

Identifizierung von Signaltransduktionskomponenten des Latenten Membranproteins 1 des Epstein-Barr Virus

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilian-Universität München

von

Ute Schultheiß

eingereicht am 25. Oktober 2001

**Identifizierung von Signaltransduktionskomponenten
des Latenten Membranproteins 1
des Epstein-Barr Virus**

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilian-Universität München

von

Ute Schultheiß

Dissertation eingereicht am 25.10.2001

Erstgutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachter: Prof. Dr. Walter Schartau

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2002

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Schultheiss, U., Puschner, S., Kremmer, E., Mak, T.W., Engelmann, H., Hammer-schmidt, W. und Kieser, A. (2001) TRAF6 is a critical mediator of signal transduction by the viral oncogene latent membrane protein 1. *EMBO J.*, **20**, 5678-5691.

*für meine Eltern
und
Reiner*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das Epstein Barr Virus (EBV) und seine Latenz	1
1.2. Das latente Membranprotein 1 (LMP1) von EBV	3
1.2.1. Transformierende Eigenschaften von LMP1	3
1.2.2. Der strukturelle Aufbau des LMP1-Moleküls	6
1.2.3. Signaltransduktion durch LMP1	8
1.3. Signaltransduktion durch MAPKs	12
1.4. Aufgabenstellung	16
2. Material	17
2.1. Antikörper	17
2.2. Plasmide	18
2.3. Oligonukleotide	21
2.4. Zelllinien und Bakterien	22
2.5. Chemikalien, Enzyme, Geräte und Sonstiges	23
3. Methoden	25
3.1. Bakterienkultur	25
3.1.1. Vermehrung und Aufbewahrung	25
3.1.2. Transformation von <i>E.coli</i>	25
3.2. Zellkultur	26
3.2.1. Zellkulturbedingungen	26
3.2.2. Aufbewahrung von Zelllinien	27
3.2.3. Transfektion	27

3.3. DNA-Arbeitstechniken	28
3.3.1. Plasmid-Schnellaufreinigung	28
3.3.2. Präparative Plasmidreinigung	28
3.3.3. PCR zur Klonierung von HA-Fusionsproteinen.....	29
3.3.4. Mutations-PCR zur Klonierung von HA-JNK1(D169A) und HA-JNK2(D169A).....	29
3.3.5. Sonstige.....	30
3.4. Protein-Arbeitstechniken	31
3.4.1. Immunoblot Analyse	31
3.4.2. Immunpräzipitation	32
3.4.3. Immunkomplex-Kinaseversuch	33
3.4.4. Luziferase-Reportergen Versuche.....	35
3.5. Fluoreszenzmikroskopie	36
4. Ergebnisse	37
4.1. Charakterisierung des LMP1-induzierten p38 MAPK Signalweges	37
4.1.1. LMP1 induziert p38 MAPK über einen TRAF6-abhängigen Signalweg.....	38
4.1.2. Die ektopische Expression von TRAF6 ermöglicht die Aktivierung von p38 MAPK durch LMP1 in TRAF6 -/- Fibroblasten	41
4.1.3. MKK6 vermittelt die Signalübertragung von LMP1 zu p38 MAPK.....	43
4.1.4. Identifizierung der für die Aktivierung von p38 MAPK essentiellen LMP1-Domänen	45
4.1.5. Die Rolle von TRAF6 bei der Aktivierung von NF- κ B durch LMP1.....	47
4.1.6. TRAF6 ist nicht in der Aktivierung von JNK1 durch LMP1 involviert.....	49
4.1.7. TRADD vermittelt die Aktivierung von p38 MAPK durch LMP1	50
4.2. Untersuchung von Protein-Phosphorylierungsmustern in B-Zellen mit Hilfe eines konditionalen LMP1-Derivats	52
4.3. Charakterisierung der LMP1-vermittelten JNK2-Aktivierung	57
4.3.1. Phosphorylierung von JNK2 nach Induktion von NGF-R:LMP1-Aktivität in B-Zellen	57
4.3.2. LMP1 aktiviert HA-JNK2	59
4.3.3. Charakterisierung der JNK2-Aktivierungsdomäne von LMP1	61

4.3.4.	Konstruktion von dominant-negativen JNK1 und JNK2-Mutanten	62
4.3.5.	Inhibition von LMP1-induzierter AP-1-Aktivität durch dominant-negative HA-JNK1 und HA-JNK2-Mutanten	66
4.4.	Untersuchungen zum Einfluß der LMP1-Aktivität auf das p53 Tumorsuppressorprotein.....	67
4.4.1.	Die Induktion von NGF-R:LMP1-Aktivität in B-Zellen führt zu einem Abbau von p53 Protein.....	68
4.4.2.	NGF-R:LMP1-Aktivität bewirkt den Abbau von p53 Protein auch in Anwesenheit p53-stabilisierender Faktoren.....	71
4.4.3.	Transiente Expressionsanalyse von HA-p53 Wildtyp und HA-p53ΔI in HEK 293- Zellen	72
4.4.4.	NGF-R:LMP1-Aktivität vermittelt den Abbau von HA-p53 und HA-p53ΔI in HEK 293-Zellen	76
5.	<i>Diskussion</i>	78
5.1.	Die Rolle von TRAF6 in der Signaltransduktion von LMP1.....	78
5.2.	Der Effekt eines konditionalen LMP1-Derivats auf das Phosphorylierungsmuster von Signalproteinen in B-Zellen	84
5.3.	Die Aktivierung von JNK2 durch LMP1.....	86
5.4.	Der Effekt von LMP1 auf das p53-Tumorsuppressorprotein	89
6..	<i>Zusammenfassung</i>.....	95
7.	<i>Abkürzungen</i>	96
8.	<i>Literatur</i>.....	98

1. Einleitung

1.1. Das Epstein Barr Virus (EBV) und seine Latenz

Das Epstein-Barr Virus (EBV) ist ein humanes Gamma-Herpesvirus mit doppelsträngigem DNA-Genom, mit dem über 90% der Weltbevölkerung latent infiziert sind. EBV ist ätiologisch eng mit einer Reihe von humanen Krebserkrankungen assoziiert, wie z.B. dem Burkitt Lymphom, dem Hodgkin Lymphom, dem Nasopharynx-Karzinom und post-Transplantationslymphoproliferativen Erkrankungen (Übersichtsartikel: Kieff, 1996; Rickinson und Kieff, 1996). EBV ist in der Lage, humane B-Zellen *in vivo* und *in vitro* sehr effizient zu infizieren und dabei zu immortalisieren.

Nach der oft asymptomatischen Primärinfektion über Epithelzellen des Nasen-Rachenraums infiziert und immortalisiert das Virus Zellen des B-Zell-Kompartiments. Im gesunden Menschen werden EBV-immortalisierte proliferierende B-Lymphozyten durch die zytotoxischen T-Zellen des Immunsystems eliminiert, weshalb eine EBV-Infektion in der Regel nicht zur Entwicklung von lymphoproliferativen Erkrankungen führt (Khanna *et al.*, 1995). Letztendlich persistiert das Virus lebenslanglich in episomaler Form in ruhenden Gedächtnis-B-Zellen des Trägers (Miyashita *et al.*, 1997; Babcock *et al.*, 1999). Durch eine Beeinträchtigung der Funktion des Immunsystems, wie im Fall einer fortgeschrittenen HIV-Infektion oder bei immunsupprimierten Transplantationspatienten, kann es jedoch zur Entwicklung von EBV-assoziierten immunoblastischen Lymphomen kommen (Kieff, 1996; Rickinson und Kieff, 1996). Immortalisierte B-Lymphozyten sind latent mit EBV infiziert und eine Virusproduktion findet nicht statt. Die Faktoren, die zur Reaktivierung des latenten EBV und zum Übergang in den lytischen Infektionszyklus führen, sind bisher wenig definiert.

Als *in vitro* Modell für die latente EBV-Infektion dienen lymphoblastoide Zelllinien, sogenannte LCLs („lymphoblastoid cell lines“), die durch Immortalisierung primärer B-Zellen mit EBV *in vitro* etabliert werden können (Thorley-Lawson und Mann, 1985). In LCLs wird nur ein Teil der über 80 EBV-kodierten Gene exprimiert (Übersichtsartikel: Young *et al.*, 2000).

Diese Gene kodieren für die EBV nukleären Antigene EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C und EBNA-LP sowie für die drei latenten Membranproteine LMP1, 2A und 2B. Zusätzlich wurde in LCLs auch die Expression von kleinen, nicht-adenylierten RNAs, EBER1 und 2, nachgewiesen. Nicht alle der genannten Gene sind absolut notwendig für den Prozeß der B-Zell Immortalisierung durch EBV. EBERs und EBNA3B sind verzichtbar, EBNA-LP, LMP2A und B verbessern lediglich die Effizienz der Immortalisierung (Übersichtsartikel: Young *et al.*, 2000). Die molekularen Funktionen der für die Immortalisierung essentiellen Gene werden im Folgenden kurz charakterisiert.

EBNA1 ist ein DNA-bindendes Kernprotein, das eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der latenten Phase spielt. Es bindet an den latenten Replikationsursprung der viralen DNA (oriP) und vermittelt die Rekrutierung des zellulären „origin recognition complex“ (ORC) an oriP (Chaudhuri *et al.*, 2001; Schepers *et al.*, 2001). Zudem ist EBNA1 für die korrekte Segregation der EBV-Episomen bei der Zellteilung verantwortlich (Yates *et al.*, 1985; Aiyar *et al.*, 1998). Damit ist EBNA1 für die Integrität der EBV-DNA während der Latenz essentiell. Eine besondere Eigenschaft von EBNA1 ist seine nahezu fehlende Immunogenizität. Glycin-Alanin-Wiederholungen innerhalb des EBNA1 Proteins inhibieren die Degradation von EBNA1 durch das Proteasom und damit die Präsentation von EBNA1-Antigenen auf der Zelloberfläche durch den MHC Klasse I-Weg (Levitskaya *et al.*, 1995; Levitskaya *et al.*, 1997).

EBNA2 wirkt als Koaktivator bei der Transkription von zellulären und viralen Genen. EBNA2 induziert die Expression der B-Zell Aktivierungsmarker CD23 und CD21 (Calender *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1990), der zellulären Tyrosinkinase c-fgr (Knutson, 1990), der viralen Gene LMP1, 2A und B und des viralen C-Promotors (Cp) (Abbot *et al.*, 1990; Sung *et al.*, 1991; Zimmer-Strobl *et al.*, 1991; Jin und Speck, 1992). EBNA2 bindet jedoch nicht direkt an DNA, sondern wird durch Interaktion mit dem zellulären Transkriptionsfaktor RBP-J κ (Rekombinationssignal-Bindeprotein-J κ) an Promotorsequenzen rekrutiert (Grossman *et al.*, 1994; Henkel *et al.*, 1994; Waltzer *et al.*, 1994). EBNA2 interagiert zudem mit dem Transkriptionsfaktor PU.1, der für die Transaktivierung von LMP1 durch EBNA2 benötigt wird

(Laux *et al.*, 1994; Johannsen *et al.*, 1995). Kürzliche Veröffentlichungen zeigen die Regulation des Onkogens c-myc durch EBNA2 und eine wichtige Bedeutung dieses Effekts für die EBV-vermittelte B-Zell Proliferation (Jayachandra *et al.*, 1999; Kaiser *et al.*, 1999).

Aus der Familie der viralen EBNA3-Gene sind nur EBNA3A und C essentiell für die *in vitro* Immortalisierung von B-Zellen durch EBV (Tomkinson *et al.*, 1993). Die nukleären Proteine EBNA3B und EBNA3C sind an der transkriptionellen Regulation viraler und zellulärer Gene beteiligt (Wang *et al.*, 1990; Allday *et al.*, 1993; Silins und Sculley, 1994). Alle EBNA3 Proteine können mit RBP-J κ assoziieren und verhindern damit die Bindung des EBNA2/RBP-J κ -Komplexes an DNA (Robertson *et al.*, 1995). Die Inhibition EBNA2-vermittelter Transkription durch EBNA3 bewirkt eine Feinregulation zellulärer und viraler Promotoren, die eine J κ -Erkennungssequenz enthalten. Weitere Funktionen der EBNA3 Proteine neben ihrer negativ regulatorischen Funktion werden vermutet. So ist beispielsweise EBNA3C in der LMP1-Induktion durch EBNA2 und PU.1 involviert (Zhao und Sample, 2000). Zudem wurde eine Inaktivierung des Retinoblastom-Tumorsuppressorproteins (Rb) durch Interaktion mit EBNA3C beobachtet, was möglicherweise zur Steigerung der Immortalisierungseffizienz durch EBV beiträgt (Parker *et al.*, 1996).

Auf die Struktur und Funktion des LMP1 Onkogens von EBV soll im Folgenden genauer eingegangen werden, da die Signaltransduktion durch LMP1 Gegenstand der experimentellen Arbeit der vorliegenden Doktorarbeit war.

1.2. Das latente Membranprotein 1 (LMP1) von EBV

1.2.1. Transformierende Eigenschaften von LMP1

Die konstitutive Expression von LMP1 ist für die Proliferation EBV-immortalisierter B-Zellen essentiell (Kilger *et al.*, 1998). Die Expression von LMP1 ist in EBV-infizierten

B-Zellen fast aller EBV-assoziiierter Erkrankungen nachweisbar (Rickinson und Kieff, 1996). LMP1 konnte als echtes virales Onkogen identifiziert werden, was dessen prominente Rolle bei der Entwicklung von EBV-assoziierten Krebserkrankungen unterstreicht. Die Expression von LMP1 in Nagerfibroblasten führt zu charakteristischen Merkmalen der onkogenen Zelltransformation wie Verlust der Kontaktinhibition und Wachstum unter geringen Serumbedingungen (Wang *et al.*, 1985). Darüber hinaus führt die exogene Expression von LMP1 in transgenen Mäusen zur Entwicklung von B-Zell Lymphomen (Kulwicht *et al.*, 1998), was das onkogene Potential von LMP1 auch *in vivo* bestätigte.

Die onkogenen Effekte von LMP1 sind zumindest teilweise auf die Aktivierung anti-apoptotischer Gene wie Bcl-2, A20, Mcl-1 und Bfl-1 zurückzuführen (Henderson *et al.*, 1991; Laherty *et al.*, 1992; D'Souza *et al.*, 2000). Eine weitere Funktion von LMP1 bei der EBV-vermittelten B-Zellproliferation liegt in der Expressionsinduktion der Zytokine IL-6, IL-8 und IL-10 (Nakagomi *et al.*, 1994; Eliopoulos *et al.*, 1997; Eliopoulos *et al.*, 1999). Daneben aktiviert LMP1 Gene für Faktoren der Antigen-Prozessierung, für Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und LFA-3 (Wang *et al.*, 1990; Rowe *et al.*, 1995) und für B-Zell Aktivierungsmarker wie CD21, CD23, CD39, CD40 und CD58 (Wang *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1990; Peng und Lundgren, 1993; Huen *et al.*, 1995). In ruhenden B-Zellen kann LMP1 DNA-Synthese und den Eintritt der Zellen aus der G₀-Phase in den Zellzyklus induzieren (Peng und Lundgren, 1992). Untersuchungen in epithelialen Zelllinien zeigten, daß eine Expression von LMP1 zur morphologischen Transformation und zur Inhibition der normalen Zelldifferenzierung führt (Dawson *et al.*, 1990; Fahraeus *et al.*, 1990). In Epithelzellen werden unter anderem die Gene für den Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor („epidermal growth factor receptor“, EGFR) (Miller *et al.*, 1997) und die Matrix Metalloprotease MMP-9 (Yoshizaki *et al.*, 1998; Takeshita *et al.*, 1999) durch LMP1 aktiviert. EGFR und MMP9 sind an der Tumorentwicklung bzw. Metastasierung beteiligt. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß LMP1 ein multifunktionales und potentes Onkoprotein ist, das im Zusammenhang mit EBV-assoziierten Krebserkrankungen eine wichtige Rolle spielt.

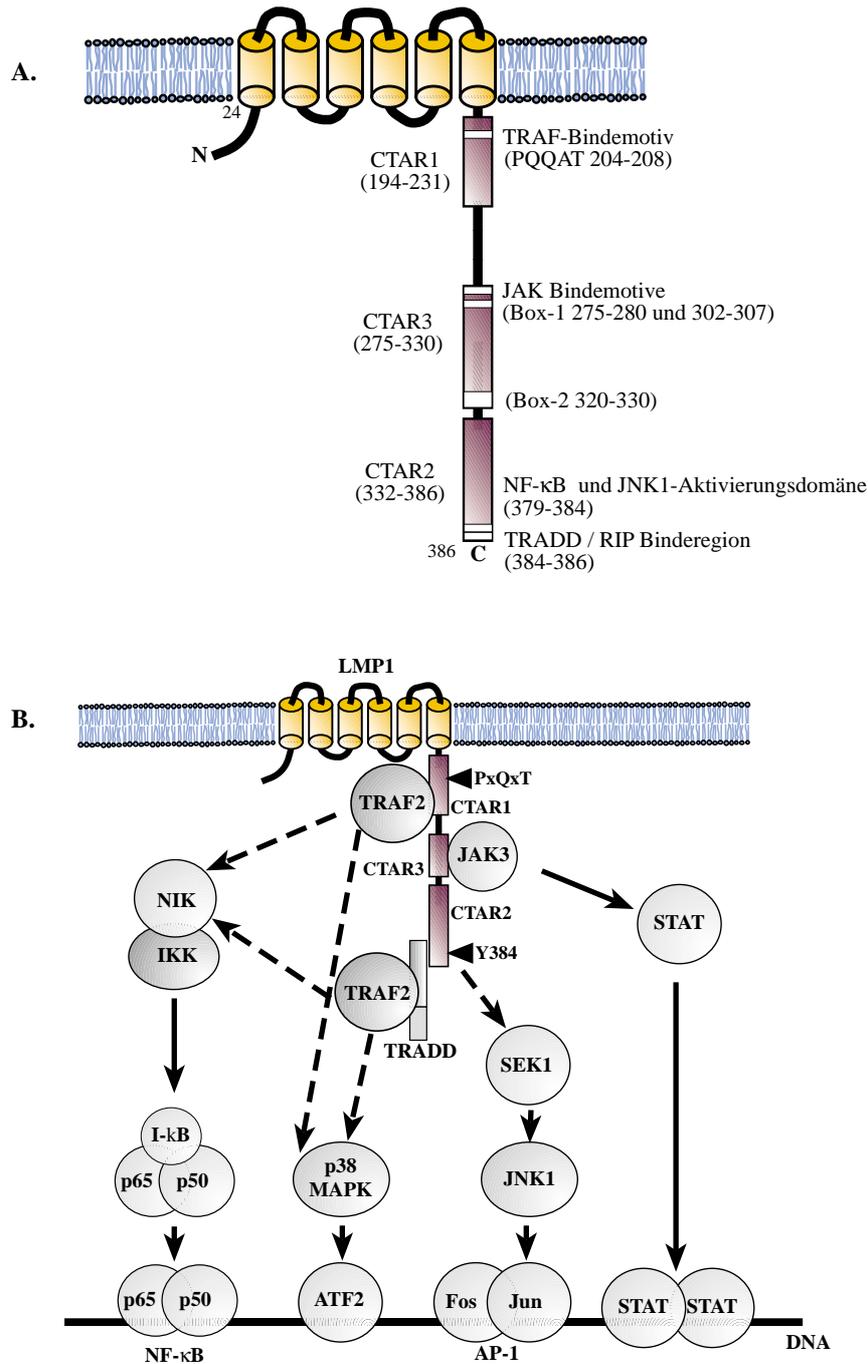


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des LMP1-Moleküls mit Signaldomänen und induzierten Signalwegen. Das LMP1-Molekül besteht aus einem kurzen N-Terminus (24 Aminosäuren (As)), sechs Transmembrandomänen (161 As) und einem langen C-Terminus (200 As). Der C-Terminus umfaßt die drei funktionale Domänen CTAR1, 2 und 3, die für die Bindung von Signalmolekülen und somit für die Aktivierung von Signalkaskaden essentiell sind. TRAF-Moleküle binden an das PxQxT-Motiv innerhalb von CTAR1. Für die Interaktion von TRADD und RIP mit LMP1 sind die As 384-386 essentiell. Die Aktivierung von NF-κB wird von CTAR1 und CTAR2 vermittelt, während für die Induktion von JNK1/AP-1 nur CTAR2 verantwortlich ist. CTAR3 beinhaltet zwei Box-1-Motive und ein Box-2-Motiv, die für die Bindung bzw. die Aktivierung von JAK3 essentiell sind. Die Bindung von JAK3 an LMP1 führt zur Aktivierung von STAT Proteinen. Die Zahlen stehen für die Positionen der Aminosäuren im LMP1-Molekül (Abb. modifiziert nach A. Kieser).

1.2.2. Der strukturelle Aufbau des LMP1-Moleküls

Das 63 kD große Transmembranprotein LMP1 besteht aus einem zytoplasmatischen N-Terminus (Aminosäuren (As) 1 bis 24), sechs hydrophoben Transmembrandomänen (As 25 bis 186) und einer ebenfalls zytoplasmatischen C-terminalen Domäne (As 187-386), die für die Induktion von Signaltransduktionsvorgängen verantwortlich ist (Liebowitz *et al.*, 1986; Kieff, 1996) (s. Abb. 1.1).

Die Transmembrandomänen von LMP1 sind für die spontane Zusammenlagerung (Autoaggregation) von LMP1-Molekülen in der Plasmamembran verantwortlich. Diese Oligomerisierung von LMP1-Molekülen ist notwendige und hinreichende Voraussetzung, um am 200 As langen C-Terminus Signaltransduktionsvorgänge auszulösen (Liebowitz *et al.*, 1986). Dies bedeutet, daß LMP1 für seine Aktivität keinen Liganden benötigt. LMP1 entspricht damit funktional einem konstitutiv aktiven Rezeptor (Floettmann und Rowe, 1997; Gires *et al.*, 1997).

Der N-Terminus von LMP1 ist für die korrekte Insertion des Moleküls in die Membran und für Interaktionen mit dem Zytoskelett essentiell (Liebowitz *et al.*, 1987; Izumi *et al.*, 1994; Coffin *et al.*, 2001). Da eine zu hohe Expression von LMP1 zytotoxische Effekte zeigt (Hammerschmidt *et al.*, 1989), ist ein regulierter Abbau von LMP1 notwendig. Der N-Terminus von LMP1 wird ubiquitiniert, was in einer kurzen Halbwertszeit und einer kontrollierten Degradation von LMP1-Molekülen über das Proteasom resultiert (Aviel *et al.*, 2000). Die Grundlage für den toxischen Effekt bei starker Überexpression ist noch unklar, basiert jedoch eindeutig nicht auf Apoptose (Izumi *et al.*, 1999b). Kürzlich wurde gezeigt, daß der N-Terminus und die Transmembrandomänen zusammen für eine Lokalisation von LMP1 in Mikrodomänen der Plasmamembran, den sogenannten „Rafts“, verantwortlich sind (Kaykas *et al.*, 2001). Rafts sind cholesterin- und sphingolipidreiche Bereiche der Plasmamembran, in denen vermehrt Moleküle vorliegen, die an Signaltransduktionsvorgängen beteiligt sind (Simons und Ikonen, 1997). Die Lokalisation von LMP1 in solchen signalaktiven Mikrodo-

mänen der Plasmamembran unterstreicht den Charakter von LMP1 als konstitutiv aktiven Rezeptor.

Der C-Terminus von LMP1 (As 187-386) umfaßt zwei funktionale Domänen, die sogenannten C-terminalen Aktivierungsregionen 1 und 2 (CTAR1 und 2) (s. Abb. 1.1), die durch Mutationsanalysen charakterisiert wurden. Die N-terminalen 231 Aminosäuren von LMP1 sind für eine initiale Immortalisierung von B-Zellen durch EBV ausreichend (Kaye *et al.*, 1995; Kaye *et al.*, 1999), wobei die Aminosäuren 194 bis 231 (CTAR1) essentiell sind. Die Deletion der Aminosäuren 332 bis 386 (CTAR2) erlaubt zwar immer noch eine Immortalisierung von primären B-Lymphozyten, verhindert jedoch das Auswachsen der Zellen über einen längeren Zeitraum (Kaye *et al.*, 1995; Izumi *et al.*, 1997; Kaye *et al.*, 1999). Offensichtlich ist CTAR1 für die Initiation der Immortalisierung essentiell, während CTAR2 durch Wachstumsfaktor-ähnliche Effekte für die Aufrechterhaltung des immortalisierten Phänotyps verantwortlich ist.

Intensive molekularbiologische Studien haben in der Folge ergeben, daß die CTAR-Domänen als Plattform für die Bindung von Proteinen dienen, die Signaltransduktionsvorgänge initiieren. CTAR1 und 2 induzieren den Transkriptionsfaktor NF- κ B über den I- κ B Kinase (IKK)-Signalweg (Huen *et al.*, 1995, Sylla *et al.*, 1998 ; Mitchell und Sugden, 1995a), wobei CTAR2 die prädominante NF- κ B Aktivatorregion ist (Huen *et al.*, 1995; Mitchell und Sugden, 1995b). Siebzig Prozent der NF- κ B-Aktivität wird durch CTAR2 induziert, während die übrigen 30 % von CTAR1 ausgehen. NF- κ B ist unter anderem für die Aktivierung der anti-apoptotischen Gene A20 und bcl-2 durch LMP1 verantwortlich (Henderson *et al.*, 1991; Laherty *et al.*, 1992).

Das transformierende Potential von LMP1 kann jedoch nicht nur auf der Aktivierung von NF- κ B basieren, da BALB/3T3-Zellen durch LMP1-Expression transformiert werden, ohne NF- κ B zu induzieren (Baichwal und Sugden, 1988; Mitchell und Sugden, 1995b). Auf der Suche nach Signalwegen, die den Wachstumsfaktor-ähnlichen Effekt von LMP1 erklären könnten, wurde 1997 der Transkriptionsfaktor AP-1, ein Dimer aus Jun/Jun bzw. Jun/Fos Proto-Onkoproteinen, als durch LMP1 induziert identifiziert (Kieser *et al.*, 1997). AP-1 wird

über die c-Jun N-terminale Kinase 1 (JNK1) allein durch CTAR2 aktiviert (Kieser *et al.*, 1997; Eliopoulos und Young, 1998; Kieser *et al.*, 1999). Die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 könnte die proliferativen Effekte von CTAR2 des LMP1-Moleküls erklären.

Ein weiterer Signalweg, der durch LMP1 aktiviert werden kann, ist der p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Weg, der eine Rolle bei der LMP1-vermittelten Induktion von IL-6 und IL-8 spielt (Eliopoulos *et al.*, 1999, Vockerodt *et al.*, 2001) (siehe auch Abschnitt 1.2.4.). Erste Daten liefern Hinweise darauf, daß CTAR1 und 2 auch für die Aktivierung von p38 MAPK notwendig sind (Eliopoulos *et al.*, 1999).

Eine dritte Aktivierungsdomäne liegt zwischen CTAR1 und CTAR2 und ist für die Induktion der Janus Kinase 3 (JAK3) Signalkaskade verantwortlich, die zur Aktivierung von STAT Transkriptionsfaktoren („signal transducers and activators of transcription“) führen (Gires *et al.*, 1999). Dieser Signalweg ist an der Kontrolle der Zellproliferation beteiligt (Übersichtsartikel: Briscoe *et al.*, 1996). In Analogie zu CTAR1 und 2 wurde diese Domäne CTAR3 genannt. Eine Rolle für JAK3/STAT in der biologischen Funktion von LMP1 konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden (Izumi *et al.*, 1999a).

Die oben beschriebene Struktur von LMP1 ist für die transformierenden Effekte von LMP1 verantwortlich. Eine kürzlich veröffentlichte Analyse von mehreren natürlich vorkommenden LMP1-Varianten konnte zeigen, daß Mutationen außerhalb der definierten CTAR1- und CTAR2-Domänen in Unterschieden bezüglich der Aktivitätsniveaus von NF- κ B- und AP-1 resultieren (Fielding *et al.*, 2001). Dies legt die Vermutung nahe, daß derartige Sequenzvariationen die Konformation des LMP1 C-Terminus und somit dessen Signaltransduktion beeinflussen.

1.2.3. Signaltransduktion durch LMP1

Auf der Suche nach Proteinen, die mit dem C-Terminus von LMP1 interagieren, wurden die Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierten Faktoren (TRAFs) als direkt mit LMP1 assoziiert identifiziert (Mosialos *et al.*, 1995). Die TRAF-Moleküle sind ursprünglich als Komponenten

der Signaltransduktion von Mitgliedern der Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNF-R) Familie wie z.B. TNF-R1, TNF-R2, CD40 und CD30 und der Interleukin-Rezeptor 1 (IL-1) Familie beschrieben worden (Übersichtsartikel: Inoue *et al.*, 2000). Die sechs bisher beschriebenen Mitglieder der TRAF-Familie (TRAF1-6) übernehmen die Rolle von Adaptorproteinen, die Signale von Rezeptoren u. a. zu zellulären Kinasekaskaden weiterleiten. Sie sind somit in der Regulation von Zellproliferation und in zellulären Streßreaktionen involviert. TRAF-Moleküle besitzen eine konservierte Domäne in ihrem C-Terminus, die sogenannte TRAF-Domäne, die für die Vermittlung der Signaltransduktion essentiell ist. Die TRAF-Domäne ist verantwortlich für die Bildung von TRAF Homo- und Heterodimeren und für die Interaktion mit Rezeptoren, die in Folge ihrer Aktivierung TRAF Proteine rekrutieren (Rothe *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1995; Takeuchi *et al.*, 1996). Ein weiterer stark konservierter Bereich im N-Terminus aller TRAF-Moleküle (mit Ausnahme von TRAF1) ist die sogenannte RING-Finger Domäne. Für TRAF6 konnte kürzlich gezeigt werden, daß dessen RING-Finger Domäne als Ubiquitin-Ligase funktioniert, die an der Ubiquitinierung und damit Aktivierung von Komponenten des IKK-Komplexes involviert ist (Deng *et al.*, 2000). Die Deletion dieses RING-Fingers resultiert in einer dominant-negativen TRAF-Mutante, deren Interaktion mit den bekannten TRAF-interagierenden Proteinen jedoch nicht beeinträchtigt wird (Rothe *et al.*, 1995).

Die Bindung von TRAF1, 2, 3 und 5 an CD40 wird durch eine Konsensussequenz, das PxQxT-Motiv (As 250-254), vermittelt (Aizawa *et al.*, 1997; Boucher *et al.*, 1997; Pullen *et al.*, 1999a), wobei x für eine beliebige Aminosäure steht. TRAF6 hingegen zeigt keine Interaktion mit diesem Motiv, sondern bindet an einen anderen Bereich der Signaldomäne von CD40 (As 231-238) mit dem Konsensusmotiv QxPxExxE/F (Ishida *et al.*, 1996; Pullen *et al.*, 1999a). LMP1 besitzt ein mit CD40 vergleichbares PxQxT-Motiv, das innerhalb der CTAR1-Domäne lokalisiert ist. Eine Bindung von TRAF1, 2, 3 und 5 an diese Sequenz von LMP1 konnte nachgewiesen werden (Devergne *et al.*, 1996; Brodeur *et al.*, 1997; Sandberg *et al.*, 1997). Die Funktion der verschiedenen TRAF-Moleküle in der Signaltransduktion von LMP1 ist intensiv untersucht worden, jedoch immer noch nicht vollständig geklärt. Die Aktivierung

von NF- κ B, die durch CTAR1 von LMP1 vermittelt wird, ist von der Bindung des TRAF2 Proteins an das PxQxT-Motiv abhängig (Devergne *et al.*, 1996; Kaye *et al.*, 1996). Die Koexpression von TRAF1 kann die Induktion der NF- κ B-Aktivität durch LMP1 noch verstärken (Devergne *et al.*, 1996). LMP1 ist ein potenter Aktivator von NF- κ B in der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293, in denen eine TRAF1-Expression kaum nachweisbar ist (Devergne *et al.*, 1998). Diese Tatsache läßt darauf schließen, daß TRAF1 nicht für die LMP1-vermittelte Aktivierung von NF- κ B essentiell ist. TRAF3 wurde als ein negativer Regulator der LMP1-vermittelten NF- κ B-Aktivierung beschrieben (Devergne *et al.*, 1996), während eine Rolle für TRAF5 in der Signaltransduktion von LMP1 bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Eine Funktion von TRAF2 im LMP1-induzierten Signalweg zu p38 MAPK konnte ebenfalls beobachtet werden (Eliopoulos *et al.*, 1999), während TRAF2 bei der Aktivierung von JNK1 durch LMP1 offenbar nicht involviert ist (Kieser *et al.*, 1999).

