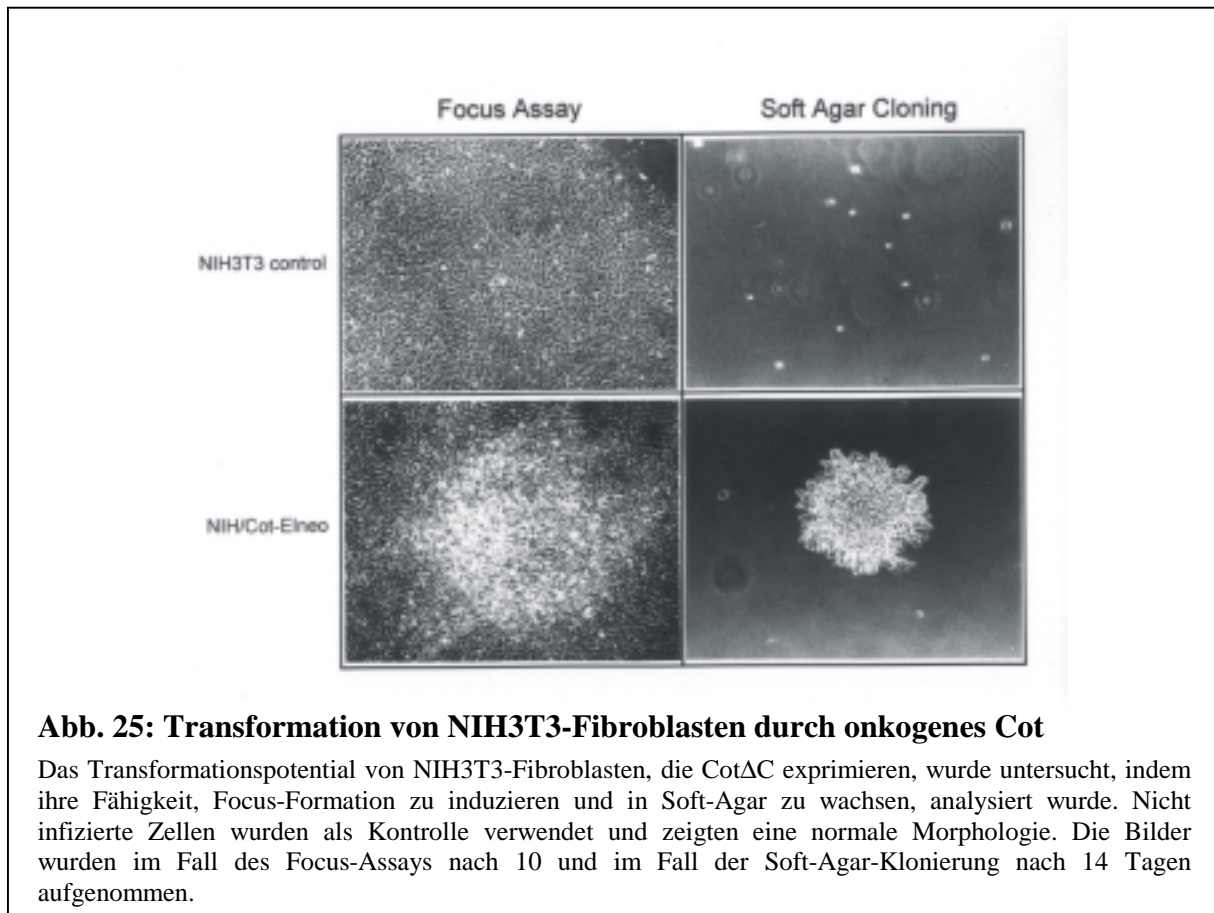
mit WEHI-Medium vermehrt. Die so selektierten Zellen wurden Cot Cl.7 genannt. Kontroll-32D-Zellen, Cot-pJJ26 Zellen und Zellen von Cot Cl.7 wurden einem Survival-Assay unterzogen. Über 120 Stunden wurden die Zellen in IL-3-freiem Medium kultiviert und die Viabilität durch Auszählen der lebenden und toten Zellen bestimmt. Der Vergleich der Sterbekurven von wildtyp- und Cot-exprimierenden-Zellen zeigt einen deutlich verzögerten Abfall der Cot-Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen, was auf einen antiapoptotischen Effekt von Cot schließen läßt.

Der höhere antiapoptotische Effekt von Cot in Cot Cl.7-Zellen ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß diese Zellen durch das 7-tägige Hungern während ihrer Etablierung auf stärkere Cot-Expression selektiert wurden. Der letzte Meßwert der Cot Cl.7-Zellen ist vermutlich dadurch scheinbar erhöht, weil die toten Zellen langsam abgebaut wurden und sich somit das Verhältnis der ausgezählten lebenden Zellen im Vergleich zu den Toten zugunsten der lebenden Zellen verschoben hat.

6.4 *in vivo*-Untersuchungen der Effekte von onkogenem Cot

Um die *in vivo*-Effekte von onkogenem Cot zu analysieren, wurden neugeborene NSF/N- und NMRI-Mäuse intraperitoneal mit $1,2 \times 10^6$ cfu eines Cot exprimierenden Retrovirus inokuliert. NIH3T3-Fibroblasten wurden mit dem retroviralen Cot Δ C-EL_{neo}-Vektor (\rightarrow 4.3.4.3) zusammen mit einem Helferviruskonstrukt stabil transfiziert (\rightarrow 5.2.2.2). Mit dem Überstand dieser Zellen, der infektiöse Viren beinhaltet, wurden erneut NIH3T3-Zellen infiziert, die morphologische Transformation zeigten (Abb. 25, links). 24 Stunden nach der Infektion wurden 10^3 - 10^4 Zellen in Soft-Agar ausgesät, um transformierte Zellen zu identifizieren und Klone zu isolieren, die die Fähigkeit haben, ohne Anheftung an ein Substrat und unabhängig von anderen Zellen wachsen zu können. Wie Abbildung 25 zeigt, waren mit Cot infizierte NIH3T3-Zellen in der Lage, in Soft-Agar zu wachsen. Besonders schnell wachsende transformierte Klone, die wahrscheinlich mehrere Kopien des Virus integriert haben, wurden aus dem Soft-Agar isoliert und vermehrt, um einen hochtitrigen Virus zu erhalten.

38 neugeborene NFS/N- bzw. NMRI- Mäuse, die mit $1,2 \times 10^6$ cfu der Cot-Viren inokuliert wurden, entwickelten Tumore und starben 7-10 Wochen nach der Injektion. Die Autopsie im späten Stadium der Krankheit ergab eine Tumor-Entwicklung in fast allen Organen, begleitet



durch eine im Vergleich zu wildtyp Mäusen des gleichen Alters 10- bis 14-fach vergrößerte Milz (100-110 mg im Vergleich zu durchschnittlich 1,45 g in den Cot-Mäusen).

(Diese Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Axel Greiner und Dr. Lev Fedorov gewonnen).

Ein Querschnitt durch den Oberschenkel einer 7 Wochen alten NFS/N-Maus zeigte ein hyperzelluläres, monotones und dichtes Tumordinfiltrat (Abb. 26a). Diese dicht gepackten Blasten mit polymorphen hyperchromatischen Kernen und dunkelblauem Zytoplasma verdrängten die restliche Hämatopoese (Abb. 26b). Der Blutausschlag des gleichen Tieres zeigte kleine Zellen der extramedullären Hämatopoese und große Tumorzellen, die Lymphoblasten ähneln (Abb. 26c). Diffuse Lymphominfiltrate waren ebenfalls in lymphatischen Geweben, wie der Milz (Abb. 26d), und extranodalen Organen, wie dem Pankreas (Abb. 26e), der Leber (Abb. 26f) und dem Magen (Abb. 26g) zu finden. Epithelienartefakte konnten in keinem Gewebe nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen zeigen, daß die Cot-Viren in den Mäusen eine hämatopoetische Neoplasie hervorrufen.

Milztumorzellen der Cot-Mäuse konnten leicht in Kultur genommen werden. Dazu wurde die Milz einer Cot-infizierten 7 Wochen alten NFS7N-Maus unter sterilen Bedingungen

entnommen und in kleine Stücke zerteilt. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Milzzellen suspendiert. Ca. 18 Tage nach Inkulturnahme dominierten große, flache, adhärente Zellen, die langsam wuchsen, aber kleine, runde Suspensionszellen produzierten (Abb. 27).

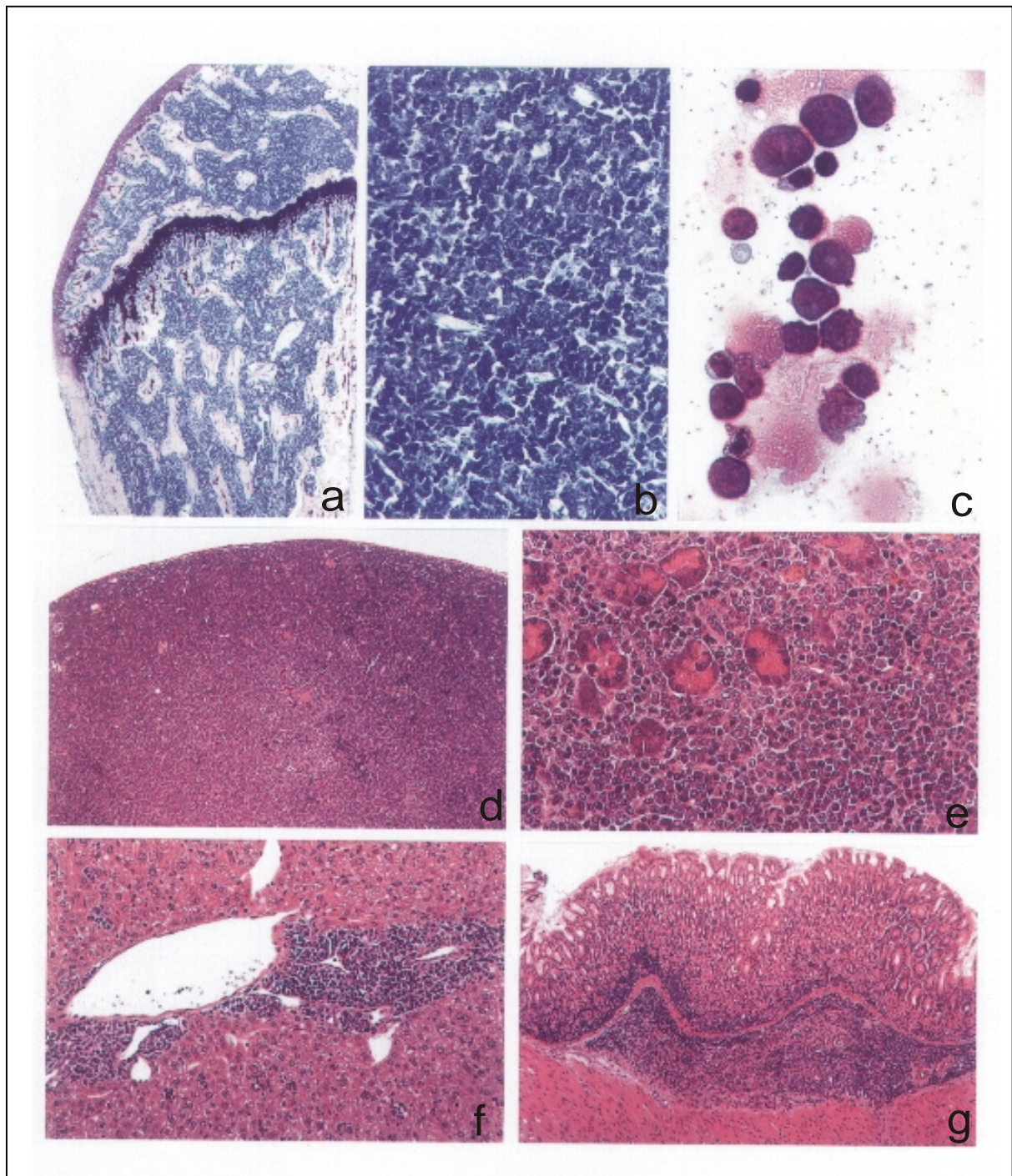
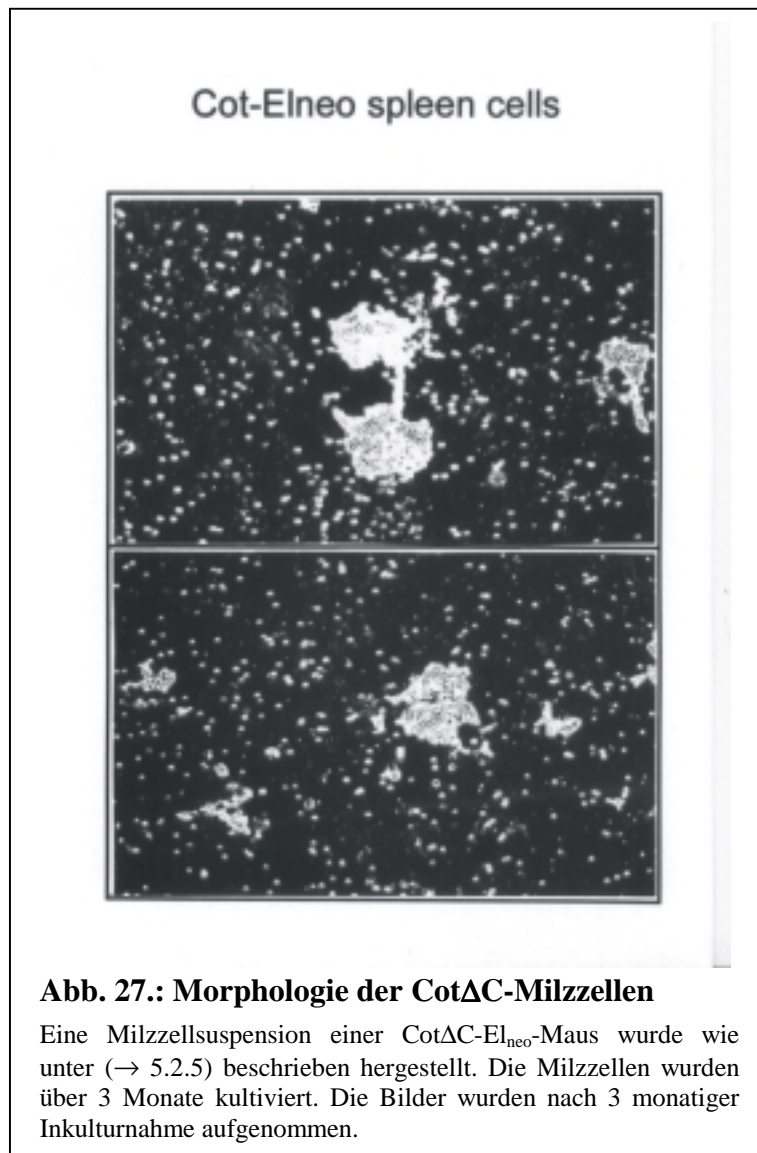


