

7. DISKUSSION

7.1 Die Rolle von Cot in verschiedenen Signaltransduktionskaskaden

Eine rasch ansteigende Zahl von Kinasen ist in die Aktivierung von MAPK involviert [199]. Die meisten onkogenen Proteinkinasen sind Aktivatoren der klassischen Kinasekaskade [91, 190, 189]. Die beiden nicht miteinander verwandten Kinasen c-Raf-1 und Mos z.B. phosphorylieren und aktivieren MEK, was zur zellulären Transformation und Differenzierung führen kann [190, 233, 254]. c-Raf-1 wurde als erster MEK-Aktivator identifiziert, und es ist bisher nicht bekannt, daß c-Raf-1 noch andere Kinasen neben MEK1 und 2 aktiviert [192, 190, 193, 220]. Es können aber auch andere Modulatoren der MEK-Aktivität wirksam werden. MEKK-1 wurde als eine Kinase identifiziert, die MEK *in vitro* phosphorylieren kann, den JNK-Signalweg über SEK aber sehr viel stärker aktiviert. Diese Kinase kann keine Zellen transformieren und die Aktivierung von SAPK durch MEKK-1 inhibiert sogar das Wachstum von NIH3T3-Zellen [160, 260]. MLK-3, MEKK2 und MEKK3 können ebenfalls ihre Signale sowohl zu JNK als auch zu ERK weiterleiten [199]. Diese Verknüpfung unterschiedlicher Signalwege trägt zur großen Vielfalt fein abgestimmter zellulärer Reaktionen bei. Von einigen Signalmolekülen wurde bis jetzt nur *in vitro* gezeigt, daß sie mehrere Signalwege beeinflussen können, andere ziehen *in vivo* einen Effektorweg vor und haben kaum Wirkung auf den anderen. Über die Kontrolle dieser „multitalentierten“ Modulatoren bzw. unter welchen Umständen welcher Signalweg beeinflusst wird, ist noch nicht viel bekannt. Einige dieser MEK-Modulatoren scheinen gewebespezifisch zu sein. So ist z.B. Mos der Schlüsselregulator der Meiose in Keimbahnzellen [251].

In der vorliegenden Arbeit werden Daten präsentiert, die zeigen, daß die humane Serin/Threonin Kinase Cot zwei verschiedene Signaltransduktionskaskaden aktiviert. Zum einen ist Cot in der klassischen zytoplasmatischen Kinasekaskade involviert, was zur Aktivierung von ERK1/2 führt, zum anderen stimuliert sie die Streß-Kinasekaskade mit dem Ergebnis einer JNK-Aktivierung. Cot phosphoryliert und aktiviert MEK-1 und SEK-1. Eine Überexpression von Cot zeigt keinen Effekt auf die Aktivierung der zweiten streßinduzierten Kinasekaskade, dem p38-Signalweg. Übereinstimmend mit der Wirkung von Cot auf ERK und JNK konnte mittels Reporterassays gezeigt werden, daß Cot Ap-1- und Ets-kontrollierte Promotoren aktiviert.

Der Verwandtschaftsgrad zwischen Kinasen ist ein guter Indikator für gemeinsame Charakteristika, die Kinasen häufig mit verschiedenen Mitgliedern der Familie teilen. Zum Beispiel kann man bei einem neu identifizierten Familienmitglied durch Vergleich mit bereits gut charakterisierten erste Schlüsse auf Funktion, Regulation und Substratspezifitäten ziehen. Einige Proteinkinasen lassen sich aber nicht den Hauptgruppen unterschiedlicher Kinasefamilien zuordnen. Auch Cot scheint keiner definierten Gruppe anzugehören. Trotzdem weist seine Kinasedomäne hohe Homologien zu verschiedenen MKKK auf (→ 3.2). Diese phylogenetischen Sequenzvergleiche weisen bereits daraufhin, daß Cot als MKKK Einfluß auf Signaltransduktionswege nehmen könnte, was in dieser Arbeit bestätigt wurde.

Die hier erbrachten Ergebnisse zeigen, daß unter Überexpressionsbedingungen Cot durch Phosphorylierung und Aktivierung von MEK und SEK *in vitro* zwei Signalwege beeinflussen kann. Dieses Ergebnis wurde durch die Verwendung von phosphospezifischen Antikörpern *in vivo* untermauert. Für c-Raf-1 wurde gezeigt, daß die Aktivierung von JNK auch indirekt durch Induktion autokriner Faktoren über die mitogene Kinasekaskade erfolgen kann. Die Expression einer Estradiol-abhängigen Form von c-Raf-1 in NIH3T3-Zellen zieht eine konstitutive Aktivierung des ERK- wie auch des SAPK-Signalweges nach sich. JNK-Aktivierung tritt aber erst 16-24 Stunden nach der Aktivierung von c-Raf-1 auf und ist von einer Neusynthese von Proteinen abhängig [160]. Es wird angenommen, daß diese verzögerte JNK-Aktivierung durch einen c-Raf-1 induzierten autokrinen Loop, der HB-EGF-Expression einschließt, verursacht wird, und nicht durch eine direkte gegenseitige Beeinflussung der beiden Signalwege [157, 125]. Unsere Untersuchungen können nicht ausschließen, daß die Cot-induzierte Aktivierung von SAPK auch durch einen autokrinen Loop verursacht wird. Dies könnte auch eine mögliche Erklärung für die beobachtete Ras-Abhängigkeit der ERK- und der Reporterogenaktivierung sein. Der Zeitverlauf zwischen Cot-induzierter ERK- und JNK-Aktivierung wird noch weiter untersucht.