Die Aktivierung von NF- κ B durch CTAR2 wird ebenfalls durch TRAF2 vermittelt (Devergne *et al.*, 1996; Brodeur *et al.*, 1997). Wie beim TNF-R1 interagiert TRAF2 jedoch nicht direkt mit CTAR2, sondern bindet über das Adaptorprotein TRADD („TNF-R-associated death domain protein“) an die Aminosäuren 384 und 385 von CTAR2 (Izumi und Kieff, 1997). TRADD ist ein Adaptorprotein des TNF-R1, das über seine C-terminale Todesdomäne („death domain“) an die Todesdomäne von TNF-R1 bindet. Durch diesen TRADD/TNF-R1-Komplex kann nun FADD („Fas-associated death domain protein“) rekrutiert und somit Apoptose induziert werden. Die Bindung von TRAF2 an TRADD resultiert in der Aktivierung von NF- κ B und JNK1 durch TNF-R1 (Übersichtsartikel: Wajant und Scheurich, 2001). Ein noch ungeklärtes Paradoxon ist, daß die C-terminale Todesdomäne von TRADD allein für die Induktion von NF- κ B notwendig und ausreichend ist, obwohl die TRAF2-Bindedomäne im N-Terminus von TRADD lokalisiert ist (Hsu *et al.*, 1995; Park und Baichwal, 1996). Interessanterweise ist LMP1 bisher das einzig bekannte rezeptorähnliche Molekül, das TRADD Signaltransduktion aktiviert ohne eine Todesdomäne zu besitzen und ohne Apoptose zu induzieren (Izumi *et al.*, 1999b). Entsprechend erfolgt die TRADD-Bindung an LMP1 nicht wie bei TNF-R1 über die Todesdomäne von TRADD, sondern über dessen N-Terminus (Kieser *et*

al., 1999). Als Konsequenz blockt eine TRADD-Mutante, der die Todesdomäne fehlt, in dominant-negativer Weise die Aktivierung von NF- κ B durch LMP1 (Kieser *et al.*, 1999).

Stromabwärts von TRAF2 konvergieren die Signale von CTAR1 und CTAR2 an der Kinase NIK (NF- κ B induzierende Kinase) (Sylla *et al.*, 1998). Der Induktion von NIK folgt die Phosphorylierung von IKK α und IKK β (I- κ B Kinase α und β). Der somit aktivierte IKK- α/β -Komplex kann I- κ B α (Inhibitor von NF- κ B α) phosphorylieren, was zur Ubiquitinierung und zum Proteasomen-vermittelten Abbau von I- κ B α führt. Der I- κ B Komplex bindet an NF- κ B und hält den Transkriptionsfaktor damit inaktiv im Zytoplasma zurück. Nach der Degradation von I- κ B wird NF- κ B freigesetzt und kann in den Kern gelangen. Dort bindet es an seine spezifischen Erkennungssequenzen in der Promotorregion NF- κ B-responsiver Gene und kann damit deren Transkription aktivieren (Übersichtsartikel: Karin, 1999).

Die Induktion von JNK1 durch LMP1 führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Kieser *et al.*, 1997). AP-1 ist ein Dimer, das aus Mitgliedern der Jun-, Fos- und ATF-Familie gebildet wird. Die Aktivierung der Proto-Onkogene c-jun und c-fos ist eng mit der Kontrolle von Proliferation und Zelltransformation, unter anderem auch in B-Zellen, verknüpft (Übersichtsartikel: Angel und Karin, 1991; Karin *et al.*, 1997). Die Induktion von JNK1 wird allein durch CTAR2 vermittelt und involviert die Aktivität der SEK1-Kinase (Kieser *et al.*, 1997) (s. auch Abschnitt 1.2.4.). Im Gegensatz zum NF- κ B Signalweg scheint die Todesdomäne von TRADD keine Rolle in der LMP1-induzierten JNK1-Aktivität zu spielen, obwohl die JNK-Aktivierungsdomäne (As 379 bis 384) mit der TRADD-Bindestelle (As 384-386) überlappt (Kieser *et al.*, 1999). Da für den JNK1-Signalweg von LMP1 TRAF2 nicht von Bedeutung ist, trennen sich die CTAR2-vermittelten Signalkaskaden zu JNK1 und NF- κ B offensichtlich schon auf der Ebene von TRADD oder von LMP1 selbst.

LMP1 wird oft funktional und molekular mit Rezeptoren aus der TNF-R-Familie verglichen. Wie oben diskutiert, ist LMP1 hinsichtlich seiner biologischen Effekte eher CD40 homolog, während es auf der Ebene der Signaltransduktion mehr Gemeinsamkeiten mit TNF-R1 aufweist. LMP1 ist aufgrund seiner onkogenen Eigenschaften und seiner bedeutenden Rolle bei

der Immortalisierung primärer B-Zellen durch EBV Ziel intensiver Forschung. Die bisher vorliegenden Ergebnisse sind jedoch für die Erklärung aller LMP1-vermittelten Effekte nicht ausreichend. Weitere Untersuchungen zur LMP1-abhängigen Signaltransduktion sind daher notwendig.

1.3. Signaltransduktion durch MAPKs

Das intrazelluläre Signaltransduktionsnetzwerk, das sich zur Regulation der Proteinaktivität und der spezifischen Genexpression entwickelt hat, ist äußerst komplex. Im Folgenden wird insbesondere auf die Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) eingegangen, da sie in der Signaltransduktion von LMP1 eine entscheidende Rolle spielen.

MAPK Signalkaskaden verbinden vor allem Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und Zytokine an der Zelloberfläche mit der Transkriptionsmaschinerie im Zellkern und Komponenten des Zytoskeletts. Daneben vermitteln einige MAPK-Kaskaden auch die zelluläre Antwort auf Streßfaktoren wie UV-Strahlung oder osmotischen Schock.

Eine MAPK-Signalkaskade ist typischerweise aus drei hierarchisch angeordneten Proteinkinasen aufgebaut (Abb. 1.2): MAPKs (MAPKs), MAPKKs (MAPKKs, MKKs oder MEKs) und MAPKKKs (MAPKKKs, MKKKs oder MEKKs). Eine MAPKKK phosphoryliert und aktiviert eine MAPKK, die ihrerseits eine nachgeschaltete MAPK phosphoryliert und aktiviert. MAPK reguliert in Folge die Aktivität von Transkriptionsfaktoren oder weiteren Kinasen durch deren Serin und/oder Threonin-Phosphorylierungen und kontrolliert somit unter anderem die Expression von Genen für den Zellmetabolismus und Funktionen des Zytoskeletts. Die Mitglieder der Familie der MAPKs weisen homologe Strukturen und gemeinsame biochemische Eigenschaften auf (Übersichtsartikel: Ichijo, 1999).

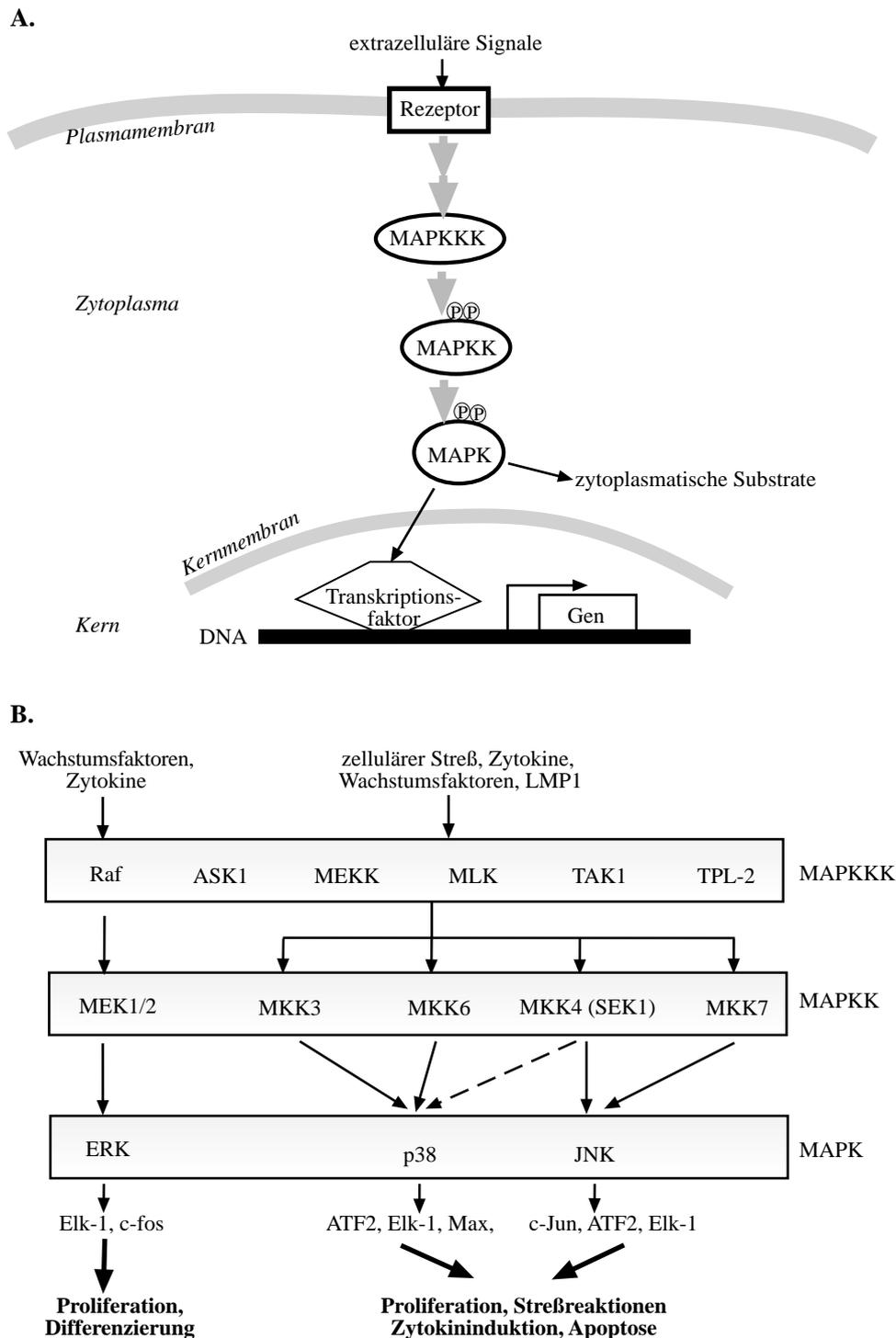


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der MAPK-Signalwege. (A) Allgemeines Schema der Struktur einer MAPK-Signalkaskade. Extrazelluläre Signale führen über einen Transmembranrezeptor zur Aktivierung der Module MAPKKK, MAPKK und MAPK. In Folge werden zytoplasmatische Substrate und/oder Transkriptionsfaktoren im Kern aktiviert, die spezifisch Genexpression regulieren. P, Phosphatrest. (B) Die Komponenten bekannter MAPK-Kaskaden sind gezeigt. MAPKKK-Aktivitäten werden von extrazellulären Stimuli wie Wachstumsfaktoren, zellulären Streß und Zytokinen stimuliert. Die aktivierten MAPKKKs können dann eine oder mehrere MAPKKs induzieren. MAPKKs wiederum aktivieren spezifisch MAPKs, die in Folge Transkriptionsfaktoren aktivieren. Die Regulation der Genexpression durch MAPK-Kaskaden resultiert letztendlich in einer zellulären Reaktion wie z.B. Differenzierung, Proliferation, Zytokininduktion, Streßreaktionen oder Apoptose.

Eine Reihe von Molekülen ist beschrieben worden, die Bindeglieder zwischen den MAPKKs und den membranständigen Rezeptoren darstellen. Diese umfassen z.B. Adaptorproteine wie TRAF-Moleküle im Fall der TNF-R-Familie oder G-Proteine wie Ras, das die Aktivierung der ERK-Signalkaskade durch den Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-R) vermittelt. Die unterschiedlichen Effekte der MAPK-Signaltransduktion basieren auf den verschiedenen extrazellulären Stimuli und der Vielzahl an Signalmolekülen. Die Spezifität der Effekte der MAPK-Signalwegen wird durch unterschiedliche Kombinationen der bekannten 12 MAPKs, 7 MAPKKs und 14 MAPKKs erreicht (Garrington und Johnson, 1999). Die Formation solcher Kinasekomplexe kann durch sogenannte molekulare Gerüstproteine vermittelt werden (Übersichtsartikel: Garrington und Johnson, 1999). Solche Proteine können mehrere Kinasen gleichzeitig binden und sie somit in räumliche Nähe zueinander bringen. Durch diesen Mechanismus können Gerüstproteine die Interaktion und Regulation von Mitgliedern der MAPK-Familie vermitteln.

Bei Säugern sind drei wichtige Gruppen von MAPK identifiziert worden, die untereinander homolog sind: ERKs („extracellular signal-regulated kinases“), c-Jun N-terminalen Kinasen (JNKs) und p38 MAPKs. Die Induktion des mitogenen ERK Signalweges wird durch Wachstumsfaktoren und Onkogene stimuliert (Übersichtsartikel: Kolch, 2000), interessanterweise jedoch nicht durch LMP1 (Kieser *et al.*, 1997). ERKs, die über den Ras/Raf/MEK-Signalweg aktiviert werden, besitzen ein breites Substratspektrum, darunter die Transkriptionsfaktoren MEF2C, Elk-1, Ets1 und c-fos (Übersichtsartikel: Su und Karin, 1996; Kolch, 2000).

Die JNK-Proteinkinasen sind eine Gruppe von MAPKs, die von drei Genen kodiert werden: *jnk1*, *jnk2* und *jnk3*. Diese Gene werden alternativ gespleißt und resultieren so in zehn JNK-Isoformen, deren unterschiedliche funktionale Signifikanz jedoch noch nicht geklärt ist (Gupta *et al.*, 1996). JNK1 wurde ursprünglich als involvierte Kinase bei der Induktion von Apoptose beschrieben (Xia *et al.*, 1995). Neuere Daten zeigen jedoch eine potentielle Rolle von JNK1 in nicht-zytotoxischen Signalwegen, die durch CD40, TNF-R1 oder EGF-R induziert werden (Berberich *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996; Natoli *et al.*, 1997; Bost *et al.*, 1997).

Die Aktivierung von JNKs wird durch Phosphorylierung der Threonin- und Tyrosin-Reste innerhalb des für MAPKs charakteristischen Thr-X-Tyr Motivs vermittelt, wobei X bei JNKs für einen Prolinrest steht (Derijard *et al.*, 1994). Bekannte JNK-induzierende Kinasen sind die MAPKKs MKK4 (=SEK1) und MKK7 (Derijard *et al.*, 1995; Tournier *et al.*, 1997). Aktivierte JNKs phosphorylieren c-Jun in seiner Transaktivierungsdomäne an den Serinresten 63 und 73 und bewirken somit dessen Aktivierung (Hibi *et al.*, 1993; Derijard *et al.*, 1994; Minden *et al.*, 1994). JNKs können darüber hinaus auch die Transkriptionsfaktoren ATF2 (Gupta *et al.*, 1995; Livingstone *et al.*, 1995) und Elk-1 (Cavigelli *et al.*, 1995; Whitmarsh *et al.*, 1995) phosphorylieren. Bisher wurde lediglich die Induktion von JNK1 durch LMP1 beschrieben.

Bisher sind vier p38 MAPKs identifiziert worden: p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ . Diese vier Kinasen sind bezüglich ihrer Aminosäuresequenz zu 60-70 % identisch und werden alle durch die MAPKK MKK6 aktiviert, während MKK3 alle p38 MAPKs mit Ausnahme von p38 β induziert (Übersichtsartikel: Nebreda und Porras, 2000). Für die Aktivierung von p38 MAPK ist eine Phosphorylierung des Thr-X-Tyr-Motives verantwortlich, wobei X für p38 MAPKs einen Glycinrest repräsentiert (Raingeaud *et al.*, 1995). Bekannte Substrate von p38 MAPK umfassen die Proteinkinasen MAPKAPK-2/3 (Freshney *et al.*, 1994; Rouse *et al.*, 1994; McLaughlin *et al.*, 1996) und mehrere Transkriptionsfaktoren wie ATF2 (Raingeaud *et al.*, 1995), Elk-1 (Raingeaud *et al.*, 1996), CHOP/GADD153 (Wang und Ron, 1996) und Max (Zervos *et al.*, 1995).

Alle drei Klassen der MAPKs, JNK, p38 MAPK und ERK, spielen somit eine wichtige Rolle bei der Regulation unterschiedlicher AP-1-Komponenten. Die AP-1 Proteine sind Homo- oder Heterodimere aus Mitgliedern der Jun, Fos und ATF Transkriptionsfaktor-Familie (Übersichtsartikel: Shaulian und Karin, 2001). Die Zusammensetzung des AP-1-Dimers ist für dessen Bindung an verschiedene DNA-Erkennungssequenzen und die differenziellen biologischen Effekte verschiedener AP-1 Faktoren verantwortlich. AP-1-Transkriptionsfaktoren sind sowohl in der Kontrolle von Zellproliferation, als auch in apoptotischen Prozessen involviert.

Die Phosphorylierung von AP-1-Untereinheiten durch JNK, p38 MAPK und ERK spielt bei der Regulation der AP-1-Aktivität eine entscheidende Rolle.

1.4. Aufgabenstellung

LMP1 ist ein virales Onkogen, das durch Eingriffe in zelluläre Signalwege transformierende Wirkung zeigt. Das komplexe Netzwerk der Signaltransduktion von LMP1 ist bisher nur unzureichend charakterisiert. Im Rahmen meiner Arbeit sollte daher die Signaltransduktion von LMP1 weiter analysiert werden.

Kürzlich wurde die p38 MAPK-Signalkaskade als LMP1-induzierter Signalweg beschrieben. Da der Mechanismus der p38 MAPK-Induktion durch LMP1 nicht bekannt war, sollte ich in meiner Arbeit die Aktivierung von p38 MAPK durch LMP1 näher charakterisieren. Um mögliche Komponenten dieses Signalweges identifizieren zu können, sollten zunächst Effekte dominant-negativer Mutanten bekannter Signalmoleküle auf LMP1-induzierte p38 MAPK-Aktivität in transienten Kinaseexperimenten und Luziferase-Reportergen Versuchen getestet werden. Darüber hinaus sollten auch die LMP1-Signaldomänen identifiziert werden, die für die Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges essentiell sind.

Zudem sollten bisher nicht bekannte Signalwege von LMP1 durch Verwendung eines konditionalen Systems analysiert werden. Mit Hilfe dieses Systems kann die Signalaktivität von LMP1 auf Proteinebene kontrolliert angeschaltet werden und ermöglicht so die Untersuchung von kurzfristigen LMP1-Effekten. Mittels phosphospezifischer Antikörper sollten Signalproteine identifiziert werden, deren Phosphorylierungsmuster sich in Abhängigkeit von LMP1 Signalaktivität ändert. Da die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Signalmolekülen einen wichtigen Mechanismus der Signaltransduktion darstellt, sollten auf diesem Wege weitere Signalkomponenten bzw. neue Signalwege von LMP1 identifiziert werden.

2. Material

2.1. Antikörper

phosphospezifische Antikörper

α -Phospho-ATF2 (Thr69/71); Kaninchen; polyklonal	New England Biolabs
α -Phospho-JNK (Thr183/Tyr185); Kaninchen; polyklonal	New England Biolabs
α -Phospho-p53 (Ser15) 16G8; Maus; monoklonal	New England Biolabs
α -Phospho-ERK (Thr202/Tyr204); Kaninchen; polyklonal	New England Biolabs
α -Phospho-Akt (Thr308); Kaninchen; polyklonal	New England Biolabs
α -Phospho-Bad (Ser136); Kaninchen; polyklonal	New England Biolabs
α -Phospho-Src (Tyr416); Kaninchen; polyklonal	New England Biolabs
α -Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182); Kaninchen; polykl.	New England Biolabs

gekoppelte Antikörper

α -Maus IgG, Meerrettich-Peroxidase gekoppelt; Ziege	Promega
α -Maus IgG; Meerrettich-Peroxidase gekoppelt; Ziege	Promega
α -Ziege IgG; Meerrettich-Peroxidase gekoppelt; Kaninchen	Dianova
α -Ratte IgG ; FITC-gekoppelt, Ziege	Dianova

sonstige Antikörper

α -FLAG (M2); Maus; monoklonal	Sigma
α -HA, Klon 3F10; Ratte; monoklonal	Roche
α -HA, Klon 12CA5; Maus	Roche
α -JNK1 (C-17); Kaninchen; polyklonal	Santa Cruz Biotech.
α -LMP1 (CS1-4); Maus; Mischung aus vier monoklonalen Ak	Dako
α -Maus IgG + IgM (H+L); Ziege	Dianova
α -Myc, Klon 9E10; Maus	Roche
α -NGF-R; Hybridom Zelllinie HB8737 (ATCC)	E. Kremmer , GSF

α -p38 (H-147); Kaninchen; polyklonal	Santa Cruz Biotech.
α -p53 (DO-1); Maus; monoklonal	Santa Cruz Biotech.
α -p53 (Ab-6), Klon DO-1; Maus; monoklonal	Oncogene Science
α -p53 (Ab-2), Klon PAb 1801; Maus monoklonal	Oncogene Science
α -p53 (Ab-3), Klon PAb 240; Maus; monoklonal	Oncogene Science
α -TRAF6 (H-274); Kaninchen; polyklonal	Santa Cruz Biotech.
α -TRAF6 (C-20); Ziege; polyklonal	Santa Cruz Biotech.

2.2. Plasmide

Die folgenden Plasmide waren teilweise in der Arbeitsgruppe Signaltransduktion bzw. der Abteilung Genvektoren vorhanden oder wurden freundlicherweise von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Die von mir klonierten Plasmide werden im Anschluß aufgeführt. Die mit einem Stern (*) markierten Plasmide wurden in Zusammenarbeit mit T. Müller kloniert. Alle Plasmide wurden mit Hilfe des Jetstar DNA-Maxipräparationssystems präpariert.

<u>Plasmidbezeichnung</u>	<u>Beschreibung</u>
<u>pSV-LMP-1</u>	LMP1 Wildtyp in pHEBo Vektor; SV40 Promotor/Enhancer (Kieser <i>et al.</i> , 1997)
<u>pSV-LMP1(PQT→AAA)</u>	LMP1-Mutante PQT/AAA in pHEBo Vektor; Mutation der TRAF-Interaktionsdomäne in CTAR1; SV40 Promotor/Enhancer (Kieser <i>et al.</i> , 1999)
<u>pSV-LMP1(Y384G)</u>	LMP1-Mutante Y384G in pHEBo Vektor; SV40 Promotor/Enhancer (Kieser <i>et al.</i> , 1999)
<u>pSV-LMP1(PQT→AAA/Y384)</u>	LMP1-Mutante PQT/AAA und Y384G in pHEBo Vektor; SV40 Promotor/Enhancer (Kieser <i>et al.</i> , 1999)

<u>pSV-LMP1Δ194-386</u>	LMP1-Mutante Δ COOH; Deletion des kompletten C-Terminus (außer den ersten 7 Aminosäuren) in pHEBo Vektor; SV40 Promoter/Enhancer (Kieser <i>et al.</i> , 1999)
<u>pSV-NGF-R:LMP1</u>	chimärer Rezeptor: As 1-279 des humanen niedrig-affinen NGF-R (extrazelluläre- und Transmembran-Domäne) und As 191-386 von LMP1 (zytoplasmatische Domäne); pHEBo Vektor; SV40 Promoter/Enhancer (Gires <i>et al.</i> , 1997)
<u>pSV-LMP1:CD40</u>	chimärer Rezeptor (248 As; 28,3 kD): As 1-190 von LMP1 (Transmembrandomäne) und As 223-280 von CD40 (zytoplasmatische Domäne); pHEBo Vektor; SV40 Promoter/Enhancer (Gires <i>et al.</i> , 1997)
<u>pcDNA3.1-TRAF6</u>	TRAF6 Wildtyp in pcDNA3.1 Vektor (H. Engelmann, LMU. München)
<u>pcDNA3.1-TRAF6(300-524)</u>	dominant-negatives TRAF6; Deletion der RING-Finger Domäne ; in pcDNA3.1 Vektor (H. Engelmann, LMU. München)
<u>pSRα-3-HA-p38</u>	humanes p38 α , HA-fusioniert, (M.Karin, San Diego, USA)
<u>pSRα-3HA-JNK1</u>	human JNK1, 3xHA-fusioniert (M.Karin, San Diego, USA)
<u>pSRα-3HA-JNK2</u>	human JNK2, 3xHA-fusioniert (M.Karin, San Diego, USA)
<u>pcDNA3-NIK</u>	NIK Kinase in pcDNA3.1, CMV-Promotor (Malinin <i>et al.</i> , 1997)
<u>pRK-myc-TRADD(1-194)</u>	dominant-negative TRADD Mutante mit myc-Epitop in pRK5; As 1-194 (humanes TRADD) (Kieser <i>et al.</i> , 1999)
<u>pcDNA3-MKK6(Ala)</u>	Flag-Epitop fusioniertes dominant-negatives MKK6 (Lys 82 \rightarrow Arg) in pcDNA3.1(+); Kinase-inaktiv (S. Ludwig, Univ. Würzburg)
<u>pSEK1-AL/EE-CMV</u>	dominant-negative Mutante von SEK1, Austausch von zwei As: S220 \rightarrow A, T224 \rightarrow L (M.Karin, San Diego, USA)

<u>pcDNA-p35</u>	Bakulovirus p35 Protein in pcDNA3.1(+) (Seshagiri und Miller, 1997)
<u>SRD-MEKK</u>	C-terminales 687 As langes Fragment von MKK1; Kinase-aktiv; SR α -Promotor (S.Hirai, Yokohama City Univ., Japan)
<u>pCB6+-pro p53</u>	humanes p53 Wildtyp in pCB6+; CMV Promotor (K. Vousden; Nat. Cancer Inst., USA)
<u>pCB6+-p53ΔI</u>	humanes p53 mit Deletion von As 13-19 (Mdm2-Bindestelle) in pCB6+; CMV Promotor (K. Vousden, Nat. Cancer Inst., USA)
<u>3xκB-L</u>	Luziferase-Reportergen Konstrukt, minimaler fos-Promotor mit 3 κ B Bindestellen (B. Sugden, Madison, USA)
<u>pRTU14</u>	Luziferase-Gen unter der Kontrolle von 4 AP-1-Bindestellen (TREs) und dem Metallothionin II-Basispromotor (D. Bohmann, Heidelberg)
<u>CMVβGal</u>	β -Galaktosidase Expressions-Plasmid von Clontech
<u>pcDNA3.1(+)</u>	CMV Expressionsvektor von Invitrogen
<u>pRK5</u>	CMV Expressionsvektor

Im Rahmen dieser Arbeit klonierte Plasmide:

<u>HA-JNK1-pcDNA3.1</u>	humanes JNK1 in pcDNA3.1(+); N-terminales HA-Epitop; CMV-Promotor
<u>HA-JNK2-pcDNA3.1</u>	humanes JNK2 in pcDNA3.1(+); N-terminales HA-Epitop; CMV-Promotor
<u>HA-JNK1(A169G)-pcDNA3.1</u>	humanes JNK1 mit Mutation im DFG-Motiv (As 169: A \rightarrow G) in pcDNA3.1(+); N-terminales HA-Epitop; CMV-Promotor
<u>HA-JNK2(A169G)-pcDNA3.1</u>	humanes JNK2 mit Mutation im DFG-Motiv (As 169: A \rightarrow G) in pcDNA3.1(+); N-terminales HA-Epitop; CMV-Promotor

<u>pRK5-HA-p53 *</u>	humanes p53 in pRK5; N-terminales HA-Epitop; CMV-Promotor
<u>pRK5-HA-p53ΔI *</u>	humanes p53 mit Deletion von As 13-19 (Mdm2-Bindestelle) in pRK5; N-terminales HA-Epitop; CMV-Promotor

2.3. Oligonukleotide

Die Synthese der verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma ARK Scientific, Darmstadt, und Metabion, München, in Auftrag gegeben. Die DNA-Sequenzen sind in 5'-3' Orientierung angegeben:

- Primer für die Klonierung von HA-JNK1 bzw. HA-JNK2 in pcDNA3.1(+):

US1: GGG CGC GGA TCC GCG ATG GAA TAT CCT TAT GAC GTT CCT GAC
TAT GCC ATG AGC AGA AGC AAG CGT GAC AAC

US2: GGG CCG CTC GAG CGG TCA CTG CTG CAC CTG TGC TAA AGG

US4: GGG CGC GGA TCC GCG ATG GAA TAT CCT TAT GAC GTT CCT GAC
TAT GCC ATG AGC GAC AGT AAA TGT GAC AGT

US5: GGG CCG CTC GAG CGG TCA TCG ACA GCC TTC AAG GGG TCC
CGT CGA GGC

- Primer für die Klonierung von HA-JNK1(A169G) und HA-JNK2(A169G) in pcDNA3.1(+):

US1, 2, 4 und 5 siehe oben

US3: GGG ACT TAA AGC CCA GTA ATA TAG TAG TAA AAT CTG ATT
GCA CTT TGA AGA TTC TTG CCT TCG GTC TGG CCA GG

US6: AGA TTT GAA GCC TAG CAA CAT TGT TGT GAA ATC AGA CTG
CAC CCT GAA GAT CCT TGC CTT TGG CCT GGC C

US9: CTA CTA TAT TAC TGG GCT TTA AGT CCC

US11: CAA CAA TGT TGC TAG GCT TCA AAT CT

- Primer für die Klonierung von HA-p53 und HA-p53ΔI in pRK5:

US12corr.: GGG GCG CGA ATT CAT GGA ATA TCC TTA TGA CGT TCC TGA CTA
TAT GGA GGA GCC GCA GTC AGA TCC TAG C

US13: GGG CCG AAG CTT TCA GTC TGA GTC AGG CCC

2.4. Zelllinien und Bakterien

Zelllinien

HEK 293 humane embryonale Nierenepithelzelllinie, die durch Expression der E1a und E1b Gene von Adenovirus Typ 5 transformiert wurde (Graham *et al.*, 1977)

HeLa humane Brustkrebs-Zelllinie (ATCC)

TRAF6 -/- embryonale Maus Fibroblasten-Zelllinie aus TRAF6-defizienten Mäusen (Amgen Inc.) (Lomaga *et al.*, 1999)

WI-38 humane Fibroblasten-Zelllinie (ATCC)

B64-19/3 B-Zelllinie, die durch Immortalisierung mit einem Maxi-EBV, dessen LMP1-Gen durch ein NGF-R:LMP1-Konstrukt ersetzt wurde, etabliert wurde (Delecluse *et al.*, 1998); wurde freundlicherweise von U. Dirmeier, Abt. Genvektoren der GSF, zur Verfügung gestellt

Bakterien

E.coli DH5α F-, *lacI*-, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*, Δ(*lacZYA-argF*), U169, F80Δ*lacZ*ΔM15, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1* (Hanahan, 1985)

2.5. Chemikalien, Enzyme, Geräte und Sonstiges

Amersham Pharmacia Biotech

ECL-Western Blotting Reagenzien, Hybond-C-Zellulosemembran, Luziferin, $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (3000 Ci/mmol), GammaBind® Plus Sepharose

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Plastik-Reagenzgefäße 15 und 50 ml, Zellkulturflaschen, 6-Loch-Platten, Zellschaber

Biochrom KG, Berlin

Newborn Calf Serum (Seromed®)

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Bacto-Agar, Hefeextrakt, Trypton

Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., USA

Röntgenfilme XAR5

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Tischzentrifuge 5415, Reaktionsgefäße verschiedener Größe, BioPhotometer

Fuji PhotoFilm Co., Ltd. Japan

PhosphoImager Fujix Bio-imaging Analyser System (BAS-1000)

Genomed, Bad Oeynhausen

Maxi-Präparations-Kit für Plasmidpräparationen (Jetstar)

Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein

Amphotericin B (Fungizone), Fötale Kälberserum, HEPES, 1 Kb DNA-Leiter, L-Glutamin, Lipofectamin Transfektionsreagenz, Natrium-Pyruvat, Optimem I, Penicillin, Streptomycin, Trypsin-EDTA (1x), Trypton, Zellkulturmedium RPMI 1640 und DMEM

Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA

Mighty Small II Gel Elektrophorese Einheit

Merck-Eurolab GmbH

Glycerin, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ammoniumperoxodisulfat (APS), Essigsäure, Ethidiumbromid, Ethanol, Glucose, Glyzin, Glyzylglyzin, Isopropanol, Kaliumacetat, Ka-

lithiumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Lithiumchlorid, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumdodecylsulfat (SDS), Natrium-Orthovanadat, Salzsäure, Saccharose, Tetramethyldiamin (TEMED), Triton-X-100,

Nunc GmbH, Wiesbaden

Cryotubes 3 ml, Impfösen, Plastikpetrischalen, Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen

New England Biolabs, Schwalbach

Restriktionsenzyme, Vent-DNA-Polymerase

PE Biosystems, Weiterstadt

PCR-Reaktionsgefäße

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Adenosin-5'-triphosphat (ATP), dNTPs, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), alkalische Phosphatase

Roth, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat, Phenol, Roti-Block, Acrylamid

Stratagene, Heidelberg

Stratalinker

Sigma Chemie, München

Ampicillin, Bromphenolblau, β -Glyzerophosphat, DMSO, Dithiothreitol (DTT), Glyzin, HEPES, Harnstoff, Lachsspermien-DNA, Lysozym, Natriumfluorid, Natriummolybdat, Natriumorthovanadat, Natriumpyrophosphat, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Glutathion-Sepharose, Triton X-100, Monolaurat (Tween-20), Prestained SDS Molecular Weight Marker, Protein A Sepharose, Rinderserumalbumin (BSA)

Tropix, Massachusetts, USA

GalactonTM-Plus, EmeraldTM-Lösung

Zeiss, Oberkochen

Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop mit hochauflösender Digital Videokamera (Hamamatsu)

3. Methoden

3.1. Bakterienkultur

3.1.1. Vermehrung und Aufbewahrung

Bakterien werden als Suspensionskultur in LB-Medium oder zur Vereinzelung von Kolonien auf LB-Agar-Platten kultiviert. Bei Selektion auf Resistenz gegen Ampicillin wurde dem LB-Medium Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde eine dicht gewachsene Bakterienkultur mit 15 % Glycerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt.

