

3. EINLEITUNG

3.1 Signaltransduktion

Signaltransduktion ist ein essentieller, hochregulierter zellulärer Prozeß, der eine extra-, intra- und interzelluläre Kommunikation ermöglicht und somit der Zelle die Fähigkeit gibt, sich selbst zu organisieren, auf Umgebungseinflüsse zu reagieren und sich effektiv anzupassen. Zellen reagieren auf einige Signale mit Proliferation, auf andere mit Differenzierung und wenige dritte können den altruistischen „Freitod“ der Zelle (Apoptose) induzieren [53]. Signalwege nutzen überwiegend Protein-Phosphorylierungen und -Dephosphorylierungen als Mechanismen, um Informationen weiterzuleiten und bestimmte physiologische Ereignisse zu steuern [108, 253]. Proteinkinasen und Phosphatasen können je nach Zielprotein positive oder negative regulatorische Effekte ausüben, so daß die Balance der Aktivitäten dieser beiden Enzyme das Ausmaß der Protein-Phosphorylierung *in vivo* bestimmt. Proteinkinasen stellen eine der größten Superfamilien von homologen Proteinen bzw. Genen dar. Die Mitglieder zeigen eine reiche Strukturdiversität, zeichnen sich aber auch durch gemeinsame hochkonservierte Merkmale aus. Sequenzvergleiche der katalytischen Domänen dienen als Basis, um die Kinasen in Stammbäume einzuordnen und nahe verwandte Enzyme in Subfamilien zusammenzufassen [88]. Die strukturelle Verwandtschaft spiegelt häufig auch ähnliche Funktionen wieder. Phylogenetische Untersuchungen trugen zu einem Modell bei, in dem evolutionär hochkonservierte Signalwege in zentralen Einheiten (Module) aus 3 Kinasen organisiert sind: Eine Membran Shuttle Serin/Threonin Proteinkinase (MKKK), die eine dual-spezifische Proteinkinase (MKK) phosphoryliert und aktiviert, die wiederum eine Kern-

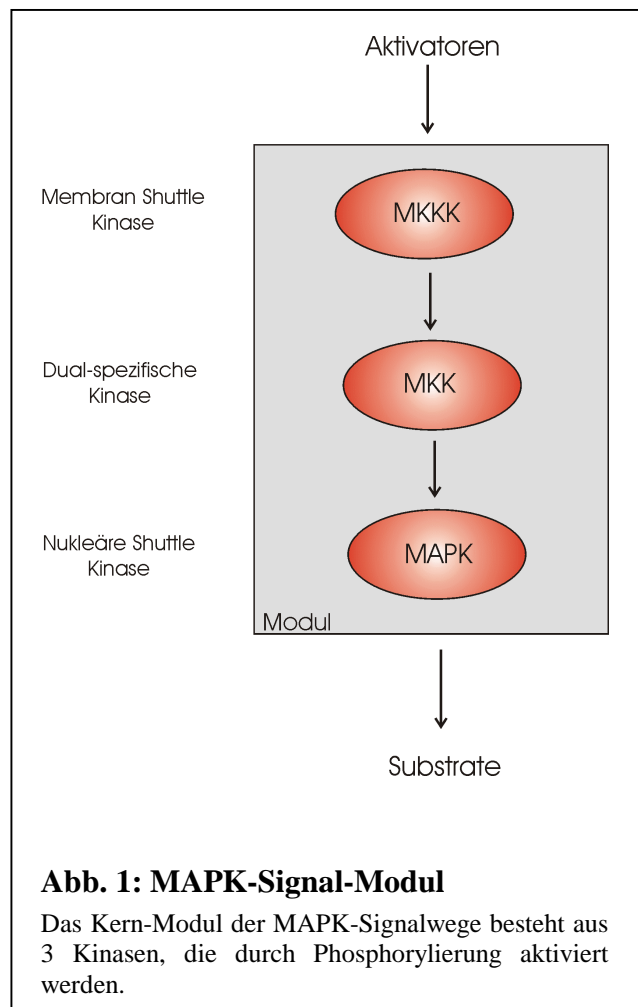
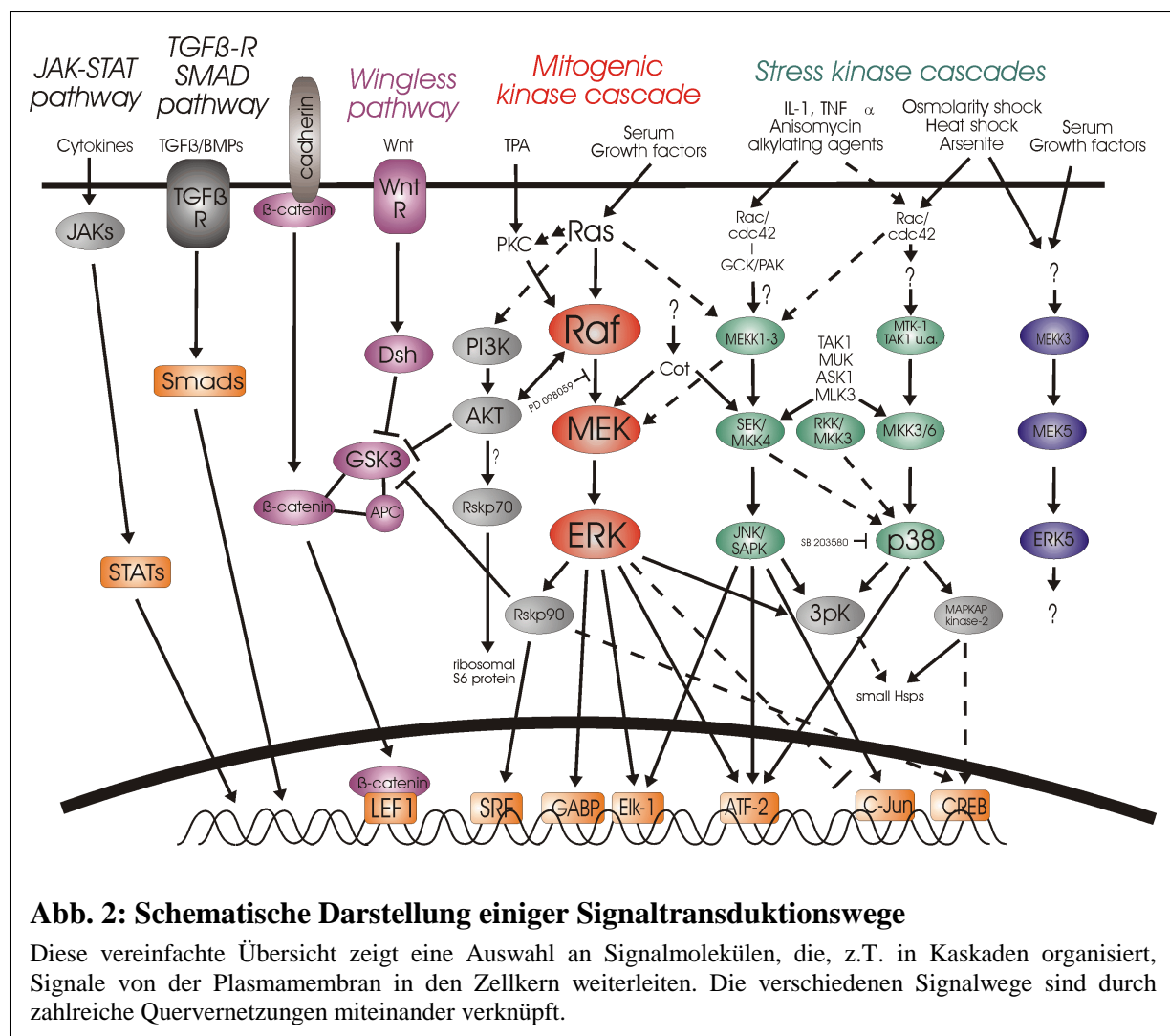