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit auf dem Aminosäurelevel zwischen Cot und Tpl-2 [161] wurde vermutet, daß Cot das menschliche Homolog des Rattenproteins Tpl-2 ist [205, 178]. Die hier präsentierten Ergebnisse unterstützen diese Hypothese. Salmerón *et al.* (1996) publizierten kürzlich, daß Tpl-2 MEK-1 und SEK-1 *in vitro* phosphoryliert [205]. Eine andere Publikation konnte zeigen, daß Tpl-2 zusammen mit Ras und Raf-1 arbeitet, um ERK zu aktivieren [179]. Im Gegensatz dazu stehen die Daten von Salmerón *et al.* (1996), die darauf hinweisen, daß Tpl-2 ERK unabhängig von Ras und c-Raf-1 aktiviert [205]. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Arbeiten von Troppmair *et al.* (1994) [233] und Patriotis *et al.*

(1994) [179]. c-Raf-1 ist ein Schlüsselprotein für die Aktivierung der klassischen zytoplasmatischen Kaskade. Die Aktivierung von c-Raf-1 ist noch nicht bis ins Detail geklärt, umfaßt aber Interaktionen mehrerer Proteine in einem großen Komplex [45, 167, 189]. Wie Reporterassays zeigten, arbeiten Cot und c-Raf-1 abhängig voneinander. Eine dominant negative c-Raf-1-Mutante (C4B) kann teilweise die Cot-induzierte Promotoraktivierung inhibieren. Umgekehrt kann eine dominant negative Cot-Mutante die durch c-Raf-1-BXB verursachte Promotoraktivität reduzieren. Letzteres kann auf eine mögliche Konkurrenz um das gemeinsame Substrat MEK zurückzuführen sein. c-Raf-1-C4B tritt mit der Ras-abhängigen Aktivierung von endogenem c-Raf-1 in Konkurrenz. Da bei einer Cotransfektion von Raf-C4B und Cot die Cot-abhängige Promotoraktivierung gehemmt wird, könnte Ras einen direkten oder indirekten Einfluß auf die Cot-Aktivierung haben oder aber an der Signalweiterleitung unterhalb von Cot beteiligt sein. Eventuell könnte eine Membrantranslokation einer oder mehrerer Komponenten des Cot-Signalweges für die Signalweiterleitung wichtig sein, die somit durch Raf-C4B unterbrochen wird. Da Ras nicht nur ein Modulator der klassischen mitogenen Kinasekaskade ist, sondern ebenfalls an die JNK-Kaskade Signale weiterleitet, könnte es sein, daß Ras in der Regulation der Cot-Aktivität bzw. der Substratspezifität der Kinase beteiligt ist. Auch ist eine dosisabhängige Wirkung von Ras auf Cot nicht auszuschließen.

Experimente mit CHP25-Zellen sollten den Zusammenhang zwischen c-Raf-1- und Cot-induzierten Wegen der Transformation klären. Diese Raf-revertante Zelllinie ist gegenüber Transformation durch die meisten Onkogene, wie v-Ras oder v-Src, die oberhalb von c-Raf-1 agieren, resistent. Sie werden aber leicht durch onkogene Formen von Proteinen wie v-Fos transformiert, die nicht im c-Raf-1-Effektor-Weg liegen, [132]. Der revertante Phänotyp der Zellen könnte das Ergebnis einer Mutation eines einzelnen Genes sein, daß für die c-Raf-1-Transformation nötig ist, z.B. der Verlust eines funktionellen Zielproteins der Raf-Kinase. es könnte aber auch an der Aktivierung eines transdominanten, c-Raf-1-spezifischen Suppressorgens, zum Beispiel einer Phosphatase, liegen [132]. Weil diese Zellen durch Cot retransformiert werden können, ist der zweite Mechanismus wahrscheinlicher. Da sich Cot in der Art und Weise der Transformation der CHP25-Zellen von v-Mos, einem anderen MEK-Aktivator, unterscheidet, könnte die JNK-Aktivierung durch Cot zur Transformation mit beitragen. Weitere Untersuchungen zum Verhältnis von Cot und c-Raf-1 sind nötig.

Weil Cot ein Onkogen ist und Transformationsaktivität in NIH3T3- und Hamster-SHOK-Zellen aufweist [161, 8], stellte sich die Frage, ob die SAPK/JNK-Streßkaskade, die unter anderem Apoptose induziert, aber auch in Transformationsprozessen beteiligt ist, zum

onkogenen Potential von Cot beiträgt oder dieses vermindert. Die Transformation durch onkogenes Ras z.B. kann durch mehrere Effektoren verursacht werden [126]. In NIH3T3-Zellen führt eine JNK-Inhibition ebenfalls zu einer Inhibition der Ras-induzierten Transformation [37]. JNK und Ras sind auch in der Transformation durch das MET- oder Bcr-Abl-Onkoprotein beteiligt [201, 185]. In stabil transfizierten NIH3T3-Zellen, die aktives Cot exprimieren, sind sowohl ERK als auch c-Jun phosphoryliert, während die Kontrollzellen keine Phosphorylierung der Proteine aufwiesen. Zur weiteren Klärung des Cot-induzierten Transformationsmechanismus soll z.B. die Wirkung von dominant negativem JNK oder MEK-spezifischen Inhibitoren untersucht werden.