LB-Medium: 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl

LB-Agar-Platten: 15 g Bacto-Agar ad 1 l LB-Medium

3.1.2. Transformation von *E.coli*

Die Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Zellen erfolgte durch Inkubation einer *E.coli* DH5α Kultur in TFB-Puffer auf Eis (Hanahan, 1985). Zu einem Aliquot (200 µl) der so behandelten Bakterien wurden ca. 50 ng eines Ligationsansatzes bzw. 1 ng Plasmid-DNA und 7 µl DMSO pipettiert und für zwei Minuten bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von glukosesupplementiertem (10 mM) SOB-Medium und einer 30 minütigen Anzucht bei 37°C wurde die Zellsuspension auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

TFB-Puffer: 10 mM K-Mes (pH 6,2), 50 mM CaCl₂, 45 mM MnCl₂, 100 mM RbCl

SOB-Medium: Bacto-Trypton (20 g), Bacto-Hefeextrakt (5 g), NaCl (0,5 g), 10 mM MgCl₂, add 950 ml H₂O.

3.2. Zellkultur

3.2.1. Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C unter einer Atmosphäre von 5 % CO₂ kultiviert. Das Kulturmedium RPMI 1640 wurde mit 10% Kälberserum (Seromed®), 1 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Streptomycin, 50 IE/ml Penicillin, 0,5 mM Natrium Pyruvat und 5 mM HEPES versetzt. Dem Kulturmedium DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) wurde 10 % (bzw. 1 % für Transfektionen) wurde 10 % fötalem Kälberserum (FKS), 1 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Streptomycin, und 50 IE/ml Penicillin zugegeben.

Adhärente Zelllinien

Die adhärenen Zelllinien HEK 293, HeLa und TRAF6 -/- Fibroblasten wurden in 10 %igem DMEM vermehrt und alle 2-3 Tage 1:8 verdünnt.

Die adhärente Fibroblastenzelllinie WI-38 wurde in 10% igem RPMI vermehrt und ebenfalls alle 2-3 Tage 1:8 verdünnt. Vor Kokultur mit der immortalisierten B-Zelllinie B64/19-3 wurden die Zellen für 90 min mit γ -Strahlung behandelt, um die Proliferation zu stoppen.

Zum Ablösen und verdünnen von adhärenen Zellen wurde den Zellen Trypsin zugesetzt, so daß sie gerade vollständig benetzt waren. Nach 1-3 minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen abgespült und (ein Teil) in frisches Vollmedium überführt.

B64-19/3-Zellen

Diese mit einem Maxi-EBV-Plasmid etablierte B-Zelllinie wurde zur Vermehrung in 10 %igem RPMI in Kokultur mit WI-38-Zellen gehalten. WI-38 ist eine Fibroblastenzelllinie, die vor der Kokultur mit B64-19/3-Zellen durch γ -Strahlung inaktiviert wurde. Bei einer Zellzahl von ca. 10⁶ Zellen/ml wurden die Zellen mit frischem Kulturmedium versetzt bzw. ein Teil in neue Kulturschalen mit WI-38 überführt. Vor der Induktion der NGF-R:LMP1-Aktivität durch Antikörperstimulierung wurden die Zellen der WI-38 Kokultur entnommen und bei einer Zelldichte von 10⁵ Zellen/ml für 48 h bei 37°C inkubiert.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer Zählkammer. Um tote von lebenden Zellen erkennen zu können, wurde die Zellsuspension mit 9 fachem Volumen an Trypan-Blau-Lösung (0,4%) gemischt.

3.2.2. Aufbewahrung von Zelllinien

Zellen können in Gegenwart von DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren und über längere Zeit gelagert werden. Zum Einfrieren wurden etwa 10^7 Zellen abzentrifugiert (5 min, 1200 Upm, 20°C) und in 1 ml DMEM bzw. RPMI-Medium mit 25 % FKS und 7,5 % DMSO resuspendiert und in 2 ml-Gefäß (NUNC-Cryotube™) pipettiert. Um die Zellen schonend abzukühlen, wurde das Röhrchen in mehrere Lagen Papierhandtücher gewickelt und bei -80°C tiefgefroren. Zur längeren Lagerung wurden die Zellen anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Wiederverwendung wurden die Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad schnell aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig in frisches Vollmedium (DMEM bzw. RPMI 1640) mit 10 % FKS überführt.

3.2.3. Transfektion

HEK 293- bzw. HeLa-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in 6-Loch-Platten in 3 ml Vollmedium ausplattiert, so daß die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion eine ca. 60-70 %ige Konfluenz erreichten. Ca. 1 h vor der Transfektion wurde das Medium entfernt und die Zellen vorsichtig mit 1,5 ml vorgewärmtem Optimum I überschichtet. Für den DNA-Lipid-Transfektionskomplex wurden die jeweiligen Mengen an Plasmid-DNA (max. 3 µg Gesamt-DNA Menge) mit 4 µl Lipofectamin in 200 µl Optimum I für 30 min bei RT inkubiert und anschließend nochmals 800 µl Optimum I zugegeben. Die DNA-Gesamt mengen der einzelnen Ansätze wurden durch Zugabe von Lachsspermien-DNA (Sigma) oder Leervektor-DNA aneinander angeglichen. Das Optimum wurde von den Zellen entfernt und die DNA-Lipid-Lösung vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Nach Inkubation der Zellen für 4 h bei 37°C

wurde das Optimum I und somit der überschüssige DNA-Lipid-Komplex entfernt und die Zellen mit Medium mit 1 % FKS überschichtet. Die geringe Konzentration an FKS soll eventuelle serumbedingte Einflüsse auf Signalwege verhindern.

TRAF6 ^{-/-} Fibroblastenzellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen in Analogie zu HEK 293-Zellen mit entsprechend größeren DNA- bzw. Lipofectamin-Mengen transfiziert.

3.3. DNA-Arbeitstechniken

3.3.1. Plasmid-Schnellaufreinigung

Die Plasmidpräparation erfolgte nach der modifizierten „Boiling Method“ (Holmes und Quigley, 1981). 1,5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur wurden kurz abzentrifugiert (30 sec, 15000 Upm, RT) und das Zellpellet in 250 µl Lysispuffer resuspendiert. Durch Zugabe von 7 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) wurde die Zellwand aufgelöst. Zur Denaturierung der DNA wurde der Ansatz für 2 min bei 100°C erhitzt und 5 min auf Eis abgekühlt. Durch Zentrifugation (10 min, 15000 Upm, RT) wurden Zellreste mit chromosomaler DNA, die mit der Zellwand assoziiert sind, und ribosomale RNA sedimentiert. Nach Entfernung dieses Pellets wurde die Plasmid-DNA mit 500 µl 100 % Ethanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und die luftgetrocknete DNA in 40 µl H₂O gelöst.

Lysispuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 62,5 mM EDTA, 0,4 % (v/v) Triton X-100, 2,5 M LiCl

3.3.2. Präparative Plasmidreinigung

Die präparative Plasmidaufarbeitung erfolgte mit Hilfe von DNA-Adsorptionssäulen entsprechend den Angaben des Herstellers (Genomed).

3.3.3. PCR zur Klonierung von HA-Fusionsproteinen

Für die Klonierung von HA-JNK1 und HA-JNK2 in pcDNA3.1(+) bzw. von HA-p53wt und HA-p53ΔI in pRK5 wurden an die Sequenzen der jeweiligen Gene die Sequenz für ein N-terminales Hämagglutinin (HA)-Epitop addiert. Dieses HA-Epitop wurde mit Hilfe eines Primers mit der entsprechenden HA-Sequenz und einem Teil der 5'-Sequenz des jeweiligen Gens eingefügt. Die entsprechenden 5'- und 3'-Primer enthielten zusätzlich eine Restriktionsschnittstelle für die nachfolgende Klonierung der amplifizierten DNA in einen Vektor. Zur Amplifizierung von HA-JNK1, HA-JNK2, HA-p53wt und HA-p53ΔI über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde die Vent-Polymerase (New England Biolabs) und der dazugehörige Reaktionspuffer verwendet. Als entsprechende Matrize dienten die Plasmide pCB6+-pro p53, pCB6+-p53ΔI, pSRα-3HA-JNK1 und pSRα-HA-JNK2. Der Reaktionsansatz enthielt 10 µl des jeweiligen 5'- und 3'-Primers (10 µM), 2 µl dNTPs (10 mM), 1 µl Vent-Polymerase, 10 µl Reaktionspuffer (10 fach), ca. 5-10 ng Plasmid-DNA (als Matrize) und H₂O in einem Gesamtvolumen von 100 µl. Die Temperatur der Elongationsphase richtete sich nach den Schmelztemperaturen der Primer. Die PCR-Reaktion umfaßte 33 Reaktionszyklen mit je 1 min Denaturierung bei 94°C, 1 min Primer-Hybridisierung bei 55°C (bzw. bis zu 58°C) und 1 min Elongation bei 72°C. Die Elongationszeit beim letzten Zyklus betrug 10 min. Die amplifizierte DNA wurde nach Standardmethoden aufgereinigt, mit Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend in das jeweilige Plasmid inseriert. Die korrekte Insertion von HA-JNK1 und HA-JNK2 in pcDNA3.1(+) bzw. HA-p53wt und HA-p53ΔI in pRK5 wurde durch Sequenzanalyse bestätigt.

3.3.4. Mutations-PCR zur Klonierung von HA-JNK1(D169A) und HA-JNK2(D169A)

Für die Einführung der Mutationen in HA-JNK1 und HA-JNK2 wurde die „overlap and extension“ Technik verwendet (Ho *et al.*, 1989). Bei dieser Art von Mutations-PCR wurden zunächst in zwei getrennten PCR-Reaktionen zwei Fragmente des JNK-Gens amplifiziert. In der einen Reaktion wurde ein flankierender Primer eingesetzt, der mit dem 3' Ende der JNK-

Sequenz hybridisiert (US2 für JNK1 und US5 für JNK2) und ein interner Primer, der an die zu mutierenden Stelle bindet und selbst die Mutation trägt (US3 für JNK1 und US4 für JNK2). In der anderen Reaktion wurde der entsprechende flankierende Primer eingesetzt, der mit dem 5'-Ende der JNK-Sequenz hybridisiert (US1 für JNK1 und US4 für JNK2) und ein interner Primer, der zu dem 5'-Ende des Mutationsprimers komplementär ist (US9 für JNK1 und US11 für JNK2). Beide PCR-Reaktionen wurden wie in Abschnitt 3.3.3. beschrieben durchgeführt. Die beiden somit erhaltenen Produkte enthalten eine Überlappung, deren Sequenz innerhalb des JNK-Gens liegt. Diese PCR-Fragmente wurden durch Gelelektrophorese auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt, die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA nach Standardmethode aufgereinigt. In einem zweiten Schritt wurden diese beiden PCR-Produkte in einer weiteren PCR-Reaktion als Matrize eingesetzt. Durch die Überlappung konnte ein Strang von jedem Fragment als Primer für das andere Fragment verwendet werden. Zusammen mit den beiden flankierenden Primern (US1/US2 für JNK1; US4/US5 für JNK2) konnte so das gesamte mutierte JNK-Gen amplifiziert werden. Die Konzentrationen der Reagenzien dieser PCR-Ansätze waren wie in Abschnitt 3.3.3. beschrieben. Die PCR-Reaktion umfaßte 20 Reaktionszyklen mit je 1 min Denaturierung bei 94°C, 1,5 min Primer-Hybridisierung bei 60°C und 1,5 min Elongation bei 72°C. Die amplifizierte DNA wurde nach Standardmethode aufgereinigt. Da die 5' und 3'-flankierenden Primer Restriktionschnittstellen enthielten, konnte das PCR-Produkt geschnitten und in pcDNA3.1(+) eingefügt werden. Die 5'-Primer (US1 für JNK1 und US4 für JNK2) enthielten zusätzlich ein HA-Epitop.

3.3.5. Sonstige

Die Anwendung allgemein üblicher Techniken, die im Umgang mit Nukleinsäuren benutzt wurden, wie z.B. Phenolextraktion, Ethanolpräzipitation, Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer, Auftrennung bzw. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, enzymatische Restriktionsanalyse, Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphata-

se, Ligierung freier DNA-Enden, etc. erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (Sambrook *et al.*, 1989).

3.4. Protein-Arbeitstechniken

3.4.1. Immunoblot Analyse

Ca. 10^6 Zellen pro Ansatz wurden in 400 μ l TBST-Puffer bei 4°C lysiert. Die unlösliche Fraktion wurde durch Zentrifugation (10 min, 15000 Upm, 4°C) abgetrennt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Lysate mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in „mighty small“-Gelapparaturen (Hoefer) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard diente die „prestained molecular weight standard mixture“ von Sigma. Die SDS-PAGE erfolgte bei 35 mA in 12,5 % igen SDS-Gelen, die mit Sammelgel überschichtet wurden. Unmittelbar nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe eines Elektrotransfer-Verfahrens auf eine Hybond-C Membran (Amersham) transferiert. Der Transfer erfolgte in einem Transferpuffer bei 100 V innerhalb von 40 min.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese für ca. 30 min in Blocklösung geschwenkt, um unspezifische Proteinbindstellen abzusättigen. Anschließend wurde der Blot über Nacht mit dem primären Antikörper in Blocklösung bei 4°C inkubiert. Bei phosphospezifischen Antikörpern erfolgten die ersten beiden Schritte in Roti-Block (Roth). Vor Zugabe des Zweitantikörpers wurde die Membran dreimal für 10 min in Waschpuffer geschwenkt. Die Inkubation mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten entsprechenden Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper in Blocklösung (Verdünnung 1:2000) erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h. Der Immunoblot wurde wieder dreimal für 10 min gewaschen und anschlie-

ßend mit Hilfe von verstärkter Chemilumineszenz (ECL, Amersham) nach Angaben des Herstellers entwickelt.

Sollte die Membran anschließend mit einem anderen Primärantikörper ein zweites Mal gefärbt werden, so wurden zunächst sämtliche gebundenen Antikörper wieder entfernt. Dies erfolgte durch Inkubation des Immunoblots in 40 ml Strip-Lösung für 20 min (52°C). Nach dreimaligem Waschen für je 20 min in Waschpuffer wurde die Membran erneut geblockt und mit Primärantikörper inkubiert.

<u>TBST-Puffer:</u>	20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid; 0,5 mM β -Glycerophosphat; 0,5 mM Natriumpyrophosphat; 0,5 mM Natriumorthovanadat; 0,5 mM Natriumfluorid; 0,5 mM Natriummolybdat; 1 % Triton X-100
<u>SDS-Probenpuffer (4 fach):</u>	100 mM Tris-HCl (pH 6,8); 4 % SDS; 20 % Glycerin; 0,2 % Bromphenolblau
<u>12,5 % SDS-Gel (100 ml):</u>	40,4 ml H ₂ O; 16,5 ml 2 M Tris-HCl (pH 8,8); 825 μ l 0,5 M EDTA; 41,25 ml Acrylamid (30 %)/Bisacrylamid (0,8 %)-Lösung; 700 μ l Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung (10 %) und 70 μ l N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)
<u>Sammelgel (10 ml):</u>	7,6 ml H ₂ O; 625 μ l 2 M Tris-HCl (pH 6,8); 100 μ l 10 % SDS; 1,5 ml Acrylamid (30 %)/Bisacrylamid (0,8 %)-Lösung; 150 μ l Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung (10 %) und 40 μ l N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)
<u>Transferpuffer (10 fach):</u>	30g Tris-OH; 95 g Glyzin; ad 1 l H ₂ O
<u>Blocklösung:</u>	20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 5 % Magermilchpulver
<u>Waschlösung:</u>	20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 1 % Tween-20
<u>Strip-Lösung</u>	125 mM Tris-HCl (pH 6,8); 10 % SDS; 10 mM DTT

3.4.2. Immunpräzipitation

Transient transfizierte TRAF6 $-/-$ Zellen einer Kulturschale (10 cm ϕ) mit 70 % Konfluenz wurden in 1 ml TBST-Puffer lysiert und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 15000 Upm) abgetrennt. Protein A-Sepharose Kügelchen (100 μ l, Sigma) in Ethanol wurden

dreimal mit TBS gewaschen und in 1 ml TBS aufgenommen. Die Zellysate wurden über Nacht bei 4°C mit 50 µl Protein A-Sepharose und 8 µl α -TRAF6-Antikörper (D-10) auf einem Drehrad inkubiert. Nach der Sedimentation der TRAF6-gebundenen Sepharosekügelchen (1 min, 4°C, 15000 Upm) folgten drei Waschschrte in je 1 ml TBST. Das immunpräzipitierte TRAF6 wurde anschließend durch 12,5 %ige SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem α -TRAF6-Antikörper (H274) nachgewiesen.

3.4.3. Immunkomplex-Kinaseversuch

Die Methode wurde durchgeführt wie in Kieser, 2001, beschrieben.

Immobilisierung von α -HA-Epitop Antikörpern an Protein G-Sepharose:

Protein G-Sepharose Kügelchen (80 µl, Sigma) in Ethanol wurden dreimal mit TBS gewaschen. Die α -HA-Epitop Antikörper 3F10 (200 µg, Roche) wurden in 500 µl PBS mit 4 % Saccharose und 0,02 % Natriumazid gelöst. Nach Zugabe des gelösten Antikörpers zu der Protein G-Sepharose wurde der Ansatz für 2 h auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Die kovalent gebundenen Antikörper wurden anschließend präzipitiert (1 min, 4°C, 15000 Upm), dreimal mit TBS + 1 % Triton X-100 gewaschen und in 1,2 ml PBS mit 4 % Saccharose und 0,02 % Natriumazid aufgenommen. Die so immobilisierten Antikörper können für mehrere Monate bei 4°C gelagert werden.

Ca. 10^6 Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen, in je 450 µl TBST-Puffer lysiert und durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 15000 Upm) von der unlöslichen Zellfraktion befreit. Zur Immunpräzipitation der HA-fusionierten Kinase wurden die Lysate über Nacht bei 4°C mit 12 µl Protein G-Sepharose immobilisierten α -HA-Antikörper (s. oben) inkubiert. Die Immunpräzipitate wurden zweimal mit TBST-Puffer und für radioaktive Kinaseaktionen zweimal mit Reaktionspuffer I bzw. für nicht-radioaktive Reaktionen zweimal mit Reaktionspuffer II gewaschen und auf ein Gesamtvolumen von 35 µl eingestellt. Die relativen Kinaseaktivitäten der untersuchten Kinasen wurden nun anhand der Substratphosphorylierung be-

stimmt, da durch die Enzymaktivität der Kinase das radioaktive γ -³²P-Phosphat des in den Reaktionsansätzen enthaltenen γ -³²P-ATP auf ein Substrat übertragen wird. In den nicht-radioaktiven Kinasereaktionen erfolgt die Substratphosphorylierung mit unmarkiertem ATP. Als spezifisches Substrat für JNK wurde Glutathion-S-Transferase (GST) markiertes c-Jun (GST-c-Jun), für p38 MAPK GST-ATF-2 (aus *E. coli* gereinigt nach Kieser, 2001) verwendet. Zum Starten der radioaktiven Kinasereaktionen wurde ein Reaktionsmix aus 8 μ l Reaktionspuffer I, 1 μ l γ -³²P-ATP (5 μ Ci) und 2 μ g GST-Substrat zugegeben. Die nicht-radioaktiven Kinasereaktionen wurden durch Zugabe von 10 μ l Reaktionspuffer II mit ca. 200 ng GST-Substrat gestartet. Nach Inkubation der Reaktionsansätze für 30 min bei 30°C wurden die Kinasereaktionen durch Zugabe von 12 μ l 4-fach SDS-Probenpuffer und Erhitzen bei 95°C für 5 min terminiert. Nach Auftrennung der Proteine durch 12,5 % SDS-PAGE und Transfer auf Hybond-C Membran (siehe Kapitel 3.4.1) wurden die radioaktiven Filter autoradiographiert und mit Hilfe eines Fuji BAS1000 Phosphoimagers quantifiziert. Die Phosphorylierung der nicht-radioaktiven Kinaseversuche wurde in einem Immunoblot mit Hilfe von phosphospezifischen α -ATF2-Antikörpern sichtbar gemacht.

TBS: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA

TBST-Puffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid; 0,5 mM β -Glycerophosphat; 0,5 mM Natriumpyrophosphat; 0,5 mM Natriumorthovanadat; 0,5 mM Natriumfluorid; 0,5 mM Natriummolybdat; 1% Triton X-100

Reaktionspuffer I: 20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 10 mM MgCl₂; 20 mM NaCl; 1 μ M DTT; 2 μ M ATP

Reaktionspuffer II: 25 mM Tris-HCl (pH 7,4); 10 mM MgCl₂; 2 mM DTT; 200 μ M ATP

SDS-Probenpuffer (4-fach): 100 mM Tris-HCl (pH 6,8); 4 % SDS; 20 % Glycerin; 0,2 % Bromphenolblau

Berechnung der Kinaseaktivitäten

Zur Quantifizierung der Kinaseaktivitäten von HA-JNK1, HA-JNK2 und HA-p38 MAPK wurden die Aktivitäten, wenn nicht anders vermerkt, auf die Menge der jeweils immunpräzipitierten Kinasen bezogen. Die Menge an immunpräzipitierter Kinase wurde im Immunoblot

mit α -HA-Antikörper ermittelt. Dazu wurden die Immunoblots mittels eines Durchlichtscanners digitalisiert und die entsprechenden Banden durch computergestützte Densitometrie mit Hilfe des Programms TINA quantifiziert. Anschließend wurden die im Immunoblot bzw. in der Autoradiographie bestimmten Aktivitätswerte auf die Menge der präzipitierten Kinase bezogen. In Abbildung 4.5 und 4.16 wurden die Kinaseaktivitäten zusätzlich auf die LMP1-Expression angeglichen.

3.4.4. Luziferase-Reportergergen Versuche

Zur Untersuchung NF- κ B- bzw. AP-1-abhängiger Transkription wurden HEK 293-Zellen in 6-Loch-Platten transient mit einem Reportergergen-Konstrukt transfiziert. In dem Plasmid 3 \times κ B-L steht das Luziferase-Reportergergen unter der Kontrolle eines minimalen c-fos-Promotors mit drei NF- κ B-Bindestellen. In dem pRTU14-Plasmid ist das Luziferase-Reportergergen unter der Kontrolle von vier TPA-responsiven Elementen (TREs) und dem Metallothionin II-Basispromotor. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und in 150 μ l Extraktionspuffer aufgenommen. Danach wurden die Ansätze für 15 min bei -80°C tiefgefroren, bei 4°C wieder aufgetaut und die Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt (10 min, 4°C , 15000 Upm). Der Nachweis der Luziferase-Aktivität in den Zellysaten erfolgte in einem Testpuffer unter Verwendung eines Luminometers. Pro Ansatz wurden 10 μ l Lysat mit 150 μ l Luziferase-Testpuffer und 100 μ l Luziferin-Puffer gemischt und die resultierende Lichtemission im Luminometer gemessen. Um die Unterschiede in der Proteinexpression auszugleichen, wurden die Luziferase-Werte auf die Expression von β -Galaktosidase angeglichen. Zur Ermittlung der β -Galaktosidase-Werte wurden 5 μ l Zellysate mit 75 μ l Galacton-PlusTM-Lösung als chemilumineszentes β -Galaktosidase-Substrat gemischt und für 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 50 μ l EmeraldTM-Puffer wurde die Lichtemission ebenfalls im Luminometer gemessen.

Extraktionspuffer: 100 mM K_2HPO_4 (pH 7,8); 100 mM KH_2PO_4 (pH 7,8), 1 mM DTT; 1 % Triton X-100

Luziferase-Testpuffer: 25 mM Glyzylglycin (pH 7,8); 15 mM MgSO_4 ; 5 mM ATP

Luziferin-Puffer (10 fach):	5 mg D-(-) Luziferin (Roche) auf 17,85 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5)
Galacton-Plus™-Lösung:	50 µl 0,01 M MgCl ₂ ; 500 µl 1 M Na ₃ PO ₄ (pH 8,0); 50 µl Galacton-Plus™ (Tropix) auf 4,4 ml H ₂ O
Emerald™-Puffer:	1 ml 1 M NaOH; 500 µl Emerald™-Lösung (Tropix) auf 3,5 ml H ₂ O (vor Licht schützen!)

3.5. Fluoreszenzmikroskopie

Für den Nachweis der Expression wurden HA-p53 und HA-p53ΔI Expressionsplasmide transient in HeLa-Zellen transfiziert. Vier Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Trypsin verdaut und auf einen Glas-Objektträger in Medium ausplattiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 3 % Paraformaldehyd/PBS für 20 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,2 % Triton X-100/PBS für 5 min permeabilisiert, dreimal mit PBS gewaschen und in 2 % Glyzin/PBS (pH 7,4) für 1 h und in 10 % fötalem Kälberserum/PBS für weitere 30 min geblockt. Die fixierten Zellen wurden über Nacht in α-HA-Epitop-Antikörper 3F10 (Roche) inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 2 h in FITC-konjugiertem α-Ratte IgG Zweitantikörper (Dianova) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 10 % Glycerin/PBS eingebettet. Zur Analyse wurden die Zellen in einem Zeiss Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop mit einer hochauflösenden Digital Videokamera (Hamamatsu) untersucht. Konfokale Aufnahmen wurden anhand von drei aufgenommenen Ebenen mit Hilfe der Openlab 2.1 Software (Improvision) digital erzeugt. Die Überlagerung von Fluoreszenz- und Phasenkontrast-Aufnahmen wurde ebenfalls mit Hilfe der Openlab 2.1 Software vorgenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung des LMP1-induzierten p38 MAPK Signalweges

Kürzlich wurde die p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalkaskade als ein weiterer Signalweg identifiziert, der durch LMP1 aktiviert werden kann. Die Aktivierung von p38 MAPK ist für die Expressionsinduktion von IL-6 und IL-8 notwendig (Eliopoulos *et al.*, 1999; Vockerodt *et al.*, 2001). Bisher wurde in dem Signalweg von LMP1 zu p38 MAPK nur der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiierter Faktor 2 (TRAF2) als beteiligtes Protein identifiziert (Eliopoulos *et al.*, 1999). Für die Aufklärung der LMP1-vermittelten proliferativen und anti-apoptischen Effekte ist die weitere Untersuchung des p38 MAPK-Signalweges von großem Interesse. Der erste Teil der vorliegenden Arbeit umfaßt daher die Identifikation von Faktoren, die in der Signalkaskade von LMP1 zu p38 MAPK involviert sind.

p38 MAPK gehört zur Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Die p38 MAPK-Signalkaskade spielt eine wichtige Rolle bei der Expression von Zytokinen und in der Reaktion der Zelle auf Streßfaktoren (Freshney *et al.*, 1994; Han *et al.*, 1994; Raingeaud *et al.*, 1995). Kürzliche Veröffentlichungen konnten weitere Funktionen von p38 MAPK aufzeigen, wie beispielsweise die Beteiligung an zellulären Differenzierungsprozessen, Proliferation und der Regulation von Apoptose (Übersichtsartikel: Nebreda und Porras, 2000). Die Aktivierung der p38 MAPK erfolgt durch Phosphorylierung des Thr-X-Tyr-Motives durch MAPK-Kinasen (Raingeaud *et al.*, 1995) (s. Einleitung). Bekannte Substrate von p38 MAPK umfassen die Proteinkinasen MAPKAPK-2/3 (Freshney *et al.*, 1994; Rouse *et al.*, 1994; McLaughlin *et al.*, 1996) und mehrere Transkriptionsfaktoren wie ATF2 (Raingeaud *et al.*, 1995), Elk-1 (Raingeaud *et al.*, 1996), CHOP/GADD153 (Wang und Ron, 1996) und Max (Zervos *et al.*, 1995).

4.1.1. LMP1 induziert p38 MAPK über einen TRAF6-abhängigen Signalweg

Die zytoplasmatischen TRAFs dienen als Adaptorproteine von Rezeptoren der TNF-Rezeptor Familie und spielen eine wichtige Rolle sowohl in apoptotischen als auch in proliferativen Signalwegen. Darüber hinaus sind sie auch in der Signaltransduktion von LMP1 involviert (s. Einleitung). Außer für TRAF4 konnte bisher nur für TRAF6 keine Rolle in der Funktion von LMP1 gezeigt werden. Da jedoch die Überexpression von TRAF6 zur Induktion von p38 MAPK führt (Baud *et al.*, 1999), stellte TRAF6 einen guten Kandidaten für eine Rolle im Signalweg von LMP1 zu p38 MAPK dar.

Um eine potentielle Funktion von TRAF6 im Zusammenhang mit LMP1-induzierter p38 MAPK-Aktivierung näher zu untersuchen, wurde zunächst der Effekt einer dominant-negativen TRAF6-Mutante, TRAF6(300-524), auf diesen Signalweg untersucht. Dieser Mutante fehlt die sogenannte RING-Finger Domäne. Mit Ausnahme von TRAF1 besitzen alle bekannten TRAFs eine solche N-terminale Domäne, für die bei TRAF6 eine Funktion als Ubiquitin-Ligase gezeigt werden konnte (Deng *et al.*, 2000 und Einleitung). Die Deletion des RING-Fingers resultiert in einer dominant-negativen TRAF-Mutante, die zwar noch mit allen bekannten TRAF-Bindemolekülen interagieren kann, jedoch keine Signale mehr weiterleitet (Rothe *et al.*, 1995; Arch *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 2000). Der Einfluß der Koexpression von TRAF6(300-524) auf die LMP1-induzierte p38 MAPK-Aktivität wurde mit Hilfe von transienten Transfektionsversuchen in HEK 293-Zellen analysiert. Diese Zelllinie wurde aufgrund ihrer guten Transfektionseffizienz für diese Experimente ausgewählt (Graham *et al.*, 1977). Darüber hinaus sind bereits viele Untersuchungen zur Signaltransduktion von LMP1 in dieser Zelllinie durchgeführt worden.

TRAF6(300-524) wurde zusammen mit Expressionsplasmiden für ein Hämagglutinin (HA)-Epitop-fusioniertes p38 MAPK (HA-p38 MAPK) und LMP1 in HEK 293-Zellen transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und HA-p38 MAPK mit Antikörpern gegen das HA-Epitop aus den Zellysaten immunpräzipitiert. Die Aktivität der präzipitierten Kinase wurde in einer *in vitro* Kinasereaktion mit Glutathion-S-

Transferase-fusioniertem ATF2 (GST-ATF2) als Substrat gemessen. p38 MAPK kann ATF2 *in vitro* an Threonin 69 und 71 phosphorylieren und somit aktivieren (Gupta *et al.*, 1995). Diese *in vitro* Phosphorylierung von GST-ATF2 wurde im Immunoblot mit Hilfe eines Phospho-ATF2 spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Dieser Antikörper detektiert nur die doppelt phosphorylierte Form des Transkriptionsfaktors ATF2 (Threonin 69 und 71).