Abb. 1: MAPK-Signal-Modul

Das Kern-Modul der MAPK-Signalwege besteht aus 3 Kinasen, die durch Phosphorylierung aktiviert werden.

Shuttle Serin/Threonin Kinase der mitogen-aktivierten Proteinkinase Familie (MAPK) durch Phosphorylierung an Serin/Threonin- und Tyrosinresten aktiviert (Abb. 1). Diese gibt das Signal im Zytoplasma an andere Proteine weiter oder modifiziert im Kern Transkriptionsfaktoren. In Eukaryoten sind bisher 6 dieser MAPK-Signaleinheiten beschrieben worden, die in definierten Signalwegen funktionieren [251, 213]. Genauere Untersuchungen zeigen, daß die wachsende Zahl der beteiligten Signalmoleküle mit diversen anderen interagieren können, so daß die verschiedenen Signalwege miteinander verknüpft werden und eine fast unerschöpfliche Vielzahl von hochregulierten zellulären Reaktionen ermöglicht wird [53].

Eine stark vereinfachte Übersicht der am besten charakterisierten Signalwege, die z.T. in den folgenden Kapiteln noch näher erläutert werden, ist in Abb. 2 dargestellt.



Initiiert werden Signalkaskaden durch externe Stimuli, die nach Bindung an einen Membranrezeptor die Aktivität seiner zytosolischen Domäne und der damit assoziierten Proteine beeinflussen kann. Bei den meisten Wachstumsfaktorrezeptoren handelt es sich um Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK), deren zytoplasmatischer Teil eine katalytische Domäne besitzt. Ligandenbindung führt zur Rezeptoroligomerisierung. Dieses Ereignis ist für die Stimulation der intrinsischen Proteinkinase-Aktivität und für die Autophosphorylierung bestimmter zytosolischer Tyrosinreste verantwortlich [239, 107, 141]. Die Phosphotyrosine sind unter anderem Erkennungs- und Bindungsstellen für Signalmoleküle, die SH2-Domänen (src homology domain) enthalten [6, 42, 180, 181]. Oft kommen in Signalmolekülen auch SH3-Domänen vor, die an prolinreiche Abschnitte binden können [42, 180]. Diese beiden Proteininteraktionsdomänen sind ursprünglich bei der Src-Protein-Tyrosinkinase entdeckt worden, kommen aber auch in einer Vielzahl von weniger verwandten Proteinen vor, die in der Signaltransduktion involviert sind [217]. SH2- und SH3- Domänen-beinhaltende Proteine stellen Adaptoren dar, die aktivierte Wachstumsfaktorrezeptoren mit intrazellulären Signaltransduktionswegen verbinden. Mit Hilfe derartiger Domänen kommt es zur schnellen Bildung von Proteinkomplexen, wodurch z.T. die funktionale Aktivität der einzelnen Komponenten geändert wird [42].

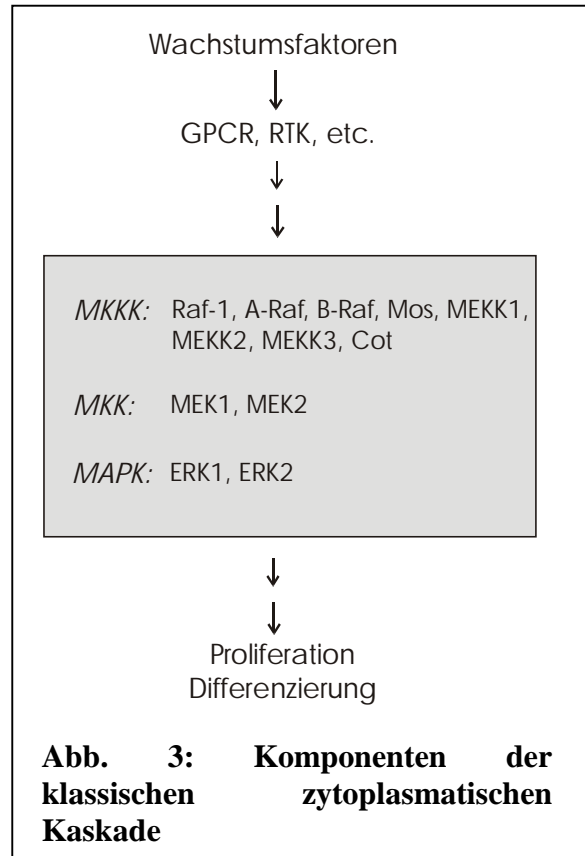
Rezeptoren, die keine eigene Kinase-Aktivität aufweisen, können über Assoziation mit intrazellulären Tyrosinkinase zur Aktivierung einer Signalkaskade führen. So sind die meisten Zytokinrezeptoren mit Mitgliedern der Janus-Proteinkinase Familie assoziiert [111, 112].

Der Besitz von 7 Transmembrandomänen ist das Kennzeichen vieler Rezeptoren, die heterotrimere G-Proteine aktivieren (Serpentin-Rezeptoren, GPCR) [171]. G-Proteine sind nach ihrer Eigenschaft benannt, GDP oder GTP zu binden. Sie sind periphere Membranproteine und bestehen im Fall der heterotrimeren G-Proteine aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit. Im inaktiven Zustand hat die α -Untereinheit des trimeren G-Proteins GDP gebunden. Die Aktivierung des Rezeptors bewirkt den Austausch von GDP gegen GTP, wobei ein α -Monomer von dem $\beta\gamma$ -Dimer dissoziiert. Eine der beiden Untereinheiten reagiert als zweiter Botenstoff (second messenger) mit Zielproteinen, so daß eine Signalkaskade gestartet wird [171].