Abb. 26: Histologische Analyse Cot induzierter Tumore

(a) Querschnitt eines Oberschenkels mit Tumordinfiltraten ($\times 25$, Giemsa); (b) Detailansicht ($\times 100$, Giemsa); Der Blutausschlag (c) zeigt große Tumorzellen, die die kleinen hämatopoetischen Zellen verdrängen; (d)-(f) zeigen Organe mit diffusen Lymphominfiltraten: Milz (d) (H&E-Färbung, $\times 25$, Giemsa), Pankreas (e) (H&E-Färbung, $\times 40$, Giemsa), Leber (f) (H&E-Färbung, $\times 40$, Giemsa) und Magen (g) (H&E-Färbung, $\times 25$, Giemsa)

Diese Suspensionszellen waren locker an der Oberfläche der „Mutterzelle“ angeheftet, so daß nur ihr Umriß zu erahnen ist (siehe Abb. 27.). Auch in Kulturen ohne die adhärennten Zellen waren die Suspensionszellen lebens- und teilungsfähig, hatten aber eine durchschnittliche Lebensdauer von nur 3 Wochen (2 mal pro Woche 1:10 gesplittet).



Mediumüberstand dieser Zellen wurde auf das Vorhandensein von Cot-exprimierenden Viren überprüft, indem NIH3T3-Fibroblasten damit infiziert wurden. 10 Tage nach der Infektion waren Foci transformierter Zellen sichtbar (Abb. 28), was bestätigt, daß die Milzzellen Cot-Viren produzieren. Als Negativkontrolle wurden uninfizierte NIH3T3-Zellen verwendet, als Positivkontrolle wurden NIH3T3-Zellen mit dem ursprünglichen Cot Δ C-E1neo-Virus infiziert. Die infizierten Fibroblasten hatten in Soft-Agar die gleiche Morphologie wie die zur Virusherstellung benutzten NIH3T3-Zellen (Vergleich Abb. 29 mit Abb 25).

Suspensionszellen der Cot-Milzzell-Kultur wuchsen ebenfalls im Soft-Agar, formten aber keine kompakten Kolonien, sondern streuten sich in alle Richtungen im Agar aus (Abb. 29).

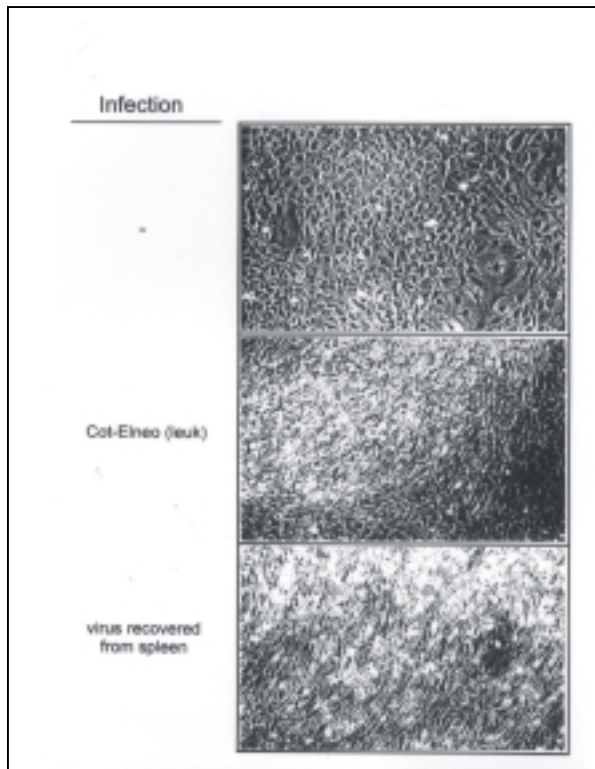


Abb. 28.: Re-Isolierung des Cot-Virus aus Cot Δ C-Milzzellen

NIH3T3-Zellen wurden mit dem Überstand der Cot-Milzzellen infiziert, um zu überprüfen, ob infektiöse Cot-Viren vorhanden sind und die Zellen infolgedessen fähig sind, Foci zu bilden. Uninfizierte Zellen wurden als Negativ- und NIH3T3-Zellen, die mit dem ursprünglichen Cot Δ C-EL_{neo}-Virus infiziert wurden, als Positivkontrolle verwendet. Die Fotos wurden 10 Tage nach der Infektion aufgenommen.

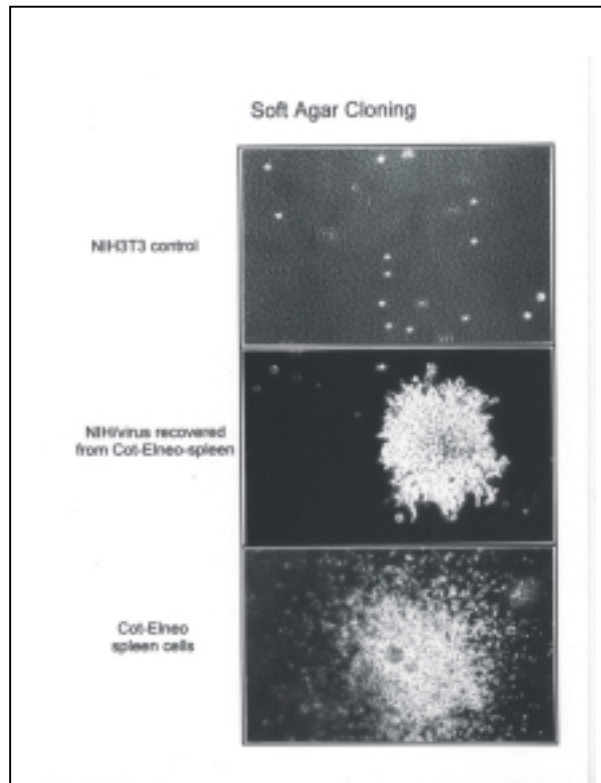


Abb. 29.: Verhalten der mit dem re-isolierten Cot-Virus infizierten NIH3T3-Zellen und der Cot Δ C-Milzzellen in Soft-Agar

NIH3T3-Zellen wurden mit Überstand der Cot-Milzzellen infiziert und auf ihre Fähigkeit getestet, in Soft-Agar zu wachsen. Das Wachstumsverhalten der Cot-Milzzellen in Soft-Agar wurde ebenfalls beobachtet. Uninfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Die Fotos wurden 4 Wochen nach der Infektion aufgenommen.

Die kommerziell erwerblichen Antikörper gegen Cot sind nicht empfindlich genug, um die Expression von endogenem Cot bzw. die Expression des virus-codierten Cots zu detektieren (unpublizierte Daten). Um retrovirale Cot-RNA in den virus-produzierenden NIH3T3-Zellen und den Cot-Milzzellen nachzuweisen, kam eine RT-PCR (\rightarrow 5.4) mit Cot- und retrovirus-spezifischen Primern zur Anwendung (Abb. 30). RNA aus uninfizierten NIH3T3-Zellen diente als Negativkontrolle, während Cot Δ C-EL_{neo}-DNA als Positivkontrolle benutzt wurde. Vier verschiedene Primerkombinationen (**A-D**) wurden verwendet (Sequenz der Primer \rightarrow 5.4.3.) [**A**: Cot1 + EL_{neo}1 \rightarrow 400 bp-Fragment; **B**: Cot2 + EL_{neo}1 \rightarrow 500 bp-Fragment; **C**: Cot1 + EL_{neo}2 \rightarrow 1300 bp-Fragment; **D**: Cot2 + EL_{neo}2 \rightarrow 1400 bp-Fragment]. Die retrovirale Cot-

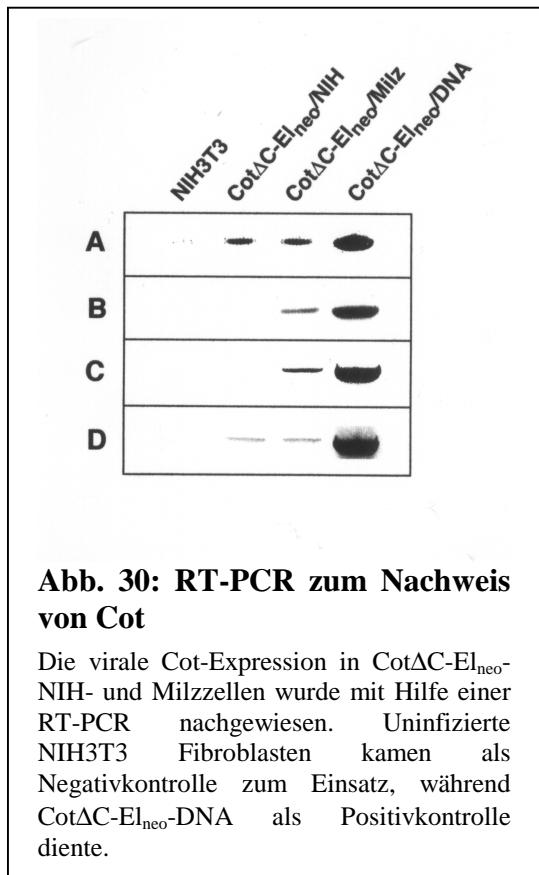


Abb. 30: RT-PCR zum Nachweis von Cot

Die virale Cot-Expression in Cot Δ C-EI_{neo}-NIH- und Milzzellen wurde mit Hilfe einer RT-PCR nachgewiesen. Uninfizierte NIH3T3 Fibroblasten kamen als Negativkontrolle zum Einsatz, während Cot Δ C-EI_{neo}-DNA als Positivkontrolle diente.