PC12-Zellen sind gegenüber der apoptoseinduzierenden Wirkung von JNK/SAPK sehr empfindlich [142]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von Cot in diesem Zellsystem untersucht. Onkogenes Cot induzierte Neuritenwachstum. Diese Daten deuten darauf hin, daß die Cot-induzierte Differenzierung in PC-12-Zellen ERK-abhängig ist. Die Phosphorylierung von endogenem ERK1/2 war hier im Vergleich zu den Kontrollzellen stark erhöht. Zusätzlich war die c-Jun-Phosphorylierung und seine Expression in diesen Zellen

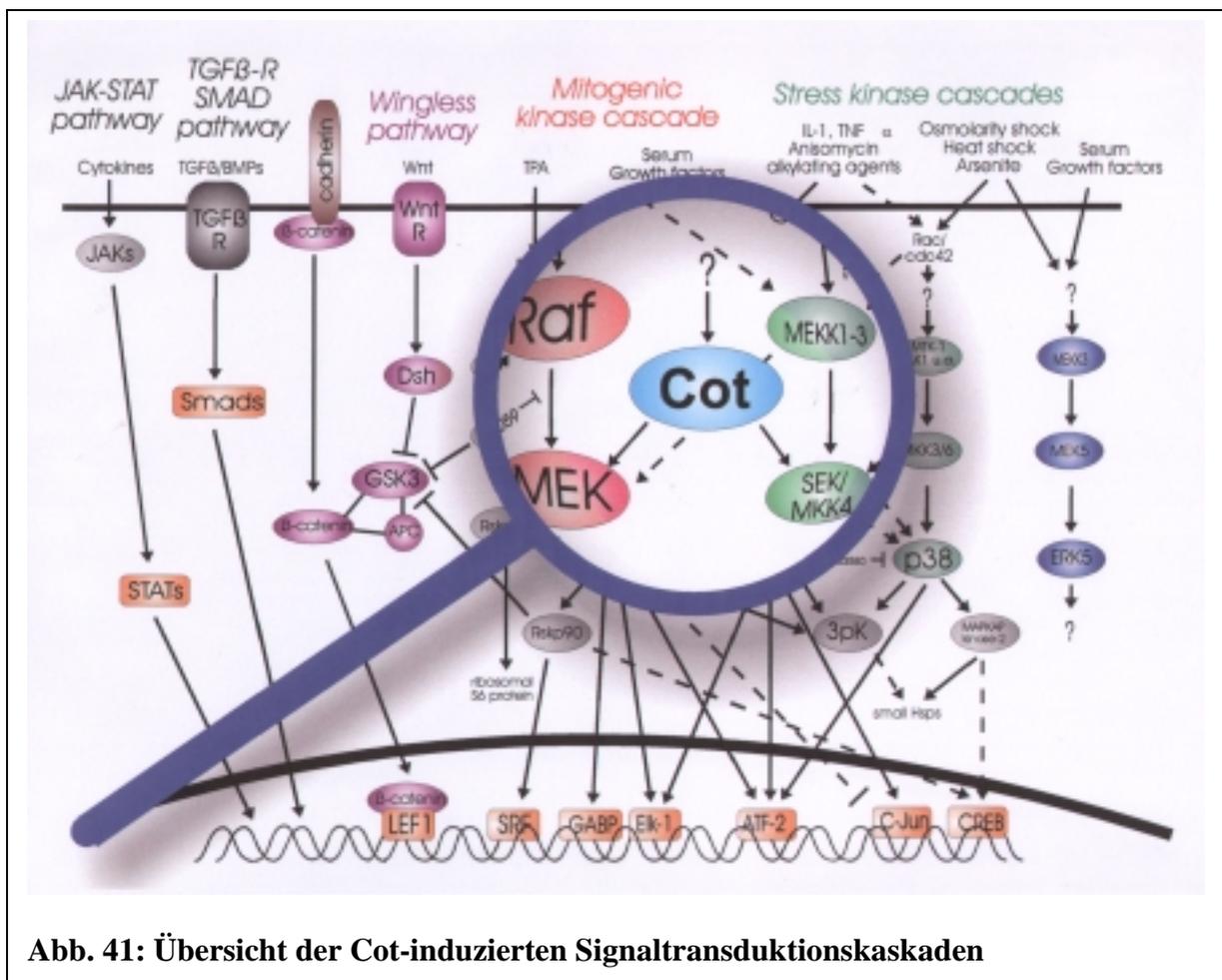


Abb. 41: Übersicht der Cot-induzierten Signaltransduktionskaskaden

erhöht. Dieses steht im Einklang mit Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, daß Differenzierung von PC12-Zellen sowohl eine Induktion der c-Jun-Synthese als auch seine Phosphorylierung erfordert. ERK und JNK können beide die relevanten Stellen von c-Jun phosphorylieren, wobei aber nur ERK die c-Jun-Expression in PC12-Zellen stimulieren kann [142]. JNK-Signale selber können keine PC12-Differenzierung hervorrufen. Es könnte auch sein, daß die Cot-induzierte JNK-Aktivität zelltypspezifisch ist. Weitere Experimente sind notwendig, um die kooperativen im Vergleich zu den antagonistischen Funktionen dieser beiden Signalwege verstehen zu können.