Im folgenden werden einige der am besten charakterisierten Signalwege kurz vorgestellt. Dazu gehören die klassische mitogene Kinasekaskade, die zur Aktivierung von ERK führt, sowie die beiden Streß-Signalwege, die in einer Aktivierung von JNK bzw. p38 gipfeln.

3.1.1 Die klassische zytoplasmatische Kaskade

Die zuerst entdeckte und am besten untersuchte Kinasekaskade in Säugern führt zur Aktivierung von Mitgliedern der ERK-Familie (extracellular-regulated kinase) und ist auch als klassische zytoplasmatische Kaskade bekannt (Abb. 3). Das Ergebnis einer ERK-Aktivierung ist von dem Repertoire an Genen abhängig, die in spezifischen Zelltypen durch ERK reguliert werden und die sowohl Zellproliferation, Schutz vor Apoptose als auch Wachstumsinhibition oder Differenzierung hervorrufen können. Auch Stärke und Dauer des übermittelten Signals beeinflusst die Reaktion der Zelle auf bestimmte Stimuli [251]. Initiiert wird die klassische Kinasekaskade durch RTK, Serpentinrezeptoren und anderen Mechanismen [251]. Kleine G-Proteine der Ras-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Verknüpfung zwischen Rezeptoraktivierung an der Zellmembran und zytoplasmatischer Signalweiterleitung und übernehmen die Funktion eines molekularen Schalters [123, 130, 131]. Die biologische Aktivität wird ähnlich wie bei den trimeren G-Proteinen von einem GDP/GTP-Zyklus reguliert. Die zelluläre Kontrolle des GDP/GTP-Austausches wird von drei Typen regulatorischer Proteine übernommen, GDP-Austauschfaktoren (GEF), GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) und Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDI). Im inaktiven Zustand liegen kleine G-Proteine im Komplex mit einem Dissoziationsinhibitor (GDI) vor, der eine Ablösung von GDP verhindert und wahrscheinlich auch die Assoziation der GTPase mit der Plasmamembran reguliert [30]. Nach einer RTK-Aktivierung entstehen durch Autophosphorylierung Phosphotyrosyl-Bindungsstellen, an denen Proteine mit SH2- und/oder Phosphotyrosyl-Bindungsdomänen (PTB) binden können [93, 239, 242, 215, 242]. So wird auch das Adaptorprotein Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2), das stabil mit Sos (son of sevenless) assoziiert ist, über direkte oder indirekte Bindung mittels weiterer Adaptorproteine an einen aktivierten Rezeptor rekrutiert. Sos, ein GEF für Ras, löst den GDI-Ras-Komplex auf und bringt Ras an der Plasmamembran in eine aktive, GTP-gebundene Form [215, 242, 27, 158, 9]. Die interne



Zellmembran und zytoplasmatischer Signalweiterleitung und übernehmen die Funktion eines molekularen Schalters [123, 130, 131]. Die biologische Aktivität wird ähnlich wie bei den trimeren G-Proteinen von einem GDP/GTP-Zyklus reguliert. Die zelluläre Kontrolle des GDP/GTP-Austausches wird von drei Typen regulatorischer Proteine übernommen, GDP-Austauschfaktoren (GEF), GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) und Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDI). Im inaktiven Zustand liegen kleine G-Proteine im Komplex mit einem Dissoziationsinhibitor (GDI) vor, der eine Ablösung von GDP verhindert und wahrscheinlich auch die Assoziation der GTPase mit der Plasmamembran reguliert [30]. Nach einer RTK-Aktivierung entstehen durch Autophosphorylierung Phosphotyrosyl-Bindungsstellen, an denen Proteine mit SH2- und/oder Phosphotyrosyl-Bindungsdomänen (PTB) binden können [93, 239, 242, 215, 242]. So wird auch das Adaptorprotein Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2), das stabil mit Sos (son of sevenless) assoziiert ist, über direkte oder indirekte Bindung mittels weiterer Adaptorproteine an einen aktivierten Rezeptor rekrutiert. Sos, ein GEF für Ras, löst den GDI-Ras-Komplex auf und bringt Ras an der Plasmamembran in eine aktive, GTP-gebundene Form [215, 242, 27, 158, 9]. Die interne

GTPase-Aktivität, die durch Assoziation mit einem GTPase-aktivierenden Protein (GAP) bis zum 1.000.000-fachen gesteigert werden kann, inaktiviert Ras durch GTP-Hydrolyse wieder [61, 70, 198, 214]. In Eukaryoten sind drei Ras-Proteine identifiziert worden: H-Ras, K-Ras und N-Ras [61].

Ras wird benötigt, um die cytosolische Serin/Threonin Kinase c-Raf-1 (MKKK, Membran Shuttle Kinase) an die Plasmamembran zu rekrutieren [11, 86, 104, 140, 148, 203, 226, 241, 245, 249, 266]. Die Ras-Interaktion allein ist für eine volle Raf-Aktivierung nicht ausreichend [45, 49, 82]. Die Mechanismen, die zur vollen c-Raf-1-Aktivierung führen, sind bisher nicht vollständig verstanden, Phosphorylierungsereignisse durch z.B. c-Src und/oder PKC-Isoformen sind aber mit Sicherheit involviert [153, 154, 156]. So wurden Ser⁴³, Ser²⁵⁹, Tyr³⁴⁰, Tyr³⁴¹, Ser⁴⁹⁹ und Ser⁶²¹ nach Mitogenstimulation als Hauptphosphorylierungsstellen von c-Raf-1 identifiziert [84].

Aktiviertes c-Raf-1 phosphoryliert MEK1/2 (MAP Kinase/ERK aktivierende Kinase) an zwei Serinresten in ihrer katalytischen Domäne [4, 48, 105, 118, 134, 268]. Aktivierte MEK ist eine dualspezifische Kinase, die Signale über Serin/Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierung des Aktivierungsloops an die nukleären Shuttle Kinasen ERK1 und ERK2 weiterleitet [253, 229, 46]. Im Gegensatz zu Raf und MEK sind für ERK eine Vielzahl von zytoplasmatischen sowie nukleären Substraten beschrieben worden. Zu ihren Zielproteinen gehören Serin/Threonin Kinasen (z.B. Rsk, MAPKAP Kinase 2, 3pK), RNA-Polymerase II, Phospholipase A2, strukturelle Proteine (z.B. Lamin, Talin) und eine Reihe von Transkriptionsfaktoren (z.B. c-Fos, c-Jun, c-Myc, Ets) [253, 22, 29, 73, 95, 146, 45, 221, 220].