RNA war sowohl in den Milzzellen der Cot-Mäuse als auch, wenn zumeist nur schwach, in den Cot Δ C-EI_{neo}-NIH3T3-Fibroblasten nachweisbar (Abb. 30).

Die Cot-Milzzellen wurden durch eine FACS-Analyse mit B-Zell-spezifischen Oberflächenmarkern (IgM, B220, HSA) weiter charakterisiert und eindeutig als B-Zell-Lymphome identifiziert. Dieses Ergebnis bestätigt die Diagnose einer Cot-induzierten hämatopoetischen Neoplasie. (Die Untersuchungen am FACS wurden von Dr. Axel Greiner durchgeführt.)

Da Cot sowohl in der klassischen Kinasekaskade als auch in der JNK-Streß-Kinasekaskade eine Rolle spielt, wurde untersucht, welche Kaskade

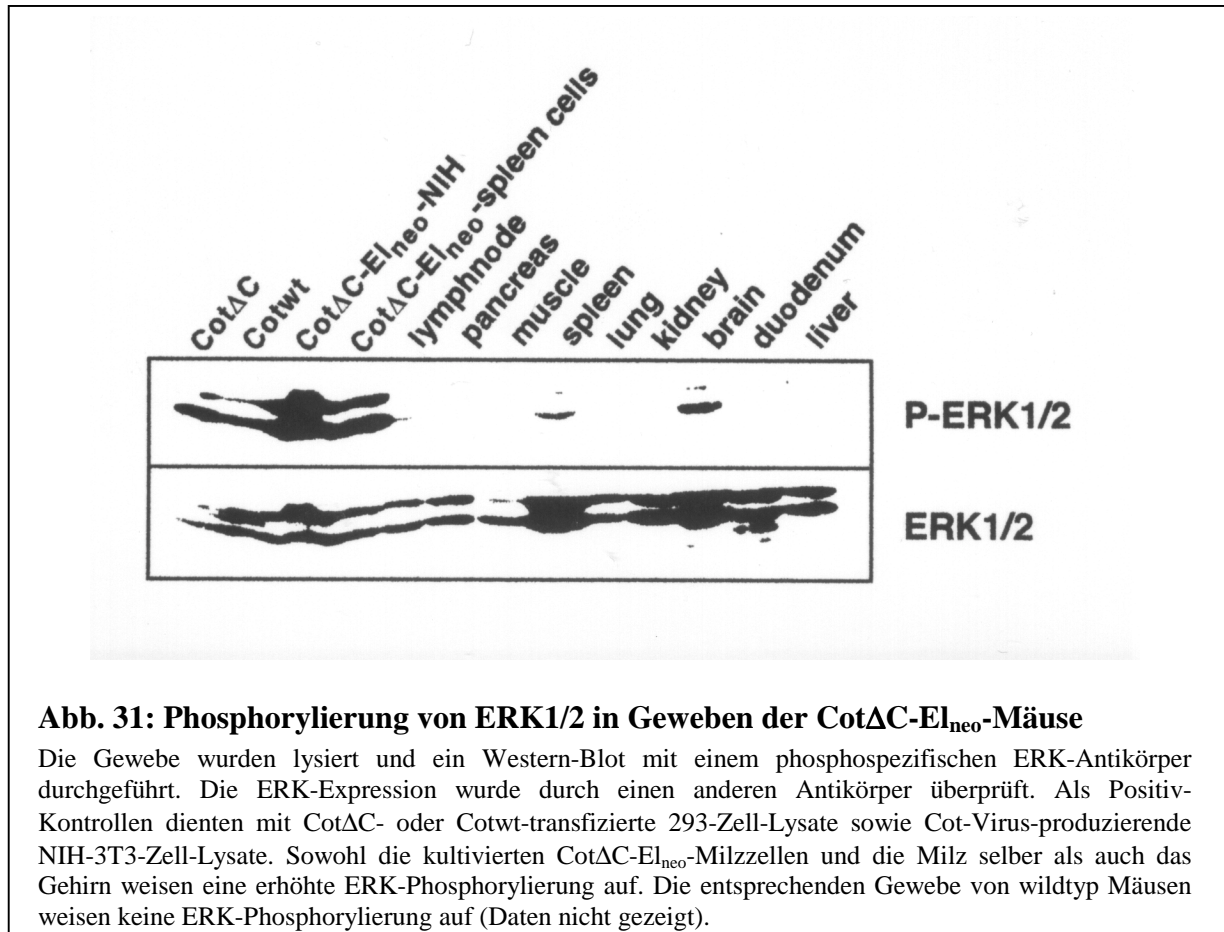


Abb. 31: Phosphorylierung von ERK1/2 in Geweben der Cot Δ C-EI_{neo}-Mäuse

Die Gewebe wurden lysiert und ein Western-Blot mit einem phosphospezifischen ERK-Antikörper durchgeführt. Die ERK-Expression wurde durch einen anderen Antikörper überprüft. Als Positivkontrollen dienten mit Cot Δ C- oder Cotwt-transfizierte 293-Zell-Lysate sowie Cot-Virus-produzierende NIH-3T3-Zell-Lysate. Sowohl die kultivierten Cot Δ C-EI_{neo}-Milzzellen und die Milz selber als auch das Gehirn weisen eine erhöhte ERK-Phosphorylierung auf. Die entsprechenden Gewebe von wildtyp Mäusen weisen keine ERK-Phosphorylierung auf (Daten nicht gezeigt).

in den Cot-Tumoren der infizierten Mäuse aktiv ist. Mit Hilfe phosphospezifischer ERK- bzw. c-Jun-Antikörper wurden verschiedene Gewebe der Cot Δ C-El_{neo}-Mäuse auf eine Cot-induzierte Aktivierung des jeweiligen Proteins untersucht (Abb. 31 und 32.). Wie aus Abb. 31 hervorgeht, weisen sowohl die kultivierten Cot Δ C-El_{neo}-Milzzellen als auch die Milz selber sowie das Gehirn eine erhöhte ERK-Phosphorylierung auf. Zwar wurde keine Autopsie des Gehirns vorgenommen, aber es kann angenommen werden, daß auch hier Tumordinfiltrate zu finden wären. Als Positivkontrolle dienten mit Cot transfizierte 293-Zellen. Gewebe von nichtinfizierten Kontrollmäusen zeigen keine ERK-Phosphorylierung (Daten nicht gezeigt), was darauf hindeutet, daß die ERK-Phosphorylierung in Organen der Cot-Mäuse auf die Cot-Infektion zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu ist in den Tumorgewebe und kultivierten Zellen weder eine c-Jun-Aktivierung noch eine c-Jun-Expression nachzuweisen (Abb. 32). Als Positivkontrollen wurden hier Cot-transfizierte 293-Zellen sowie mit Anisomycin-stimulierte 293-Zellen verwendet. Diese Daten weisen darauf hin, daß Cot-induziertes Tumorstadium ebenso in einer Aktivierung der klassischen mitogenen Signalkaskade resultiert, der SAPK-Signalweg aber unbeeinflusst bleibt.

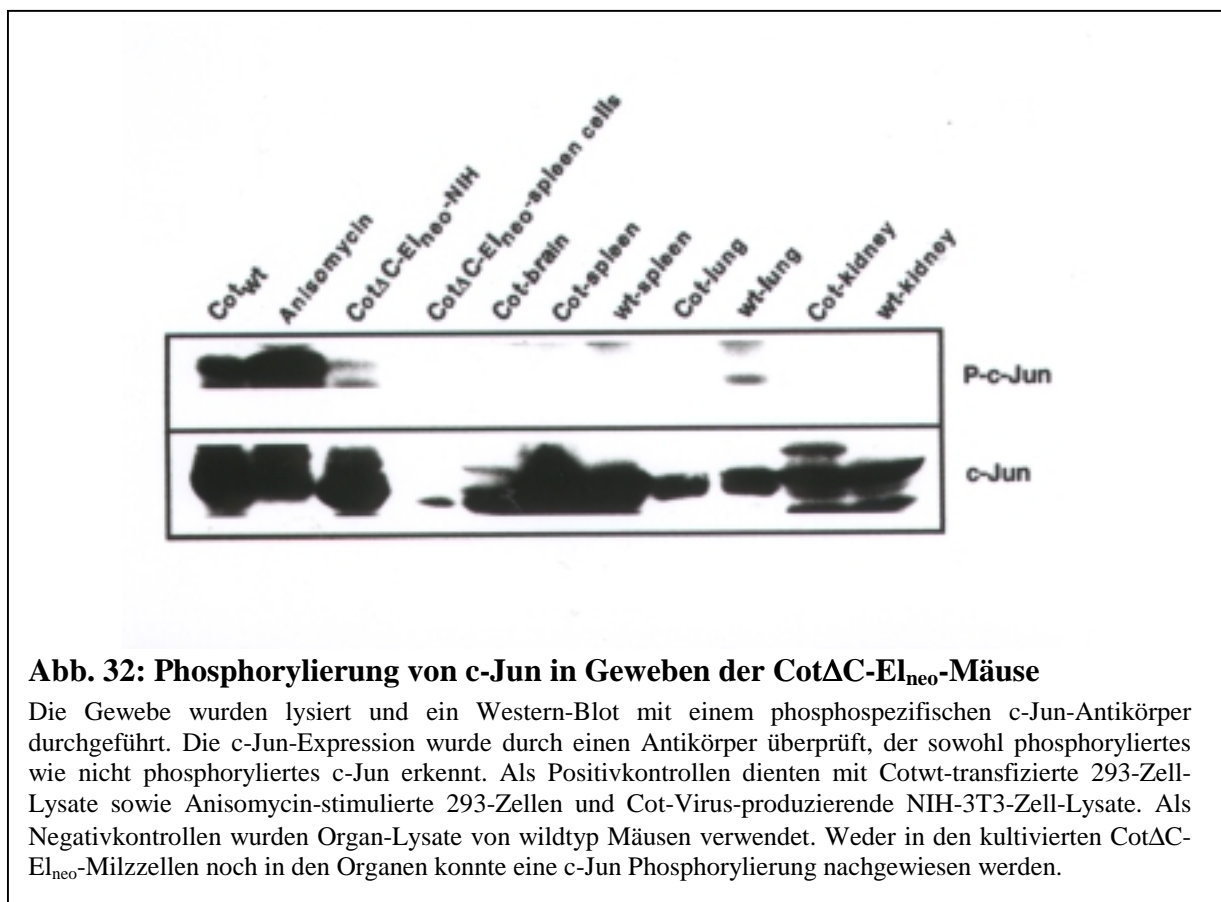


Abb. 32: Phosphorylierung von c-Jun in Geweben der Cot Δ C-El_{neo}-Mäuse

Die Gewebe wurden lysiert und ein Western-Blot mit einem phosphospezifischen c-Jun-Antikörper durchgeführt. Die c-Jun-Expression wurde durch einen Antikörper überprüft, der sowohl phosphoryliertes wie nicht phosphoryliertes c-Jun erkennt. Als Positivkontrollen dienten mit Cotwt-transfizierte 293-Zell-Lysate sowie Anisomycin-stimulierte 293-Zellen und Cot-Virus-produzierende NIH-3T3-Zell-Lysate. Als Negativkontrollen wurden Organ-Lysate von wildtyp Mäusen verwendet. Weder in den kultivierten Cot Δ C-El_{neo}-Milzzellen noch in den Organen konnte eine c-Jun Phosphorylierung nachgewiesen werden.