7.2 Transformationspotential von Cot *in vivo*

Die Rolle von MEK und ERK in der Transformation ist gut dokumentiert [79, 44, 152, 106, 218, 26], die Rolle der Streßkinasewege dagegen ist weniger genau untersucht. Verschiedene Studien belegen die Beteiligung von JNK in Transformationsprozessen (→ 7.1) [37, 201, 185]. Es gibt bis jetzt keine Untersuchungen, die die Relevanz einer gemeinsamen Aktivierung beider Signalwege bei der Transformation *in vivo* analysiert haben. Da Cot die Fähigkeit hat, sowohl den ERK- als auch den JNK-Signalweg zu aktivieren, wurde sein onkogenes Potential *in vivo* getestet und mit dem von unserem Labor schon früher publizierten Tumorspektrum von onkogenem Raf verglichen [191]. Neugeborene NSF/N-Mäuse, die mit einem Retrovirus infiziert wurden, welches das *v-raf*-Gen trägt, entwickelten nach einer Latenzzeit von 7 Wochen primär große Fibrosarkome in Muskeln und Milz. Der Helfervirus alleine induzierte nicht vor 9 Wochen nach der Injektion Lymphome. Eine Kombination aus *v-raf* und *v-myc* hingegen beschleunigte nicht nur das Tumorwachstum und verkürzte die Latenzzeit auf weniger als 3 Wochen, sondern änderte auch das Tumorspektrum. Die Tiere entwickelten Lymphome, Erythroblastome, epitheliale Dysplasien, aber nur noch vereinzelt kleine, *v-raf*-typische Sarkome. Im Blut und allen lymphatischen Organen waren große lymphoide Zellen mit großem Kern und dicker Kernmembran sichtbar. Infolge dieser Lymphominfiltration vergrößerten sich die betroffenen Organe, z.B. die Milz, im Vergleich zu Kontrollmäusen des gleichen Alters beträchtlich. FACS-Analysen identifizierten diese lymphoiden Zellen als frühe B- und T-Zellen [191, 168].

Injektion von Retroviren, die die onkogene Form von *cot* tragen, riefen in NSF/N-Mäusen die Formation einer hämatopoetischen Neoplasie hervor. Die Latenzzeit ist vergleichbar mit der der *v-raf*-induzierten Tumoren und betrug 7-10 Wochen, der Tumorphänotyp ist aber

charakteristisch für die Kombination von *v-raf/v-myc*. Diffuse Lymphome waren im Blut und in lymphatischen Geweben, aber auch in extranodalen Organen zu finden. Epithelienartefakte konnten genauso wenig wie Fibrosarkome beobachtet werden.

Das Fehlen von Raf-Tumoren zeigt, dass Cot neben seiner Fähigkeit, ERK zu aktivieren, ein zu v-Raf unterschiedliches Zielzellenspektrum aufweist und wahrscheinlich ein zusätzlicher Signalweg zur Tumor-Formation beigetragen hat. Biochemische Analysen haben gezeigt, dass das kooperative Signal nicht wie angenommen von der JNK-Streßkinase ausgeht, da zwar eine ERK-Phosphorylierung aber weder eine c-Jun-Phosphorylierung, noch eine c-Jun-Expression in den Tumorgeweben nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtung ist ungewöhnlich, da eine onkogene Aktivierung der klassischen Kaskade auch eine Hochregulation von c-Jun nach sich zieht und ebenfalls in Cot-transformierten Fibroblasten beobachtet werden konnte. c-Jun könnte während der LySAT-Präparation abgebaut worden sein. Dagegen spricht aber die einwandfrei nachzuweisende ERK-Phosphorylierung und -Expression. Einige Mutationen in diesem Tumor könnten auch die Notwendigkeit von c-Jun eliminiert haben.

Die Ähnlichkeit des Phänotyps der Raf/Myc- und Cot-Tumoren, neben der etwas längeren Latenzzeit der Letzteren, weist daraufhin, dass sich auch hier eine Faktorunabhängigkeit entwickelt haben könnte. Während hämatopoetische Zellen der v-Raf-Mäuse in Kultur nicht ohne Zugabe von IL-3 wachsen konnten, wiesen v-Raf/v-Myc-Zellen keine Faktorabhängigkeit auf [191]. Unsere Experimente zeigen, dass auch Milzzellen der Cot-Mäuse ohne Schwierigkeiten in Kultur genommen werden konnten.

Die stark vergrößerte Milz in diesen Tieren deutete bereits auf einen hämatopoetischen Ursprung der Neoplasie hin, welches in FACS-Analysen bestätigt werden konnte. Die in Kultur genommenen Milzzellen exprimierten IgM, B 220 und HSA, waren aber für CD43- und IgD-Marker negativ. Diese Anfärbungen identifizierten die Cot-Tumorzellen als frühes B-Zellstadium, wie es auch für *v-raf/v-myc*-induzierte Lymphome beschrieben wurde.

Diese Daten schlagen einen zusätzlichen Signalweg neben der Aktivierung der klassischen Kinasekaskade in der Cot-induzierten Tumorformation vor, der in Zukunft weiter untersucht wird.

7.3 Identifikation neuer Cot-Interaktionspartner mittels des Two-Hybrid Systems

7.3.1 Die Rolle der Cot/NF- κ B-Interaktion im NF- κ B-Signalweg

In einem Two-Hybrid Screen konnte NF- κ B bzw. p105 als neuer Interaktionspartner von Cot Δ C identifiziert werden. Cot hatte in Reporterexperimenten eine aktivierende Wirkung auf NF- κ B, die sich aber durch I κ B α , EGFR⁻ oder ERKC3 inhibieren lie β . In Coimmunopr \ddot{a} zipitationsexperimenten konnte eine Interaktion sowohl zwischen Cot und I κ B α als auch zwischen Cot und IKK α festgestellt werden.