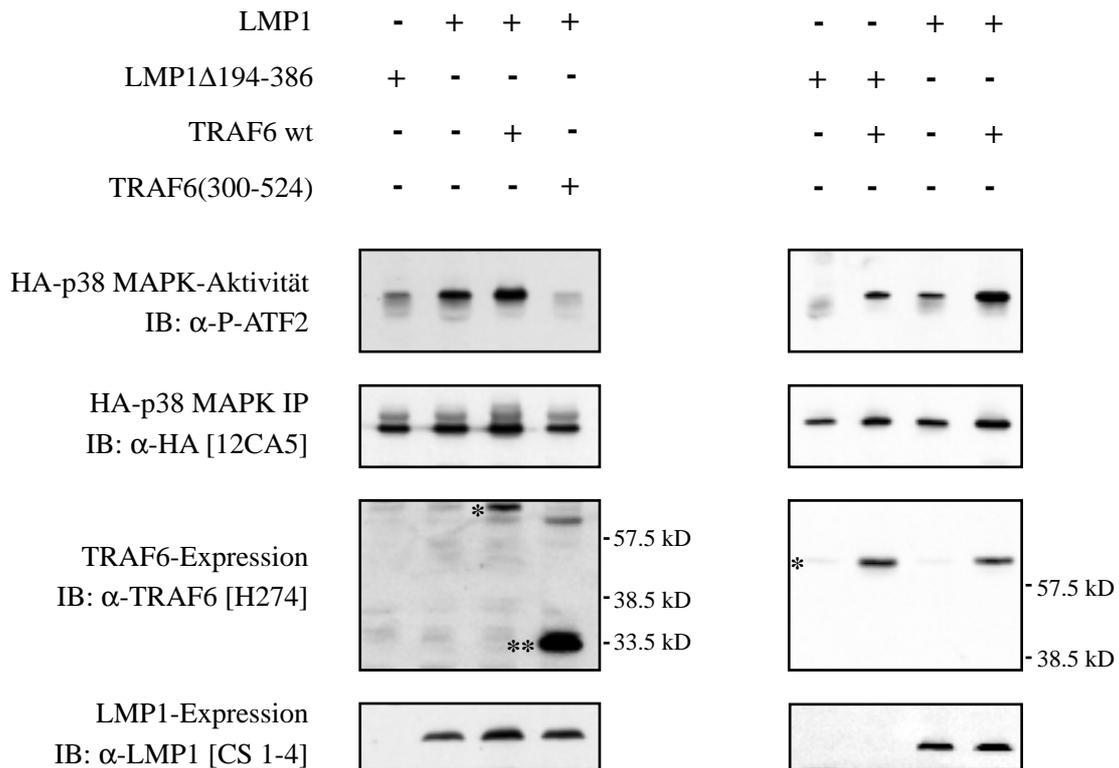


Abb. 4.1: Dominant-negatives TRAF6 inhibiert die LMP1-induzierte p38 MAPK-Aktivierung. HEK 293-Zellen wurden transient mit 1,0 µg HA-p38 MAPK zusammen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden wie angezeigt transfiziert: 1,0 µg LMP1 Wildtyp (wt), 1,0 µg LMP1 Δ194-386, 1,0 µg TRAF6wt und 1,0 µg dominant-negatives TRAF6(300-524). Transfizierte DNA-Mengen wurden mit pcDNA3.1-Leervektor auf 3,0 µg angeglichen. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurden nicht-radioaktive HA-p38 MAPK Immunkomplex Kinasereaktionen durchgeführt. Die *in vitro* Phosphorylierung von GST-ATF2 durch präzipitiertes HA-p38 MAPK wurde durch einen Phospho (P)-ATF2-spezifischen Antikörper im Immunoblot (IB) nachgewiesen. Die Phosphorylierung von GST-ATF2 ist ein Maß der p38 MAPK-Aktivität. Das immunpräzipitierte (IP) HA-p38 MAPK und die Expression von TRAF6 und LMP1 wurden im Immunoblot nachgewiesen. * TRAF6wt; ** TRAF6(300-524). Rechter und linker Teil der Abbildung stammen aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Wie Abbildung 4.1 zeigt, führt die Expression von LMP1 zu einer starken Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges. Diese durch LMP1 vermittelte Induktion wird durch die Koexpres-

sion von TRAF6(300-524) vollständig blockiert. Dieses Resultat zeigt, daß TRAF6 offenbar eine essentielle Rolle in der Signaltransduktion von LMP1 zu p38 MAPK spielt. Somit konnte TRAF6 als eine neue Komponente dieses Signalweges identifiziert werden.

Eine Überexpression von TRAF6 Wildtyp resultierte wie erwartet in der Aktivierung von p38 MAPK (Abb. 4.1, rechts). Die LMP1-induzierte p38 MAPK-Aktivität wurde durch die Koexpression von TRAF6 Wildtyp noch verstärkt. In den Versuchen wurde eine LMP1-Mutante, LMP1 Δ 194-386, als Nullwert transfiziert, deren C-terminale Signaldomäne (As 194-386) deletiert wurde. Der C-Terminus von LMP1 ist für die Signaltransduktion von LMP1 essentiell und seine Deletion resultiert in einem LMP1-Molekül, das keine Signalwege mehr aktivieren kann. Die Basisaktivität von p38 MAPK wird durch die Expression von LMP1 Δ 194-386 nicht beeinflußt (Daten nicht gezeigt). Die Expression von LMP1 und der TRAF Proteine wurde durch Analyse der Zellysate vor der Immunpräzipitation im Immunoblot nachgewiesen. LMP1 Δ 194-386 kann jedoch nicht mit der α -LMP1 Antikörpermischung CS1-4 (Dako) nachgewiesen werden, da die Epitope CS1-4 alle im deletierten C-Terminus von LMP1 lokalisiert sind (Rowe *et al.*, 1987).

Des Weiteren wurden radioaktive Kinaseversuche durchgeführt, in denen die Phosphorylierung von GST-ATF2 und somit die p38 MAPK-Aktivität mit Hilfe eines Phosphoimagers quantifiziert werden kann. Wie in Abbildung 4.2 zu sehen ist, wird p38 MAPK durch Expression von LMP1 aktiviert, während die Koexpression von TRAF6(300-524) zu einer völligen Inhibition der p38 MAPK-Aktivität führt. Diese Resultate bestätigen die Ergebnisse aus den nicht-radioaktiven Kinaseversuchen und unterstreichen nochmals die essentielle Bedeutung des TRAF6 Proteins in der Signalkaskade zu p38 MAPK. In diesem Experiment wurde zusätzlich ein LMP1:CD40-Fusionsprotein als Positiv-Kontrolle eingesetzt. Dieses chimäre Protein besteht aus der Transmembrandomäne von LMP1 und dem zytoplasmatischen Anteil des CD40-Rezeptors. Daraus resultiert ein konstitutiv aktives CD40-Fusionsmolekül, das von der Bindung eines Liganden unabhängig ist (Gires *et al.*, 1997; Kieser *et al.*, 1999). Wie erwartet, konnte die Aktivität von p38 MAPK durch die Expression von LMP1:CD40 induziert werden. Die Koexpression von TRAF6(300-524) hatte auch hier eine fast vollständige Inhibi-

tion der p38 MAPK-Aktivität zur Folge. Dies bestätigt Ergebnisse, die zeigen, daß TRAF6 im Signalweg von CD40 zu p38 MAPK involviert ist (Pullen *et al.*, 1999a). In den radioaktiven Kinaseversuchen konnte eine schwächere p38 MAPK-Aktivierung im Verhältnis zu den nicht-radioaktiven Kinaseversuchen beobachtet werden. Dies ist auf die geringere und daher nicht optimale ATP-Konzentration in den radioaktiven Experimenten zurückzuführen. Zusammengefaßt zeigen die Ergebnisse aus beiden Versuchen eindeutig die essentielle Bedeutung von TRAF6 in dem Signalweg von LMP1 zu p38 MAPK.

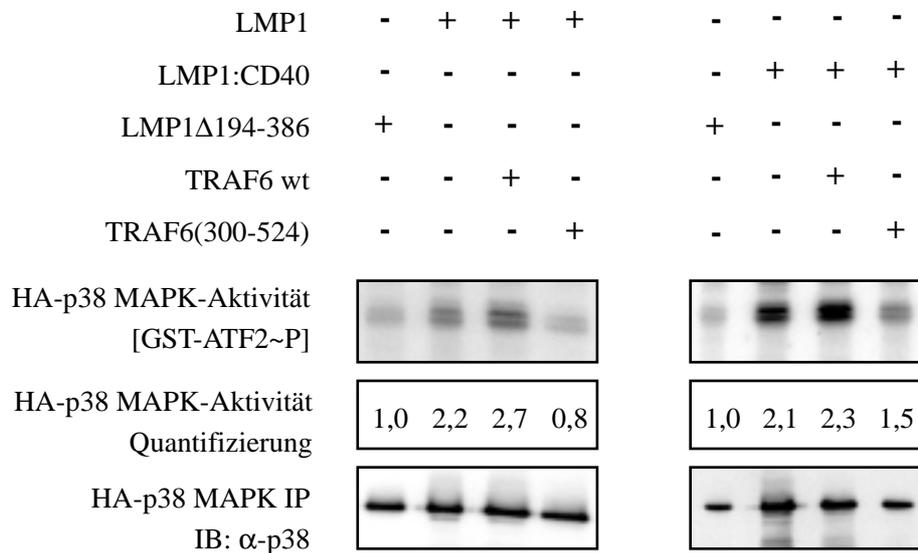


Abb. 4.2: Dominant-negatives TRAF6 inhibiert LMP1- und LMP1:CD40-induzierte p38 MAPK-Aktivität. HEK 293-Zellen wurden transient mit 1,0 μ g HA-p38 MAPK zusammen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden wie angezeigt transfiziert: 1,0 μ g LMP1wt, 1,0 μ g LMP1 Δ 194-386, 1,0 μ g LMP1:CD40, 1,0 μ g TRAF6wt oder 1,0 μ g TRAF6(300-524). Transfizierte DNA-Mengen wurden mit pcDNA3.1-Leervektor auf 3,0 μ g angeglichen. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurden radioaktive HA-p38 MAPK Immunkomplex-Kinasereaktionen in Gegenwart von γ -³²P-ATP durchgeführt. HA-p38 MAPK-Aktivitäten sind durch Autoradiographie des *in vitro* phosphorylierten GST-ATF2 dargestellt. Die Quantifizierung der GST-ATF2 Phosphorylierung erfolgte durch Phosphoimager-gestützte Analyse.

4.1.2. Die ektopische Expression von TRAF6 ermöglicht die Aktivierung von p38 MAPK durch LMP1 in TRAF6 $-/-$ Fibroblasten

Für Untersuchungen von Genfunktionen eignet sich besonders die Verwendung von Zellen, in denen das zu analysierende Gen in beiden Allelen deletiert wurde („Knockout“-Zellen). Die

folgenden Versuche wurden in einer Fibroblasten-Zelllinie durchgeführt, die aus TRAF6 Knockout-Mäusen etabliert wurde (Lomaga *et al.*, 1999) und somit kein endogenes TRAF6 mehr besitzt. In diesen Zellen wurde getestet, ob p38 MAPK in Abwesenheit von TRAF6 noch durch LMP1 aktiviert werden kann.

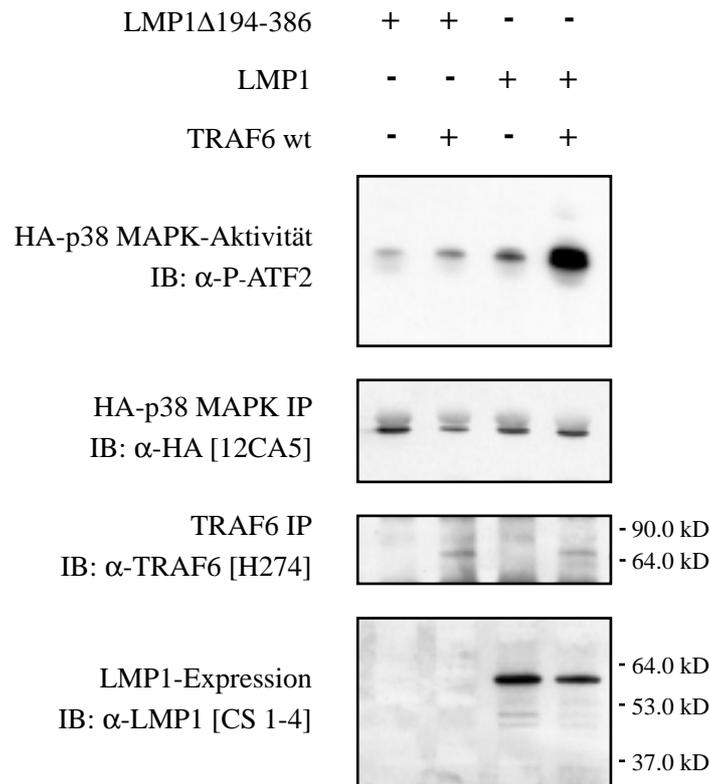


Abb. 4.3: Die ektopische Expression von TRAF6 ist für eine signifikante p38 MAPK-Aktivierung durch LMP1 in TRAF6 $-/-$ Zellen essentiell. TRAF6-defiziente Mausfibroblasten wurden in 10 cm Zellkulturplatten mit 3,3 μ g HA-p38 MAPK zusammen mit den den entsprechenden Expressionsplasmiden wie angezeigt transfiziert: 9,9 μ g LMP1wt, 9,9 μ g LMP1 Δ 194-386 und 6,6 μ g TRAF6wt. Transfizierte DNA-Mengen wurden mit pcDNA3.1-Leervektor angeglichen. HA-p38 MAPK-Aktivitäten wurden durch phosphoryliertes GST-c-Jun im Immunoblot nachgewiesen. TRAF6 wurde mit Hilfe des α -TRAF6-Antikörpers D10 aus Zellysaten immunpräzipitiert und im Immunoblot nachgewiesen.

Wie in Abbildung 4.3 zu sehen ist, führt die Expression von LMP1 in TRAF6 $-/-$ Fibroblasten nur zu einem sehr schwachen Anstieg der p38 MAPK-Aktivität. Dieses Ergebnis war zu erwarten, unter der Voraussetzung, daß TRAF6 bei der Aktivierung von p38 MAPK eine essentielle Rolle spielt. Die schwache Induktion von p38 MAPK durch LMP1 ist möglicher-

weise dadurch zu erklären, daß hier andere TRAF Proteine die Funktion von TRAF6 teilweise übernehmen können. Die Transfektion von TRAF6 allein resultierte gleichermaßen in einem sehr schwachen Anstieg der p38 MAPK-Aktivität. Dies spricht dafür, daß das Niveau der ektopischen TRAF6-Proteinexpression ungefähr der physiologischen TRAF6-Expression entspricht, die ebenfalls nicht zu einer Induktion von p38 MAPK *per se* führt. Dagegen konnte eine sehr starke Aktivierung von p38 MAPK in den TRAF6 *-/-* Fibroblastenzellen durch die Koexpression von LMP1 mit TRAF6 erreicht werden. Offensichtlich kann durch die Expression von TRAF6 auf physiologischem Niveau die Aktivierung von p38 MAPK durch LMP1 wiederhergestellt werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen nochmals die essentielle Bedeutung von TRAF6 in der Signaltransduktion von LMP1 zu p38 MAPK.

4.1.3. MKK6 vermittelt die Signalübertragung von LMP1 zu p38 MAPK

p38 MAPK wird durch Phosphorylierung der Aminosäuren Threonin 180 und Tyrosin 182 innerhalb des Thr-X-Tyr-Motives aktiviert (Raingeaud *et al.*, 1995 und Einleitung). Die Phosphorylierung erfolgt durch in der Signalkaskade direkt aufwärts gelegene Kinasen, die sogenannten MAPKKs (MAPKKs bzw. MKKs). Es ist gezeigt worden, daß die MAPKK MKK6 in Folge von extrazellulären und intrazellulären Stimuli p38 MAPK phosphoryliert und somit aktiviert (Nebreda und Porras, 2000). Auf der Suche nach Faktoren des LMP1 → p38 MAPK-Signalweges wurde daher MKK6 als weiterer potentieller Signalmediator untersucht.

Um die Rolle von MKK6 in der Signaltransduktion von LMP1 zu p38 MAPK zu testen, wurde der Einfluß einer dominant-negativen MKK6-Mutante auf die p38 MAPK-Aktivierung durch LMP1 analysiert. Diese Flag-Epitop-fusionierte dominant-negative Mutante von MKK6, Flag-MKK6(Ala), besitzt keine Kinaseaktivität mehr (Raingeaud *et al.*, 1996; Hoffmeyer *et al.*, 1999). Flag-MKK6(Ala) wurde zusammen mit LMP1 und HA-p38 MAPK Expressionsplasmiden in HEK 293-Zellen transfiziert. Anschließend wurde ein nicht-radioaktiver Kinaseversuch durchgeführt. Wie in Abbildung 4.4 zu sehen ist, bewirkt die Koexpression von Flag-MKK6(Ala) eine starke Reduktion der LMP1-induzierten p38 MAPK-

Aktivität. Die Aktivierung von p38 MAPK durch LMP1 wurde durch Koexpression von Flag-MKK6(Ala) um 84,5 % herabgesetzt. Das Expressionsniveau von LMP1 und Flag-MKK6(Ala) sowie die Menge an immunpräzipitiertem HA-p38 MAPK war in allen Ansätzen annähernd gleich.

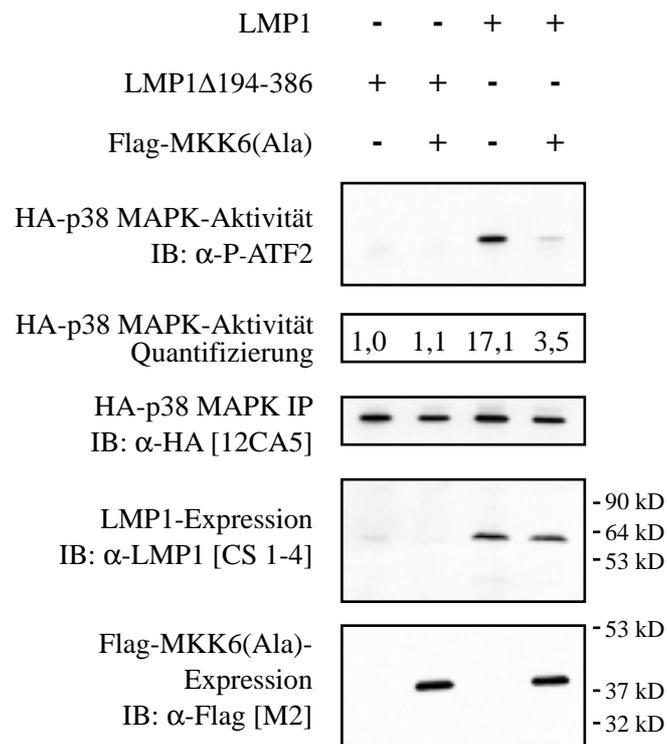


Abb. 4.4: Dominant-negatives MKK6 inhibiert die Induktion von p38 MAPK durch LMP1. HEK 293-Zellen wurden transient mit 1,0 μ g HA-p38 MAPK zusammen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden wie angezeigt transfiziert: 1,0 μ g LMP1wt, 1,0 μ g LMP1 Δ 194-386 und 1,0 μ g dominant-negatives Flag-MKK6(Ala). Transfizierte DNA-Mengen wurden mit pcDNA3.1-Leervektor auf 3,0 μ g angeglichen. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurden nicht-radioaktive HA-p38 MAPK Immunkomplex Kinasereaktionen durchgeführt. Die HA-p38 MAPK-Aktivitäten sind durch *in vitro* phosphoryliertes GST-c-Jun im Immunoblot nachgewiesen.

Dieses Ergebnis zeigt, daß MKK6 in der Signaltransduktion von LMP1 zu p38 MAPK involviert ist. Somit konnte MKK6 neben TRAF6 als ein weiterer Faktor der LMP1 \rightarrow p38 MAPK-Signalkaskade identifiziert werden. MKK6 muß in der Signalkaskade unterhalb von TRAF6 agieren, da p38 MAPK durch MKK6 direkt phosphoryliert wird.

4.1.4. Identifizierung der für die Aktivierung von p38 MAPK essentiellen LMP1-Domänen

Als nächstes wurde untersucht, welche Domänen des LMP1-Moleküls die Aktivierung von p38 MAPK vermitteln. Es ist bekannt, daß LMP1-induzierte NF- κ B-Aktivität durch TRAF-Moleküle vermittelt wird und daß sowohl CTAR1 als auch CTAR2 an der Aktivierung beteiligt sind (s. Einleitung). In Abschnitt 4.1.1. wurde gezeigt, daß bei der Aktivierung von p38 MAPK TRAF-Moleküle ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. Daher war es naheliegend, eine mögliche Beteiligung von CTAR1 und CTAR2 am p38 MAPK-Signalweg zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene LMP1-Mutanten verwendet, deren Funktionalität schon in anderen Versuchen in unserem Labor getestet worden war (Kieser *et al.*, 1999). Bei der Mutante LMP1(PQT \rightarrow AAA) wurde das TRAF-Bindemotiv innerhalb der CTAR1-Domäne (siehe Einleitung) mutiert, während bei der Mutante LMP1(Y384G) der Tyrosinrest 384 innerhalb der CTAR2-Domäne gegen Glycin ausgetauscht wurde, was die Bindung von TRADD an LMP1 verhindert. Zusätzlich wurde die entsprechende Doppelmutante LMP1(PQT \rightarrow AAA/Y384G) und die C-terminale Deletionsmutante LMP1 Δ 194-386 als Nullkontrolle eingesetzt.

Die Mutation des PxQxT-Motives resultierte in einer Reduktion der p38 MAPK-Induktion auf 57 % des LMP1 Wildtyps. Einen noch stärkeren Einbruch der p38 MAPK-Aktivität auf 7 % Restaktivität verursachte die Mutation von Tyrosin 384 zu Glycin. LMP1(PQT \rightarrow AAA/Y384G) besaß wie auch LMP1 Δ 194-386 keinerlei p38 MAPK-Aktivierungspotential. Die p38 MAPK-Aktivitäten wurden hier zusätzlich zur immunpräzipitierten HA-p38 MAPK Menge auch auf die LMP1-Expression angeglichen (s. Material und Methoden). Offensichtlich sind an der Induktion von p38 MAPK durch LMP1 sowohl das PxQxT-Motiv in CTAR1, als auch Tyrosin 384 in CTAR2 beteiligt. Da eine Mutation von Tyrosin 384 jedoch eine wesentlich stärkere Auswirkung auf die Aktivierbarkeit von p38 MAPK hatte, scheint CTAR2 die wichtigere Domäne für p38 MAPK-Aktivierung durch LMP1 zu sein. Maximale Aktivierung wird jedoch nur durch die Beteiligung beider Domänen erreicht. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer kürzlich veröffentlichten Beobachtung,

daß für die maximale NF- κ B-Aktivierung durch LMP1 eine Kooperation und physikalische Interaktion von CTAR1 und CTAR2 notwendig ist (Floettmann *et al.*, 1998).

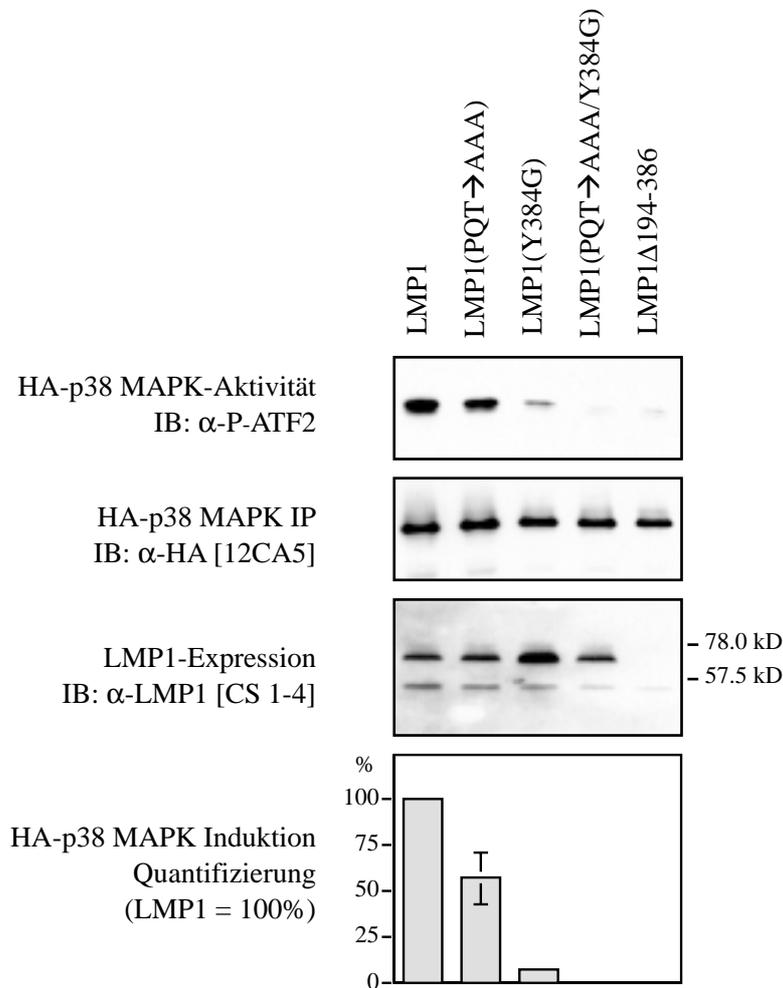


Abb. 4.5: CTAR1 und CTAR2 kooperieren bei der Induktion von p38 MAPK durch LMP1. HEK 293-Zellen wurden transient mit 1,0 μ g HA-p38 MAPK zusammen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden wie angezeigt transfiziert: 1,0 μ g LMP1wt, 1,0 μ g LMP1(PQT \rightarrow AAA), 1,0 μ g LMP1(Y384G) oder 1,0 μ g LMP1(PQT \rightarrow AAA/Y384G). LMP1 Δ 194-386, dessen gesamte C-terminale Signaldomäne deletiert wurde, diente als Nullwert. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurden nicht-radioaktive HA-p38 MAPK Immunkomplex Kinasereaktionen durchgeführt. Das Ergebnis eines repräsentativen Versuches von vier ist in Form von Immunoblots gezeigt. Das Balkendiagramm zeigt die Durchschnittswerte der HA-p38 MAPK-Aktivitäten aller vier Versuche mit Angabe der Standardabweichungen. p38 MAPK-Aktivitäten sind in % relativ zu LMP1wt angegeben, dessen Induktionswert auf 100 % festgesetzt wurde. Die Induktionswerte wurden zusätzlich zu den Mengen der immunpräzipitierten HA-p38 MAPK auch auf die Expression von LMP1 angeglichen.

4.1.5. Die Rolle von TRAF6 bei der Aktivierung von NF- κ B durch LMP1

Die bisher vorgestellten Ergebnisse zeigen eine Beteiligung von CTAR1 und CTAR2 an der Induktion von p38 MAPK durch LMP1. NF- κ B-Aktivierung von LMP1 wird ebenfalls durch diese beiden Domänen vermittelt (Floettmann und Rowe, 1997; Devergne *et al.*, 1998). Darüber hinaus ist bekannt, daß eine Überexpression von TRAF6 zur Aktivierung von NF- κ B führt (Cao *et al.*, 1996). Aufgrund dieser Hinweise wurde eine potentielle Rolle von TRAF6 im Signalweg von LMP1 zu NF- κ B untersucht.

Dazu wurde der Einfluß der dominant-negativen Mutante TRAF6(300-24) auf LMP1-vermittelte NF- κ B-Aktivität in transienten Reporter-genversuchen analysiert. TRAF6(300-24) wurde zusammen mit LMP1 Wildtyp oder LMP1-Mutanten und einem NF- κ B-Luziferase Reporter-genplasmid in HEK 293-Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und Luziferase-Reporter-genversuche durchgeführt. Die gemessene Luziferase-Aktivität ist ein direktes Maß für die NF- κ B-Aktivität. Wie in Abbildung 4.6A gezeigt ist, bewirkt die Koexpression von TRAF6(300-24) eine Reduktion der LMP1-induzierten NF- κ B-Aktivität um 40 %. Die Koexpression von TRAF6 Wildtyp konnte die NF- κ B-Aktivierung durch LMP1 hingegen noch verstärken (Ergebnisse nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten (Floettmann und Rowe, 1997; Devergne *et al.*, 1998) resultierten Mutationen des PxQxT-Motives und von Tyrosin 384 in einer Reduktion der LMP1-vermittelten NF- κ B-Aktivität, während die Doppelmutante LMP1(PQT \rightarrow AAA/Y384G) völlig inaktiv war. Als Nullwert diente in diesen Versuchen wieder die C-terminale Deletionsmutante LMP1 Δ 194-386, die NF- κ B nicht mehr aktivieren kann. Die Ergebnisse zeigen, daß dominant-negatives TRAF6 die NF- κ B-Aktivierung von LMP1 durch CTAR1 und CTAR2 nur partiell blockt. Ein stärkerer inhibitorischer Effekt von TRAF6(300-524) auf CTAR1- als auf CTAR2-vermittelte NF- κ B-Induktion war zu beobachten. Die NF- κ B-Aktivierung von LMP1 wurde durch die Y384G Mutation um 80 % reduziert, während die Mutation des PxQxT-Motivs eine Reduktion um 56 % bewirkte. Der Effekt des dominant-negativen TRAF6 auf die beiden LMP1-Mutanten LMP1(Y384G) und LMP1(PQT \rightarrow AAA) war damit jeweils stärker

als auf LMP1 Wildtyp. Diese Beobachtung ist vermutlich auf eine Interaktion der beiden Domänen zurückzuführen. Es wird davon ausgegangen, daß CTAR1 und CTAR2 physikalisch miteinander interagieren und bezüglich ihrer Funktion miteinander kooperieren (Floettmann *et al.*, 1998). Es ist deshalb anzunehmen, daß sich Moleküle, die an CTAR1 und CTAR2 des LMP1 Wildtyp-Proteins binden, gegenseitig beeinflussen und damit den Holo-komplex stabilisieren. Ist nun eine der beiden Domänen mutiert, ist der Signalkomplex der anderen Domäne möglicherweise zugänglicher für dominant-negatives TRAF6(300-524).

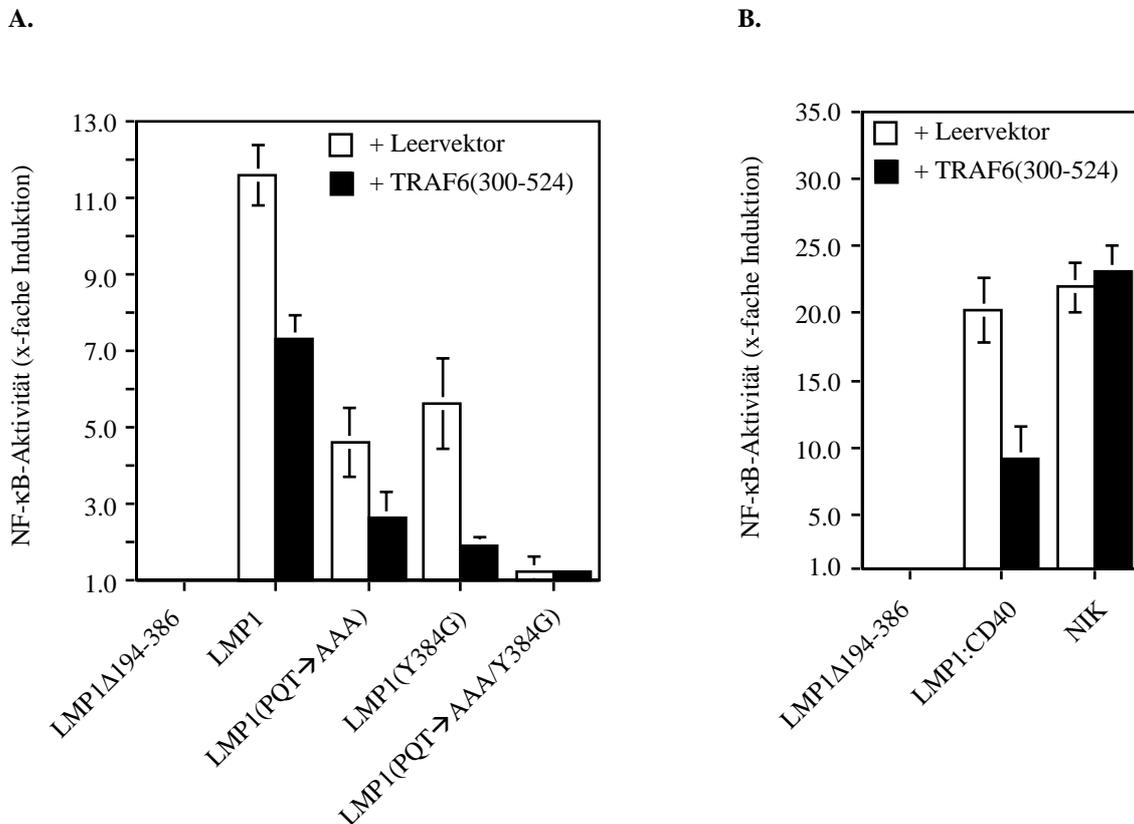


Abb. 4.6: Dominant-negatives TRAF6 interferiert mit der LMP1-vermittelten Aktivierung von NF-κB. Transientes Luziferase-Reportergen Experiment in HEK 293-Zellen. 10 ng 3x-κB-Luziferase-Reporterplasmid und 50 ng β-Galaktosidase-Expressionsplasmid wurden mit den entsprechenden Expressionsplasmiden wie angegeben in HEK 293-Zellen transfiziert: **(A)** 0,5 µg LMP1Δ194-386, LMP1wt, LMP1(PQT→AAA), LMP1(Y384G) oder LMP1(PQT→AAA/Y384G) mit 1,5 µg TRAF6(300-524) bzw. pcDNA3.1-Leervektor. **(B)** 0,5 µg LMP1Δ194-386, LMP1:CD40 oder NIK und 1,5 µg TRAF6(300-524) oder pcDNA3.1-Leervektor. **(A)** und **(B)** Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurde die Luziferase-Aktivität als Maß für die NF-κB-Induktion gemessen und die Werte für die β-Galaktosidase-Expression angeglichen (s. Material und Methoden). NF-κB-Aktivitäten (y-Achse) sind als x-fache Induktion im Vergleich mit der inaktiven LMP1Δ194-386 Mutante angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Um die Spezifität von TRAF6(300-524) auf die LMP1-induzierte NF- κ B-Aktivierung nachzuweisen, wurden entsprechende Kontrollversuche durchgeführt (Abb. 4.6B). Als Positivkontrolle diente LMP1:CD40, da für CD40 bereits gezeigt wurde, daß TRAF6 im Signalweg zu NF- κ B involviert ist (Pullen *et al.*, 1999a). Als Negativ-Kontrolle wurde die NF- κ B-induzierende Kinase (NIK) verwendet. NIK ist eine Kinase, die erst unterhalb der TRAF Proteine in der Signalkaskade zu NF- κ B eine Rolle spielt (s. Einleitung) und daher von einer dominant-negativen TRAF-Mutante nicht beeinflußt werden sollte. Wie erwartet, konnte TRAF6(300-524) tatsächlich nur die CD40-induzierte NF- κ B-Aktivierung blocken, zeigte aber keinen Effekt auf das NF- κ B Aktivierungspotential von NIK.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine Beteiligung von TRAF6 an dem Signalweg von LMP1 zu NF- κ B. Im Gegensatz zur essentiellen Bedeutung von TRAF6 für die Induktion von p38 MAPK durch LMP1, scheint TRAF6 in der LMP1 \rightarrow NF- κ B-Signalkaskade lediglich eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Koexpression von TRAF6(300-524) bewirkt eine völlige Inhibition der p38 MAPK-Aktivierung durch LMP1 (s. Abb. 4.1 und 4.2), während TRAF6(300-524) unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen NF- κ B-Induktion nur partiell inhibiert. Offensichtlich unterscheiden sich die Mechanismen, die zur Aktivierung von NF- κ B oder p38 MAPK durch LMP1 führen.