6.6 Two-Hybrid

Die Analyse der Regulation der Cot Aktivierung und Signalweiterleitung *in vivo* ist durch die Tatsache eingeschränkt, daß Cot alleine durch Überexpression aktiv ist und daß endogenes Protein durch kommerzielle Antikörper nicht detektiert werden kann. Es wurde daher versucht, über die Identifikation und Charakterisierung Cot-interagierender Proteine mit Hilfe des Two-Hybrid Systems, neue Einblicke in diese Prozesse zu gewinnen.

6.6.1 Test der Two-Hybrid Konstrukte auf korrekte Klonierung und Funktionalität im Two-Hybrid Assay

Für die Durchführung von Two-Hybrid Screens und direkten Two-Hybrids Tests wurden verschiedene Two-Hybrid Konstrukte hergestellt (→ 4.3.4.4). Viele dieser Klonierungen wurden mit Hilfe der PCR-Methode durchgeführt, bei deren Verwendung es aufgrund von Fehlern der Taq-Polymerase zur Entstehung ungewünschter Mutationen kommen kann. Daher wurden alle Klonierungsprodukte sequenziert (nicht gezeigt). Die hergestellten Konstrukte wurden auf Expression und korrekte Faltung in direkten Two-Hybrid Tests mit bekannten Interaktionspartnern (MEK-2) getestet. Dabei wurden keine Fehler entdeckt.

6.6.2 Screen einer 14,5 Tage-Mausembryo cDNA-Bibliothek

$0,2 \times 10^6$ Klone einer 14,5 Tage-Mausembryo-cDNA-Bibliothek wurden mit Cot Δ C als Bait gescreent. Von 120 Histidin- und LacZ-positiven Klonen wurden 55 Klone schließlich als wirklich positiv gewertet, weil sowohl der Histidin-, als auch der LacZ-positive Phänotyp abhängig von der Präsenz des Cot Δ C enthaltenden Bait-Plasmids in der Hefezelle war.

Bibliothek	14,5 Tage Mausembryo Cot Δ C	Jurkat	
		1.Cot Δ C	2.Cot Δ C
gescreente Klone	$0,2 \times 10^6$	$0,3 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$
His ⁺	120	71	342
LacZ ⁺	55	19	81
positive Klone	α -Globin β -Globin ϵ -Globin Ran Hsp84 unbekannte Proteine	Mch3 unbekannte Proteine	p105 TFE3 p68

Tabelle 1: Cot Δ C Two-Hybrid Screens

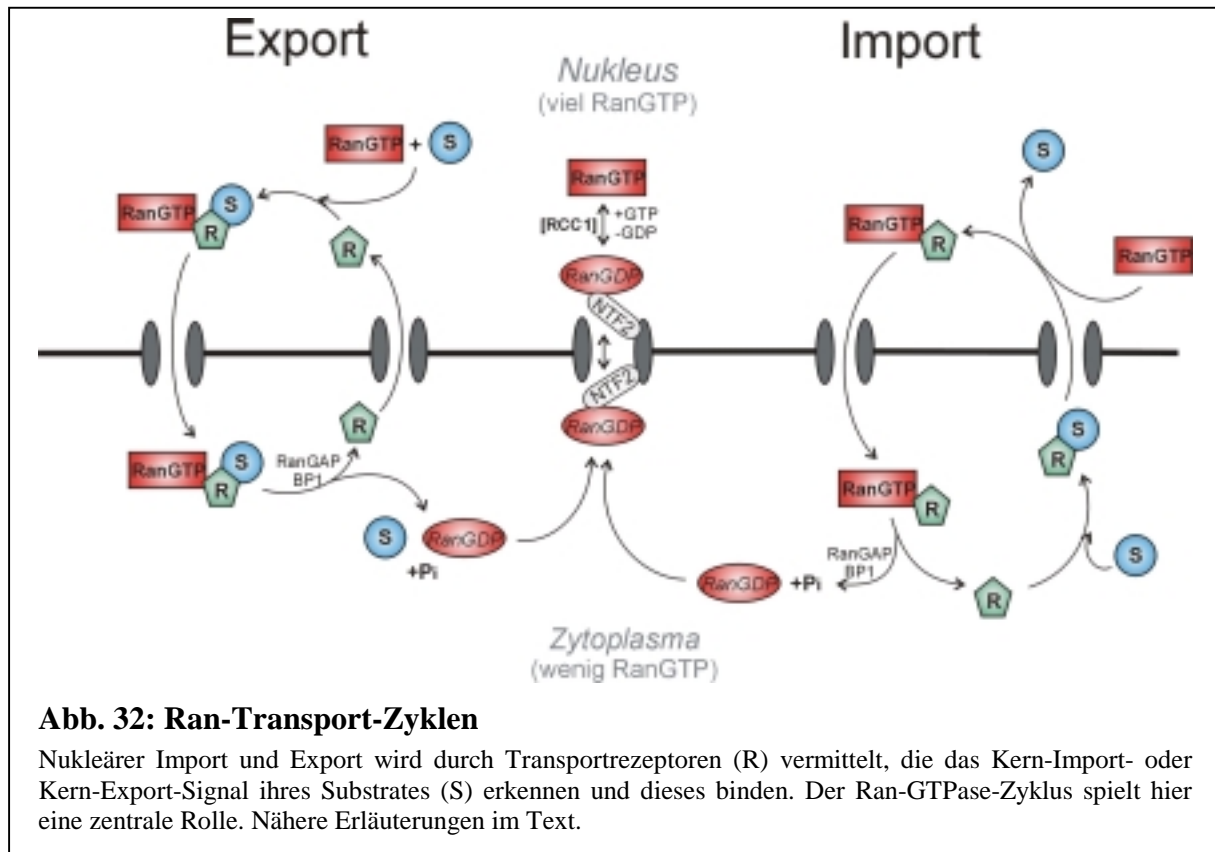
Diese positiven Klone kodierten u.a. α -Globin, β -Globin, ϵ -Globin, Ran, Hsp84 und ein bisher unbekanntes Protein (Tabelle 1).

6.6.2.1 Die kleine GTPase Ran und ihre Funktionen im Kern-Im- und Export

Ran gehört zu der Familie der kleinen GTPasen, zu denen auch Ras zählt. Diese monomeren Guaninnukleotid-Bindeproteine haben eine molekulare Masse zwischen 20 und 25 kDa und unterteilen sich in fünf Unterfamilien: Ras, Rho, ADP-Ribosylierungsfaktoren, Rab und Ran. Ran spielt in dem Protein- und RNA-Transport in und aus dem Nukleus eine zentrale Rolle [76, 163]. Makromoleküle werden von verschiedenen Rezeptoren und Carriern durch Kern-Poren-Komplexe transportiert (NPCs), die durch eine 8-fache Rotationssymmetrie charakterisiert sind. Es wird angenommen, daß sie aus mindestens 50 verschiedenen Proteinen zusammengesetzt sind, die kollektiv Nucleoporine genannt werden und von denen viele noch nicht charakterisiert sind. Nucleoporine sind nicht nur strukturelle Komponenten, sondern dienen auch als Docking- und Interaktionsstellen für Kern-Transportfaktoren. Neben der großen membran-eingebetteten basalen Kernstruktur beinhalten Kern-Poren-Komplexe zytoplasmatische und nukleäre Domänen, die Filamente bilden. Im Zentrum befindet sich der Transportkanal. Eine Bewegung von Makromolekülen durch diesen Kanal findet durch zwei verschiedene Mechanismen statt: passive Diffusion und aktiver Transport. Kleine Proteine diffundieren sehr schnell, während solche, die größer als 50-60 kDa sind, ein Transportsignal beinhalten (NLS/NES), um aktiv transportiert zu werden. Je nach Richtung werden Transportrezeptoren, die die Transportsignale erkennen, Importine oder Exportine genannt. NLS-Rezeptoren sind z.B. Importin α , Importin β und das Ran-GTPase-System, die direkt oder indirekt mit den NPCs interagieren können [76, 163].

Die Schlüsselfunktion von Ran liegt im Zusammen- und Auseinanderbau von Transportkomplexen (Abb. 32). Der Transport ist von dem Ran-GTPase-Zyklus und einer Reihe von Ran-Interaktionsproteinen abhängig. G-Proteine haben reversible Strukturen, abhängig von dem Guaninnukleotid, welches sie gerade gebunden haben. Diese Eigenschaft erlaubt es ihnen, als molekularer Schalter in vielen Signalwegen zu arbeiten. Wie andere Ras-verwandte GTPasen hat Ran nur eine sehr niedrige GTPase-Aktivität und kann GTP nur schlecht hydrolysieren und austauschen. Es benötigt dazu ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP), wodurch Ran durch Katalyse der GTP-Hydrolyse inaktiviert wird und einen GDP-GTP Austauschfaktor (GEF), das die aktive, GTP-gebundene Form von Ran wiederherstellt. Der einzige bisher identifizierte Ran-GEF in Säugern ist RCC1, ein nukleäres, chromatinassoziiertes Protein, das die Konversion von nukleärem GDP-Ran zu GTP-Ran

katalysiert. Ran hat eine 10-fach höhere Affinität für GDP als für GTP. Dadurch, daß GTP im Kern aber in einer 20-30-fach höheren Konzentration verglichen mit GDP vorkommt, wird Ran durchgängig mit GTP beladen.



Das einzige bekannte RanGAP-Protein, RanGAP1, ist im Zytoplasma nahe den NPC-Fibrillen lokalisiert, wo es an RanBP2, einem Nucleoporin der Fibrillen, bindet. RanBP1 bindet GTP-Ran und steigert somit seine Affinität für Ran-GAP1 um ca. das 10-fache. Die Lokalisation von RanGEF im Kern und RanGAP im Zytoplasma sorgt dafür, daß ein Gradient von GDP-Ran im Zytoplasma und GTP-Ran im Kern entsteht und sichert somit einen gerichteten Transport [76, 163].

Importine binden die zu transportierenden Moleküle im Zytoplasma und lassen sie im Kern wieder frei, nachdem der Komplex den NPC passiert hat. Im Austausch für das Substrat bindet RanGTP an das Importin und fördert somit die Dissoziation des Transportkomplexes. Importin wird nun zusammen mit RanGTP zurück in das Zytoplasma befördert, wobei die Umwandlung von GTP in GDP das Importin für einen erneuten Transportzyklus wieder freigibt. Exportine binden ihre Substrate im Kern und bilden dort trimere Komplexe mit RanGTP. Im Zytoplasma fällt der Komplex unter GTP-Verbrauch auseinander. Exportin kann nun wieder in den Kern eintreten [76, 163].