Insgesamt gehören fünf verschiedene MAP-Kinasen zu der ERK-Familie, ERK1 bis ERK5 [251]. ERK3 ist vorwiegend im Kern lokalisiert und wird durch PKC-Isoformen aktiviert [35, 211]. ERK4 wird durch Ras-abhängige Signalwege nach NGF- oder EGF-Stimulation aktiviert [182]. Oxidativer Streß und hyperosmolare Bedingungen [1], aber auch streßunabhängige Stimuli wie Serum [122] rufen eine ERK5-Aktivierung durch MEK5 hervor [269]. Aktive ERK5 wandert in den Kern, wo z.B. die Aktivierung des Transkriptionsfaktors MEF2C induziert und eine c-Jun Expression ausgelöst wird [122]. Vor kurzem konnte gezeigt werden, daß MEKK3 die Aktivität von MEK5 und ERK5 nach Wachstumsfaktorstimulation reguliert [34].

Signaltransduktion durch eine Kaskade von Kinasen erfordert verschiedene Kontrolloptionen, um das Signal zu amplifizieren und/oder zu modulieren. So verstärkt z.B. aktivierte MEK-1 die Aktivität von c-Raf-1, wodurch das weiterzuleitende Signal amplifiziert wird [271].

c-Raf-1 und MEK-1 gehören auch zu den Substraten von ERK1/2, wodurch c-Raf-1 und MEK-1 inhibiert werden können [253, 250, 137]. Es wird angenommen, daß eine Hyperphosphorylierung von c-Raf-1 seine Affinität für die Plasmamembran verringert und in Folge dessen seine Aktivität nachläßt [250]. Desweiteren phosphoryliert ERK1/2 den EGFR und Sos und reduziert somit deren katalytische Aktivität [253]. Diese klassischen Feedback-Mechanismen verhindern eine unkontrolliert hohe Aktivierung der klassischen Kaskade [251, 253]. Wie bereits unter 3.1 erwähnt, spielen Phosphatasen in der Regulation von Kinasekaskaden eine große Rolle. Die Phosphatasen MKP-1, -3 und -4 scheinen dabei spezifisch für ERK1/2 zu sein, wobei MKP-3 und -4 rein zytoplasmatisch sind. Andere Phosphatasen arbeiten weniger spezifisch [251].

Die klassische zytoplasmatische Kaskade ist ein komplexes System, von dem noch nicht alle Einzelheiten bekannt sind. Es können auch andere Modulatoren als die oben beschriebenen wirksam werden. So gibt es z.B. alternative MEK-Aktivatoren wie c-Mos, MLK-3, MEKK1, MEKK2 und MEKK3 [62] (Abb. 3). Einige dieser Kinasen regulieren auch andere Signalwege. Diese Verknüpfung unterschiedlicher Signalwege trägt zur großen Vielfalt fein abgestimmter zellulärer Reaktionen bei.

3.1.1.1 Die Raf-Familie

c-Raf-1 wurde als erstes Mitglied einer Familie zytoplasmatischer Serin/Threonin Kinasen entdeckt, die in Säugern aus drei Mitgliedern besteht: c-Raf-1, B-Raf und A-Raf [84, 45, 170]. Es wurde ursprünglich als transformierende Komponente des Maus-Retrovirus MSV 3611 isoliert. Im Vergleich zu c-Raf-1 ist das Onkogen *v-raf* aminoterminal verkürzt und mit Virussequenzen fusioniert [155, 162, 188, 192, 195, 238].

Die zwei weiteren Mitglieder der Raf-Familie, A-Raf und B-Raf, werden ebenfalls mit Hilfe von Ras aktiviert und regulieren die MEK-Aktivität [84]. Alle drei Raf-Kinasen weisen eine vergleichbare Struktur aus drei hochkonservierten Regionen (CR) auf, die in variablen Regionen eingebettet sind [170, 220]. CR1 beinhaltet die Ras-Bindedomäne und ein Zinkfingermotiv. CR2 weist viele Serin- und Threoninreste auf und hat regulatorische Phosphorylierungsstellen. Die Kinasedomäne ist in CR3 in der Nähe des Carboxyterminus lokalisiert. CR1 und CR2 repräsentieren autoinhibitorische Domänen in diesem Enzym. Mutationen in diesen Regionen resultieren in einer onkogenen Konversion des *raf-1*-Gens, was zur Expression einer konstitutiv aktiven Kinase führt [170, 45]. In der Maus wird c-Raf-1 ubiquitär exprimiert, wobei die höchsten Expressionsraten in der quergestreiften Muskulatur, im Cerebellum und im fötalen Gehirn zu finden sind. B-Raf-Expression dagegen

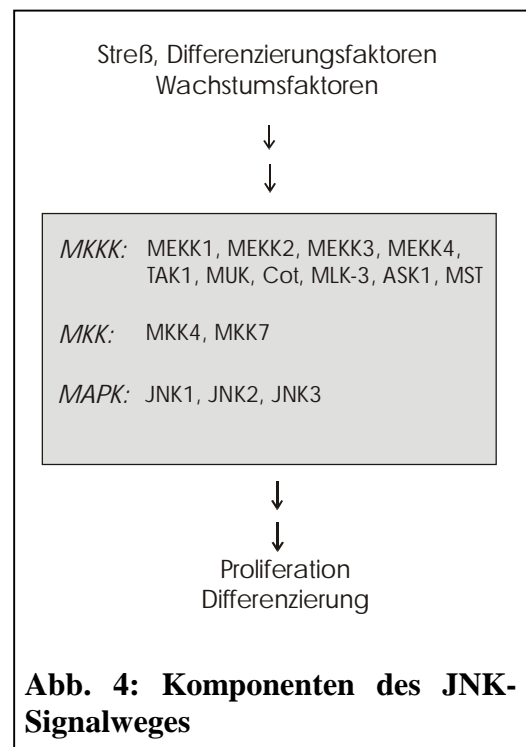
findet sich vor allem in neuronalen Geweben und im Testis und scheint der Haupt-MEK-Aktivator im Gehirn zu sein, während das *A-raf*-Transkript überwiegend im urogenitalen Gewebe exprimiert wird [31, 258, 84, 92, 166, 187].