4.1.6. TRAF6 ist nicht in der Aktivierung von JNK1 durch LMP1 involviert

Nachdem gezeigt werden konnte, daß TRAF6 in zwei LMP1-induzierten Signalwegen, p38 MAPK und NF- κ B, involviert ist, stellte sich die Frage, ob TRAF6 auch bei der Aktivierung von JNK1 durch LMP1 eine Rolle spielt. In einem radioaktiven Kinaseexperiment wurde daher der Einfluß von TRAF6(300-524) auf LMP1- und LMP1:CD40-abhängige JNK1-Aktivität mit GST-c-Jun als Substrat (Abb. 4.7) getestet. Die Überexpression von TRAF6 führte zu einer Aktivierung der JNK1-Aktivität, die durch Koexpression von LMP1 oder LMP:CD40 noch erhöht wurde. TRAF6(300-524) zeigte jedoch keinen Effekt auf JNK1-Aktivierung durch LMP1 oder LMP:CD40 unter Bedingungen, die für eine völlige Inhibition

der p38 MAPK-Aktivierung durch LMP1 ausreichend waren (s. Abb. 4.1). Dieses Ergebnis unterstreicht nochmals die Spezifität von TRAF6(300-524) auf den p38 MAPK Signalweg. Offensichtlich ist TRAF6 kein Faktor des LMP1→JNK1 Signalweges. Die Tatsache, daß TRAF2 an der Induktion von p38 MAPK durch LMP1 beteiligt ist (Eliopoulos *et al.*, 1999), während es bei der Aktivierung von JNK1 keine Rolle spielt (Kieser *et al.*, 1999), demonstriert einen weiteren Unterschied der beiden Signalkaskaden. Die Induktion der p38 MAPK und JNK1 Signalwege durch LMP1 verzweigen sich offenbar oberhalb von TRAF2 und TRAF6.

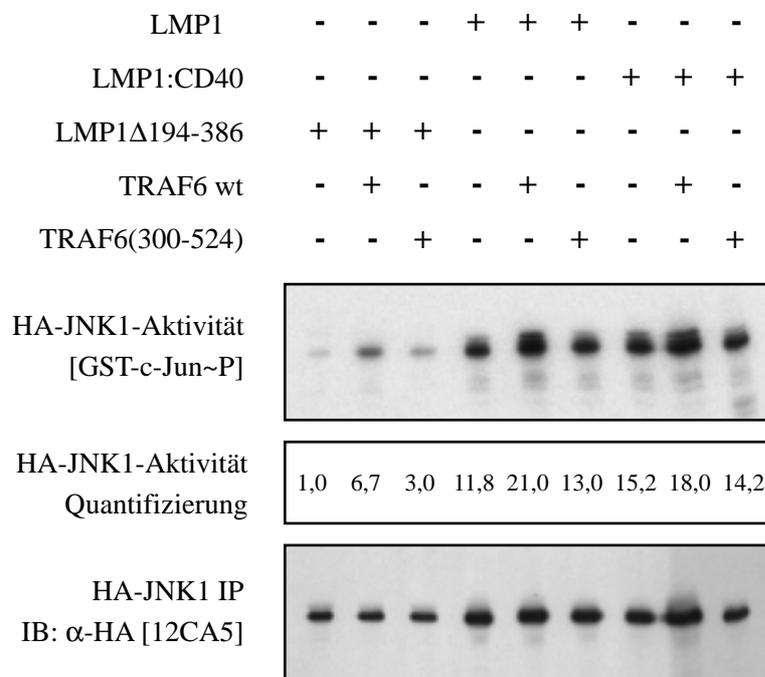


Abb. 4.7: TRAF6 ist nicht an der Aktivierung von JNK1 durch LMP1 oder durch CD40 beteiligt. HEK 293-Zellen wurden transient mit 1,0 µg HA-JNK1 zusammen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden wie angezeigt transfiziert: 1,0 µg LMP1Δ194-386, 1,0 µg LMP1wt, 10 µg LMP1:CD40, 1,0 µg TRAF6wt und 1,0 µg TRAF6(300-524). Transfizierte DNA-Mengen wurden mit pcDNA3.1-Leervektor auf 3,0 µg angeglichen. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurden radioaktive HA-JNK1 Immunkomplex Kinasereaktionen in Gegenwart von γ -³²P-ATP durchgeführt. Die HA-p38 MAPK-Aktivität ist durch Autoradiographie der *in vitro* Phosphorylierung von GST-ATF2 dargestellt.

4.1.7. TRADD vermittelt die Aktivierung von p38 MAPK durch LMP1

Wie in Abbildung 4.5 bereits gezeigt wurde, spielt Tyrosin 384 in der CTAR2-Domäne von LMP1 eine Hauptrolle hinsichtlich der Aktivierung von p38 MAPK durch LMP1. Es ist be-

kannt, daß diese Aminosäure essentiell für die direkte Bindung von TRADD an LMP1 ist (Izumi und Kieff, 1997). Es war daher interessant zu untersuchen, ob TRADD im Signalweg von LMP1 zu p38 MAPK positioniert ist. In unserem Labor konnte gezeigt werden, daß die LMP1-vermittelte Aktivierung von NF- κ B durch die Expression einer TRADD-Deletionsmutante, TRADD(1-194), der die sogenannte Todesdomäne fehlt, inhibiert werden kann, während diese Mutante auf die Induktion von JNK1 durch LMP1 keine Wirkung zeigt (Kieser *et al.*, 1999). Daher wurde der Effekt von TRADD(1-194) auf die LMP1-vermittelte p38 MAPK-Aktivierung getestet. Die in diesem Abschnitt dargestellten Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Arnd Kieser durchgeführt.

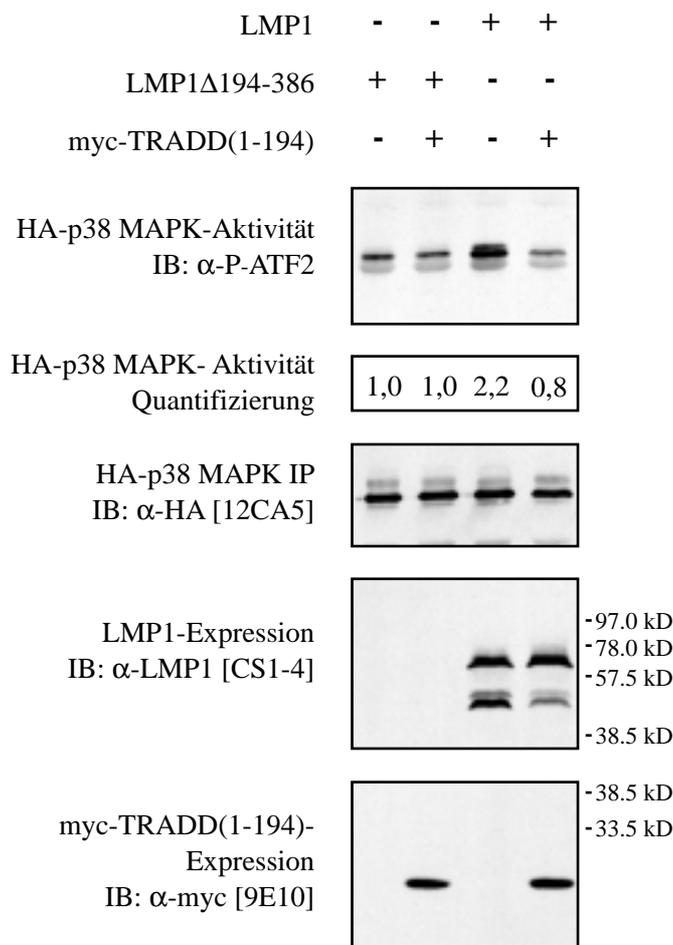


Abb. 4.8: Dominant-negatives TRADD inhibiert die LMP1-induzierte p38 MAPK-Aktivität. HEK 293-Zellen wurden transient mit 1,0 μ g HA-p38 MAPK zusammen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden wie angezeigt transfiziert: 1,0 μ g LMP1wt, 1,0 μ g LMP1 Δ 194-386 und 0,5 μ g myc-TRADD(1-194). Jeweils 0,5 μ g pcDNA-p35 wurden kotransfiziert, um Apoptose zu verhindern. Transfizierte DNA-Mengen wurden mit pRK5-Leervektor auf 3,0 μ g angeglichen.

Die Abbildung 4.8 zeigt, daß die Expression von TRADD(1-194) sehr effektiv die Signaltransduktion von LMP1 zu p38 MAPK blockt. Dabei muß dominant-negatives TRADD, das an Tyrosin 384 von LMP1 bindet, mit der CTAR2-vermittelten Aktivierung von p38 MAPK interferieren. Anhand dieser Versuche konnte TRADD als eine weitere Komponente der LMP1→p38 MAPK Signalkaskade identifiziert werden. Da TRADD direkt mit der CTAR2-Domäne von LMP1 interagiert, TRAF6 jedoch nicht direkt an LMP1 bindet (Ishida *et al.*, 1996; Brodeur *et al.*, 1997; Schultheiss *et al.*, 2001), ist anzunehmen, daß TRAF6 unterhalb von TRADD im p38 MAPK Signalweg von CTAR2 agiert.

4.2. Untersuchung von Protein-Phosphorylierungsmustern in B-Zellen mit Hilfe eines konditionalen LMP1-Derivats

Die Zellen innerhalb eines Organismus müssen miteinander kommunizieren, um Wachstum und Differenzierung zu koordinieren. Dazu werden in der Zelle unterschiedliche Signalwege verwendet, die über einen spezifischen Rezeptor an der Zelloberfläche angeschaltet werden und die Signale zum Zellkern weiterleiten, wo in Folge individuelle Gene reguliert werden. Viele dieser Signalkaskaden funktionieren über sequentielle Phosphorylierung und/oder Dephosphorylierung der beteiligten Signalmoleküle. Auch in den Signalwegen, die von LMP1 aktiviert werden, sind Phosphorylierungsreaktionen involviert (s. Einleitung).

Um neue LMP1-abhängige Signalkaskaden zu identifizieren, wurden daher Unterschiede im Phosphorylierungsmuster von bekannten Signalproteinen in Abhängigkeit von LMP1-Aktivität untersucht. Hierzu wurde ein konditionales B-Zellsystem eingesetzt, das von Ulrike Dirmeier, Abteilung Genvektoren der GSF, etabliert wurde. In diesem konditionalen System kann LMP1-Signalaktivität innerhalb von Minuten auf Proteinebene induziert werden und somit Kurzeffekte wie z.B. Phosphorylierungsreaktionen untersucht werden. Dieses System besteht aus einem NGF-R:LMP1-Fusionsprotein, das mit Hilfe von Antikörpern kreuzvernetzt und damit aktiviert werden kann (s. Abb. 4.9). Das Fusionsprotein besteht aus dem

extrazellulären und transmembranen Anteil des humanen niedrig-affinen p75 Nervenwachstumsfaktor („nerve growth factor“, NGF)-Rezeptors und der intrazellulären C-terminalen Signaldomäne von LMP1 (Gires *et al.*, 1997). Durch Stimulierung der Zellen mit Primärantikörper, der an den extrazellulären NGF-R-Anteil bindet und einem Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, kommt es zu einer Quervernetzung der NGF-R:LMP1-Moleküle in der Plasmamembran, in deren Folge LMP1-Signalaktivität durch den intrazellulären Anteil des Fusionsproteins induziert wird. Die Bindung des α -NGF-R-Antikörpers alleine ist für die Aktivität von NGF-R:LMP1 nicht ausreichend (Gires *et al.*, 1997). Die induzierte Aggregation der NGF-R:LMP1-Moleküle ersetzt die Autoaggregation von LMP1 Wildtyp-Molekülen in der Plasmamembran und ist ausreichend für die Induktion von Signaltransduktion, die durch den LMP1 C-Terminus vermittelt wird (Floettmann und Rowe, 1997; Gires *et al.*, 1997).

Dieses NGF-R:LMP1-Fusionskonstrukt ist im Austausch gegen das LMP1 Wildtyp-Gen in ein sogenanntes Maxi-EBV Plasmid kloniert worden, auf dem alle restlichen EBV-Gene vorhanden sind (Delecluse *et al.*, 1998). Mit dem das NGF-R:LMP1-tragende Maxi-EBV wurde durch Infektion primärer B-Zellen eine immortalisierte B-Zelllinie generiert (B64-19/3, U. Dirmeier, unveröffentlichte Daten). Da LMP1-Aktivität für die effiziente Immortalisierung und Proliferation solcher LCLs essentiell ist (Kaye *et al.*, 1993; Kilger *et al.*, 1998), können B64-19/3-Zellen nur nach künstlicher LMP1-Aggregation oder in Kokultur mit einer Fibroblastenzelllinie (WI-38) proliferieren. Der genaue Effekt der Fibroblasten-Kokultur ist noch nicht geklärt. Es ist jedoch offensichtlich, daß von diesen Zellen Signale ausgehen, die eine Proliferation auch ohne LMP1-Aktivität ermöglichen.

Für die Analyse von LMP1-abhängigen Proteinphosphorylierungen wurden B64-19/3-Zellen 48 Stunden vor der Stimulierung aus der Fibroblasten-Kokultur entnommen. Dies hat einen Arrest der Zellen im Zellzyklus zur Folge (U. Dirmeier, persönliche Mitteilung). Offensichtlich sind in dieser Situation proliferative Signalwege nicht mehr aktiv und erst die Induktion der NGF-R:LMP1-Aktivität führt zu einer Aktivierung von LMP1-spezifischen, proliferativen Signalkaskaden. Bei einer Zelldichte von 10^5 Zellen/ml wurden die Zellen zunächst für

60 Minuten mit α -NGF-R-Antikörper inkubiert. Danach erfolgte die Quervernetzung und damit die Stimulierung von NGF-R:LMP1-Aktivität durch Zugabe des α -Maus IgG Sekundärantikörpers in das Zellkulturmedium. Als Negativ-Kontrolle wurde parallel ein Teil der Zellen nur mit α -NGF-R-Antikörper behandelt, was für die Aktivität von NGF-R:LMP1 nicht ausreichend ist. Die Lysate der stimulierten und der nicht-stimulierten Zellen wurden anschließend im Immunoblot mit unterschiedlichen phosphospezifischen Antikörpern untersucht.

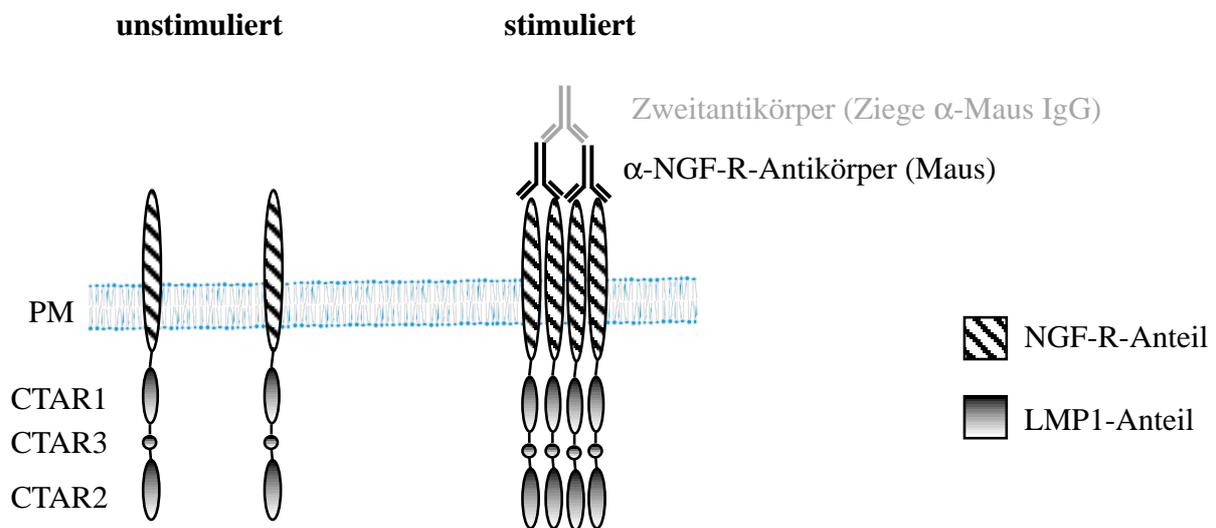


Abb. 4.9: Schematische Darstellung des konditionalen NGF-R:LMP1-Fusionsproteins. Für die Aktivität von LMP1 ist eine Autoaggregation der LMP1-Moleküle in der Plasmamembran verantwortlich, die durch die LMP1 Transmembrandomänen vermittelt wird. Die Signalaktivität von LMP1 kann auch durch künstliche Aggregation eines NGF-R:LMP1-Fusionsproteins mit Hilfe von Antikörpern erreicht werden (Gires *et al.*, 1997). Das Fusionsprotein ist ein Chimär bestehend aus der extrazellulären und transmembranen Domäne des NGF-Rezeptors und der intrazellulären C-terminalen Signaldomäne von LMP1. Aufgrund der LMP1 Signaldomäne induziert NGF-R:LMP1 das identische Signaltransduktionsmuster wie LMP1wt. Die Aktivierung von NGF-R:LMP1 erfolgt über die Quervernetzung des Fusionsproteins durch α -NGF-R-Antikörper und einem Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Dieses NGF-R:LMP1-Konstrukt wurde im Austausch gegen das LMP1 Wildtyp-Gen in ein Maxi-EBV Plasmid, welches das EBV-Genom auf einem F-Faktor-basierenden Plasmid enthält, kloniert. Mit dem so veränderten EBV-Plasmid wurden anschließend primäre B-Zellen infiziert und somit immortalisiert (B64-19/3 Zellen) (U. Dirmeier, unveröffentlichte Daten). PM: Plasmamembran.

Wie in Abbildung 4.10 zu sehen ist, ist bereits 30 Minuten nach Zugabe des Sekundärantikörpers eine starke Phosphorylierung der p38 MAPK zu beobachten. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da die Aktivität von p38 MAPK durch LMP1 induziert werden kann, wie im ersten Teil der Arbeit gezeigt wurde. Dieses Ergebnis bestätigt außerdem die Funktionalität des konditionalen Zellsystems. Da LMP1 proliferative und anti-apoptotische Signalwege induziert, wurden im weiteren Verlauf bekannte Komponenten solcher Signalwege auf eine mögliche Phosphorylierung nach NGF-R:LMP1 Stimulierung getestet.

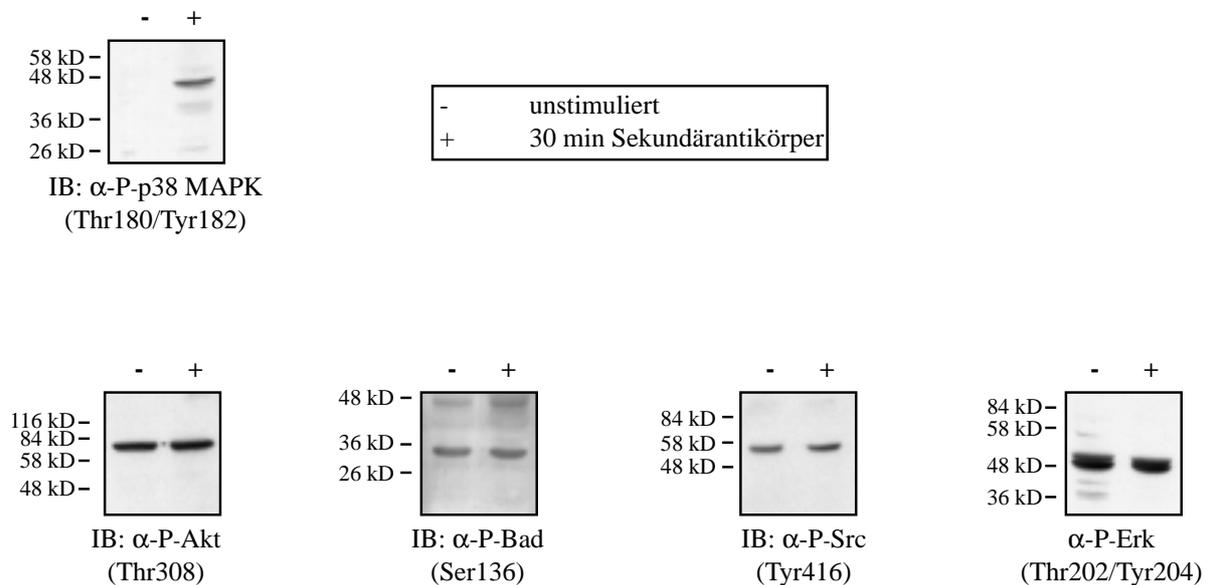


Abb. 4.10: Analyse des Phosphorylierungsstatus ausgewählter Signalmoleküle in Abhängigkeit von NGF-R:LMP1-Aktivität. Achtundvierzig Stunden vor der Stimulierung wurden B64-19/3 Zellen aus der WI-38 Fibroblasten-Kokultur entnommen und auf eine Zelldichte von 10^5 Zellen/ml eingestellt. Um die Zellen zu stimulieren, wurde $25 \mu\text{l}$ α -NGF-R-Antikörper (Kulturüberstand aus einer Hybridom-Zelllinie) für 1 h und anschließend $5 \mu\text{g/ml}$ Sekundärantikörper für 30 min zugegeben. Eine Induktion der NGF-R:LMP1-Aktivität wird erst durch Zugabe des Sekundärantikörpers erreicht. Als Negativ-Kontrolle wurden die Zellen lediglich 1 h mit α -NGF-R-Antikörper behandelt. Die Zellen wurden lysiert und die Proteine durch 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt. Proteinphosphorylierungen wurden mit den angegebenen phosphospezifischen Antikörpern im Immunoblot detektiert. In Klammern unter den verwendeten Antikörpern sind die Aminosäuren angegeben, deren Phosphorylierung für die Antikörper-Erkennung notwendig sind. Thr: Threonin, Tyr: Tyrosin.

Als erste mögliche LMP1-induzierte Signalkaskade wurde der Akt-Signalweg untersucht. Akt ist eine Serin/Threonin Proteinkinase, durch deren Aktivierung Apoptose inhibiert werden kann (Übersichtsartikel: Datta *et al.*, 1999). Akt wird durch Phosphorylierung der Aminosäuren Threonin 308 und Serin 473 aktiviert. Die anti-apoptotischen Effekte von Akt werden durch Phosphorylierung mehrerer Substrate vermittelt. Eines der Substrate ist das Protein Bad, das im unphosphorylierten Zustand an der Induktion von Apoptose beteiligt ist. In Folge seiner Phosphorylierung an Serin 136 durch Akt wird Bad inaktiviert (Datta *et al.*, 1997; del Peso *et al.*, 1997). Wie in Abbildung 4.10 gezeigt, ist nach 30 Minuten NGF-R:LMP1-Aktivität keine Veränderung der Phosphorylierung der Proteinkinase Akt oder des Bad Proteins zu beobachten. Diese beiden Signalmoleküle scheinen damit an den anti-apoptotischen Effekten von LMP1 nicht beteiligt zu sein.

Darüber hinaus wurde die Aktivierung der Src-Kinase in Abhängigkeit von LMP1 Signalaktivität in B64/19-3 Zellen getestet. Src gehört zu einer Familie von Tyrosin-Kinasen, die eine wichtige Rolle bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung eukaryontischer Zellen spielt (Brown und Cooper, 1996; Thomas und Brugge, 1997). Mit Hilfe des verwendeten phosphospezifischen Src-Antikörpers konnte jedoch keine Phosphorylierung von Src nach Induktion der NGF-R:LMP1-Aktivität nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurde die ERK-Signalkaskade als potentieller LMP1-induzierter Signalweg untersucht, da ERK ebenfalls in der Proliferation und Differenzierung von Zellen involviert ist (Übersichtsartikel: Kolch, 2000 und s. Einleitung). ERK wird durch direkte Phosphorylierung durch die Raf-1 Kinase aktiviert. Im Immunoblot mit einem α -Phospho-ERK-Antikörper, der phosphoryliertes ERK1 und ERK2 detektiert, konnten jedoch keine Unterschiede im Phosphorylierungsmuster durch die Aktivität von NGF-R:LMP1 beobachtet werden. Dieses Ergebnis bestätigt Untersuchungen aus unserem Labor, die gezeigt haben, daß ERK2 in transienten Versuchen in HEK 293-Zellen nicht durch LMP1 induziert wird (Kieser *et al.*, 1997).

Die in diesen Versuchen verwendeten Antikörper erkennen ihr Epitop nur, wenn es in der jeweils phosphorylierten Form vorliegt. Die Antikörper wurden so gewählt, daß sie spezifisch das aktivierte Protein aufgrund seiner Phosphorylierung detektieren. Es ist nicht auszuschließen, daß die untersuchten Signalmoleküle an anderen Stellen Änderungen des Phosphorylierungsmusters aufweisen, die jedoch nicht in der Aktivierungsdomäne liegen und somit keine Rolle bezüglich ihrer Aktivierung spielen. Die Resultate lassen darauf schließen, daß das onkogene Potential von LMP1 offenbar nicht durch die Induktion des Akt/Bad-Signalweges oder die der Src- und ERK-Kinasen vermittelt wird.

4.3. Charakterisierung der LMP1-vermittelten JNK2-Aktivierung

4.3.1. Phosphorylierung von JNK2 nach Induktion von NGF-R:LMP1-Aktivität in B-Zellen

Die Gruppe der c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) gehört zu den Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK), die durch zellulären Streß, Zytokine und mitogene Stimuli aktiviert werden (s. Einleitung). Die Aktivität von JNK ist notwendig für die Regulation von Entzündungsreaktionen, Zellproliferation und Apoptose. Die Aktivierung von JNK erfolgt über Phosphorylierung von Threonin 183 und Tyrosin 185 innerhalb eines für MAPKs typischen Thr-Pro-Tyr-Motives (Übersichtsartikel: Whitmarsh und R.J., 1996 und s. Einleitung). Die JNK1- und JNK2-Signalwege aktivieren den AP-1 Transkriptionsfaktor. Es wurde beschrieben, daß diese Signalwege an transformierenden Prozessen einiger Onkogene beteiligt sind (Whitmarsh und R.J., 1996). Eine steigende Zahl an Veröffentlichungen zeigt, daß JNK1 und JNK2 verschiedene Funktionen zugeordnet sind und sie oft nicht redundant wirken (Butterfield *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1997; Potapova *et al.*, 2000). Die bisherigen Forschungsergebnisse über LMP1 konzentrierten sich auf die Induktion von JNK1 (Kieser *et al.*, 1997;

Eliopoulos und Young, 1998; Hatzivassiliou *et al.*, 1998). Im Zusammenhang mit Untersuchungen zu LMP1-vermittelten Änderungen des Phosphorylierungsmusters (s. Abschnitt 4.2) wurde auch die Phosphorylierung von JNKs nach Induktion von NGF-R:LMP1-Aktivität analysiert.

Mit Hilfe des oben beschriebenen konditionalen B64-19/3 Zellsystems (Abschnitt 4.2.) konnte gezeigt werden, daß das 55 kD große JNK2 Protein 30 Minuten nach Zugabe des Sekundärantikörpers wesentlich stärker phosphoryliert war als das 46 kD große JNK1 Protein (Abb. 4.11). Der in Abbildung 4.11, links, verwendete α -Phospho-JNK-Antikörper (Thr183/Tyr185) erkennt sowohl die zweifach phosphorylierte Form von JNK1 als auch die von JNK2. Auf der rechten Seite der Abbildung wurde mit Hilfe eines Antikörpers, der JNK1 und JNK2 detektiert, sichergestellt, daß die JNK-Proteinexpression durch die Aktivität von LMP1 nicht beeinflußt wurde. Da das Expressionsniveau von JNK2 im Vergleich zu JNK1 sogar geringer war, seine Phosphorylierung jedoch um ein vielfaches stärker, weist dieses Ergebnis darauf hin, daß JNK2 in Abhängigkeit von LMP1-Signalaktivität im Verhältnis zu JNK1 offensichtlich bevorzugt phosphoryliert wird.

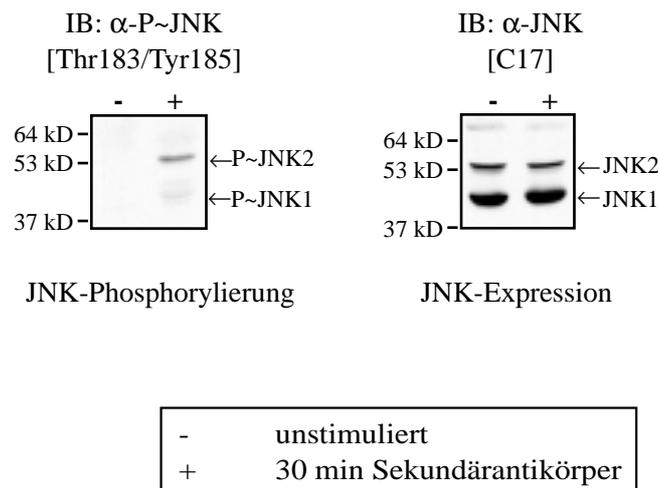


Abb. 4.11: Phosphorylierung von JNK1 und JNK2 nach Induktion der NGF-R:LMP1-Aktivität in B64-19/3 Zellen. Die Stimulierung der B64-19/3 Zellen erfolgte wie in Abb. 4.10 beschrieben. Links: Detektion der Phosphorylierung von JNK1 und JNK2 durch Verwendung des phosphospezifischen Antikörpers α -Phospho-JNK (Thr183/Tyr185) (NEB). Dieser Antikörper erkennt sowohl JNK1 als auch JNK2 nur in ihrer jeweils phosphorylierten Form. Rechts: Expression von JNK1 und JNK2 im Immunoblot mit einem für beide JNK-Homologe spezifischen Antikörper (C17).

4.3.2. LMP1 aktiviert HA-JNK2

In weiteren Versuchen sollte die Aktivierung von JNK2 durch LMP1 genauer charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Induktion eines Hämagglutinin (HA)-Epitop fusionierten JNK1 und JNK2 Proteins (HA-JNK1 und HA-JNK2) durch LMP1 in einem *in vitro* Kinaseversuch untersucht. Dafür wurden zunächst HA-JNK1 und HA-JNK2 in den Vektor pcDNA3.1 kloniert (s. Material und Methoden). Expressionsplasmide für HA-JNK1 bzw. HA-JNK2 wurden zusammen mit LMP1 transient in HEK 293-Zellen transfiziert. Die Aktivitäten des anschließend aus dem Zellysat immunpräzipitierten HA-JNK1 und HA-JNK2 wurden in radioaktiven Kinasereaktionen mit GST-c-Jun als Substrat getestet.