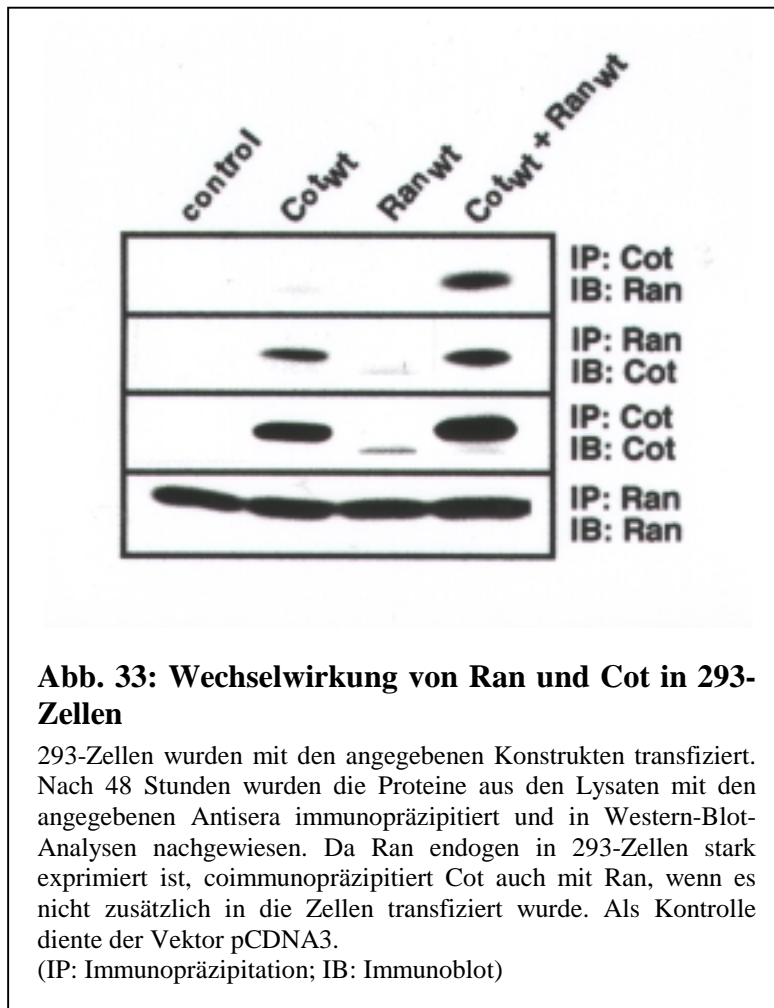
Manche Proteine benötigen für ihren Transport zusätzliche Adaptormoleküle. Importin α bindet sein Substrat mit NLS und bildet mit Importin β im Zytoplasma einen Transportkomplex. Importin β vermittelt den Kontakt mit dem NPC, womit der Komplex in den Kern geschleust wird. Hier bindet nun Ran-GTP an Importin β und induziert eine Dissoziation des Komplexes vom NPC und schließlich eine Dissoziation von Importin α . Importin β /Ran-GTP kann nun den Kern direkt wieder verlassen [76, 163].

Zytoplasmatisches RanGDP wird mit Hilfe des Importrezeptors NTF2 zurück in den Kern "recycled". NTF2 ist durch Interaktion mit Nucleoporinen am NPC lokalisiert und bindet spezifisch RanGDP. Nach der Translokation in den Kern wird Ran mit GTP beladen, wobei die sterische Veränderung, die dieser Austausch mit sich bringt, eine erneute Bindung an NTF2 verhindert. Es handelt sich also um einen irreversiblen Import. Eine Beteiligung von NTF2 an weiteren nukleären Transportwegen wird angenommen, Details sind aber noch nicht bekannt [76, 163].

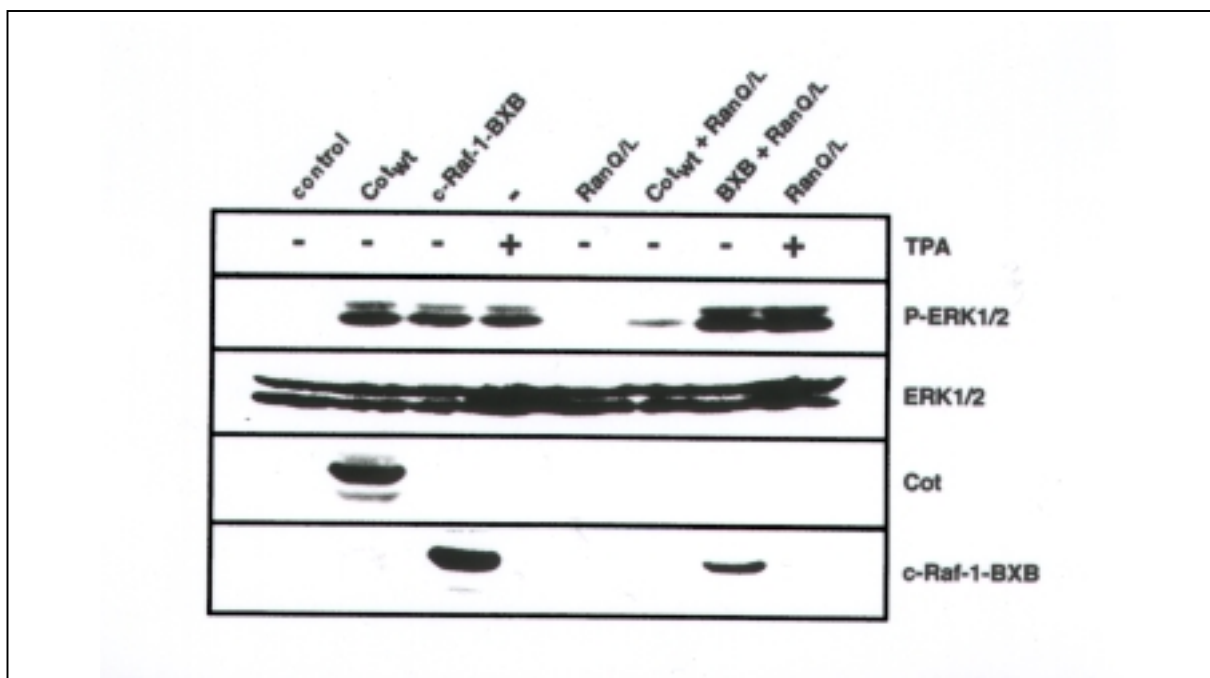
Es existieren Inhibitoren der GDP-Dissoziation (GDI), welche die Aktivität von GTPasen vermindern. Für Ran konnte bisher aber noch kein spezifischer GDI identifiziert werden. Andere Negativregulatoren der Ran-Aktivität sind z.B. Importin β -verwandte Transportrezeptoren, die, an RanGTP gebunden, den Nukleotidaustausch, Ran's intrinsische GTPase und die GTPase-Aktivierung durch RanGAP1 inhibieren. Dieser Komplex aus RanGTP mit Mitgliedern der Importin β -Familie ist kinetisch sehr stabil. RanGTP kann nur mit RanBP1 komplexiert von Importin β dissoziieren und durch RanGAP1 in die GDP-Form konvertieren [76, 163].

6.6.2.2 Untersuchungen zur Ran/Cot-Interaktion in Säugerzellen und Effekte auf die Cot-Aktivität

In dem Two-Hybrid Screen wurde Ran als neuer Interaktionspartner von Cot identifiziert. Um zu klären, ob Ran auch in Säugerzellen mit Cot in Wechselwirkung tritt, wurde Ran zusammen mit Cot in 293-Zellen coexprimiert und auf Komplexbildung in Coimmunopräzipitationsexperimenten untersucht. Wie in Abb. 33 gezeigt wird, kann Cot mit Ran coimmunopräzipitiert werden. Da 293-Zellen eine hohe endogene Ran-Expression aufweisen, konnte selbst ohne Überexpression von Ran eine etwas schwächere Coimmunopräzipitation mit Cot detektiert werden. Im reziproken Fall konnte Ran mit Cot coimmunopräzipitiert werden, abhängig vom Vorhandensein von Cot.

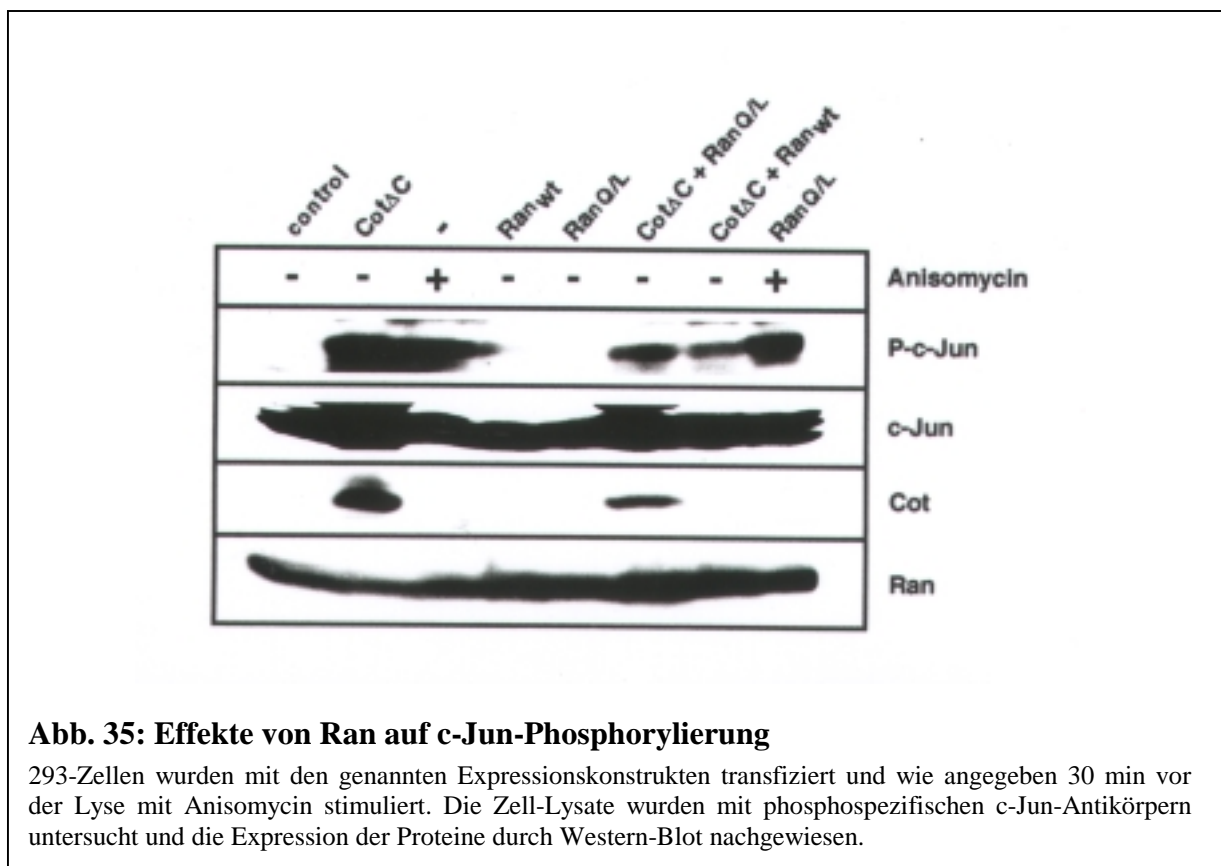


Da Cot eine Serin/Threonin Kinase ist und sowohl im Two-Hybrid Test, wie auch in 293-Zellen *in vitro* mit Ran interagiert, könnte Ran ein Substrat von Cot sein. Um dieses zu überprüfen, wurden Präparationen von Ran aus 293-Zellen in Immunkomplexkinase-Assays eingesetzt. Obwohl das Cot-Substrat MEK in diesen Assays effizient phosphoryliert wurde, konnte keine Phosphorylierung von Ran durch Cot beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