Es ist anzunehmen, da β die Cot-abh \ddot{a} ngige Aktivierung von NF- κ B durch autokrine Rekrutierung von Komponenten der JNK-Stre β -Kinasekaskade vonstatten geht. Die Serin/Threonin Kinase c-Raf-1 spielt ebenfalls eine Rolle in der NF- κ B-Aktivierung [25, 64, 65]. K \ddot{u} rzlich konnte in unserem Labor gezeigt werden, da β die c-Raf-1-induzierte NF- κ B-Aktivierung durch Suramin, welches die Liganden-Rezeptor-Interaktion blockiert, und einem spezifischen Inhibitor der EGFR-PTK-Aktivit \ddot{a} t effizient inhibiert werden kann [234]. Auch eine dominant negative EGF-Rezeptor-Mutante blockiert die c-Raf-BXB-induzierte NF- κ B-Reporter-Expression. Die c-Raf-1-abh \ddot{a} ngige NF- κ B-Aktivierung scheint indirekt zu sein und Komponenten der Stre β -kinasekaskade zu involvieren. Wie bereits unter 7.1 diskutiert, zieht eine \ddot{U} berexpression von c-Raf-1 in NIH3T3-Zellen nicht nur eine konstitutive ERK-Aktivierung nach sich, sondern auch eine verz \ddot{o} gerte JNK-Aktivit \ddot{a} t, die wahrscheinlich auf Induktion eines autokrinen Loops unter Beteiligung des EGF-Rezeptors zur \ddot{u} ckzuf \ddot{u} hren ist [157, 125]. In Reporterassays mit 6 κ B als Reporter treten Parallelen zwischen Cot- und c-Raf-1-induzierter NF- κ B-Aktivierung auf. Auch die Cot-induzierte NF- κ B-Aktivierung l \ddot{a} st sich durch einen dominant negativen EGFR, aber auch durch eine dominant negative ERK-Mutante (ERKC3) inhibieren (\rightarrow 6.6.3.3, Abb. 38). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, da β sowohl eine ERK-Aktivierung als auch eine indirekte Induktion des JNK-Stre β -Kinaseweges \ddot{u} ber den EGF-Rezeptor f \ddot{u} r die Aktivierung der NF- κ B-Reporterexpression notwendig ist.

Da I κ B α die Cot-abh \ddot{a} ngige NF- κ B-Induktion komplett inhibieren kann, kann angenommen werden, da β Cot entweder oberhalb von I κ B α funktioniert oder aber ebenfalls von I κ B α reguliert wird. In einer Copr \ddot{a} zipitation konnte eine Interaktion zwischen Cot und I κ B α

festgestellt werden. Diese Daten deuten darauf hin, daß Cot eventuell Teil des 700-900 kDa großen zytoplasmatischen NF- κ B-Komplexes ist [150] und weitere Faktoren notwendig sind, um eine NF- κ B-Aktivierung auszulösen bzw. Cot ebenfalls von I κ B α inhibiert werden kann.

In unserem Labor konnte kürzlich gezeigt werden, daß c-Raf-1 NF- κ B durch einen neuen, direkten Signalweg stimuliert, der MEKK-1 und den IKK-Komplex involviert und nicht auf eine Induktion eines autokrinen Loops zurückzuführen ist [16]. Auch bei diesen Ergebnissen lassen sich Parallelen zu Cot feststellen. Erste Repotergen-Assays weisen darauf hin, daß Cot und MEKK-1 synergistisch auf die Stimulation von NF- κ B wirken (Daten nicht gezeigt). Kürzlich wurden Daten veröffentlicht, in denen die Rolle von Cot/Tpl-2 im NF- κ B-Signalweg genauer untersucht und ein direkter Weg zur Aktivierung von NF κ B beschrieben wurde. Teilweise wurden die bisher beschriebenen Ergebnisse bestätigt bzw. ergänzt, teilweise stehen sie aber auch im Widerspruch zu den hier präsentierten Daten. In einem Two-Hybrid Screen mit Tpl-2 wurde ebenfalls p105 als neuer Interaktionspartner identifiziert. Wie bereits beschrieben (\rightarrow 6.6.3.3), ist p105 ein Vorläuferprotein von NF- κ B, aus dem nach proteosomaler Abspaltung des C-Terminus p50 entsteht, so daß in Folge dessen aktives NF- κ B in den Kern transportiert werden kann. p105 fungiert ebenfalls als ein Inhibitor-Protein von NF- κ B [71, 127, 177, 144]. Belich *et al.* [20] konnten zeigen, daß Tpl-2 und p105 über ihre Carboxytermini interagieren, wobei das onkogene Tpl-2 nur eine schwache Affinität zu p105 aufweist. Belich *et al.* [20] folgerten aus der von ihnen postulierten sehr schwachen Affinität zwischen onkogenem Tpl-2 und p105 einen möglichen Mechanismus für das onkogene Potential von Tpl-2. Dadurch, daß Tpl-2 Δ C nicht mit p105 in einem Komplex gebunden ist, können andere Zielproteine von Tpl-2 nun aktiviert werden. In den hier präsentierten Daten konnte diese Beobachtung allerdings nicht bestätigt werden. Es konnte eine starke Interaktion zwischen Cot Δ C und p105 beobachtet werden, zumal p105 mit Cot Δ C als Bait im Two-Hybrid Screen gefischt wurde. Eine Hypothese des Transformationsmechanismus von Cot wird unter 7.3.1.1 erläutert.

Die Tpl-2/p105-Interaktion resultiert in einer Phosphorylierung und Degradation von p105, so daß es zur Bildung von aktivem nukleären NF- κ B kommt. Dominant negatives Tpl-2 hingegen blockiert die TNF α induzierte Degradation von p105 [20]. Tpl-2 stellt somit eine Komponente eines neuen Signalweges da, der die Proteolyse von NF- κ B-p105 kontrolliert. Die Phosphorylierung von p105 scheint aber nicht direkt durch Tpl-2 zu erfolgen, sondern involviert eine weitere Kinase ähnlich zu NIK, das I κ B α phosphoryliert und reguliert.