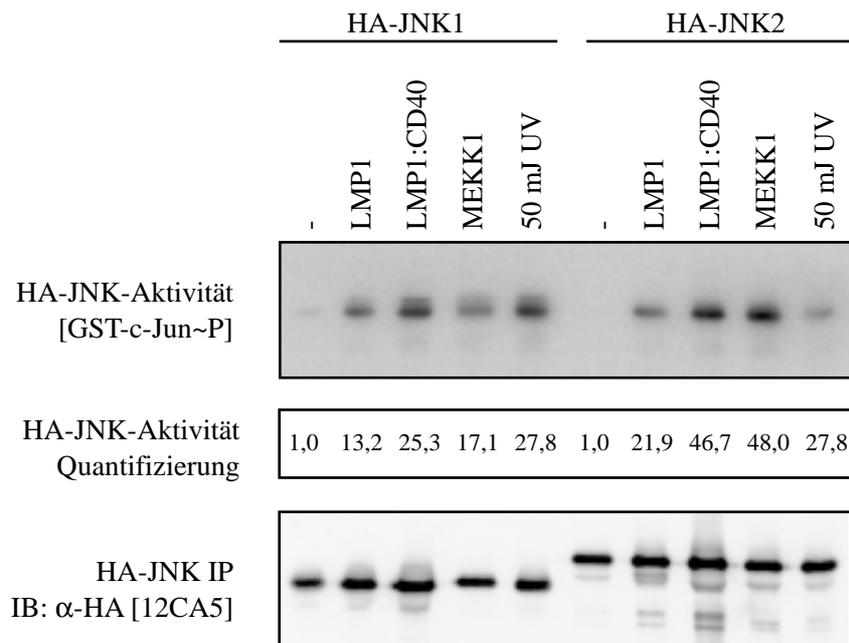


Abb. 4.12: Aktivierung von HA-JNK1 und HA-JNK2 durch LMP1. HEK 293-Zellen wurden transient mit 1,0 µg HA-JNK1 bzw. HA-JNK2 zusammen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden wie angezeigt transfiziert: 1,0 µg LMP1wt, 1,0 µg LMP1:CD40 oder 1,0 µg MEKK. Die Negativ-Kontrolle (-) und der UV-stimulierte Ansatz wurden mit 1,0 µg Lachsspermien-DNA transfiziert. Die UV-Stimulierung erfolgte durch 50 mJ UV-Bestrahlung in einem Stratalinker (Stratagene) 30 min vor Zellyse. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurden radioaktive HA-JNK1 bzw. 2 Immunkomplex Kinasereaktionen in Gegenwart von γ -³²P-ATP durchgeführt. HA-JNK1- bzw. HA-JNK2-Aktivität ist durch Autoradiographie der *in vitro* Phosphorylierung von GST-c-Jun dargestellt. HA-JNK1- bzw. 2-Aktivitäten wurden durch Phosphoimager basierte Quantifizierung der GST-c-Jun Phosphorylierung ermittelt.

Wie in Abbildung 4.12 gezeigt ist, konnte die Expression von LMP1 einen 21,9 fachen Anstieg der HA-JNK2-Aktivität bewirken, während die HA-JNK1-Aktivität um das 13,2 fache induziert wurde. Als Positiv-Kontrollen wurden weitere bekannte Aktivatoren der JNKs, wie CD40 (Berberich *et al.*, 1996), MEKK1 (Yan *et al.*, 1994) und UV-Strahlung (Derijard *et al.*, 1994) gewählt. Wie erwartet konnte sowohl die konstitutiv aktive LMP1:CD40-Chimäre (Gires *et al.*, 1997; Kieser *et al.*, 1999), MEKK1 als Mitglied der MAPKKK-Familie und UV-Strahlung als zellulärer Streßfaktor beide JNK-Homologe aktivieren. Mit der Ausnahme von UV-Strahlung wurde HA-JNK2 in dem gezeigten Versuch durch alle Faktoren stärker induziert als HA-JNK1. Diese relativen Unterschiede in der Aktivierungsintensität von JNK1 und JNK2 konnten jedoch in anderen Versuchen nicht bestätigt werden (Ergebnisse nicht gezeigt), während jedoch eine absolute Aktivierung beider JNK-Moleküle durch die genannten Faktoren immer beobachtet werden konnte. Die Differenzen der Aktivierungsintensität beruhen möglicherweise auf der unterschiedlichen Expression der transfizierten Plasmide in den jeweiligen Versuchen.

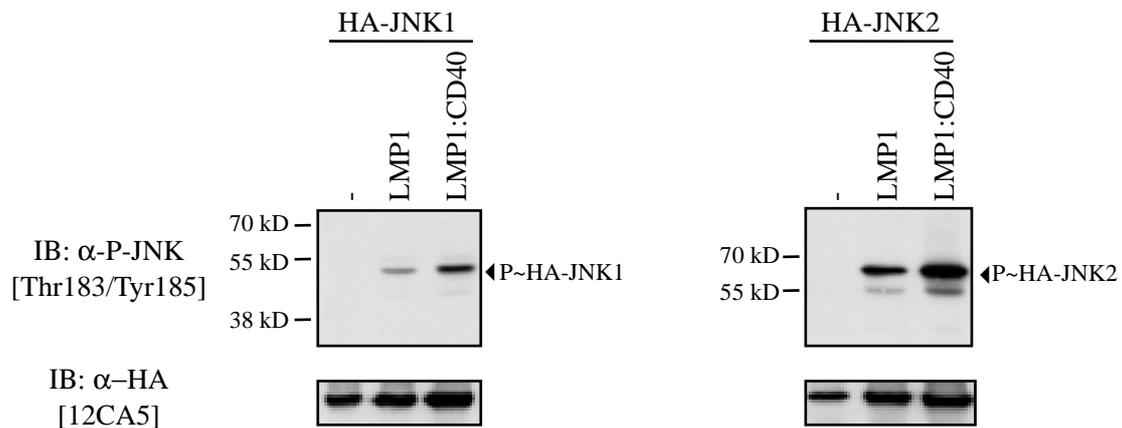


Abb. 4.13: LMP1-vermittelte Phosphorylierung von HA-JNK1 und HA-JNK2. HEK 293-Zellen wurden transient mit 1,0 µg HA-JNK1 bzw. HA-JNK2 zusammen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden wie angezeigt transfiziert: 1,0 µg LMP1wt oder 1,0 µg LMP1:CD40. Die Negativ-Kontrolle (-) wurde mit 1,0 µg Lachsspermien-DNA transfiziert. Der Immunoblot zeigt die Phosphorylierung von HA-JNK1 und HA-JNK2 durch einen phosphospezifischen α-JNK-Antikörper. Unterer Immunoblot: Expression von HA-JNK1 und HA-JNK2.

In Abbildung 4.13 ist gezeigt, daß die Induktion von HA-JNK1 und HA-JNK2 auch mit Hilfe des α -Phospho-JNK-Antikörpers in Zellysaten vor der Immunpräzipitation nachgewiesen werden konnte. Bei gleicher HA-JNK1 bzw. HA-JNK2-Expression (Abb. 4.13 unten), ist nach Koexpression von LMP1 und LMP1:CD40 eine starke Induktion der JNK-Phosphorylierung zu beobachten. Die Bande, die unterhalb des phosphorylierten HA-JNK2 im Immunoblot zu erkennen ist, repräsentiert vermutlich phosphoryliertes endogenes JNK2, das im SDS-Gel schneller als das größere HA-JNK2 läuft. Diese Ergebnisse zeigten zum ersten Mal, daß JNK2 durch LMP1 aktiviert werden kann.

4.3.3. Charakterisierung der JNK2-Aktivierungsdomäne von LMP1

Es konnte u.a. in unserem Labor gezeigt werden, daß für die Aktivierung von JNK1 die CTAR2-Domäne von LMP1 essentiell ist (Kieser *et al.*, 1997; Eliopoulos und Young, 1998). Eine genauere Mutationsanalyse ergab, daß die Aminosäuren 379 bis 384 in CTAR2 für die JNK1-Induktion verantwortlich sind (s. Abb. 1.1) und daß allein durch Mutation der Aminosäure Tyrosin 384 diese Induktion stark reduziert wird (Kieser *et al.*, 1999). In Analogie dazu wurde untersucht, welche Bereiche des LMP1 C-Terminus die Aktivierung von JNK2 vermitteln. In transienten JNK-Kinaseversuchen wurden LMP1-Mutanten hinsichtlich ihres Aktivierungspotentials auf HA-JNK1 und HA-JNK2 untersucht (Abb. 4.14).

Wie erwartet hatte die Mutation des PxQxT-Motives keinen Einfluß auf die Induktion von HA-JNK1 durch LMP1, während die Y384G Mutation zu einer starken Reduktion führte. Die Doppelmutante LMP1(PQT \rightarrow AAA/Y384G) wurde in diesem Versuch als Nullwert gewählt, da sie, wie in unserem Labor gezeigt wurde, keine JNK1-Aktivierung mehr vermitteln kann (Kieser *et al.*, 1999). Bezüglich dieser Mutante bewirkte LMP1 Wildtyp eine 4,5 fache Induktion der HA-JNK2-Aktivität. Die Mutation von Y384 in CTAR2 führte zu einer fast vollständigen Reduktion dieser Aktivierung, vergleichbar mit der von HA-JNK1. Eine Mutation in CTAR1 hatte auf HA-JNK2-Induktion nur eine sehr schwache Auswirkung. Die Induktion war um ca. 15 % geringer als die durch LMP1 Wildtyp vermittelte Aktivierung. Die Ergebnisse zeigen, daß JNK2-Induktion durch LMP1 im Wesentlichen dem Muster von JNK1 folgt.

Offensichtlich spielt für die Aktivierung von JNK2 ebenfalls die CTAR2-Domäne eine Hauptrolle.

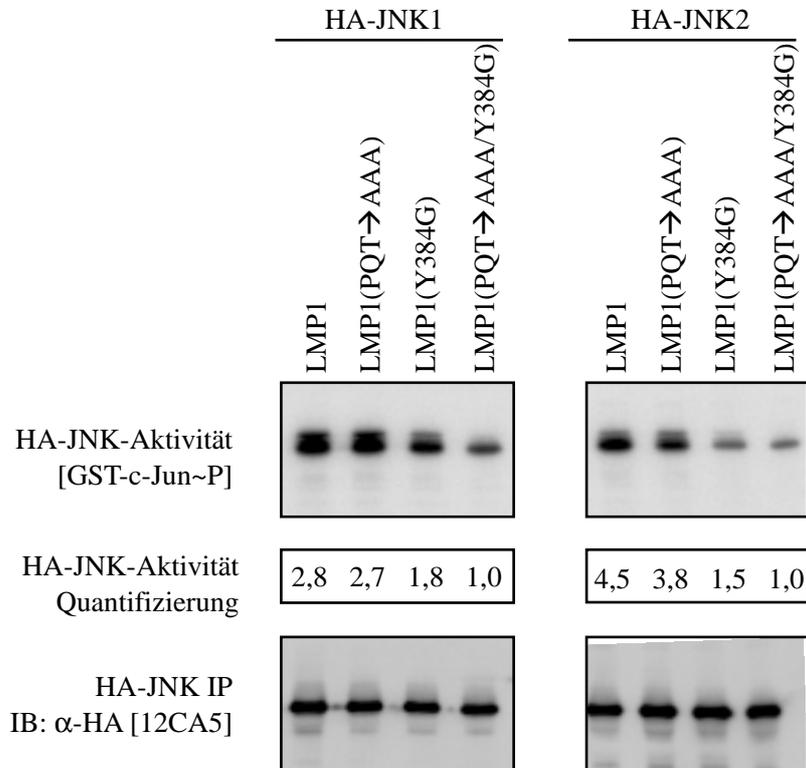


Abb. 4.14: Charakterisierung der LMP1-Domänen, die an der Aktivierung von JNK2 beteiligt sind. HEK 293-Zellen wurden transient mit 1,0 µg HA-JNK1 bzw. HA-JNK2 zusammen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden wie angezeigt transfiziert: 1,0 µg LMP1wt, 1,0 µg LMP1(PQT→AAA), 1,0 µg LMP1(Y384G) oder 1,0 µg LMP1(PQT→AAA/Y384G). Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurden radioaktive Immunkomplex Kinasereaktionen durchgeführt. Die Aktivitäten von HA-JNK1 und HA-JNK2 sind durch Autoradiographie des *in vitro* phosphorylierten GST-c-Jun dargestellt. Die Induktion von HA-JNK1 bzw. HA-JNK2 durch LMP1wt und LMP1-Mutanten sind nach Phosphoimager-basierter Quantifizierung relativ zu LMP1(PQT→AAA/Y384G) angegeben.

4.3.4. Konstruktion von dominant-negativen JNK1 und JNK2-Mutanten

Für Untersuchungen von Signalwegen werden oft dominant-negative Formen von Signalmolekülen verwendet. Durch die Überexpression dieser dominant-negativen Mutanten wird der Effekt des unterschüssigen endogenen Wildtyp-Moleküls durch Konkurrenz aufgehoben. Die Verwendung dominant-negativer Signalmoleküle ermöglicht eine Unterbrechung der Signal-

weiterleitung in Signalkaskaden. Sie sind somit ein wichtiges Werkzeug bei der Identifikation neuer Signalfaktoren und deren Einordnung in das verzweigte Netz der Signaltransduktion.

Bisher entwickelte potentiell dominant-negative JNK-Mutanten basierten auf einer Mutation innerhalb der Aktivierungsdomäne (s. Abb. 4.15). Die Aktivierungsdomäne beinhaltet ein für MAPKs charakteristisches Thr-X-Tyr-Motiv, das im Zuge der JNK-Aktivierung von MAPKKs phosphoryliert wird. Durch Mutation dieses Motivs soll JNK in eine nicht mehr aktivierbare Form überführt werden. Versuche in unserem Labor zeigten jedoch, daß derartig konstruierte JNK1-Mutanten allein durch Überexpression, unabhängig von sonstigen Aktivatoren, konstitutiv aktiv waren (Arnd Kieser, persönliche Mitteilung). Der Grund für dieses Verhalten liegt in der immer noch funktionalen Kinasedomäne. Da eine Mutation der Aktivierungsdomäne offensichtlich nicht zu einer dominant-negativen JNK-Variante führt, sollte dies durch Einführung einer anderen Mutation erreicht werden. Um Substrate phosphorylieren zu können, besitzen Kinasen in ihrer katalytischen Domäne eine ATP-Bindestelle. Ein konserviertes Aspartat-Phenylalanin-Glycin (DFG) Sequenzmotiv, das in cAMP-abhängigen Protein Kinasen (PKAs) identifiziert wurde (Buechler und Taylor, 1988; Zheng *et al.*, 1993), ist für die Bindung von Mg^{2+} verantwortlich und somit an der ATP-Bindung von Kinasen beteiligt. Durch Sequenzanalyse wurden hier die Aminosäuren 169 bis 171 als potentielles DFG-Motiv in JNK1 und JNK2 identifiziert. Dieses konservierte Motiv sollte nun mutiert und der Einfluß dieser Mutation auf die JNK1- und JNK2-Aktivität getestet werden.

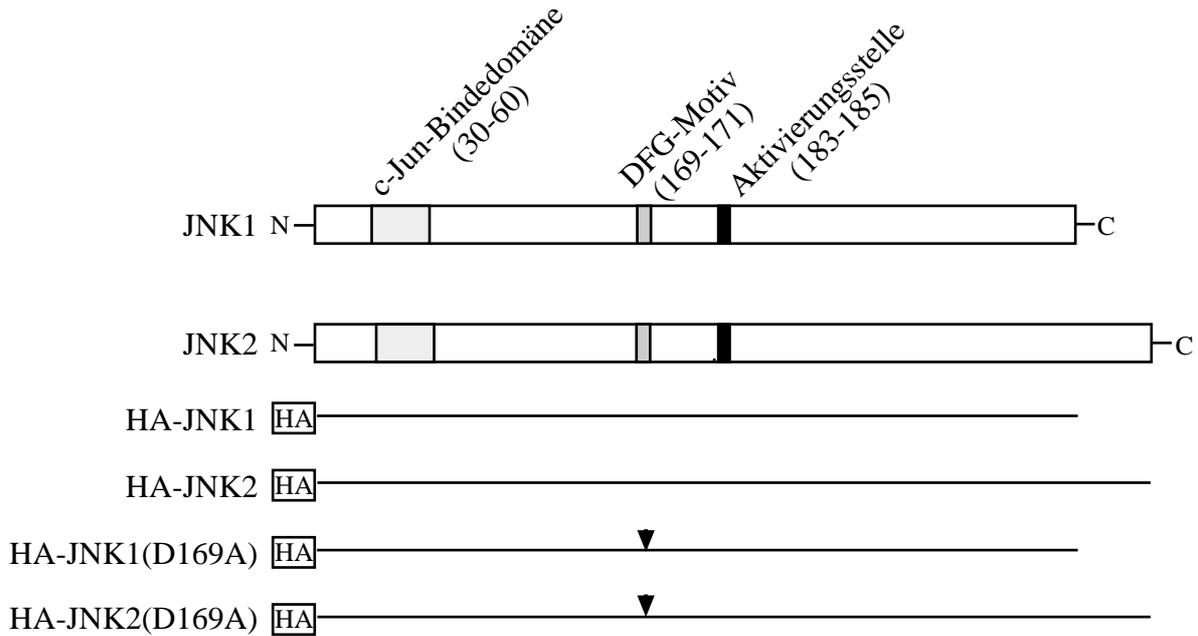


Abb. 4.15: Schematische Darstellung der JNK-Domänen und der hier klonierten HA-JNK-Konstrukte.

Die Mitglieder der MAPK-Familie JNK1 und JNK2 sind auf DNA-Ebene zu 83 % identisch. Das JNK2-Protein (424 As) ist aufgrund eines verlängerten N-Terminus größer als das JNK1-Protein (385 As). Die Bindestelle für das Substrat c-Jun ist zwischen den As 30 und 60 lokalisiert. Das potentielle DFG-Motiv der ATP-Bindestelle, das für die Mg^{2+} -Bindung zuständig ist, umfaßt die As 169 bis 171. Das für MAPKs charakteristische Aktivierungsmotiv Threonin-X-Tyrosin (As 183-185) wird durch MAPK-Kinasen (z.B. SEK1) phosphoryliert, was zur Aktivierung von JNK1 und JNK2 führt. Unten sind die Hämagglutinin (HA)-Epitop fusionierten JNK1 und JNK2-Konstrukte und die Mutanten HA-JNK1(D169A) und HA-JNK2(D169A) gezeigt, die in ihrem DFG-Motiv mutiert sind. Das schwarze Dreieck markiert die über PCR eingeführte Mutation.

Mit Hilfe der „overlap-Extension-PCR“ Methode (Ho *et al.*, 1989; Horton *et al.*, 1989) wurde das DFG-Motiv in HA-JNK1 und HA-JNK2 durch Austausch des Aspartatrestes gegen ein Alanin zu AFG mutiert (Abb. 4.15 und Material und Methoden). Die daraus resultierenden Mutanten HA-JNK1(D169A) und HA-JNK2(D169A) wurden zunächst auf ihre Kinaseaktivität hin in einem radioaktiven Immunkomplex Kinaseversuch untersucht. Dazu wurden Expressionsplasmide für HA-JNK1 und 2 Wildtyp bzw. HA-JNK1(D169A) und HA-JNK2(D169A) zusammen mit LMP1 bzw. LMP1 Δ 194-386 transient in HEK 293 transfiziert und die immunpräzipitierten HA-JNK Varianten anschließend mit GST-c-Jun als Substrat in einer Kinasereaktion getestet. Abbildung 4.16 zeigt, daß die Überexpression der Wildtyp HA-JNK Varianten in einer geringen JNK1- und JNK2-Aktivität resultiert, die durch Koexpression von LMP1 Wildtyp wesentlich verstärkt wurde. Die Aktivität von HA-JNK2

durch LMP1-Koexpression stieg um den Faktor 4,0, die von HA-JNK1 um 2,4. Bei Koexpression von LMP1 mit HA-JNK1(D169A) oder HA-JNK2(D169A) konnte keine Phosphorylierung von GST-c-Jun mehr nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Mutation des DFG-Motivs zu Kinase-inaktiven JNK1- und JNK2-Mutanten führt, die in Folge dessen ihr Substrat nicht mehr phosphorylieren können.

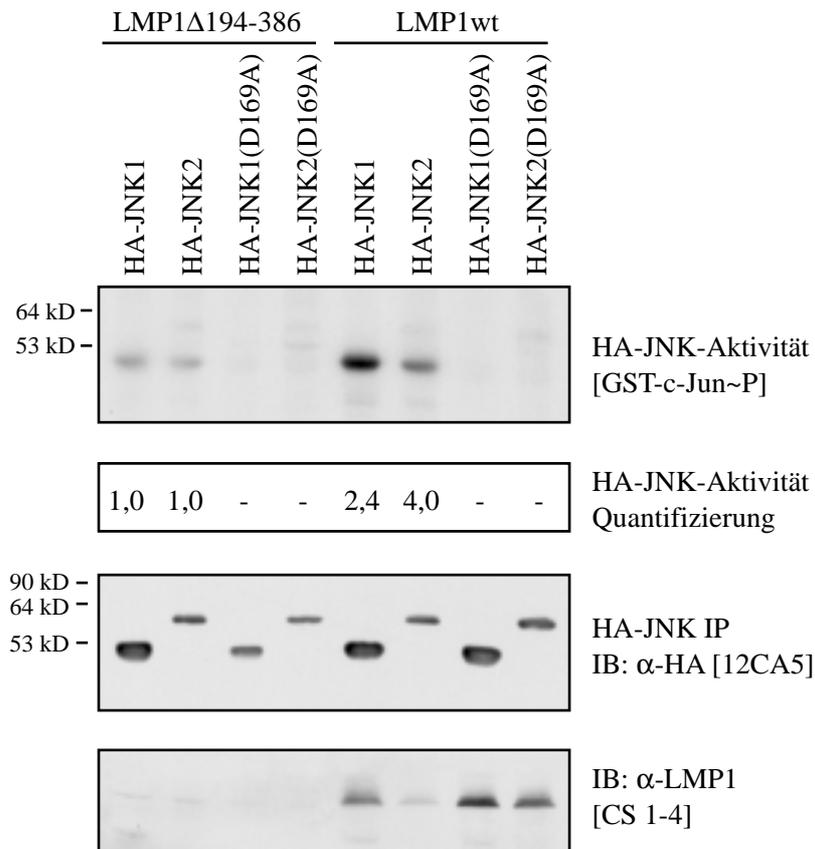


Abb. 4.16: HA-JNK1(D169A) und HA-JNK2(D169A) besitzen keine Kinaseaktivität. HEK 293-Zellen wurden transient mit 1,0 μ g LMP1 Δ 194-386 bzw. LMP1wt zusammen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden wie angezeigt transfiziert: 1,0 μ g HA-JNK1, 1,0 μ g HA-JNK2, 1,0 μ g HA-JNK1(D169A) oder 1,0 μ g HA-JNK2(D169A). JNK-Aktivitäten sind durch Autoradiographie des *in vitro* phosphorylierten GST-c-Jun dargestellt. HA-JNK-Aktivitäten wurden auf die JNK- und LMP1-Expression angeglichen (s. Material und Methoden).

4.3.5. Inhibition von LMP1-induzierter AP-1-Aktivität durch dominant-negative HA-JNK1 und HA-JNK2-Mutanten

Wenn LMP1 den Transkriptionsfaktor AP-1 über JNK1 und JNK2 induziert, sollten funktionale dominant-negative JNK-Mutanten die durch LMP1 induzierte AP-1-abhängige Transkription blocken können. Um die klonierten HA-JNK1(D169A) und HA-JNK2(D169A) Mutanten auf ihre Funktionalität zu überprüfen, wurden sie zusammen mit einem LMP1-Expressionsplasmid und einem AP-1 Luziferase-Reportergenkonstrukt (pRTU14) transient in HEK 293-Zellen transfiziert. Dieses Reportergenkonstrukt besitzt ein Luziferasegen unter der Kontrolle eines Minimalpromotors und vier AP-1-Bindestellen. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und ein Luziferase-Reportergenversuch durchgeführt.

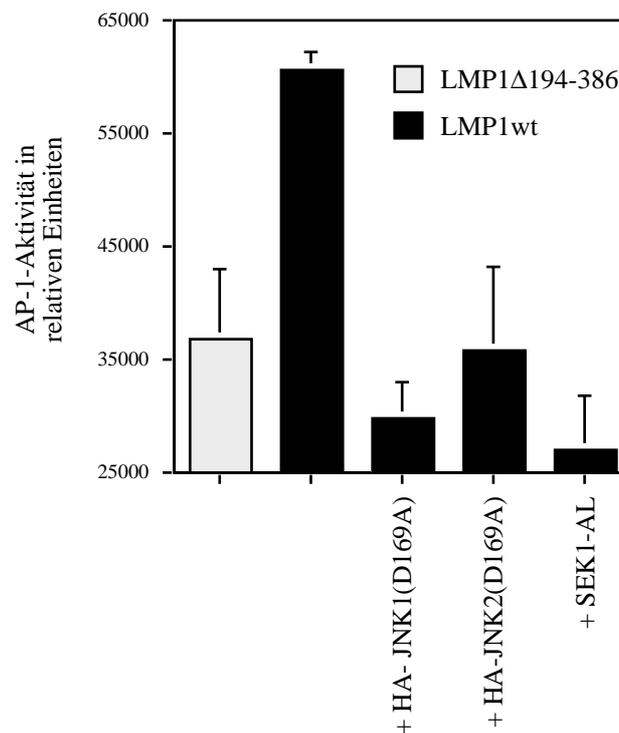


Abb. 4.17: Inhibition von LMP1-induzierter AP-1-Aktivität durch HA-JNK1(D169A) und HA-JNK2(D169A). 50 ng AP-1 Reporterplasmid pRTU14 (4xTRE-Luziferase Plasmid) und 50 ng β -Galaktosidase-Expressionsplasmid wurden mit den entsprechenden Expressionsplasmiden wie angegeben in HEK 293-Zellen transfiziert: 1,0 μ g der inaktiven LMP1 Δ 194-386 Deletionsmutante bzw. 1,0 μ g LMP1wt zusammen mit 1,0 μ g HA-JNK1(D169A), HA-JNK2(D169A) oder SEK1(S220A/T224L). Die dominant-negative Mutante SEK1(S220A/T224L) diente als Kontrolle. Nach 24 h wurden die Luziferase-Aktivitäten als Maß für die AP-1-Induktion gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei Experimenten. Die AP-1-Aktivität (y-Achse) ist in relativen Einheiten angegeben und wurde auf die β -Galaktosidase-Expression angeglichen (s. Material und Methoden).

Die Auswertung der Luziferase-Werte ergab, daß die Expression von LMP1 zu eine Induktion der AP-1-Aktivität führt, die durch Koexpression beider JNK-Mutanten inhibiert wird (Abb. 4.17). Die Luziferaseaktivität als Maß der AP-1-Aktivität ist nach Koexpression von LMP1 mit HA-JNK1(D169A) und HA-JNK2(D169A) auf bzw. unter dem Basisniveau der Koexpression mit LMP1 Δ 194-386, das kein Signaltransduktionspotential besitzt. Als Positivkontrolle wurde eine dominant-negative SEK1-Mutante, SEK1(S220A/T224L), kotransfiziert. SEK1 ist eine Kinase, die JNK1 phosphorylieren und somit aktivieren kann und deren dominant-negative Mutante erwiesenermaßen LMP1-induzierte AP-1-Aktivität blockt (Kieser *et al.*, 1997). Wie erwartet, inhibiert auch die SEK1-Mutante die durch LMP1 induzierte AP-1-Aktivität. Diese Ergebnisse belegen eindeutig den dominant-negativen Effekt von HA-JNK1(D169A) und HA-JNK2(D169A). Damit konnte erstmals auf direktem Weg eine Rolle von JNK1 und JNK2 in der AP-1-Induktion durch LMP1 gezeigt werden. Mit Hilfe dieser dominant-negativen JNK-Mutanten kann nun in der Zukunft die Rolle von JNK1 und JNK2 in der Signaltransduktion und Biologie von LMP1 näher charakterisiert werden.

4.4. Untersuchungen zum Einfluß der LMP1-Aktivität auf das p53 Tumorsuppressorprotein

Das p53 Tumorsuppressorprotein ist ein Transkriptionsfaktor (Kern *et al.*, 1991), der in Folge unterschiedlicher zellulärer Streßbedingungen, wie z.B. DNA-Schädigung, aktiviert wird (Fritsche *et al.*, 1993) und zu Zellzyklus-Arrest oder Apoptose führt (Canman *et al.*, 1995). Aufgrund seiner biologischen Funktion bekam das p53 Protein das Attribut „Wächter des Genoms“ verliehen. Störungen des p53 Signalweges sind bei einer großen Anzahl menschlicher Krebserkrankungen zu beobachten (Harris, 1996). Da p53 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellproliferation spielt, muß die Aktivität von p53 für normales Wachstum und Entwicklung eines Organismus streng kontrolliert werden. Die Funktion von p53 wird durch verschiedene Mechanismen reguliert, wobei die Regulation der Proteinstabilität im Vorder-

grund steht. Einer der wichtigsten Faktoren, die den Abbau von p53 regulieren, ist das Protein Mdm2. Mdm2 bindet an einen definierten Abschnitt von p53 (As 17-27), blockiert somit die Transkriptions-Aktivierungsdomäne und bewirkt gleichzeitig die Ubiquitinierung mit anschließendem Proteasomen-vermittelten Abbau (Prives, 1998). Änderungen des Phosphorylierungsstatus von p53 können vermutlich die Mdm2-Affinität und somit die p53-Stabilität beeinflussen (Shieh *et al.*, 1997). p53 ist darüber hinaus ein häufiges Ziel viraler Proteine. Viele Viren haben spezifische Strategien entwickelt, um p53-induzierte Apoptose zu inhibieren. Eine Inaktivierung von p53 wird von viralen Onkoproteinen, wie z.B. dem Simian Virus 40 T-Antigen, dem Adenovirus E1B 55K und dem humanen Papillomavirus E6 Protein bewirkt (Levine, 1997). Für EBV wurde bisher keine derartige Regulation des p53 Proteins gezeigt. In dem folgenden Teil meiner Arbeit stehen Untersuchungen zum Einfluß von LMP1 auf das Tumorsuppressorprotein p53 im Vordergrund.

4.4.1. Die Induktion von NGF-R:LMP1-Aktivität in B-Zellen führt zu einem Abbau von p53 Protein

Erste Hinweise auf einen möglichen Einfluß von LMP1 auf das p53 Protein lieferten die in Abschnitt 4.2 beschriebenen Untersuchungen zur Änderung des Phosphorylierungsmusters in Folge von NGF-R:LMP1-Aktivität. Im Rahmen dieser Versuche wurde auch ein phosphospezifischer p53-Antikörper verwendet, der nur ein an Serin 15 phosphoryliertes p53 detektieren kann.

Wie in Abbildung 4.18A gezeigt, ist nach 30 minütiger Stimulierung der NGF-R:LMP1-Aktivität in B64-19/3-Zellen keine p53-Phosphorylierung im Immunoblot mehr nachweisbar. Zur Kontrolle wurde das Expressionsniveau von p53 im Immunoblot analysiert. Überraschenderweise war 30 Minuten nach Induktion der NGF-R:LMP1-Aktivität kein p53 Protein mehr zu detektieren. Dieser offensichtliche Einfluß von LMP1 auf die Expression des p53 Proteins wurde in folgenden Versuchen näher untersucht.