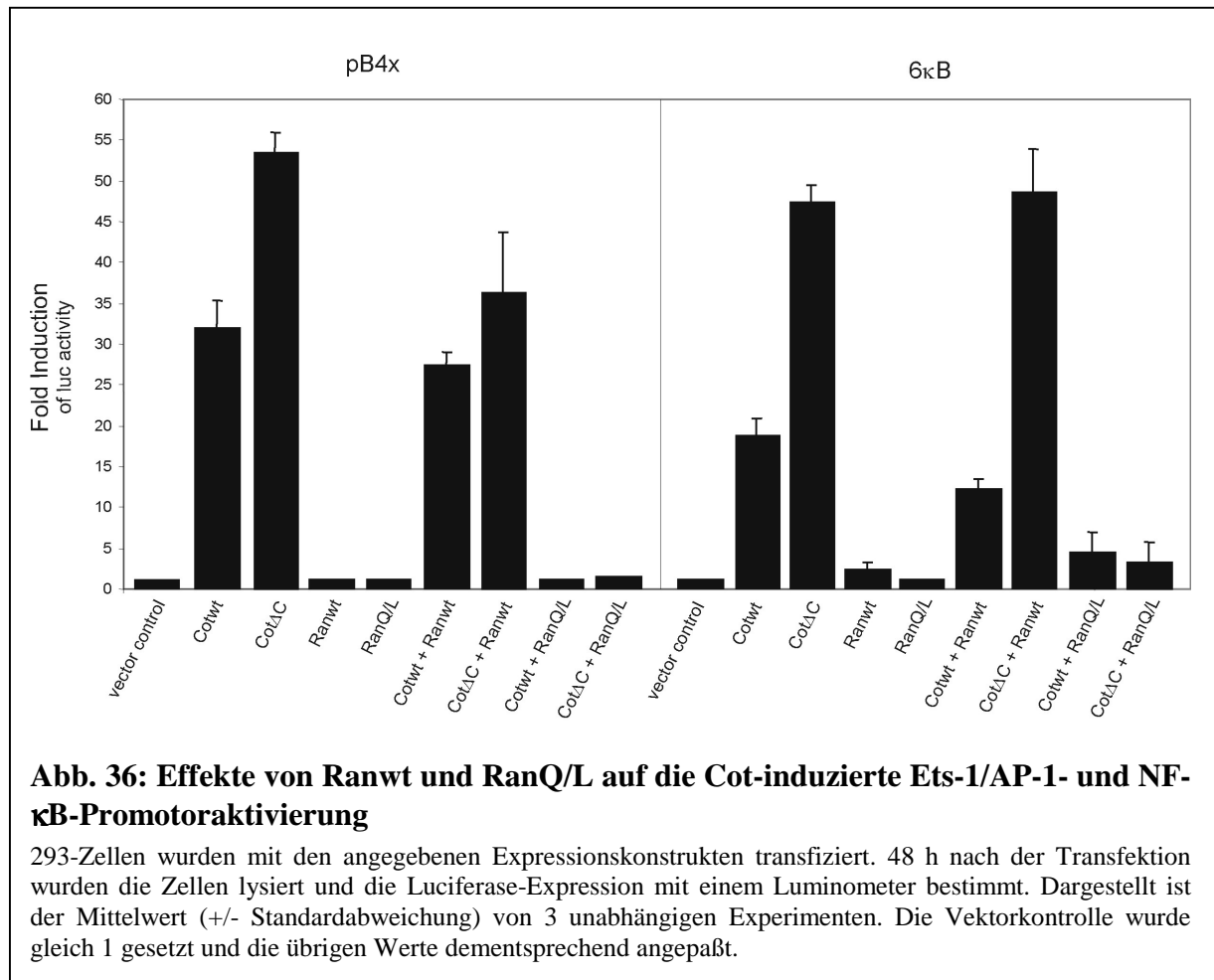


Um die Wechselwirkung der beiden Proteine zu untersuchen, wurden verschiedene Transfektionsexperimente durchgeführt und die Effekte auf die ERK- bzw. cJun-Aktivierung mittels phosphospezifischer Antikörper observiert. Cot oder c-Raf-1-BXB wurden jeweils alleine oder in Kombination mit einer dominant negativen Ran-Mutante (RanQ/L) in 293-Zellen transfiziert. Cot- bzw. BXB-transfizierte Zellen weisen dabei eine verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 auf, wie auch TPA-stimulierte Zellen (Abb. 34). Die dominant negative Ran-Mutante hat keine aktivierenden Effekte auf ERK und inhibiert die Cot-induzierte ERK-Aktivierung, was auf eine Blockierung der Expression von Cot zurückzuführen ist. Auch die BXB-Expression wird durch RanQ/L leicht verringert, aber nicht komplett unterbunden. Die TPA-induzierte Aktivierung der klassischen zytoplasmatischen Kaskade scheint von der dominant negativen Ran-Mutante unbeeinflusst zu bleiben.

Ähnliche Ergebnisse zeigten Coexpressionsexperimente in 293-Zellen, in denen der Effekt von Ran auf Cot-induzierte Jun-Phosphorylierung untersucht wurde (Abb. 35). Die dominant negative Ran-Mutante inhibierte die Cot-vermittelte c-Jun-Phosphorylierung, da die Cot-Expression unterbunden wurde, während RanQ/L auf die Anisomycin-stimulierte c-Jun-Phosphorylierung keinen Einfluß nahm. Ranwt hat weder inhibitorische noch eine stimulierende Wirkung auf die Cot-Signalweiterleitung.



Diese Untersuchungen zeigen, daß der experimentelle Ansatz der Coexpression zur Untersuchung von Ran-Effekten auf Cot-induzierte Signalwege ungeeignet ist. Daher werden in Zukunft alternative Versuchsansätze Verwendung finden wie z.B. Mikroinjektionen mit gereinigten Proteinen.



Reportergen-Assays zeigten ähnliche Effekte von RanQ/L auf Cot und sind wahrscheinlich wegen der Blockade der Cot-Expression nicht aussagekräftig. Sowohl das Reportergenkonstrukt pB4x als auch 6κB, das NF-κB-spezifische Promotoren beinhaltet (→ 6.6.3.3), wurden zusammen mit Cot und Ran coexprimiert. Die dominant negative Mutante von Ran inhibierte die Cot-induzierte Promotoraktivierung vollständig (Abb. 36). Eine Coexpression von wildtyp Ran hatte keinen signifikanten Einfluß auf Cot und seine Signalweiterleitung.

6.6.2.3 Das Hitzeschockprotein Hsp84

Neben Ran wurde Hsp84 als weiteres Cot-bindendes Protein in dem Two-Hybrid Screen gefunden. Es handelt sich hierbei um ein Hitzeschockprotein, das zur Hsp90 Familie gehört. Diese hochkonservierten Streß-Proteine werden in allen eukaryotischen Zellen exprimiert und sind vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Hsp90 Familienmitglieder stellen die Basis eines molekularen „Chaperone-Systems“ dar (bestehend aus Hsp90-Dimeren, hsp70, p23, p60 u.a.) und sind bei einer Reihe von Proteinen für die Faltung notwendig. Unter Streß-Bedingungen haben Hsp90-Proteine zusätzlich die Aufgabe der Renaturierung von geschädigten Proteinen [184, 66].

Eine Assoziation zwischen Substrat und Hsp90 ist sowohl für die Proteinstabilität wie auch für die Lokalisation in der Zelle wichtig. Viele Signaltransduktionsmoleküle nutzen die Interaktion mit Hsp90 als eine essentielle Komponente der Signalweiterleitung. Eine Herbimycin A-induzierte Degradation der Hitzeschockproteine resultiert ebenfalls in einem Abbau der assoziierten Proteine. c-Raf-1 assoziiert mit seiner C-terminalen katalytischen Domäne mit dem Hsp90-Chaperone-System. Diese Interaktion könnte neben der Stabilisierung des Proteins sowohl für die Translokation von c-Raf-1 zur Plasmamembran wichtig sein, als auch die Effektivität der Raf-Signaltransduktion erheblich verstärken [216].

Es wurden verschiedene Coimmunopräzipitationsexperimente durchgeführt, in denen versucht wurde, Cot mit endogenem Hsp90 cozupräzipitieren. Da auch eine Copräzipitation von Hsp90 mit dem bekannten Interaktionspartner c-Raf-1 scheiterte, ist anzunehmen, daß die Antikörper für derartige Experimente nicht geeignet waren, da sie entweder nicht empfindlich genug waren oder mit der Bindedomäne der Proteine interagieren, so daß eine Assoziation sterisch verhindert wird. Weitere Experimente sind nötig, um die Cot-Hsp84 Interaktion im Detail zu charakterisieren.

6.6.3 Screen einer Jurkat T-Zell-Bibliothek

Da für Tpl-2, dem Rattenhomolog von Cot, eine Funktion in T-Zellen beschrieben wurde (→ 3.2), wurde zusätzlich zu der bereits beschriebenen c-DNA-Bibliothek eine T-Zell-Bibliothek gescreent. Hierbei handelt es sich um eine kommerzielle Two-Hybrid-Bibliothek, die mit den pPC-Plasmiden nicht kompatibel ist. Die kommerziellen Vektoren weisen im Vergleich zu den vorher verwendeten pPC-Plasmiden eine umgekehrte Anordnung der Selektionsmarker auf, so daß das Bait-Plasmid den Tryptophanmarker trägt und der Prey-

Vektor den Leucinmarker. Bei einer Kombination beider Systeme würden daher Bait und Prey den gleichen Selektionsmarker aufweisen. Hinzu kommt, daß es sich um 2 μ -Plasmide handelt, die in jeder Hefezelle in einer Vielzahl von Kopien vorliegen. Im Gegensatz dazu verwendet das pPC-System centromere Plasmide, die pro Zelle nur einmal repliziert und gleichmäßig auf Mutter- und Tochterzelle aufgeteilt werden. Da viele pPC-Konstrukte teilweise über aufwendige Klonierungsstrategien hergestellt wurden (\rightarrow 4.3.4.4) und durch unterschiedliche Polylinker in beiden Systemen eine Umklonierung in kommerzielle Vektoren des Systems mit sehr viel Aufwand verbunden gewesen wäre, wurde der Vektor pPCH-1 verwendet, in dem die Selektionsmarker im Vergleich zu den pPC-Vektoren ausgetauscht worden war [83]. Weil der pPC97-Polylinker erhalten blieb, war es einfach, die bereits vorhandenen pPC97 und pPC86 Konstrukte umzuklonieren.

Der Screen einer Jurkat T-Zell-Bibliothek wurde zweimal mit Cot Δ C als Bait durchgeführt. Es wurden 71 bzw. 342 Histidin- und LacZ-positive Klone isoliert, von denen sich 19 bzw. 81 als wirklich positiv herausstellten. Unter diesen positiven Klonen waren Mch3 (mCaspase 7), p105 und verschiedene bis jetzt unbekannte Proteine. Die Auswertung aller positiven Klone ist noch nicht abgeschlossen.

6.6.3.1 Maus-Caspase 7 (Mch3)

Caspase 7 gehört zu der Protease-Familie der Caspasen, die in 3 Unterfamilien unterteilt werden: Die ICE-ähnlichen Caspasen, zu denen Caspase-1, -11 und -12 zählen, die ICH-ähnlichen mit Caspase-2 als Mitglied und die CPP32-ähnlichen Caspasen, die Caspase-3, -6 und -7 beinhalten. Caspasen spielen eine wichtige Rolle im Prozeß der Apoptose [206]. Verschiedene zelluläre Proteine wurden als Substrate für Caspasen identifiziert, wie z.B. nukleäre Lamine, zytoskeletale Komponenten, Proteine, die in der DNA-Reparatur oder RNA-Processing involviert sind oder auch Komponenten von Signaltransduktionswegen [28].