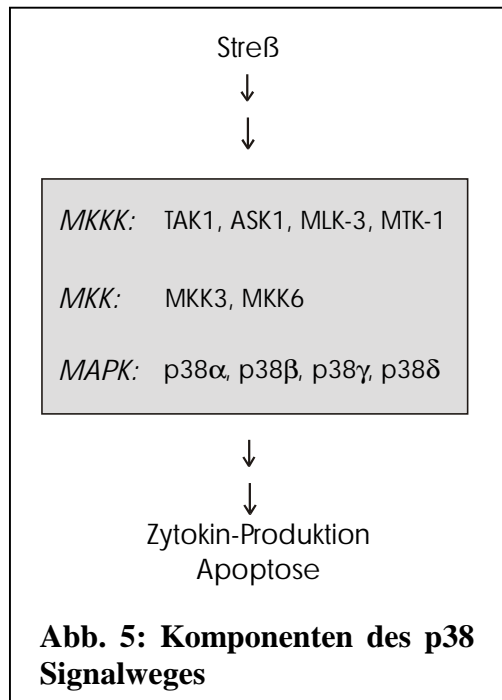
3.1.2 Streß-Kinasekaskaden

Zelluläre Reaktionen auf Streßeinwirkungen durch z.B. UV-Licht, osmotischen Schock oder auch inflammatorische Zytokine erfolgen meist durch eine Signaltransduktion via SAPK/JNK- oder p38-Kaskaden (Abb. 4 und 5). Diese beiden Signalwege sind ebenso hierarchisch aufgebaut wie die klassische Kinasekaskade, ihre Komponenten und Effekte sind aber bis jetzt weniger gut charakterisiert. Eine Aktivierung der Streß-Kinasekaskaden kann Apoptose, Transformation, Differenzierung, Immunreaktionen, Inflammation oder Adaption an eine veränderte Umwelt hervorrufen [230].

Bis jetzt sind 3 JNK Gene (*jnk1*, *jnk2*, *jnk3*) und 10 verschiedene Splicevarianten beschrieben worden [213, 230]. Die JNK/SAPK Proteinkinasen phosphorylieren den Transkriptionsfaktor c-Jun an seinem Aminoterminus. c-Jun ist eine Komponente des AP-1 (activator protein 1) Transkriptionsfaktorkomplexes. Diese JNK-induzierte AP-1-Phosphorylierung führt zu einer verstärkten Expression von Genen, die AP-1-Bindestellen in ihrem Promotor aufweisen [115]. Ein Zielgen von AP-1 ist c-Jun selbst, so daß ein positiver Feedback-Loop initiiert wird. Andere nukleäre Ziele von JNK außer AP-1 sind ATF-2, ELK-1 und SAP-1a, was zum Teil auch zur Expression von c-Fos führt, einer weiteren Komponente des AP-1-Komplexes [230]. JNK-Familienmitglieder werden durch 2 verschiedene dualspezifische Kinasen, MKK4/SEK1 [209, 50] und MKK7 [165, 261, 255, 231, 101] aktiviert.

Die p38-Untergruppe der MAP-Kinasen besteht aus vier Genen, *p38 α* , *p38 β* , *p38 γ* und *p38 δ* [87, 138, 119, 225, 75] (Abb. 5). Sie phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren ATF-2, SAP-1a und GADD1553 und sind für die Induktion von c-Jun und c-Fos nach Anisomycin





und UV-Strahlung verantwortlich [40]. Einige p38-Isoformen aktivieren auch andere Proteine neben Transkriptionsfaktoren wie z.B. MAPKAP Kinase 2, 3 und 5 [40, 172] und das verwandte MNK1 [67]. p38-Kinasen werden ebenfalls durch mindestens zwei MKK aktiviert, MKK3 [50] und MKK6 [224, 164]. Auch MKK4 ist *in vitro* ein Aktivator der p38-Kinasen [50].

Initiiert werden die Stress-Kaskaden von einer Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren (Serpentin-Rezeptoren, RTK, usw.). Wie schon unter 3.1.1 beschrieben, führen extrazelluläre Stimuli unter Beteiligung von RTK zur Aktivierung bzw. GTP-

Beladung kleiner G-Proteine, die das Signal an eine Reihe von Serin/Threonin Kinasen weiterleiten. Im Fall der Stress-Kaskaden wird das Signal von Rac und Cdc42, zwei Mitgliedern der Rho-Familie, die zur Ras-Superfamilie kleiner G-Proteine gehören [244], an GCK (Germinal center kinase) oder PAK (p21-activated kinase) weitergegeben [251].

PAK und GCK gehören zu einer Gruppe von Kinasen, die als MKKKK (Steril 20 Kinase Familie) klassifiziert werden können [251, 133] und zu denen auch HPK1, NIK und Krs-1 zählen [109]. PAK wurde als erstes Protein identifiziert, das mit Cdc42 und Rac in einer GTP-abhängigen Weise über das Cdc/Rac-interaktive Bindungsmotiv (CRIB) assoziiert [62]. Anders als bei c-Raf-1, bei welchem weitere Faktoren zusätzlich zur Ras-Bindung für eine volle Aktivierung erforderlich sind, wird die Kinaseaktivität von PAK alleine durch die physische Interaktion mit Cdc42-GTP oder Rac-GTP stimuliert. PAK kann sowohl den JNK- als auch den p38-Signalweg aktivieren, während GCK JNK-spezifisch ist. Beiden Kinasen konnten keine direkte Phosphorylierung oder Aktivierung von MKK4, MKK3 oder MKK6 nachgewiesen werden [62]. Es sind wahrscheinlich noch zusätzliche Faktoren in der Aktivierung der Kaskaden eingebunden. PAK kann z.B. an das Adaptorprotein Nck binden. Diese Assoziation stellt möglicherweise einen Mechanismus dar, mit dem PAK an die Plasmamembran und einem aktivierten Rezeptor rekrutiert und dort von Cdc42/Rac reguliert wird [62]. Kürzlich wurde gezeigt, daß neben Ras auch die Stimulation des PAK-Signalweges zur Aktivierung von c-Raf-1 beiträgt. PAK3 ist in der Lage, c-Raf-1 direkt zu phosphorylieren und es wird angenommen, daß PAK ein Kontrollpunkt ist, der Einfluß auf mehrere

Signalwege hat und eventuell eine wichtige Rolle in der Balance zwischen Proliferation und Apoptose spielt [129].

Rho-GTPasen sind nicht nur Regulatoren der Streß-Signalwege, sondern haben auch großen Einfluß auf die Formation des Aktin-Skeletts und vielen Aspekten der Zellform und -bewegung [219].