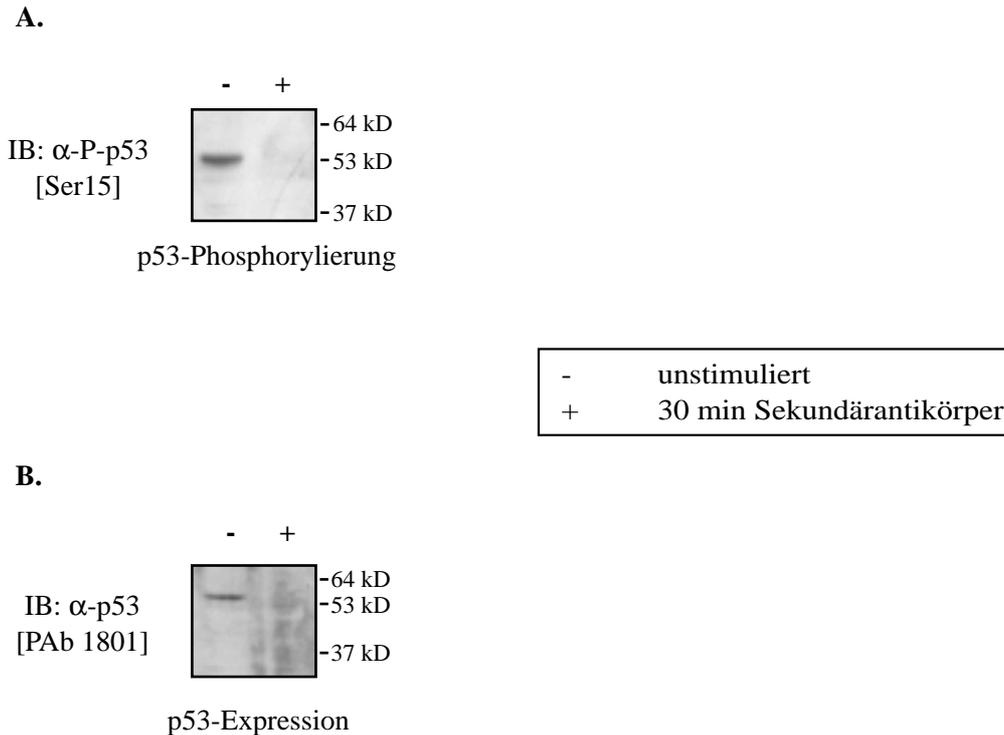
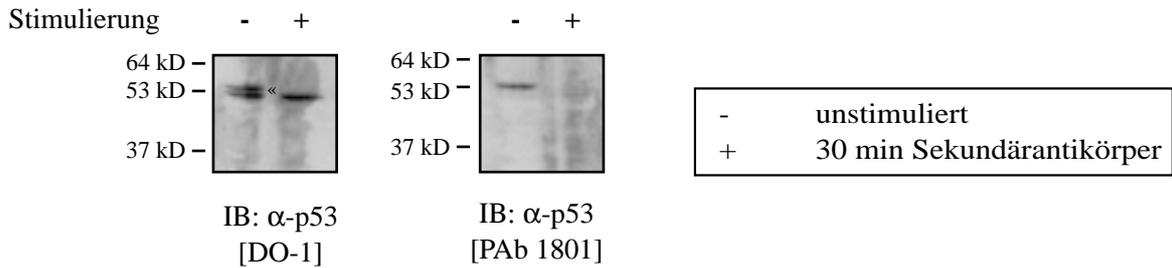


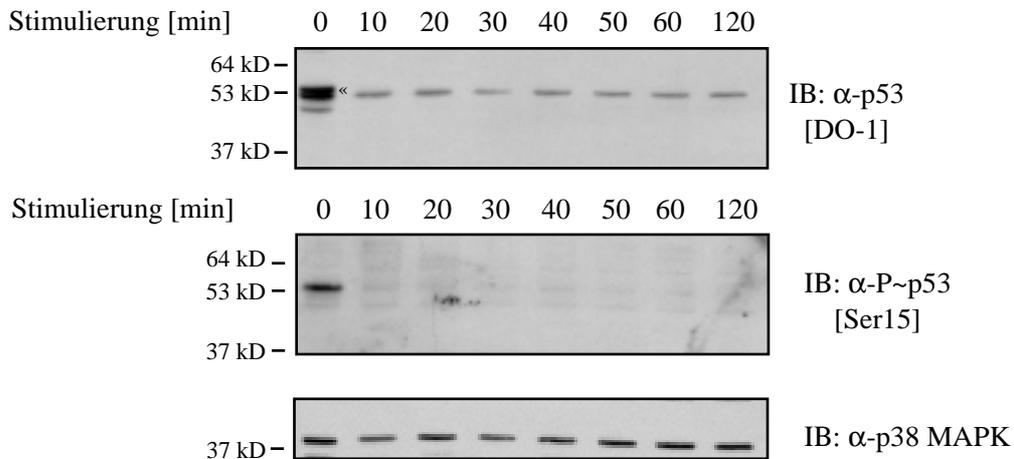
Abb. 4.18: Eliminierung von p53 Protein nach Induktion von NGF-R:LMP1-Aktivität in B64-19/3-Zellen. (A) und (B): Achtundvierzig Stunden vor NGF-R:LMP1-Aggregation wurden B64-19/3-Zellen, aus der WI-38 Fibroblasten-Kokultur entnommen und auf eine Zelldichte von 10^5 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden die Zellen wie beschrieben stimuliert. (A) p53-Phosphorylierung 30 min nach Zugabe des Sekundärantikörpers. Immunoblot mit einem phosphospezifischen Antikörper, der nur das an Serin 15 phosphorylierte p53 Protein detektiert. (B) p53-Expression 30 min nach Zugabe des Sekundärantikörpers. Immunoblot mit α -p53-Antikörper (PAb 1801).

Zunächst wurde der zeitliche Verlauf der Verringerung des p53 Proteinniveaus durch NGF-R:LMP1-Aktivität untersucht. Dazu wurde NGF-R:LMP1 in B64-19/3-Zellen zunächst unterschiedlich lang stimuliert und anschließend die p53-Expression im Immunoblot analysiert. In Abbildung 4.19B ist ein deutlicher Abbau des p53 Proteins zehn Minuten nach Zugabe des Sekundärantikörpers zu erkennen, der auch nach 120 Minuten unverändert blieb. Dieselben Zellysate wurden unter Verwendung des phosphospezifischen p53-Antikörpers analysiert. Wie aufgrund des gezeigten p53-Abbaus zu erwarten war, konnte auch keine phosphorylierte Form des p53 Proteins nachgewiesen mehr werden. Um sicherzustellen, daß dieser beobachtete Abbaueffekt spezifisch für das p53 Protein ist, wurde in einem weiteren Immunoblot gezeigt, daß die Expression von p38 MAPK durch die Stimulierung unbeeinflusst blieb.

A.



B.



C.

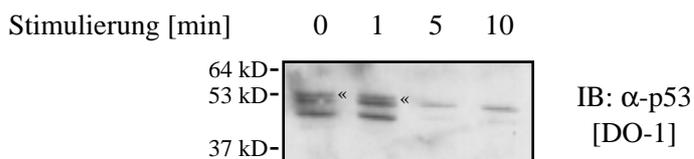


Abb. 4.19: Degradationskinetik des p53 Proteins nach Induktion von NGF-R:LMP1-Aktivität in B64-19/3-Zellen. Stimulierung des konditionalen NGF-R:LMP1 erfolgte wie beschrieben. (A) Vergleich von zwei α -p53-Antikörpern. Um die im linken Immunoblot gekennzeichnete Bande («) eindeutig als p53-spezifische Bande definieren zu können, wurde dasselbe Zellysate mit einem weiteren α -p53-Antikörper (PAb 1801) analysiert. Die untere Bande des DO-1 Immunoblots ist höchstwahrscheinlich eine unspezifische Hintergrundbande, was auch durch Immunoblots mit weiteren p53 spezifischen Antikörpern bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). (B) Degradationskinetik von p53 in Abhängigkeit von NGF-R:LMP1-Aktivität. Nach den angegebenen Zeitintervallen wurden die stimulierten Zellen lysiert und die Proteine durch 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt. Als Negativ-Kontrolle (-) wurde ein Teil der Zellen nur mit α -NGF-R-Antikörper behandelt und somit NGF-R:LMP1-Aktivität nicht induziert. Bereits nach 10 min ist das gesamte p53 Protein in den Zellen abgebaut und es ist nur noch die unspezifische Bande zu sehen. Als Kontrolle wurde die Expression von p38 MAPK im Immunoblot analysiert, dessen Expression über die gesamte Zeitspanne konstant bleibt. (C) p53-Abbau 1, 5 und 10 min nach Zugabe des Sekundärantikörpers.

Um den Zeitpunkt des p53-Abbaus nach Induktion der NGF-R:LMP1-Aktivität genauer festlegen zu können, wurden in einem weiteren Versuch kürzere Stimulierungszeiten gewählt. Abbildung 4.19C zeigt, daß der Abbau des p53 Proteins sehr rasch nach Zugabe des Sekundärantikörpers erfolgt und p53 bereits nach fünf Minuten nicht mehr im Immunoblot nachweisbar ist. Die Tatsache, daß das p53 Protein derart schnell nach NGF-R:LMP1-Aktivierung aus der Zelle eliminiert wird, spricht für einen direkten Signalweg von LMP1 zu p53, der nicht über die Regulation der p53 Transkription/Translation läuft. Für einen direkten Signalweg sprechen auch Ergebnisse aus transienten Versuchen, in denen p53 nicht von seinem endogenen Promotor exprimiert wird und die Eliminierung von p53 somit nicht durch Regulation des p53-Promotors verursacht werden kann (s. Abschnitt 4.4.3.).

Für die hier beschriebenen Versuche wurde ein α -p53-Antikörper (DO-1) verwendet, der im Immunoblot eine unspezifische Bande aufweist, deren Laufhöhe wenig unterhalb der spezifischen p53-Bande liegt. Um zu zeigen, daß es sich tatsächlich um eine unspezifische Hintergrundbande handelt, wurde daher das p53 Protein von Zellysaten vor und nach Induktion der NGF-R:LMP1-Aktivität mit insgesamt vier verschiedenen α -p53-Antikörpern detektiert (DO-1 und PAb 1801 s. Abb. 4.19A). Die unspezifische Bande war lediglich mit dem Antikörper DO-1 zu sehen. Bei der zusammen mit der p53-Bande erscheinenden untersten Bande (Abb. 4.19 B und C) handelt es sich vermutlich um ein Abbauprodukt von p53, das auch in anderen Versuchen (Abb. 4.20 und 4.24) zu beobachten war.

4.4.2. NGF-R:LMP1-Aktivität bewirkt den Abbau von p53 Protein auch in Anwesenheit p53-stabilisierender Faktoren

Die Regulation der p53-Aktivität erfolgt hauptsächlich über dessen Stabilität (Maki *et al.*, 1996; Brown und Pagano, 1997). In normal wachsenden Zellen ist die Halbwertszeit von p53 auf ca. 30 min beschränkt, während zellulärer Streß oder DNA-schädigende Substanzen wie UV-Strahlung zu einem Anstieg der Halbwertszeit auf mehrere Stunden führt (Maltzman und Czyzyk, 1984). Um zu testen, ob UV-Strahlung trotz LMP1-Signalaktivität den Abbau von

p53 induzieren kann, wurden B64-19/3-Zellen gleichzeitig mit UV bestrahlt und NGF-R:LMP1 stimuliert. 30 Minuten nach UV-Bestrahlung war in den unstimulierten Zellen ein Anstieg der p53 Proteinmenge im Immunoblot zu beobachten, der durch eine p53-Stabilisierung zu erklären ist. Trotz UV-Bestrahlung wurde jedoch das p53 Protein nach Induktion der NGF-R:LMP1-Aktivität abgebaut (Abb. 4.20). Die Zugabe des α -Maus IgG Sekundärantikörpers zur Quervernetzung und die UV-Bestrahlung erfolgten gleichzeitig 30 Minuten vor der Zellyse. Offensichtlich ist das LMP1-Signal, das zum Abbau des p53 Proteins führt, dominant über den stabilisierenden Effekt der UV-Strahlung.

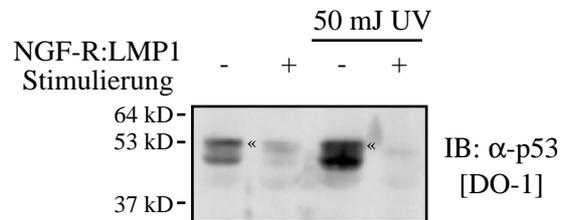


Abb. 4.20: Die Degradation von p53 durch NGF-R:LMP1-Aktivität ist dominant über die p53-Stabilisierung durch UV-Strahlung. B64-19/3 Zellen wurden wie beschrieben stimuliert. Immunoblot mit α -p53-Antikörper (DO-1). Die UV-Stimulierung erfolgte durch 50 mJ UV-Bestrahlung in einem Stratalinker (Stratagene) 30 min vor der Zellyse.

4.4.3. Transiente Expressionsanalyse von HA-p53 Wildtyp und HA-p53 Δ I in HEK 293-Zellen

Der Effekt von LMP1 auf die p53-Stabilität und der Mechanismus des Abbaus sollte im Folgenden genauer untersucht werden. Dazu wurde zusätzlich zum p53 Wildtyp Protein eine p53 Δ I-Mutante verwendet, deren Mdm2-Bindedomäne deletiert ist (Abb. 4.21). Die Deletion dieser Region verhindert die Interaktion von p53 mit Mdm2, ohne dabei andere Funktionen von p53, wie z.B. Transkriptionsaktivierung, zu beeinflussen (Marston *et al.*, 1994).

Mit Hilfe dieser p53 Δ I-Mutante sollte eine potentielle Beteiligung von Mdm2 an dem durch NGF-R:LMP1-Aktivität induzierten Abbau getestet werden. Sowohl p53 Wildtyp als auch die p53 Δ I-Mutante wurden an ihrem N-terminalen Ende mit einem Hämagglutinin (HA)-Epitop fusioniert, um eine Unterscheidung von endogenem p53 Protein zu ermöglichen. Die HA-p53-Konstrukte wurden in Zusammenarbeit mit Thomas Müller kloniert (s. Material und Methoden).

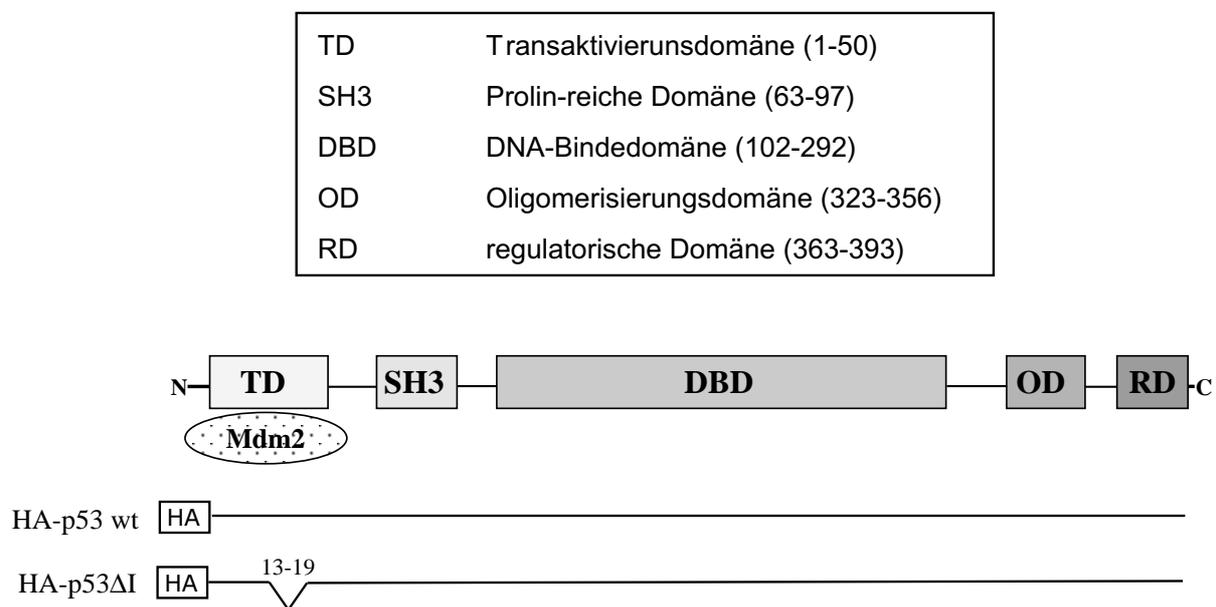
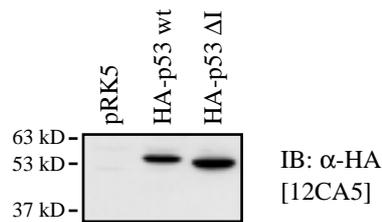


Abb. 4.21: Schematische Darstellung der p53-Proteindomänen und der hier klonierten HA-p53-Konstrukte. Das 393 Aminosäure große p53 Protein umfaßt fünf charakteristische funktionale Domänen. Die Transaktivierungsdomäne (TD) beinhaltet Bindestellen für Faktoren der Transkriptionsmaschinerie und für Mdm2 (As 13-19). Die SH3-Domäne enthält fünf prolinreiche SH3-Bindemotive und ist für p53-abhängige Apoptose essentiell. Die DNA-Bindedomäne (DBD) ist verantwortlich für die Erkennung und Bindung an die p53-Bindemotive der DNA. Sie ist außerdem die Region, in der 80-90 % der in Tumoren auftretenden Mutationen kartiert sind. Die Oligomerisierungsdomäne (OD) ist notwendig für die Tetramerisierung, die für p53-Aktivität notwendig ist. Die regulatorische Domäne (RD) wird auch als „allosterische Kontrollregion“ bezeichnet und ist an wichtigen Konformationsänderungen zur Aktivierung von p53 beteiligt (Übersichtsartikel May und May, 1999). Unterer Teil: Schematische Darstellung von HA-p53 und HA-p53 Δ I. HA: Hämagglutinin-Epitop. Zahlenangaben veranschaulichen die jeweiligen Aminosäuren des p53 Proteins.

Die Expression dieser HA-p53 Moleküle wurde im Immunoblot und mit Hilfe einer Immunfluoreszenzanalyse nachgewiesen. Im Immunoblot wurde das HA-p53 Wildtyp und das HA-p53 Δ I Protein mit dem α -HA-Antikörper 12CA5 detektiert (Abb. 4.22A). Wie erwartet, ist HA-p53 Δ I aufgrund der Deletion etwas kleiner als HA-p53 Wildtyp und läuft im SDS-Gel deshalb unterhalb von HA-p53 Wildtyp. Für die Detektion von HA-p53 und HA-p53 Δ I durch Immunfluoreszenz wurden Expressionsplasmide der beiden Konstrukte transient in HeLa-Zellen transfiziert. Diese Zelllinie eignet sich für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie besser als HEK 293-Zellen, da aufgrund der flachen Zellmorphologie eine eindeutige Unterscheidung von Zellkern und Zytoplasma möglich ist. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurde die subzelluläre Lokalisation von HA-p53 und HA-p53 Δ I mit Hilfe eines Antikörpers gegen das HA-Epitop und eines Fluorescein (FITC)-gekoppelten Sekundärantikörpers analysiert. Somit wurden nur die HA-fusionierten Proteine, nicht aber endogenes p53 Protein, detektiert. Wie in Abbildung 4.22B zu sehen ist, ist die Lokalisation von HA-p53 und HA-p53 Δ I fast ausschließlich auf den Zellkern beschränkt. Beide Proteine sind im Nukleoplasma, jedoch nicht in den Nukleoli zu finden, was mit früheren Beobachtungen übereinstimmt (Lohrum und Vousden, 2000).

Auffällig war eine Akkumulation von HA-p53 Δ I an der Kernmembran, was sich in einer ringförmigen Fluoreszenz zeigte. Diese Beobachtung beruht möglicherweise auf der Blockierung des Mdm2-vermittelten p53-Abbaus dieser Mutante. Für den Proteasomen-gebundenen p53-Abbau ist dessen Transport aus dem Kern ins Zytoplasma notwendig. Da Mdm2 an diesem Transportmechanismus ebenfalls beteiligt ist (Tao und Levine, 1999), wird HA-p53 Δ I möglicherweise nicht mehr bzw. ineffizienter aus dem Kern transportiert und akkumuliert daher an der Kernmembran. Die Resultate zeigen, daß HA-p53 und HA-p53 Δ I exprimiert werden und trotz des HA-Epitops eine normale Lokalisation im Kern aufweisen.

A.



B.

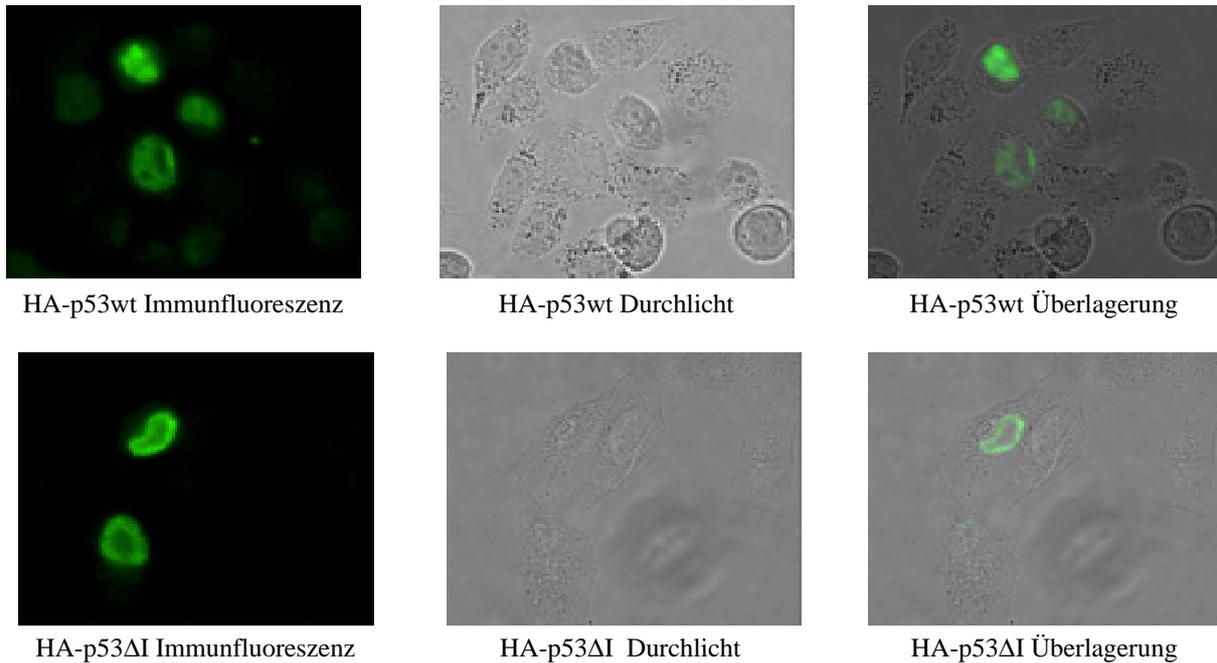


Abb. 4.22: Expression von HA-p53 Wildtyp und der HA-p53 Δ I Mutante. (A) Nachweis im Immunoblot. 1,0 μ g pRK5-HA-p53wt oder 1,0 μ g pRK5-HA-p53 Δ I wurden transient in HEK 293-Zellen transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Proteine durch 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde die Expression von HA-p53 und HA-p53 Δ I im Immunoblot durch den α -HA-Antikörper 12CA5 detektiert. (B) Nachweis durch Immunfluoreszenz-Analyse. HeLa Zellen wurden transient mit 1,0 μ g pRK5-HA-p53wt oder 1,0 μ g pRK5-HA-p53 Δ I transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und im Immunfluoreszenz-Mikroskop analysiert (s. Material und Methoden). HA-p53wt und HA-p53 Δ I wurden mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen das HA-Epitop gerichtet ist und einem FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper nachgewiesen. oben: HA-p53wt. unten: HA-p53 Δ I. Links ist jeweils die Immunfluoreszenz-Aufnahme gezeigt. Die mittlere Aufnahme zeigt dieselben Zellen durch Phasenkontrast-Lichtmikroskopie, während rechts eine Überlagerung der beiden Aufnahmen zu sehen ist (Vergrößerung: 630 fach).

4.4.4. NGF-R:LMP1-Aktivität vermittelt den Abbau von HA-p53 und HA-p53ΔI in HEK 293-Zellen

Im folgenden Versuch wurde der Abbau von HA-p53 Wildtyp und HA-p53ΔI in Abhängigkeit von NGF-R:LMP1-Aktivität untersucht (in Zusammenarbeit mit T. Müller). Dazu wurden HA-p53 oder HA-p53ΔI zusammen mit NGF-R:LMP1 transient in HEK 293-Zellen exprimiert. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurde NGF-R:LMP1-Aktivität wie beschrieben für 30 Minuten stimuliert (s. auch Abb. 4.9 in Abschnitt 4.2.). Der Kontrollansatz wurde nur mit α -NGF-R-Antikörper behandelt. Die Zellen wurden lysiert und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Abbildung 4.23 zeigt das Ergebnis im Immunoblot links durch Detektion mit dem α -HA-Antikörper 12CA5 und rechts mit dem α -p53-Antikörper PAb 240. Dreißig Minuten nach Zugabe des Sekundärantikörpers ist ein deutlicher Abbau sowohl von HA-p53 Wildtyp als auch von HA-p53ΔI zu beobachten. Obwohl das Expressionsniveau von HA-p53ΔI vor Stimulierung sogar noch höher als das des Wildtyp-Proteins war, konnte im Immunoblot kein Protein der Mutante nach Stimulierung mehr nachgewiesen werden, während HA-p53 noch schwach zu detektieren war. Dieses Resultat zeigt, daß der LMP1-vermittelte Abbau von p53 in HEK 293-Zellen auf einem Mdm2-unabhängigen Weg erfolgt. Die Deletion der Mdm2-Bindestelle hatte offensichtlich keinen stabilisierenden Einfluß auf das p53 Protein. Das erhöhte Expressionsniveau der Mutante vor Stimulierung ist möglicherweise wieder auf einen verminderten Abbau aufgrund fehlender Mdm2-Interaktion zurückzuführen. Die untere Bande des HA-markierten p53 Wildtyp-Proteins ist vermutlich ein Abbauprodukt, das auch schon in vorhergehenden Versuchen (Abb. 4.19-4.20) zu beobachten war. Dieses natürliche Abbauprodukt war nur bei HA-p53 Wildtyp zu beobachten, nicht jedoch bei HA-p53ΔI. Möglicherweise ist das Fragment ein Produkt der Mdm2-vermittelten Degradation und kann deshalb nach Deletion der Mdm2-Bindestelle nicht mehr entstehen. Da es durch den α -HA-Antikörper stärker detektiert wird als durch den α -p53-Antikörper, handelt es sich vermutlich um ein N-terminales p53-Fragment, da auch das HA-Epitop am N-Terminus von p53 lokalisiert ist.

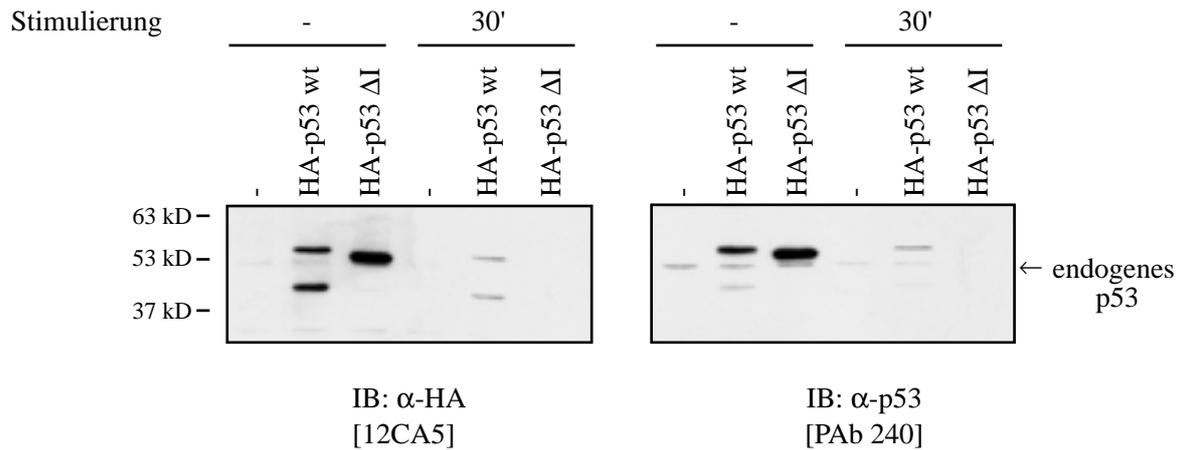


Abb. 4.23: Abbau von HA-p53 und HA-p53 Δ I nach Induktion der NGF-R:LMP1-Aktivität in HEK 293-Zellen. 1,0 μ g NGF-R:LMP1 wurde zusammen mit 1,0 μ g pRK5-HA-p53wt oder 1,0 μ g pRK5-HA-p53 Δ I transient in HEK 293-Zellen transfiziert. Zur Kontrolle wurde 1,0 μ g pRK5 als Leervektor transfiziert. Die Aggregation der NGF-R:LMP1-Fusionsproteine erfolgte durch Zugabe von 25 μ l α -NGF-R-Antikörper (Kulturüberstand aus einer Hybridom-Zelllinie) in das Zellkulturmedium für 1 h und anschließender Zugabe von 5 μ g/ml Zweitantikörper für 30 min. Als Negativ-Kontrolle wurden die Zellen nur 1 h mit α -NGF-R-Antikörper behandelt, was für eine Induktion der LMP1-Signalaktivität nicht ausreicht. Die Expression von HA-p53 und HA-p53 Δ I vor und nach Zugabe des Sekundärantikörpers wurde im Immunoblot nachgewiesen. Links: α -HA-Antikörper. Rechts: α -p53-Antikörper (PAb 240).

Durch die Verwendung des α -p53-Antikörpers in der rechten Abbildung kann ebenfalls das endogene p53 Protein detektiert werden, das aufgrund der geringeren Größe unterhalb der HA-Varianten zu erkennen ist. Auch hier ist ein Abbau von p53 in Folge von NGF-R:LMP1-Aktivität zu erkennen. Die Ergebnisse zeigen, daß NGF-R:LMP1-Aktivität in HEK 293-Zellen eine Degradation des p53 Proteins durch einen Mdm2-unabhängigen Weg vermittelt.

5. Diskussion

Das Latente Membranprotein 1 (LMP1) spielt eine zentrale Rolle bei der Immortalisierung von B-Lymphozyten durch EBV. LMP1 ist ein virales Onkogen, das Zellproliferation induziert und Apoptose inhibiert. Die Expression von LMP1 resultiert in Änderungen des zellulären Phänotyps, die durch Eingriffe in die zelluläre Signaltransduktion und somit in die Regulation von Genen, ausgelöst werden. Bisher identifizierte Signalwege, die durch LMP1 reguliert werden, umfassen die Aktivierung von NF- κ B, JNK1/AP-1, JAK3/STAT und p38 MAPK. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen dieser Signalkaskaden war und ist Ziel intensiver Forschung. Der momentane Stand der Untersuchungen reicht jedoch nicht zur vollständigen Klärung der transformierenden Effekte von LMP1 aus. Für das bessere Verständnis der Rolle von LMP1 bei EBV-assoziierten Krebserkrankungen und eventuellen therapeutischen Ansätzen ist eine möglichst vollständige Aufklärung der Signalmechanismen dieses Onkogens wünschenswert.

Das Ziel meiner Arbeit war daher die Untersuchung von LMP1-abhängigen Signalwegen. Es sollten neue Komponenten der bekannten Signalkaskaden bzw. neue LMP1-vermittelte Signalmechanismen identifiziert werden. Zu solchen Analysen eignet sich unter anderem die Verwendung dominant-negativer Mutanten von Signalmolekülen, für die eine Funktion in der LMP1 Signaltransduktion vermutet wird. Ein wichtiger Mechanismus der Signaltransduktion ist die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Signalmolekülen. Auf der Basis von LMP1-abhängigen Phosphorylierungsänderungen sollten daher neue Funktionen von LMP1 aufgedeckt werden.

5.1. Die Rolle von TRAF6 in der Signaltransduktion von LMP1

Die Mitglieder der TRAF (Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiierter Faktor) Familie (TRAF1-6) spielen in Signalmechanismen, die zum Überleben und zur Proliferation von Zel-

len führen und in zellulären Streßreaktionen eine wichtige Rolle (Übersichtsartikel: Arch *et al.*, 1998). Auch in der Signaltransduktion von LMP1 sind TRAF Proteine involviert und die Bindung von TRAF1, 2, 3 und 5 an das PxQxT-Motiv in der CTAR1-Domäne von LMP1 konnte bereits nachgewiesen werden (Devergne *et al.*, 1996; Brodeur *et al.*, 1997; Sandberg *et al.*, 1997). Das TRAF2 Protein ist an den Signalwegen von CTAR1 und CTAR2 zu NF- κ B (Devergne *et al.*, 1996; Kaye *et al.*, 1996) und ebenfalls an der Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges beteiligt (Eliopoulos *et al.*, 1999). TRAF1 kann *in vitro* LMP1-vermittelte NF- κ B-Aktivierung verstärken, während TRAF3 vermutlich inhibitorisch in diesen Signalweg eingreift (Devergne *et al.*, 1996). Eine Rolle für TRAF5 in der Signaltransduktion von LMP1 konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals TRAF6, ein weiteres Mitglied der TRAF Proteinfamilie, als essentielles Signalprotein der Signaltransduktion von LMP1 identifiziert werden. In früheren Untersuchungen wurde TRAF6 als Adaptorprotein in den Signalwegen von Rezeptoren der TNF-Rezeptor Familie und von Mitgliedern der Toll/Interleukin 1 (IL-1)-Rezeptor Familie wie z.B. CD40, p75 NGF-R („nerve growth factor receptor“) oder IL-1-Rezeptor charakterisiert (Inoue, 1997). LMP1 ist damit das bisher erste transformierende Protein, für das eine Rolle von TRAF6 in der Signaltransduktion gezeigt werden konnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern damit auch das bekannte zellbiologische Wirkungsspektrum von TRAF6.