Caspasen werden als inaktive Vorläufermoleküle synthetisiert und durch proteolytische Spaltung aktiviert [207]. Ein Mechanismus der Aktivierung besteht aus der Rekrutierung von Caspase-8 zu einem aktivierten Zytokin-Rezeptor, welches zur proteolytischen Aktivierung der Caspase führt. Caspase-8 induziert dann die Caspase Kaskade, was z.B. die Aktivierung der Caspasen-3, -6 und -7 nach sich zieht [28].

Caspase-3 und -7 können auch durch einige humane IAP (inhibitor of apoptosis) Familienmitglieder inhibiert werden. [51, 202, 52, 58]. Der exakte Mechanismus der selektiven Blockierung ist noch nicht im Detail geklärt.

Wie unter 6.3 gezeigt, spielt Cot ebenfalls eine Rolle beim programmierten Zelltod. In Experimenten mit 32D-Zellen konnte für Cot eine antiapoptotische Wirkung nachgewiesen werden. Es erscheint möglich, daß die Bindung von Caspase-7 an Cot diese inaktiviert oder umgekehrt Caspase-7 ein Substrat der Serin/Threonin Kinase ist, womit die Caspase-Kaskade unterbrochen wird. Eine Zusammenarbeit mit IAP-Proteinen ist ebenfalls denkbar, da diese Apoptoseinhibitoren in Zellen teilweise ähnliche Effekte wie Cot hervorrufen, z.B. Differenzierung von PC-12 Zellen und Schutz vor Apoptose [90]. Die Untersuchungen zur Interaktion zwischen Cot und Caspase-7 stehen noch am Anfang.

6.6.3.2. Der Rel/NF- κ B Signalweg

In dem Two-Hybrid Screen der Jurkat-Bibliothek wurde p105 als neuer Bindepartner von Cot Δ C gefunden. Dabei handelt es sich um ein Vorläuferprotein von NF- κ B1, daß in dieser Form eine I κ B-ähnliche Funktion besitzt.

Rel/NF- κ B-Transkriptionsfaktoren umfassen eine Gruppe von Proteinen, die viele wichtige physiologische Aspekte kontrollieren. Ihr Wirkspektrum reicht von Entscheidungen, die Entwicklung und Differenzierung betreffen, über Proliferation, Krebs, Apoptose und Expression bestimmter viraler Gene bis hin zur Aktivierung der inflammatorischen und angeborenen Immunantwort [12]. Rel/NF- κ B-Proteine (p50/p105, p52/p100, p65/RelA, RelB, c-Rel (Dorsal, Dif und Relish bei Drosophila)) teilen eine hochkonservierte Rel-Homologie (RH) Domäne [13]. Diese Domäne hat mehrere Funktionen. Sie ist die Dimerisierungs- und DNA-Bindedomäne für diese Klasse von Proteinen, beinhaltet die Kern-Lokalisations-Sequenz (NLS) und spielt in der Regulation der Proteine eine wichtige Rolle, da sie ebenfalls für NF- κ B-Inhibitoren (I κ B) eine Bindedomäne darstellt. Basierend auf Sequenzen, die C-terminal von der Rel-Homologie Domäne liegen, können Rel/NF- κ B-Transkriptionsfaktoren in zwei Klassen unterteilt werden. Zu der ersten Klasse gehören p105 und p100. Sie haben eine lange C-terminale Domäne mit vielen Ankyrin-Wiederholungssequenzen gemeinsam, die die Proteine inhibieren. Sie werden erst durch limitierte Proteolyse oder verkürzte Translation aktiviert, so daß aus p105 p50 und aus p100 p52 wird. Die zweite Klasse beinhaltet c-Rel, RelB sowie RelA (p65) und weist eine C-terminale Aktivierungsdomäne auf. Alle Rel-

Proteine von Vertebraten können sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden. Eine Ausnahme stellt dabei RelB dar, welches nur Heterodimere bilden kann. Diese kombinatorische Diversität trägt zur Regulation verschiedenster Gene (über 150 [176]) bei, in denen die individuellen Dimere bestimmte DNA-Bindesepezifitäten haben. NF- κ B besteht meistens aus p50-RelA-Heterodimeren [74].

Die Aktivität von NF- κ B ist durch die Interaktion mit inhibitorischen I κ B-Proteinen reguliert (Abb. 37) [74, 121]. I κ B-Proteine (I κ B α , - β , - γ , - δ , - ϵ , Bcl-3) gehören zu einer kleinen Familie von nahe verwandten Proteinen mit einem Kern aus 6 oder mehr Ankyrin-Wiederholungssequenzen, einer N-terminalen regulatorischen Domäne und einer C-terminalen Domäne, die ein PEST-Motiv beinhaltet [72].

Es gibt verschiedene I κ B-Proteine mit verschiedenen Affinitäten für individuelle Rel/NF- κ B-Komplexe. Die am besten untersuchte NF- κ B/I κ B-Interaktion ist die von I κ B α mit NF- κ B. Diese Interaktion blockiert zum einen die Funktion der Kernlokalisationssequenz (NLS), so daß Rel-I κ B latent inaktiv im Zytoplasma gefangen ist, zum anderen werden die Sequenzen bedeckt, die für die DNA-Bindung wichtig sind. Das Schlüsselereignis der Kontrolle der NF- κ B-Aktivität ist die Regulation der I κ B/NF- κ B-Interaktion. Alle Signale, die zur NF- κ B-Aktivierung führen (Phorbolester, proinflammatorische Zytokine TNF α und IL-1, bestimmte Viren, Bakterien, bakterielle Produkte u.v.a. [176]), rufen eine Zerstörung des Komplexes hervor, indem eine Serin-spezifische I κ B-Kinase (IKK) aktiviert wird, was zur Phosphorylierung von zwei spezifischen Serinresten in der Nähe des N-Terminus von I κ B α führt. Diese Phosphorylierung ruft I κ B α -Ubiquitinierung hervor. Schließlich wird es durch 26S Proteasomen degradiert [5, 56, 94]. Das "unmaskierte" NF- κ B kann in den Kern transportiert werden und die Ziel-Gen-Expression induzieren.

Da I κ B α sowohl eine NLS als auch eine Kern-Export-Sequenz (NES) enthält, kann durch neusynthetisiertes I κ B α , dessen Expression durch aktives NF- κ B angeregt wird, das NF- κ B Signal unterbrochen werden (Negativer Feedback Loop). I κ B α gelangt in den Kern, entfernt die NF- κ B-Dimere von der DNA und ruft einen Exportin-vermittelten Export ins Zytoplasma hervor (Abb. 37) [263].

IKK ist ein Proteinkomplex aus drei assoziierten Polypeptiden mit einer Größe von 700-900 kDa [121, 259, 150]. IKK kommt vorwiegend als IKK α -IKK β Heterodimer vor, das entweder mit einem IKK γ -Dimer oder -Trimer assoziiert ist. IKK α und IKK β haben eine ähnliche Primärstruktur, beinhalten eine N-terminale Kinasedomäne, im C-terminalen Teil

einen Leucin-Zipper- und ein Helix-loop-Helix-Motiv [55, 41, 265, 264]. IKK γ (auch NEMO oder IKKAP genannt) weist drei große α -helikale Regionen und ein Leucin-Zipper-Motiv auf und dient als regulatorische Untereinheit [259, 159].

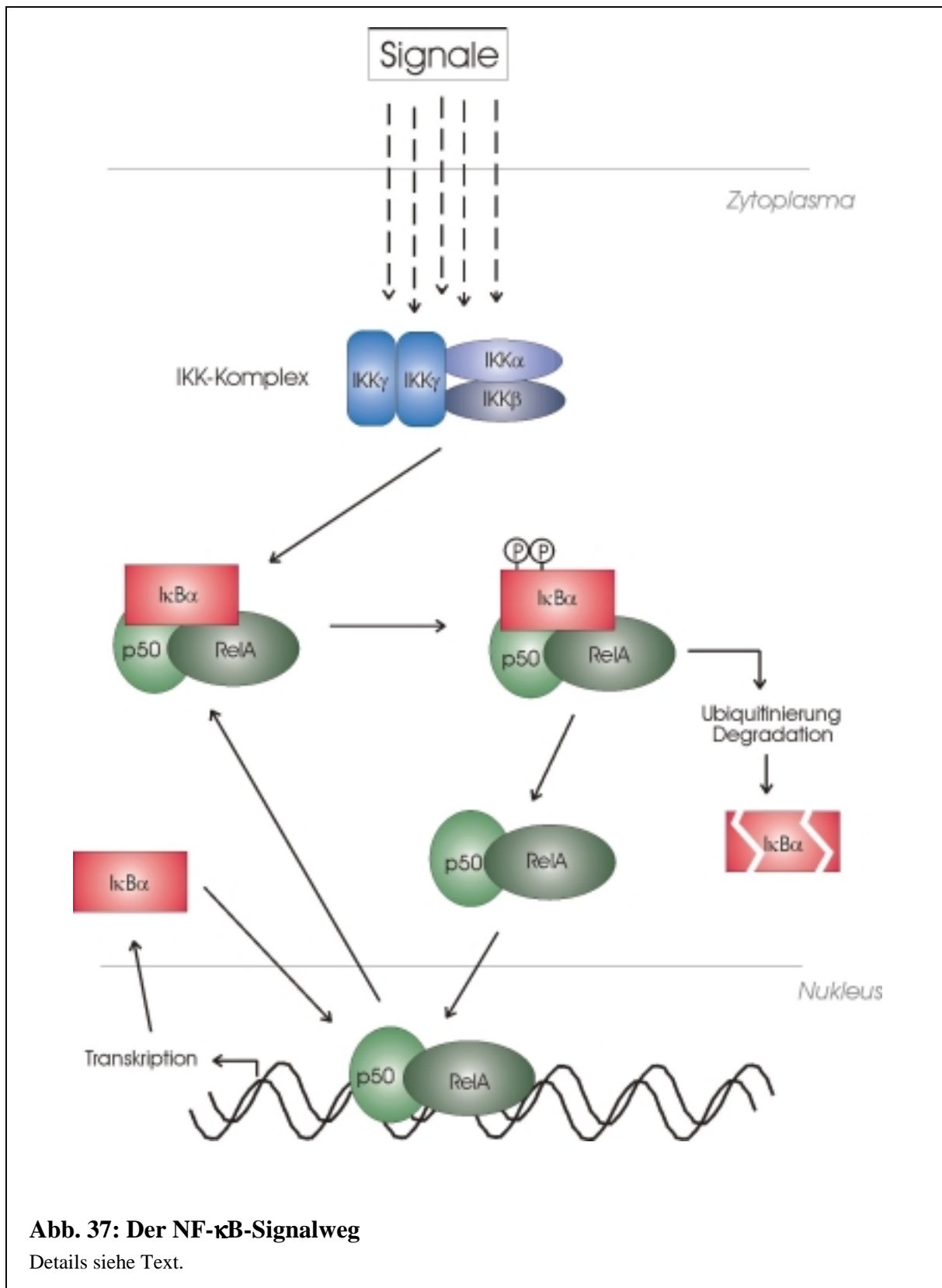


Abb. 37: Der NF- κ B-Signalweg

Details siehe Text.

Als viertes Protein in diesem Komplex wurde IKAP (IKK complex-associated protein) identifiziert [41]. IKAP scheint in der Aktivierung von IKK involviert zu sein, seine physiologische Signifikanz und Funktion ist aber noch weitgehend unerforscht. MEKK-1 [98, 139] und NIK (NF- κ B inducing kinase) [196] wurden als potentielle Aktivatoren von IKK und NF- κ B identifiziert. Die Rolle von MEKK1 und NIK im NF- κ B-Signalweg ist aber noch nicht bis ins Detail geklärt.