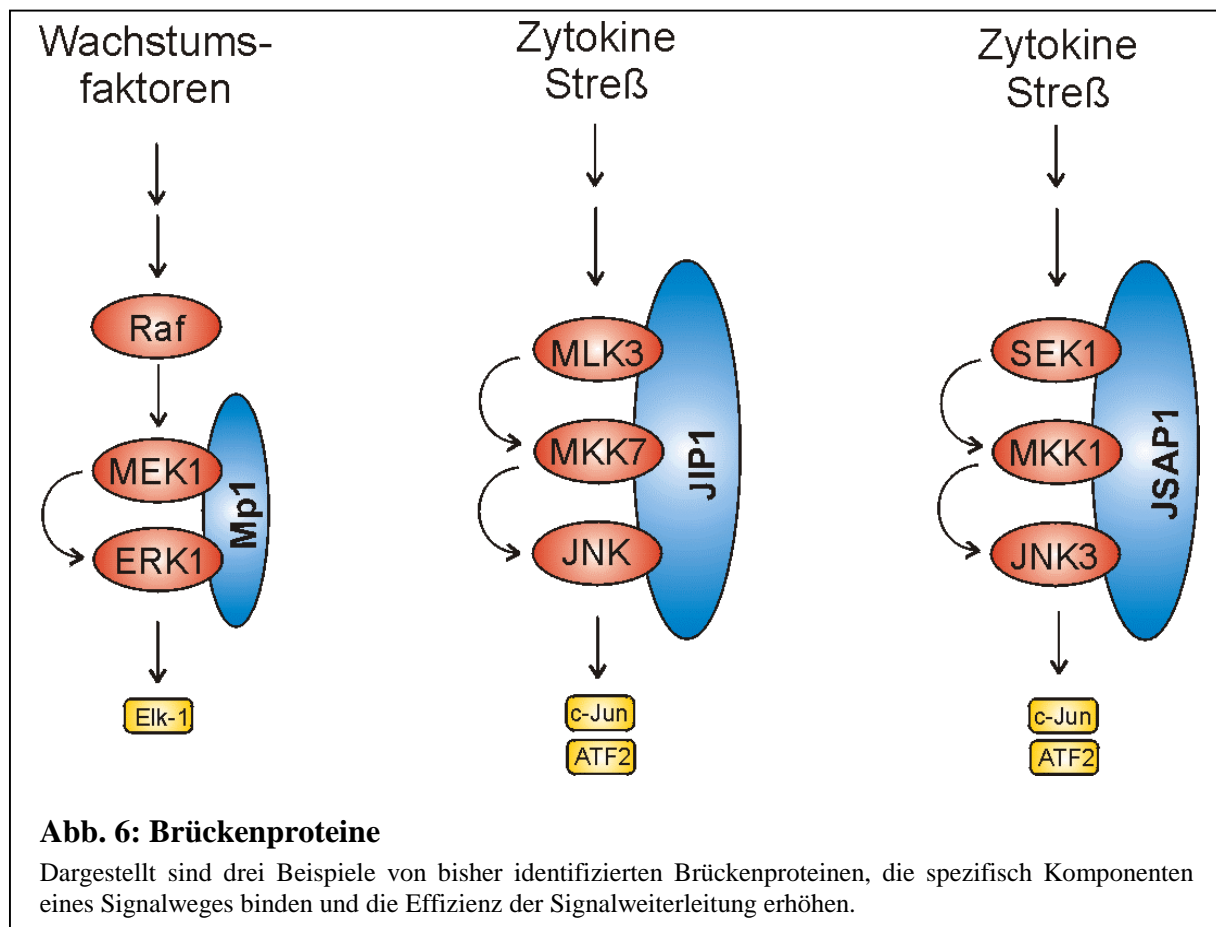
Im Kontrast zu den MAPK und den MKK haben die MKKK der JNK- und p38-Kinasekaskaden eine hoch divergente Struktur und Genzahl. Bis jetzt sind elf verschiedene Aktivatoren des JNK-Signalweges identifiziert worden [251]. Dazu gehören MEKK1 [136], MEKK2 [21], MEKK3 [21], MTK1/MKK4 [228, 69], Tpl-2/Cot [7, 205, 85], MUK/DLK/ZPK [96, 102, 194], MLK-2/MST [57, 97], MLK-3/SPRK/PTK-1 [186, 68, 113], TAK-1 [257], ASK-1/MAPKKK5 [246, 110] und ASK-2/MAPKKK6 [247]. MEKK1, MEKK2, MEKK3 und Cot spielen ebenfalls in der Aktivierung der klassischen Kinasekaskade eine Rolle, während TAK-1, ASK-1, MLK-3 und MTK-1 auch starke Aktivatoren der p38-Kaskade sind.

Die Zahl der MKKK und MKKKK ist sehr viel größer als die der MKK und MAPK. Der Grund könnte darin liegen, daß einige stromaufwärts liegende Kinasen Substrate aufweisen, die nicht zum MAPK-Modul gehören. So können zum Beispiel MEKK1 [169], MEKK2 und MEKK3 [267], Cot/Tpl-2 [20, 143] und TAK1 [173] NF- κ B aktivieren, indem gewisse Komponenten dieses Signalweges phosphoryliert werden. Die Divergenz der stromaufwärts liegenden Kinasen könnte von der Zelle auch dazu genutzt werden, um entsprechend auf die große Anzahl der extrazellulären Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine oder physiochemischen Streß zu reagieren.

3.1.3 Brückenproteine

Die Aktivierung eines MAPK-Signalweges führt normalerweise nicht zur Aktivierung anderer MAPK-Wege, auch wenn die betreffende Komponente in mehreren Signalkaskaden eine Rolle spielt. Es wird angenommen, daß verschiedene Signalmodule durch spezifische Interaktion von Mitgliedern einer Signalkaskade mit anderen Proteinen entstehen, die eine Art Brückenfunktion (Scaffold) haben. Diese Brückenproteine binden spezifisch an Komponenten eines Signalweges, so daß eine Interaktion der Kinasen erleichtert oder sogar erst ermöglicht wird. Ein Beispiel liefern die beiden bisher identifizierten Mitglieder der JIP-Gruppe (JNK-interacting protein) von Scaffoldproteinen, JIP1 [54] und JIP2 [262]. Beide Scaffoldproteine

können oligomäre Komplexe miteinander bilden und binden JNK, MKK7, MLK-3 und die mit Ste20 verwandte Proteinkinase HPK1 [252, 262]. JIP-Proteine vermitteln und verstärken spezifisch die Signaltransduktion von MLK, nicht aber die von MEK Kinasen [252, 262].