Schon Ballester *et al.* [15] und Tsatsani *et al.* [235, 236] hatten erste Hinweise auf eine Beteiligung von Cot/Tpl-2 im CD3/CD28 costimulstischen Signalweg, der zur vollen JNK- und NF- κ B-Aktivierung nötig ist [135, 223] und eine Cot-abhängige Transkription des IL-2-Genes auslöst, während der TNF α -induzierte Signalweg Cot-unabhängig zu sein scheint. Die Stimulation des IL-2 Promotors involviert eine kooperative Interaktion von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. AP-1, NF- κ B und NF-AT, die von Cot/Tpl-2 aktiviert werden [14, 15]. Expression einer dominant negativen Mutante von I κ B α wie auch Expression kinasetoter Mutanten von IKK α und IKK β inhibieren die Cot-vermittelte und NF- κ B abhängige Induktion des IL-2-Enhancers [143, 15, 235]. Auch diese Daten bestätigen die Beobachtung, daß dominant negatives I κ B α in Reporterassays die Cot-induzierte NF- κ B-Aktivität blockieren kann (\rightarrow 6.6.3.3, Abb. 38). Lin *et al.* folgerten, daß Cot neben NIK und MEKK-1 die dritte MKKK ist, die NF- κ B durch Aktivierung von IKK stimuliert [143]. Dieses steht im Einklang mit der unter 6.6.3.3, Abb. 40 gezeigten Copräzipitation von Cot und IKK α .

Weitere Studien zeigten, daß Cot IKK α *in vitro* nicht direkt phosphorylieren kann, aber *in vivo* eine NIK-Phosphorylierung hervorruft [143]. Da MEKK-1 in der c-Raf-1-induzierten Aktivierung von NF- κ B eine große Rolle spielt, ist eine Beteiligung im Fall von Cot ebenfalls möglich und wird zur Zeit untersucht. Ein Modell, daß die Rolle von Cot/Tpl-2 im NF- κ B-Signalweg zeigt, ist in Abb. 42 dargestellt.

Bisher gibt es keine Daten, was stromaufwärts der Cot-Signalwege liegt. Im Falle des Cot-abhängigen NF- κ B-Signalweges könnte Cot ein Substrat von AKT sein, das an CD28-Signalen beteiligt ist. AKT ist eine Serin/Threonin Kinase, die, durch Wachstumsfaktoren, Zytokine oder onkogenes Ras stimuliert, das Überleben der Zelle reguliert und ein kritischer Faktor in der Tumorgenese ist [120]. AKT wird durch den PI3K-Signalweg aktiviert. Durch direkte Phosphorylierung und Inaktivierung von Proteinen, die in dem Prozeß der Apoptose involviert sind, sichert AKT das Überleben der Zelle. So sind z.B. Bad, ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie, Caspase 9 und Mitglieder der Forkhead-Transkriptionsfaktorfamilie Substrate des AKT-Signalweges [120]. Zusätzlich zur direkten Phosphorylierung und Inaktivierung proapoptotischer Zielproteine kann AKT Signalwege regulieren, die die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B regulieren [147].

Vor kurzem wurde gezeigt, daß AKT mit c-Raf-1 interagiert und c-Raf-1 in der regulatorischen Domäne *in vivo* phosphorylieren kann. Infolgedessen kann 14-3-3 an c-Raf-1 binden und dieses somit inhibieren [270]. Diese Ergebnisse zeigen, daß es eine Verbindung