Die Kinaseaktivität von IKK α und IKK β und ihre Fähigkeit, aktiviert zu werden, ist von ihrer Leucin-Zipper-vermittelten Dimerisierung abhängig. IKK β dient als Ziel für stromaufwärtsliegende Kinasen und wird an spezifischen Serinresten, die im Aktivierungs-Loop von IKK β liegen, phosphoryliert [47]. Die C-terminale Region von IKK γ ist für die Rekrutierung derartiger stromaufwärts liegender Aktivatoren verantwortlich. IKK α wird ebenfalls phosphoryliert, dieses trägt aber nicht zur Stimulation der I κ B-Kinase-Aktivierung bei [47]. Durch Trans-Phosphorylierungen kann IKK β andere Untereinheiten, also IKK α oder IKK β , oder andere inaktive IKK-Komplexe durch intermolekulare Reaktionen phosphorylieren und somit das ursprüngliche Signal amplifizieren.

Phosphorylierung kann auch in einer Negativregulation der IKK-Aktivität resultieren. Durch die Autokinaseaktivität von IKK β werden weitere Serinreste zwischen dem Helix-Loop-Helix-Motiv und dem C-Terminus phosphoryliert, womit die Kinaseaktivität herunterreguliert wird [47].

Wie bereits beschrieben, findet die Regulation von NF- κ B auf verschiedenen Ebenen des Signalweges statt. Mittlerweile wurden sehr viele NF- κ B-Inhibitoren, z.B. anti-inflammatorischen oder immunsuppressiven Substanzen, identifiziert, wobei der Wirkungsmechanismus zum Teil noch nicht bekannt ist. Derartige Inhibitoren greifen bei der NF- κ B-Dimerisierung, der I κ B-Degradation, der DNA-Bindung, der Interaktion mit transkriptionellen Koaktivatoren oder an der basalen Transkriptionsmaschinerie ein [59].

6.6.3.3 Interaktions- und Aktivierungsstudien der Bindung zwischen NF- κ B1-p105 und Cot

In dem Two-Hybrid Screen einer Jurkat-Library wurde das Vorläuferprotein von NF- κ B, p105, als neuer Bindepartner von Cot Δ C gefunden. Durch proteasomale Abspaltung des carboxyterminalen Teiles von p105 entsteht p50, das als Homo- oder Heterodimer in den Kern wandern kann und dort die Transkription verschiedener Zielgene kontrolliert. Das p105-

Vorläuferprotein funktioniert als NF- κ B-Inhibitor. Es assoziiert im Zytoplasma carboxyterminal mit p50, c-Rel und Rel A und verhindert durch Maskierung des NLS-Signals die Kerntranslokation und Aktivität der Proteine.

Mit Hilfe von Reporter-Gen-Assays wurden erste Aktivierungsstudien durchgeführt. Hierfür wurde das Reporter-Gen 6 κ B verwendet, das NF- κ B-spezifische Bindemotive im Promotor aufweist [89]. Cotransfektion des Reporter-Genes zusammen mit onkogenem *cot* führte zu einer knapp 20-fachen Steigerung der NF- κ B-vermittelten Luciferase-Aktivität (Abb. 38).

Cot aktiviert somit den NF- κ B-Signalweg. Die inhibitorischen I κ B-Proteine regulieren durch Interaktion mit NF- κ B dessen Aktivität und verhindern eine Translokation von NF- κ B in den Kern. I κ B inhibiert auch die Cot-abhängige NF- κ B-Aktivierung (Abb. 38), was darauf hindeutet, daß auch diese NF- κ B-Aktivierung von IKK und I κ B kontrolliert wird.

Da Cot nicht nur die klassische Kinasekaskade aktiviert, sondern ebenfalls eine JNK-Aktivierung hervorruft, sollte untersucht werden, ob die Cot-abhängige NF- κ B-Aktivierung direkt vermittelt wird, oder ähnlich wie bei c-Raf-1 [234] über die Rekrutierung von autokrinen Signalwegen läuft, die auch zur JNK-Aktivierung führen [157]. Die c-Raf-1 vermittelte NF- κ B-Aktivierung kann z.B. durch Cotransfektion eines dominant negativen EGF-R blockiert werden, genauso wie eine dominant negative SEK-Mutante die NF- κ B-Aktivität reduziert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die c-Raf-1-induzierte NF- κ B-Aktivierung nicht direkt, sondern indirekt erfolgt [234].

Cotransfektionen des dominant negativen EGF-R (EGFR⁻) mit Cot und 6 κ B resultierten ebenfalls in einer Blockade der Cot-induzierten NF- κ B-Aktivität. Die dominant negative ERK3-Mutante hat ebenfalls einen blockierenden Einfluß auf die Cot-Aktivität und inhibiert die NF- κ B-induzierte Luciferase-Aktivität (Abb. 38). Diese Daten zeigen, daß sowohl die klassische Kinasekaskade als auch ein nach Aktivierung von ERK durch einen autokrinen Loop aktivierter Signalweg an der NF- κ B-Aktivierung durch Cot beteiligt ist. Außerdem kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, daß Cot oberhalb der I κ B α -Kinase fungiert bzw. Cot in seiner NF- κ B-Aktivierung von I κ B α abhängig ist.

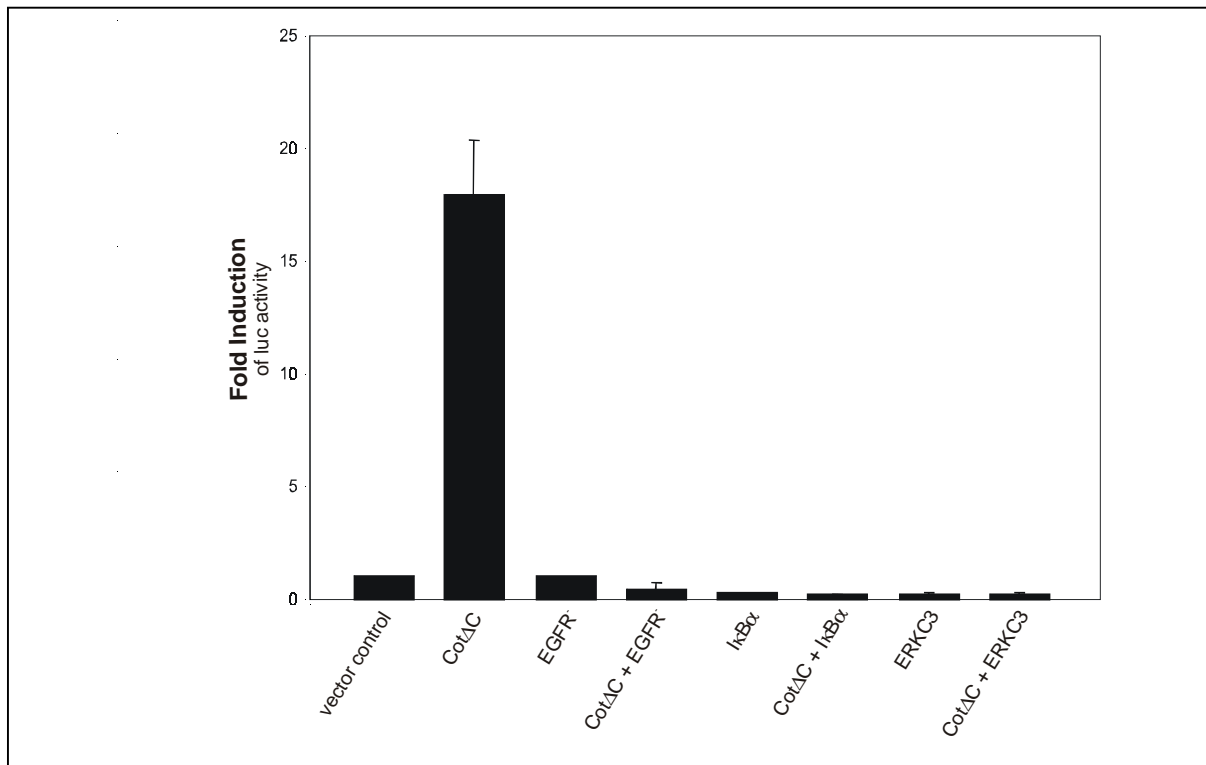


Abb. 38: Effekte von EGFR, I κ B α und ERK3 auf die Cot-induzierte NF- κ B-Promotoraktivierung

293-Zellen wurden mit den angegebenen Expressionskonstrukten transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Expression mit einem Luminometer bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert (+/- Standardabweichung) von 3 unabhängigen Experimenten. Die Vektorkontrolle wurde gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte dementsprechend angepaßt.

Während die bisher beschriebenen Daten einen indirekten Mechanismus der NF- κ B-Aktivierung durch Cot vorschlagen, läßt es die im Two-Hybrid Screen gefundene Interaktion von Cot mit p105 wahrscheinlich erscheinen, daß auch noch eine andere Ebene der Cot-vermittelten Regulation der NF- κ B Aktivierung besteht. Diese Vermutung wird auch durch weitere Coimmunopräzipitationsexperimente bestätigt. Abbildung 39 zeigt, daß in 293-Zellen überexprimiertes Cot und I κ B α copräzipitieren. Es konnte ebenfalls in Cotransfektionsexperimenten gezeigt werden, daß Cot mit IKK α interagiert (Abb. 40). Aus diesen Ergebnissen kann vermutet werden, daß Cot wahrscheinlich zusammen mit NF- κ B und seinen anderen Interaktionspartnern in einem großen, zytoplasmatischen Komplex vorliegt.

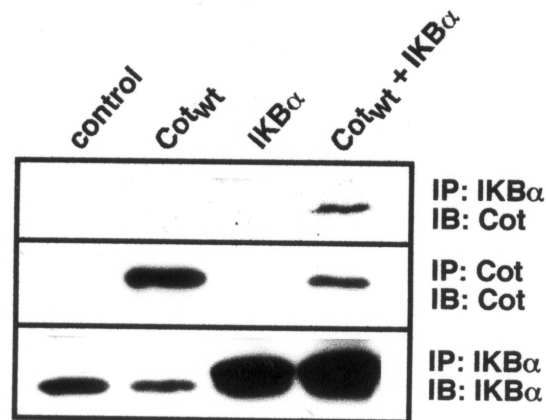


Abb. 39: Wechselwirkung von Cot und IκBα in 293-Zellen

293-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Proteine aus den Lysaten mit den angegebenen Antisera immunopräzipitiert und in Western-Blot-Analysen nachgewiesen. Die Cot-Coimmunopräzipitation in IκBα-Präzipitaten konnte nicht nachgewiesen werden, da die Cot-Bande durch die schwere Kette des Immunglobulins überlagert wurde.

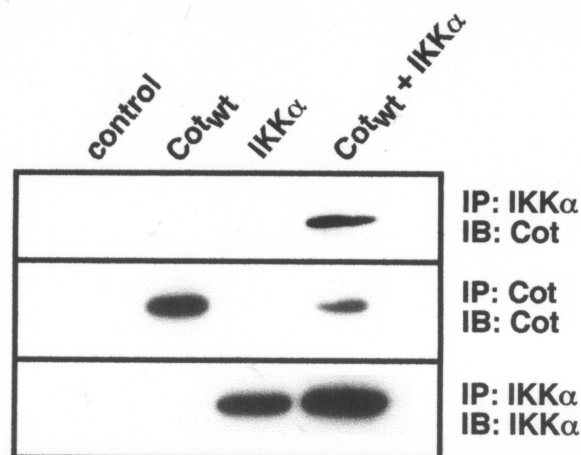


Abb. 40: Wechselwirkung von Cot und IKKα

293-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Proteine aus den Lysaten mit den angegebenen Antisera immunopräzipitiert und in Western-Blot-Analysen nachgewiesen. Die Cot-Coimmunopräzipitation in IKKα-Präzipitaten konnte nicht nachgewiesen werden, da die Cot-Bande durch die schwere Kette des Immunglobulins überlagert wurde.