Vor kurzem wurde ein weiteres Scaffoldprotein identifiziert, das JSAP1 (JNK/SAPK-associated protein 1) genannt wurde [116]. Es bindet spezifisch JNK1, 2 und 3 (mit Präferenz für JNK3), MEKK1 sowie aktiviertes SEK1 und verstärkt die JNK3 Aktivierung [116].

Auch für die klassische Kinasekaskade wurde ein Brückenprotein entdeckt. MP1 (MEK Partner 1) bindet an MEK1 und ERK1 und ist dadurch in der Lage, die Aktivierbarkeit dieser Proteine durch Raf zu steigern. Die Isoformen MEK2 und ERK2 werden nicht von MP1 gebunden [212].

Kürzlich wurde gezeigt, daß 14-3-3 Proteine für die Stabilität sowohl der zytoplasmatischen, inaktiven, als auch der vollständig aktivierten Konformation von c-Raf-1 notwendig sind [238]. 14-3-3 Proteine scheinen ebenfalls als eine Art von Brückenprotein (→ 3.1.3) agieren zu können und vermitteln die Interaktion diverser Komponenten von Signaltransduktionswegen [84]. So wurde beschrieben, daß die Phosphatase CDC25A über 14-3-3ε-Dimere an c-Raf-1 binden kann [43]. Auch ein Komplex aus c-Raf-1 und der Kinase

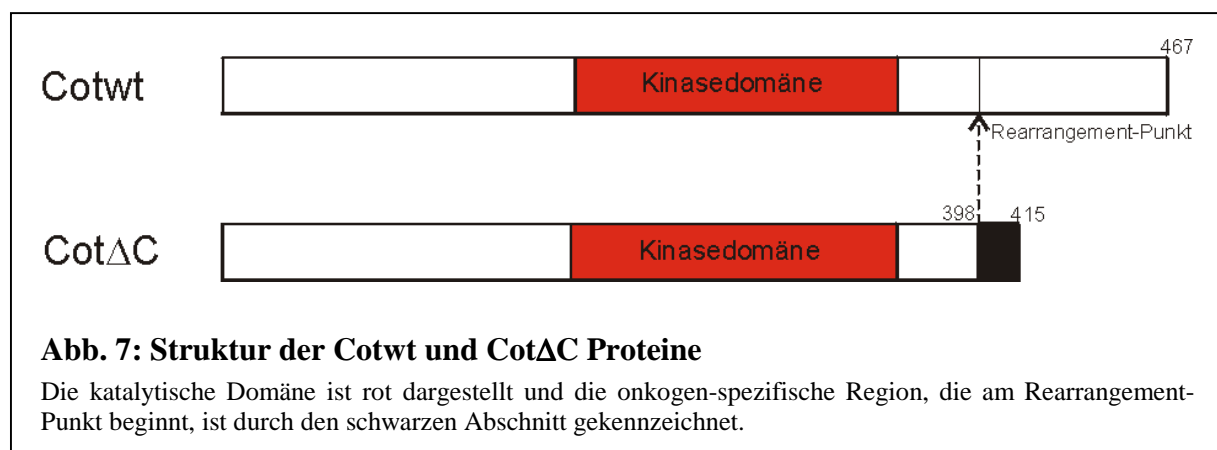
Bcr wird durch 14-3-3 β -Dimere ermöglicht [23]. Die genaue Funktion von 14-3-3 als Brückenprotein bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen.

Diese Beispiele zeigen, daß es Organismen möglich ist, Komponenten eines Signalweges mit anderen Faktoren zu kombinieren, um parallele Signalkaskaden für verschiedene Antworten auf unterschiedliche Signale auszubilden.

3.2 Die Serin/Threonin Kinasen Cot und Tpl-2

Die Serin/Threonin Kinase Cot wurde ursprünglich aus embryonalen Hamster-SHOK-Zellen (Syrian hamster Osaka Kanazawa) kloniert, die durch Transfektion mit genomischer DNA einer menschlichen Schilddrüsentumor-Zelllinie transformiert waren [161]. Sie zeigt sowohl in NIH3T3-Zellen als auch in SHOK-Zellen eine transformierende Wirkung [161, 85]. Die Aktivierung von Cot scheint das Ergebnis eines 3'-Rearrangements im letzten kodierenden Exon zu sein. Das für das onkogene Potential verantwortliche DNA-Rearrangement ereignete sich während der Transfektion in die SHOK-Zellen und ist nicht für den ursprünglichen Schilddrüsentumor verantwortlich [161]. In einem Immunkomplex-Kinase-Assay konnte die Kinaseaktivität von Cot nachgewiesen werden [161].

Eine weitere Isolierung von Cot erfolgte in Transfektionsexperimenten mit cDNA einer Ewing sarcoma Zelllinie mit NIH3T3-Zellen. Dieses Onkogen wurde *est* (Ewing sarcoma transformant) genannt [32]. Das humane Proto-Onkogen *cot* (*est*) hat einen offenen Leserahmen, der für 467 Aminosäuren codiert. Die ersten 397 Aminosäuren sind identisch mit dem onkogenen Cot, bei dem die 70 carboxyterminalen Aminosäuren durch 18 völlig andere ersetzt sind (Abb. 7) [8]. Durch den veränderten Carboxyterminus im onkogenen Cot ist die negative Regulation wahrscheinlich gestört, so daß die Kinase ständig aktiv ist [8].



Es existieren zwei verschiedene Cot-Formen, ein 46 kDa- und ein 52 kDa-Protein, welche vorwiegend im Zytosol lokalisiert sind. Sie unterscheiden sich in ihren aminoterminalen Strukturen, die aus einer alternativen Initiation der Translation resultieren [7, 161]. Beide zeigen Autophosphorylierungsaktivität an Serinresten, weshalb die entstehenden Phosphoproteine ein höheres Molekulargewicht aufweisen und nun als 52- bzw. 58 kDa-Phosphoproteine detektiert werden können [8]. Das 52 kDa-Phosphoprotein ist stabiler als das 58 kDa-Phosphoprotein. Der aminoternale Teil könnte daher für die Regulation der Stabilität der Proteine wichtig sein [8].