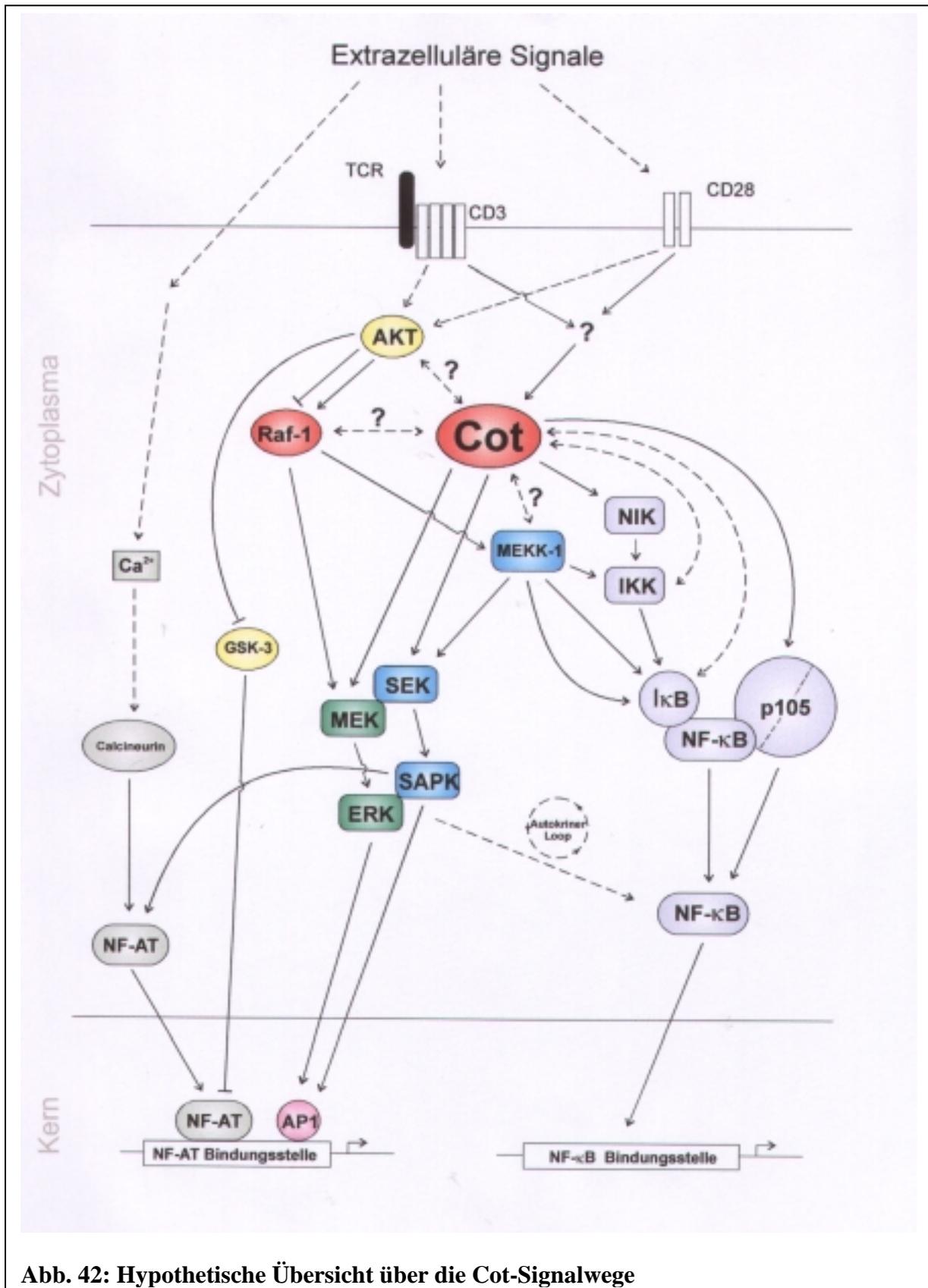


Abb. 42: Hypothetische Übersicht über die Cot-Signalwege

zwischen zwei Signalwegen auf der Höhe von AKT und c-Raf-1 gibt und dadurch zellsystemspezifisch Signaltransduktionseffekte moduliert werden können. Eine andere Arbeit zeigt, daß die Raf-1 Aktivierung in den AKT-abhängigen antiapoptotischen Effekten eine

wichtige Rolle spielt [149]. Da Cot auf der gleichen Ebene wie c-Raf-1 zu finden ist und viele Cot-induzierte biologische Effekte mit c-Raf-1- aber auch AKT-induzierten übereinstimmen, ist eine AKT-Beteiligung in Cot-Signalwegen nicht abwegig.

Auf eine Beteiligung des AKT-Signalweges deutet auch hin, daß Cot in der Aktivierung von NF-AT involviert ist. Die nukleäre Lokalisation von NF-AT wird durch Phosphorylierung kontrolliert. GSK3 reguliert durch Phosphorylierung den Kern-Export von NF-AT [17]. Die Funktion von AKT als Negativregulator von GSK3 [3] ist ein weiterer Hinweis auf die Involvement von AKT im Cot-Signalweg. AKT könnte den Export von NF-AT aus dem Kern inhibieren und somit seine Aktivität fördern. Dieser möglichen Involvement wird experimentell nachgegangen werden.

7.3.1.1 Cot und NF- κ B und ihre Wirkung auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose

Die Mitglieder der NF- κ B Transkriptionsfaktorfamilie spielen in der Kontrolle des zellulären Wachstums und Überlebens eine wichtige Rolle [145, 18, 19, 240, 248]. Komponenten von intrazellulären Signalwegen, die zur NF- κ B-Aktivierung führen, sind teilweise Produkte von Proto-Onkogenen, wie z.B. c-Raf-1 und Cot. Konstitutive Expression von nukleärem NF- κ B ist mit der Transformation einer Reihe von Zellen assoziiert. NF- κ B spielt z.B. auch eine wichtige Rolle in der zellulären Transformation, die durch BCR-Abl-Onkogenprodukten initiiert wird [197]. Auch für die c-Raf-1 induzierte Transformation von Fibroblasten ist die simultane Stimulation von zumindest 2 unabhängigen Signalwegen notwendig, die den NF- κ B-Signalweg einschließt [16]. Zelluläre Transformation, die mit NF- κ B-Aktivierung assoziiert ist, könnte zum Teil auf die antiapoptotischen Wirkungen von NF- κ B zurückzuführen sein [145, 18, 19, 240, 248]. Die Tatsache, daß Cot NF- κ B aktiviert, schlägt auch einen möglichen molekularen Mechanismus vor, der zur onkogenen Fähigkeit von Cot beiträgt. Die Aktivierung von NF- κ B durch Cot könnte nicht nur für die Apoptose-Blockierung in Cot exprimierenden 32D-Zellen verantwortlich sein (\rightarrow 6.3, Abb. 24), sondern auch die Cot-induzierte Zellproliferation bzw. Differenzierung stimulieren (\rightarrow 6.3, Abb. 21/22). Dafür spricht auch, daß in der Cot-abhängigen Differenzierung von PC12-Zellen sowohl ERK aktiviert ist als auch eine c-Jun-Expression und -Phosphorylierung induziert wird, die eventuell eine NF- κ B-Aktivität nach sich zieht. Hierbei könnte auch die Aktivierung

eines autokrinen Loops involviert sein. Weitere Studien werden die Rolle von NF- κ B in der Cot/Tpl-2-vermittelten Transformation charakterisieren.