Durch Untersuchungen von Moloney murine leukemia Virus (MoMuLV) induzierten T-Zell-Lymphomen in Ratten wurde das Ratten-Homolog des *cot* Gens, *tpl-2*, entdeckt [178]. Sequenzvergleiche ergaben eine Homologie zwischen beiden Proteinen von über 90 % [205]. Während der Tumorprogression ereignen sich eine steigende Anzahl von Provirusintegrationen in das Rattengenom. Das *tpl-2*-Gen (Tumor progression locus 2) ist ein häufiges Ziel dieser Proviren. Eine Provirusintegration zieht die Aktivierung dieses Gens nach sich. 22,5 % der durch MoMuLV-induzierten Tumore tragen ein Genrearrangement im *tpl-2*-Lokus [178]. Es entsteht verstärkt eine stabile mRNA, die am 5'-Ende mit der proviralen LTR endet und für ein Protein kodiert, dem am C-Terminus 43 Aminosäuren fehlen. Diese Aminosäuren des letzten Exons sind durch 7 Aminosäuren aus dem vorhergehenden Intron ersetzt worden, weil kein Splicen erfolgen konnte. Die Verkürzung des Tpl-2-Proteins ist wahrscheinlich für sein onkogenes Potential verantwortlich. Wie bereits erwähnt, könnte der fehlende C-Terminus in die Regulation der Kinase involviert sein. *tpl-2* ist ebenfalls bei der Provirusinsertion in MMTV-induzierten (mouse mammary tumor virus) Maus-Brustkarzinomen betroffen. Die Integrationsstelle des MMT-Virus befindet sich ähnlich wie beim MoMuL-Virus zwischen Exon 7 und Exon 8 des *tpl-2*-Gens, so daß dieses unterbrochen und verstärkt exprimiert wird [60].

Cot/Tpl-2 wird in den meisten Geweben nur in geringen Mengen exprimiert [174, 60]. ISH-Histochemie-Analysen (*in situ*-Hybridisierung) an einer Serie von Zelllinien und Tumorgeweben zeigte, daß Cot in verschiedenen Typen von Drüsenzellen exprimiert wird und eventuell in sekretorischen Prozessen involviert sein könnte. Zu diesen Drüsentypen gehören submandibulare und sublinguale Speicheldrüsen, Ohrspeicheldrüsen, sowie sekretorische Drüsenzellen im Magen und im Dickdarm. Cot wird nur in morphologisch differenzierten und funktional aktiven Zellen dieser Typen exprimiert. In den Adenokarzinomzelllinien SW40 und WiDr konnte ebenfalls eine hohe Cot-Expression festgestellt werden [174]. Auch in humanem Brustkrebs konnte eine Cot/Tpl-2

Überexpression und Genamplifikation festgestellt werden, welches ein frühes Ereignis in der Entwicklung dieser Krankheit sein könnte [222]. Die Hauptexpressionsorte von Tpl-2 sind Milz, Thymus und Lungengewebe. In normalen T-Zellen trägt Tpl-2 zu den frühen Ereignissen der Mitogen-induzierten Aktivierung bei [178].

Signaltransduktion durch Proteinkinasen ist ein evolutionär sehr ursprünglicher Prozeß. Nicht nur Eukaryoten zeichnen sich durch diverse Proteinkinasen aus, auch in Pflanzen, Pilzen und Prokaryoten wurden Proteinkinasen entdeckt. Studien an den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* haben dazu beigetragen, Proteinkinasen zu identifizieren und ihre Funktion in der Zelle zu charakterisieren. In vielen Fällen wurden homologe Kinasen in Vertebraten gefunden, was bestätigt, daß Proteinphosphorylierungssignalwege, die basale Aspekte der Zellphysiologie regulieren, sich auch während der eukaryotischen Evolution behauptet haben. Es kann angenommen werden, daß Proteinkinasen, die nahe verwandte katalytische Domänen haben und somit eine Familie bilden, Genprodukte repräsentieren, die sich phylogenetisch erst kürzlich voneinander getrennt und vergleichbare Funktionen haben [88].

Die Proteinkinase Cot kann zwar keiner der bis jetzt definierten Familien zugeordnet werden, hat aber in ihrer Kinasedomäne eine Serie von kurzen Sequenzmotiven, die hochkonserviert sind. Ein Vergleich dieser Sequenzen mit denen von anderen Proteinkinase-Familien, zeigt eindeutig eine Zugehörigkeit zu den Serin/Threonin Kinasen [161]. Cot weist z.B. 48 % Ähnlichkeit zu c-Raf-1, 56 % zu MEKK und den homologen Kinasen in *S. pombe* (BYR2) und *S. cerevisiae* (BCK) und 54 % Ähnlichkeit zu STE11 auf, einer MKKK der Hefe *S. cerevisiae*, die in einem MAPK-Signalweg die Antwort auf Pheromone reguliert [251].

3.3 Gegenstand der Arbeit

Die unter 3.2 beschriebenen phylogenetischen Analysen geben bereits erste Hinweise, daß Cot als MKKK einzuordnen ist und eventuell bei der Signalweiterleitung in MAPK-Kaskaden eine Rolle spielt. Vorarbeiten im Labor von Ulf R. Rapp haben auf eine mögliche Beteiligung von Cot in der Aktivierung der klassischen zytoplasmatischen Kaskade hingewiesen. Cotransfektionsexperimente mit onkogenem Cot und HA-ERK-1 in 293 Zellen zeigten eine Aktivierung von ERK-1, die aber durch die dominant negative c-Raf-1-Mutante C4 inhibiert werden konnte. Weitere Experimente zeigten, daß Transformation von NIH3T3-Fibroblasten durch ein retrovirales, aktives Cot-Konstrukt zur Hyperphosphorylierung von c-Raf-1 führt [233]. Diese Ergebnisse weisen auf eine funktionale Interaktion zwischen Cot und c-Raf-1 hin

und lassen auch die Schlußfolgerung zu, daß Cot eine c-Raf-1-Kinase sein könnte. Diese Vermutung steht allerdings im Widerspruch zu den Ergebnissen phylogenetischer Sequenzvergleiche (→ 3.2). In Weiterführung dieser Projekte sollte versucht werden, die zu Beginn dieser Dissertation noch weitgehend unbekannt Funktionen der Serin/Threonin Kinase Cot im Detail zu charakterisieren. Es wurde die Beteiligung von Cot an verschiedenen Signaltransduktionsprozessen, die mögliche Abhängigkeit von c-Raf-1 sowie der Einfluß von Cot-Expression auf Morphologie, Metabolismus und Differenzierungsstatus von Zellen untersucht. Weiterhin wurde das Transformationspotential des *cot*-Onkogens in Versuchstieren *in vivo* aufgeklärt.

Ein zusätzlicher Aspekt dieser Dissertation war die Suche nach neuen Interaktionspartnern von Cot sowie weiterführende Untersuchungen über deren Einfluß auf die Regulation und Signalweiterleitung der Kinase.