7.3.2 Ran als Interaktionspartner von Cot

In einem Two-Hybrid Screen wurde die GTPase Ran als neuer Interaktionspartner von Cot identifiziert. Wie unter 6.6.2.1 beschrieben, spielt Ran eine wichtige regulatorische Rolle im Kern-Im- und -Export. Um die Effekte der Cot/Ran-Wechselwirkung zu charakterisieren, wurden diverse Aktivierungsstudien mittels 293-Transfektionsexperimenten und Reporterassays mit 6 κ B bzw. pB4x als Reportergenkonstrukt durchgeführt. Eine dominant negative Mutante von Ran inhibiert sowohl die Cot-vermittelte Aktivierung von c-Jun und ERK als auch die AP-1- und NF- κ B-Promotoraktivierung durch Cot. Diese Inhibition ist auf eine Blockierung der Cot-Expression zurückzuführen, da in einem Western-Blot Cot in einer Cot-Ran-Q/L-Cotransfektion nicht nachgewiesen werden konnte. Da Ran nicht nur Proteine in und aus dem Kern transportiert, sondern auch für mRNA-Transport verantwortlich ist, könnte die dominant negative Mutante von Ran die gesamte Transkriptionsmaschinerie und somit die Neusynthese von Proteinen lahmlegen. Um dies zu bestätigen, wurde c-Raf-1-BXB zusammen mit RanQ/L transfiziert und die Effekte untersucht. Die Funktionen von c-Raf-1-BXB in Bezug auf ERK-Aktivierung wurden durch die Ran-Mutante ebenfalls beeinträchtigt, seine Expression war aber nicht komplett inhibiert. TPA- oder Anisomycin-stimulierte Zellen zeigen unter Coexpression von RanQ/L die gleiche ERK- bzw. c-Jun-Phosphorylierung als ohne dominant negatives Ran. Die durch TPA- und Anisomycin-induzierten Signalwege scheinen von Ran nicht beeinflusst zu werden bzw. benötigen keine Proteinneusynthese und sind somit auch nicht von einem Kerntransport abhängig. Eine Hypothese dieses Effektes beruht darauf, daß die dominant negative Ran-Mutante im Kern an Cot bindet und einen Export ins Zytoplasma blockiert. Diese Hypothese setzt voraus, daß bei der Lyse der Zellen der Kern weitgehend unbeschädigt bleibt, so daß Cot im Western-Blot nicht nachgewiesen werden kann. Es könnte sein, daß Ran eine wichtige Rolle im Transport von Cot in und aus dem Kern spielt. Cot könnte ähnlich wie ERK eine Kern Shuttle Kinase sein und im Zytoplasma andere Aufgaben als im Nukleus inne haben. Diese könnten durch Ran kontrolliert werden.

Für ERK wurden zwei Mechanismen für einen Kernimport beschrieben [2]. Im Zytoplasma tritt ERK mit MEK komplexiert auf, welches ein NES aufweist und somit als

zytoplasmatischer Anker für ERK wirkt. Als Antwort auf extrazelluläre Stimuli wird ERK durch MEK phosphoryliert, wodurch es zur Dissoziation der beiden Kinasen kommt und ERK in den Kern wandern kann [2]. ERK-Monomere können aufgrund ihrer geringen Größe passiv in den Kern diffundieren, Dimere sind allerdings auf Ran-abhängige aktive Transportmechanismen angewiesen. Die dominant negative Ran-Mutante blockiert komplett den Import von ERK-Dimeren bzw. ERK-Komplexen, die größer als 45 kDa sind [2].

Die biologische Relevanz der Cot/Ran-Interaktion ist noch nicht geklärt. Eine Ran-Phosphorylierung durch Cot konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch ob, nach welchen Stimuli und mit welchem Ziel Cot vom Zytoplasma in den Kern transportiert wird, bedarf noch genauerer Untersuchungen. Cotransfektionsexperimente mit der dominant negativen Ran-Mutante haben sich, wie oben beschrieben, als ungeeignet erwiesen, um die Funktion der Cot/Ran-Interaktion zu untersuchen. Mikroinjektionsexperimente mit gereinigten Proteinen könnten bei der weiteren Aufklärung der Fragestellung eine Alternative darstellen.

I κ B α z.B., mit dem Cot ebenfalls interagiert (\rightarrow 6.6.3.3, Abb. 39), kontrolliert die transkriptionale Aktivität von NF- κ B, indem es an dieses bindet und es ähnlich wie MEK ERK im Zytoplasma hält [237]. Wenn I κ B α aber im Nukleus exprimiert wird, kann es dort die NF- κ B-DNA-Bindung inhibieren und sorgt für einen Kern-Export von NF- κ B. Ist I κ B α im Zytoplasma nicht mit NF- κ B komplexiert, wird es kontinuierlich in den Kern transportiert. Diese Translokation resultiert nicht aus passiver Diffusion, sondern beruht auf einem aktiven Transportmechanismus abhängig von Importin α und β und der GTPase Ran [237]. Verantwortlich dafür ist die freiliegende Ankyrin-Wiederholungssequenz, die sonst durch eine NF- κ B-Bindung maskiert ist. Die Transportrezeptoren und Ran sind aber für eine nukleäre Translokation von I κ B α nicht ausreichend, zusätzlich ist wahrscheinlich eine direkte oder indirekte Interaktion mit einem Kern-Importrezeptor erforderlich [237]. Da Cot sowohl mit Ran als auch mit I κ B α interagiert, könnte es sein, daß Cot zum Kernimport von I κ B α beiträgt. Cot könnte auch freies zytoplasmatisches I κ B α binden und somit seinen Kernimport verhindern, so daß die Aktivität von nukleärem NF- κ B gesichert ist. Eine weitere Möglichkeit ist, daß Cot im Kern an I κ B α bindet und über einen Ran-abhängigen Mechanismus den Export von I κ B α reguliert. Dadurch könnte Cot ebenfalls zu einer verlängerten NF- κ B-Aktivität beitragen. Für die letzte Hypothese sprechen kürzlich publizierte Daten, die zeigen, daß der I κ B α -Import Ran-unabhängig ist und über direkte Interaktionen mit dem NPC laufen [204]. Für den Export ist aber sowohl eine Transportrezeptor als auch Ran nötig [204]. Der

genaue Transportmechanismus ist noch nicht bis ins Detail geklärt. Es könnte aber durchaus sein, daß Cot im Kern-Transport beteiligt ist, die Translokation von Proteinen regulieren kann und somit auch Einfluß auf die Regulation der Gen-Expression nimmt. Diese Fragestellungen werden derzeit weiter untersucht.