Die Expression von TRAF6 Wildtyp in HEK 293-Zellen allein resultierte in der Aktivierung von p38 MAPK, NF- κ B und JNK1. Diese Beobachtung beruht vermutlich auf einer Oligomerisierung der überexprimierten TRAF6 Proteine über ihre C-terminale TRAF-Domäne, was für die Aktivierung dieser Signalwege ohne extrazelluläre Stimuli ausreichend ist (Baud *et al.*, 1999). Die Beteiligung von TRAF6 in der Signaltransduktion von LMP1 ist jedoch auf bestimmte LMP1-vermittelte Signalwege beschränkt, was die Spezifität der TRAF6-Funktion demonstriert. TRAF6 spielt in der Induktion von p38 MAPK die Schlüsselrolle, während es im NF- κ B Signalweg eher eine untergeordnete Funktion ausübt. Es konnte gezeigt werden,

daß eine dominant-negative TRAF6-Mutante, deren RING-Finger Domäne deletiert ist, LMP1-Aktivierung von p38 MAPK vollständig inhibiert (Abb. 4.1 und 4.2). Diese essentielle Bedeutung von TRAF6 für die Induktion von p38 MAPK durch LMP1 konnte durch die Ergebnisse in TRAF6 *-/-* Zellen bestätigt werden. Nur nach Wiederherstellung des physiologischen TRAF6 Proteinexpressionsniveaus durch Transfektion war eine substantielle p38 MAPK-Aktivierung durch LMP1 in diesen Zellen möglich (Abb. 4.3). TRAF6 konnte somit als wesentliche Komponente des Signalweges von LMP1 zu p38 MAPK identifiziert werden.

Die dominant-negative TRAF6 Mutante konnte die Aktivierung von NF- κ B durch LMP1 dagegen nur teilweise inhibieren (Abb. 4.6). Eine wahrscheinliche Erklärung für diese Beobachtung ist, daß andere TRAF Proteine die Hauptrolle in der NF- κ B-Induktion durch LMP1 spielen. Vor allem TRAF2 vermittelt die NF- κ B-Induktion durch LMP1 (Devergne *et al.*, 1996; Kaye *et al.*, 1996). Die direkte Interaktion von TRAF2 mit NIK ist für die Signaltransduktion von LMP1 zu NF- κ B verantwortlich (Malinin *et al.*, 1997; Sylla *et al.*, 1998). Es ist daher vorstellbar, daß z.B. die Interaktion von TRAF2 mit NIK in Anwesenheit von TRAF6 stabilisiert wird, wobei TRAF6 damit eine regulatorische Rolle übernehmen würde. Eine weitere Möglichkeit ist, daß TRAF6 an einem alternativen Signalweg von LMP1 zu NIK beteiligt ist, der parallel zum bekannten TRAF2-abhängigen Signalweg verläuft. Ein Beispiel für einen solchen TRAF2-unabhängigen Signalweg ist die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch den IL-1 Rezeptor. Hier wird NIK in Abhängigkeit von TRAF6 durch die TGF β -aktivierende Kinase 1 (TAK1) induziert (Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999), was in Folge ebenfalls in einer Aktivierung von NF- κ B resultiert.

Die Induktion von JNK1 durch LMP1 ist von TRAF6 unabhängig. Dies konnte in Kinaseversuchen nachgewiesen werden, in denen die dominant-negative TRAF6-Mutante keinen Effekt auf die LMP1-vermittelte Aktivität von JNK1 hatte (Abb. 4.7). Die Komponenten der Signalwege, die zur Induktion von p38 MAPK und NF- κ B einerseits bzw. JNK1 andererseits durch LMP1 führen, unterscheiden sich damit offenbar. Diese Tatsache wird auch durch

kürzlich veröffentlichte Resultate aus unserem Labor gestützt, die eine Rolle von TRAF2 in der Signaltransduktion von LMP1 zu NF- κ B zeigten, nicht jedoch in der Signaltransduktion zu JNK1 (Kieser *et al.*, 1999). Offensichtlich verzweigen sich die Signalwege, die zu p38 MAPK und NF- κ B, bzw. zu JNK1 führen, schon oberhalb von TRAF2 und TRAF6, möglicherweise bereits direkt am LMP1-Molekül.

Die p38 phosphorylierende Kinase, MKK6, konnte durch Untersuchungen in dieser Arbeit als eine weitere Komponente der Signaltransduktion von LMP1 zu p38 MAPK identifiziert werden. Die Koexpression einer dominant-negativen Mutante von MKK6, die keine Kinaseaktivität mehr besitzt, führte im Kinaseversuch zu einer Reduktion der p38 MAPK-Aktivierung durch LMP1 um 84,5 % (Abb. 4.4). Die Charakterisierung der Signalmoleküle, die in der Signalkaskade zwischen TRAF6 und MKK6 liegen, sind Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Durch die Analyse mit LMP1-Mutanten ließen sich das PxQxT-Motiv in CTAR1 und Tyrosin 384 in CTAR2 als essentielle Domänen für die Aktivierung von p38 MAPK bestimmen. Die Hauptrolle scheint dabei Tyrosin 384 zu spielen, da die p38 MAPK-Aktivität in den Kinaseversuchen durch die Y384G-Mutation wesentlich stärker beeinflusst wurde als durch die Mutation des PxQxT-Motivs (Abb. 4.5). Diese Ergebnisse werden durch kürzlich veröffentlichte Daten gestützt (Eliopoulos *et al.*, 1999). Es stellte sich nun die Frage, auf welche Weise TRAF6 mit diesen beiden Domänen interagiert und somit die Signaltransduktion von LMP1 weiterleitet. Die direkte Bindung von TRAF6 an CD40 erfolgt unabhängig von dem PxQxT-Motiv an einen anderen Bereich der Signaldomäne des Rezeptors, dem QxPxExxE/F-Konsensusmotiv (Pullen *et al.*, 1998; Pullen *et al.*, 1999b). LMP1 besitzt jedoch keine mit CD40 vergleichbare TRAF6-Bindestelle. Eine direkte Interaktion von TRAF6 mit LMP1 konnte somit auch nicht nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt), was frühere Veröffentlichungen bestätigt, die lediglich die Bindung von TRAF1, 2, 3 und 5, jedoch nicht von TRAF6 an LMP1 zeigen konnten (Devergne *et al.*, 1996; Brodeur *et al.*, 1997). Mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie und einer sensitiven Sandwich ELISA-Technik konnte TRAF6 jedoch im LMP1-Signalkomplex detektiert werden (Schultheiss *et al.*, 2001, in Zusammenarbeit mit Dr. Arnd Kieser bzw. Stephanie Püschner und Hartmut Engelmann). Dabei verhindert die

gleichzeitige Mutation des PxQxT-Motives und des Tyrosinrestes 384 die Bindung von TRAF6 an den LMP1-Komplex. Beide Domänen sind für die Induktion der TRAF6-abhängigen p38 MAPK und NF- κ B Signalwege essentiell. Diese Resultate deuten darauf hin, daß TRAF6 durch eine Interaktion mit dritten Proteinen an CTAR1 und 2 von LMP1 bindet. In mehreren Publikationen wurde eine direkte Bindung von TRAF2 an das PxQxT-Motiv und eine indirekte Bindung an LMP1 über TRADD an Tyrosin 384 beschrieben (Devergne *et al.*, 1996; Brodeur *et al.*, 1997; Izumi und Kieff, 1997; Sandberg *et al.*, 1997; Devergne *et al.*, 1998; Kieser *et al.*, 1999). Durch Verwendung einer dominant-negativen TRADD-Mutante konnte die Beteiligung von TRADD am p38 MAPK Signalweg nachgewiesen werden (Abb. 4.8). TRADD ist ein Adaptorprotein, das vor allem mit der zytotoxischen Aktivität von TNF-Rezeptor 1 in Verbindung gebracht wurde (Übersichtsartikel: Yuan, 1997). Die Beteiligung von TRADD an proliferativen und anti-apoptotischen Signalwegen von LMP1 ist daher von großem Interesse. Eine dominant-negative TRAF2-Mutante inhibiert die Induktion von p38 MAPK durch LMP1 (Eliopoulos *et al.*, 1999). Im Hinblick auf diese Ergebnisse ist es wahrscheinlich, daß die Bindung von TRAF6 an den LMP1-Signalkomplex durch TRAF2 und TRADD vermittelt wird. Beide Adaptormoleküle müssen im Signalweg von LMP1 zu p38 MAPK und NF- κ B oberhalb von TRAF6 positioniert sein, da sie beide direkt an LMP1 binden und ihre dominant-negativen Formen diese Signalwege inhibieren.

Bisher ist noch nicht eindeutig geklärt, wie TRAF6 mit den Komponenten des LMP1-Komplexes interagiert. Die eleganteste Möglichkeit wäre eine direkte Bindung von TRAF6 an TRAF2. Es ist bekannt, daß TRAF-Moleküle Homo- und Heterodimere durch Interaktion ihrer C-terminalen TRAF-Domänen bilden (Arch *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 2000). Es konnte sogar bereits eine direkte Interaktion von TRAF6 und TRAF2 in einem „yeast two-hybrid“-Versuch und in Ko-Immunpräzipitationsversuchen in Säugerzellen gezeigt werden (Cao *et al.*, 1996). Es ist damit vorstellbar, daß TRAF2 am PxQxT-Motiv von LMP1 als Brückenprotein für TRAF6 agiert. Wie bereits erwähnt, bindet TRAF2 direkt an das PxQxT-Motiv und liegt somit in der Signalkaskade zu p38 MAPK oberhalb von TRAF6. Eine komplexere Situation liegt an Tyrosin 384, der Hauptaktivierungsdomäne von p38 MAPK, vor, da hier TRAF

Proteine nicht direkt binden können. Die bisher diskutierten Ergebnisse und bereits veröffentlichte Daten führen zur folgenden Modellvorstellung der Interaktion von TRAF6 mit CTAR2 (s. auch Abb. 5). TRADD baut den TNF-Rezeptor 1-Signalkomplexes dadurch auf, daß es als Plattform für die direkte Bindung der Signalmoleküle TRAF2, RIP und FADD dient (Hsu *et al.*, 1996a; Hsu *et al.*, 1996b; Yuan, 1997). Bemerkenswerterweise kann TRADD gleichzeitig TRAFs und FADD an den TNF-Rezeptor 1 rekrutieren. Im Fall von LMP1 bindet TRADD durch direkte Interaktion seines N-terminalen Endes mit dem Tyrosinrest 384 von LMP1 (Izumi *et al.*, 1997; Kieser *et al.*, 1999). TRADD könnte als Brückenprotein für TRAF2/6-Heterodimere dienen und so eine Lokalisation von TRAF6 im LMP1-Signalkomplex vermitteln. Der LMP1-Holokomplex könnte durch Interaktionen von TRAF-Molekülen, die an CTAR1 bzw. CTAR2 binden, noch weiter stabilisiert werden. Für die Bildung des LMP1-Signalkomplexes müssen CTAR1 und CTAR2 kooperieren. Nur so kann das maximale Signaltransduktionspotential von LMP1 erreicht werden (Floettmann *et al.*, 1998). Für die Stabilität und Funktionalität des LMP1-Signalkomplexes ist eine Interaktion zwischen CTAR1 und CTAR2 offenbar essentiell.

Auf welche Weise könnte TRAF6 LMP1-Signale in die Zelle weiterleiten? TRAF6 wurde kürzlich als eine Ubiquitin-Ligase identifiziert, die gemeinsam mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzymkomplex Ubc13/Uev1A zur Synthese von neuen Ubiquitinketten befähigt ist (Deng *et al.*, 2000). Die Fähigkeit zur Ubiquitinierung ist an die RING-Finger-Domäne von TRAF6 gekoppelt, die auch an der Aktivierung von NF- κ B beteiligt ist. Die Ubiquitin-Ligaseaktivität von TRAF6 führt durch einen noch nicht vollständig geklärten Mechanismus zur Aktivierung von NF- κ B (Deng *et al.*, 2000). Diese Resultate lassen vermuten, daß eventuell auch die Induktion von NF- κ B durch LMP1 zumindest teilweise auf das Ubiquitinierungspotential von TRAF6 und/oder anderer TRAF Proteine zurückzuführen ist.

In meiner Arbeit konnten TRADD, TRAF6 und MKK6 und als neue Komponenten des LMP1-induzierten p38 MAPK Signalweges identifiziert werden. p38 MAPK wird vor allem durch zellulären Streß und Zytokine wie z.B. IL-1 und TNF α aktiviert, die an Entzündungsre-

aktionen beteiligt sind. p38 MAPK spielt unter anderem eine Schlüsselrolle in der Regulation von Apoptose und Entzündungsreaktionen (Übersichtsartikel: Nebreda und Porras, 2000; Ono und Han, 2000). Neue Ergebnisse machen jedoch deutlich, daß p38 MAPK auch in proliferativen Signalwegen involviert sein kann, da es z.B. für eine optimale CD40-induzierte B-Zell Proliferation benötigt wird (Craxton *et al.*, 1998; Aicher *et al.*, 1999). Im Kontext der LMP1-vermittelten proliferativen und anti-apoptotischen Signale ist p38 MAPK an der Aktivierung der Zytokinen IL-6, IL-8 und IL-10 beteiligt (Eliopoulos *et al.*, 1999; Vockerodt *et al.*, 2001). Die Rolle von NF- κ B in der Funktion von LMP1 liegt vor allem in der Aktivierung von anti-apoptotischen Genen (Henderson *et al.*, 1991; Laherty *et al.*, 1992; D'Souza *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, daß TRAF6 an beiden Signalwegen und somit auch an den von ihnen vermittelten biologischen Funktionen beteiligt ist. Offensichtlich agieren TRADD und TRAF6 in einem gemeinsamen Signalweg, der von einem transformierenden und anti-apoptotischen Onkogen, LMP1, ausgeht. Diese Ergebnisse zeigen neue Aspekte der molekularen und biologischen Funktion beider Adaptorproteine auf und tragen zum besseren Verständnis der Funktionen von LMP1 bei.

5.2. Der Effekt eines konditionalen LMP1-Derivats auf das Phosphorylierungsmuster von Signalproteinen in B-Zellen

Ein wichtiger Mechanismus für die Weiterleitung von Signalen in der Zelle ist die sequentielle Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Signalmolekülen. Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen führen unter anderem zur Aktivierung bzw. Deaktivierung von Kinasen, Änderungen der Interaktion mit anderen Signalmolekülen und Regulation von Transkriptionsfaktoren. Auch bei der Aktivierung von NF- κ B, JNK1/AP-1 und p38 MAPK durch LMP1 spielen solche Phosphorylierungsreaktionen eine essentielle Rolle. Für die Identifikation neuer Signalkaskaden, die von LMP1 aktiviert werden, war daher eine Analyse des Phosphorylierungsmusters bekannter Signalmoleküle von großem Interesse. Für

diese Analyse wurden B64-19/3 Zellen als Zellsystem gewählt, in dem die Aktivität von LMP1 auf Proteinebene innerhalb von Minuten angeschaltet werden kann, die der anderen EBV Proteine jedoch unbeeinflusst bleibt. Dieses System erlaubt somit die Analyse von Kurzeffekten, wie z.B. Phosphorylierungsreaktionen, die auf die Aktivität von LMP1 zurückzuführen sind. Die Funktionalität des konditionalen Systems wurde anhand der Aktivierung von p38 MAPK nach künstlicher Aggregation von NGF-R:LMP1 Molekülen durch spezifische Antikörper bestätigt. Dieses induzierbare System wurde in primären B-Lymphozyten etabliert (U. Dirmeier, unveröffentlichte Daten). Da B-Lymphozyten auch die wichtigsten Zielzellen einer EBV-Infektion darstellen, sind Ergebnisse von besonders großer Relevanz, die mit Hilfe dieses Modellsystems gewonnen wurden.

LMP1-Aktivität zeigt anti-apoptotische Effekte, die zumindest teilweise auf die Induktion von anti-apoptotischen Genen zurückzuführen sind (s. oben und Einleitung). Durch eine Analyse des Phosphorylierungsstatus von Signalfaktoren, die an der Regulation von Apoptose beteiligt sind, sollten weitere anti-apoptotische Signale von LMP1 identifiziert werden. In diesem Zusammenhang wurde daher die Phosphorylierung der Proteinkinase Akt und eines seiner Substrate, dem Bad Protein, in Abhängigkeit von LMP1-Aktivität untersucht. Beide Signalmoleküle zeigen in Folge ihrer Phosphorylierung anti-apoptotische Wirkung (Übersichtsartikel: Datta *et al.*, 1999). Die Induktion der LMP1-Aktivität hatte jedoch keinen Effekt auf die Phosphorylierung von Bad oder der Aktivierungsdomäne von Akt. Somit konnte nachgewiesen werden, daß der anti-apoptotische Akt-Signalweg offensichtlich keine Rolle in der Signaltransduktion von LMP1 spielt. LMP1 vermittelt auch proliferative Effekte. Deshalb wurden zelluläre Signalwege abgefragt, die bei der Regulation von Zellproliferation eine große Rolle spielen. Dazu wurden phosphospezifische Antikörper verwendet, die nur die aktiven Formen der Kinasen ERK und Src detektieren. Im Immunoblot konnten jedoch keine Unterschiede im Phosphorylierungsmuster von ERK und Src vor oder nach Stimulierung der NGF-R:LMP1-Aktivität beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, daß diese Signalwege nicht direkt durch LMP1 angesteuert werden. Dies bestätigt frühere Resultate aus unserem Labor, die zeigen, daß ERK2 in transienten Kinaseversuchen in HEK 293-Zellen nicht durch

LMP1 induziert werden kann (Kieser *et al.*, 1997). Dies stellt für die Rolle der MAPK-Kaskaden in der Zelltransformation einen sehr interessanten Befund dar. Offensichtlich ist es möglich, Zellen lediglich durch die Aktivität der hauptsächlich Streß- und Apoptose-relevanten p38 MAPK- und JNK-Kaskaden ohne gleichzeitige Stimulierung des klassischen mitogenen ERK Signalweges zu transformieren.

Die Resultate zeigen zudem die prinzipielle Funktionalität des konditionalen Zellsystems. Dieses System zur Induktion von LMP1-Aktivität in B-Zellen eignet sich gut für die Charakterisierung von LMP1-Signalwegen. Da die Zahl der erhältlichen phosphospezifischen Antikörper von Signalfaktoren ständig steigt, können auf diesem Wege in Zukunft vermutlich weitere Komponenten der LMP1-Signaltransduktion identifiziert werden.

5.3. Die Aktivierung von JNK2 durch LMP1

Die Mitglieder der JNK-Familie (JNK1, 2 und 3) werden in Folge von Zytokinaktivität und einer Reihe zellulärer Streßfaktoren wie UV-Licht, H₂O₂ oder Entzug von Wachstumsfaktoren aktiviert. Darüber hinaus scheinen sie aber auch an der Entstehung von Tumoren beteiligt zu sein. JNK1 und 2 sind in einigen Tumorzelllinien konstitutiv aktiv und das transformierende Potential einiger Onkogene beruht auf der Aktivität von JNK1 (Ip und Davis, 1998, Bost *et al.*, 1999). JNKs können unter anderem c-Jun, ATF2 und Elk-1 phosphorylieren und die Induktion des Transkriptionsfaktors AP-1 bewirken. JNK1 und JNK2 zeigen dabei eindeutig unterschiedliche Affinitäten zu diesen Substraten, während der Einfluß verschiedener JNKs auf deren Aktivität noch nicht völlig geklärt ist (Kallunki *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1996). Es ist jedoch wahrscheinlich, daß die Effekte von JNK1 und JNK2 nicht immer redundant sind, was durch eine steigende Zahl an Veröffentlichungen zu Unterschieden der beiden JNK-Varianten gestützt wird. Kürzlich wurde beispielsweise gezeigt, daß JNK2 im Gegensatz zu JNK1 in der EGF-induzierten Transformation einer humanen Lungenkrebszelllinie involviert ist (Bost *et al.*, 1999). In einer weiteren Publikation konnte JNK2 eine wesentliche Rolle bei

Tumor-Entwicklungsprozessen in Mäusen zugeordnet werden (Chen *et al.*, 2001). Diese Resultate sprechen für eine mögliche Beteiligung von JNK2 auch an LMP1-vermittelten transformierenden Effekten. Die bisherigen Untersuchungen zu LMP1-induzierter JNK-Aktivität beschränkten sich auf JNK1. Ergebnisse in dieser Arbeit demonstrieren, daß auch JNK2 in Abhängigkeit von LMP1 aktiviert werden kann. Möglicherweise spielt JNK2 sogar eine wichtigere Rolle in der Vermittlung von proliferativen Effekten durch LMP1 als JNK1.

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen zu LMP1-abhängigen Phosphorylierungsmustern in B64-19/3 Zellen wurde auch die Phosphorylierung von JNKs in Abhängigkeit von NGF-R:LMP1-Aktivität analysiert. Nach Induktion der NGF-R:LMP1-Aktivität durch Antikörper-vermittelte Aggregation konnte eine im Vergleich zu JNK1 sehr starke Phosphorylierung von JNK2 beobachtet werden (Abb. 4.11). Da das Expressionsniveau von JNK2 im Vergleich zu JNK1 sogar geringer war, deuten diese Ergebnisse auf eine bevorzugte Aktivierung von JNK2 durch LMP1 hin. Eine LMP1-abhängige Induktion von JNK2 konnte daraufhin auch in transienten Kinaseversuchen in HEK 293-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.12). Die Aktivierung von JNK2 ließ sich dabei auch wie erwartet über die Induktion von CD40-Rezeptor, MEKK1 und durch UV-Bestrahlung erreichen. Es wurde dabei ein ähnliches Induktionsmuster von JNK1 und JNK2 bezüglich ihrer Aktivatoren beobachtet. Zum ersten Mal konnte eine Aktivierung von JNK2 durch LMP1 nachgewiesen werden.

Die Induktion von JNK1 durch LMP1 wird ausschließlich über CTAR2 vermittelt (Kieser *et al.*, 1997; Eliopoulos und Young, 1998; Kieser *et al.*, 1999). Die Mutation von Tyrosin 384 in CTAR2 führte ebenfalls zu einem fast völligen Verlust der LMP1-induzierten JNK2-Aktivität (Abb. 4.14). Im Gegensatz zu JNK1 zeigte die Mutation des PxQxT-Motives in CTAR1 einen geringfügigen Einfluß auf die Aktivierung von JNK2 durch LMP1. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß die Mutation in CTAR1 zu Änderungen der Zusammensetzung und der Stabilität des LMP1-Holokomplexes führen, wie bereits oben diskutiert wurde. Diese Modifikationen könnten somit auch Einfluß auf die Signaltransduktion von CTAR2 haben, die sich auf JNK2 eventuell stärker als auf JNK1 auswirkt. Eine alternative Erklärung für den

Unterschied in der Induktion von JNK1 und JNK2 wäre die Beteiligung von Signalfaktoren an der Induktion von JNK2, die mit CTAR1 interagieren.

Für die Analyse spezifischer Funktionen der JNK1 und JNK2 Signalwege im Kontext der Zelltransformation und Genregulation durch LMP1 wäre die Verfügbarkeit von spezifisch wirkenden dominant-negativen Mutanten von JNK1 und JNK2 sehr hilfreich. Aus diesem Grund war das nächste Ziel meiner Arbeit die Herstellung dominant-negativer JNK1 und JNK2 Proteine. Da bereits vorhandene JNK-Mutanten mit Mutationen in den aktivierenden Phosphorylierungsstellen der Aktivierungsdomäne keinen dominant-negativen Effekt zeigten, sondern sogar konstitutiv aktiv waren (persönliche Mitteilung von A. Kieser), wurde hier ein anderer Weg zur Etablierung von dominant-negativen JNK1- und JNK2-Formen gewählt. Durch Austausch des Aspartatrestes gegen Alanin wurden die konservierten DFG-Motive von JNK1 und JNK2 mutiert. Dieses Motiv scheint aufgrund seiner Beteiligung an der ATP-Bindung durch Mg^{2+} -Chelatierung essentiell für die Aktivität von JNK zu sein (Gibbs *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1998). Es konnte hier nun gezeigt werden, daß die Mutation des DFG-Motivs zu einem völligen Defekt der Kinaseaktivität von JNK1 bzw. JNK2 führte. In einem Kinaseversuch konnte keine Phosphorylierung des Substrates c-Jun durch die mutierten HA-JNK1(D169A) bzw. HA-JNK2(D169A) Proteine, auch nicht nach Kotransfektion von LMP1, nachgewiesen werden (Abb. 4.16). Die weitere Analyse der JNK-Mutanten ergab, daß ihre Expression zu einer Inhibition der LMP1-induzierten AP-1-Aktivität führen. Damit zeigen diese Resultate, daß der Austausch einer Aminosäure in dem DFG-Motiv ausreichend für die Generierung dominant-negativer JNK1- und JNK2-Mutanten ist und daß JNK1 und 2 für die Aktivierung von AP-1 durch LMP1 notwendig sind.

Die Induktion des AP-1 Transkriptionsfaktors durch LMP1 spielt bei Transformationsprozessen durch LMP1 vermutlich eine wichtige Rolle. AP-1 ist ein dimerer Transkriptionsfaktor aus Jun, Fos und ATF Proteinen und ist in der Kontrolle der Zellproliferation involviert (Übersichtsartikel: Angel und Karin, 1991; Karin *et al.*, 1997). Die unterschiedliche Substrataffinität von JNK1 und JNK2 zu c-Jun, ATF2 und Elk-1 weist darauf hin, daß in Folge der Aktivität von JNK1 und JNK2 AP-1-Dimere unterschiedlich aktiviert werden und da-

mit differentieller Genexpression induziert wird. Die Entdeckung, daß JNK2 auch an der Signaltransduktion von LMP1 beteiligt ist, gibt Anlaß zur Frage, welche Effekte der LMP1-induzierten AP-1-Aktivität durch JNK2 vermittelt werden und ob JNK1 und JNK2 in der Signaltransduktion von LMP1 redundante oder unterschiedliche Funktionen erfüllen. Mit Hilfe der von mir etablierten dominant-negativen Mutanten kann nun untersucht werden, welche Rolle JNK2 in der Signaltransduktion von LMP1 spielt. Auch die Identifizierung der Komponenten des JNK2-Signalweges soll zur weiteren Aufklärung des komplexen LMP1-Signaltransduktionsnetzes beitragen.

5.4. Der Effekt von LMP1 auf das p53-Tumorsuppressorprotein

Das p53 Tumorsuppressorprotein ist ein Transkriptionsfaktor, der nach seiner Aktivierung in Folge von DNA-Schäden oder anderer zellulärer Streßbedingungen zu einem Arrest des Zellzyklus oder zur Induktion von Apoptose führt. Die Aktivität von p53 wird dabei hauptsächlich über die Kontrolle seiner Proteinstabilität reguliert (Übersichtsartikel: Ashcroft und Vousden, 1999). Ein wichtiger Abbauweg involviert die Bindung von Mdm2 an p53. Mdm2 inhibiert die Aktivität von p53 durch Bindung innerhalb der Transaktivierungsdomäne und induziert gleichzeitig den Proteasomen-vermittelten Abbau von p53 durch Ubiquitinierung (Prives, 1998). Transformierende DNA-Viren wie SV40, Adenovirus und humanes Papillomvirus kodieren für Onkoproteine, die ebenfalls mit dem p53 Protein interagieren und dessen Funktion supprimieren oder dessen Abbau einleiten (Übersichtsartikel: Teodoro und Branton, 1997). Die Tatsache, daß p53 in EBV-assoziierten Krebserkrankungen in der Regel nicht mutiert ist (Effert *et al.*, 1992; Edwards und Raab-Traub, 1994), gibt deshalb Anlaß zu Spekulationen, ob möglicherweise ein EBV-kodiertes Protein mit der Funktion von p53 interferiert. Bisherige Untersuchungen ergaben eine Interaktion von EBNA-LP mit p53 (Szekely *et al.*, 1993), die dessen Funktion jedoch nicht zu beeinträchtigen scheint (Allday *et al.*, 1995). Des Weiteren wurde eine direkte Bindung von BZLF1 an p53 beobachtet (Zhang *et al.*, 1994). Da

dieses EBV Protein jedoch für den Übergang in die lytische Phase von EBV verantwortlich ist und seine Expression während der latenten Phase nicht nachgewiesen werden kann (Kieff, 1996), spielt diese Interaktion vermutlich während der Latenz von EBV keine Rolle. Daher war es von besonderem Interesse zu untersuchen, ob das latente Onkoprotein LMP1 über Mechanismen zur Inaktivierung von p53 verfügt.

Mit Hilfe des konditionalen NGR-R:LMP1-Systems konnte hier in B-Lymphozyten ein unerwarteter Effekt von LMP1 beobachtet werden. Die Aktivierung von NGF-R:LMP1 resultierte in einer raschen Eliminierung des p53 Proteins aus der Zelle. Der Abbau erfolgte innerhalb weniger Minuten und war spezifisch für p53, da das Expressionsniveau anderer Proteine, wie beispielsweise p38 MAPK, nicht davon betroffen war (Abb. 4.18 und 4.19). Die Degradation von p53 wurde im Immunoblot nachgewiesen. Aufgrund der Tatsache, daß einige Antikörper nur spezifische Konformationen bzw. nur bestimmte Epitope von p53 detektieren, wurde der Abbau mit mehreren p53-spezifischen Antikörpern bestätigt. Damit konnte auch gleichzeitig eine zusätzliche und nicht regulierte Proteinbande, die bei der Detektion mit dem α -p53-Antikörper DO-1 zu sehen war, als unspezifisch nachgewiesen werden. Offensichtlich bewirkt die Induktion der NGF-R:LMP1-Aktivität in B-Lymphozyten eine Degradation von p53 Protein auf ein Niveau, das im Immunoblot nicht mehr nachweisbar ist.

Um Hinweise auf den Mechanismus der p53 Degradation zu erhalten, wurden weitere Versuche mit HA-Epitop-fusioniertem p53 und einer p53-Mutante durchgeführt, die nicht mehr durch Mdm2 gebunden werden kann. Der Mutante HA-p53 Δ I fehlt die Mdm2-Bindestelle (As 13-19) und kann somit nicht mehr auf dem Mdm2-vermitteltem Weg abgebaut werden (Marston *et al.*, 1994). Die Resultate zeigten jedoch, daß p53 in Folge von NGF-R:LMP1-Aktivität offenbar auf einem Mdm2-unabhängigen Weg abgebaut wird, da p53 trotz Deletion der Mdm2-Interaktionsdomäne effizient degradiert wurde. LMP1 wählt damit anscheinend einen alternativen Weg, um p53 zu destabilisieren.

Eine Alternative zu einem Mdm2-abhängigen Weg könnte ein JNK-vermittelter Abbau von p53 sein. Es wurde gezeigt, daß JNK1 an die Aminosäuren 97 bis 155 von p53 bindet (Adler

et al., 1997) und bei der Regulation der p53-Stabilität eine Rolle spielt. Der Mechanismus dieser JNK1-vermittelten Regulation, der sowohl zur Stabilisierung (Fuchs *et al.*, 1998a; Fuchs *et al.*, 1998b) als auch zur Destabilisierung (Song *et al.*, 1999; Wang und Friedman, 2000) des p53 Proteins führen kann, ist bisher jedoch noch nicht geklärt.

Das p53 Protein enthält mehrere Phosphorylierungsstellen, die durch unterschiedliche Kinasen phosphoryliert werden. Obwohl der Effekt dieser Phosphorylierungen intensiv studiert wurde, ist eine klare Aussage über den Einfluß einzelner Modifikationen auf p53-Stabilität, DNA-Bindung und Aktivität bislang nicht möglich (Übersichtsartikel: Ashcroft und Vousden, 1999; Meek, 1999). Eine Phosphorylierung von p53 durch die Aktivität von JNK1 und 2 konnte ebenfalls beobachtet werden (Milne *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 1997). Der Effekt einer JNK-vermittelten Phosphorylierung auf p53 ist jedoch nicht eindeutig geklärt. Es wurde postuliert, daß JNK nach seiner Aktivierung p53 phosphoryliert, so die Bindung von JNK bzw. Mdm2 an p53 blockiert und damit der Abbau von p53 verhindert wird (Fuchs *et al.*, 1998b). Andere Veröffentlichungen zeigen jedoch, daß die Phosphorylierung durch JNK eine Destabilisierung von p53 verursacht (Song *et al.*, 1999; Wang und Friedman, 2000). Möglicherweise sind für diese unterschiedlichen Effekte unterschiedliche Phosphorylierungsstellen von p53 oder unterschiedliche JNK-Moleküle verantwortlich. Da LMP1 die Aktivierung von JNK1 und JNK2 induzieren kann, scheint eine Verbindung des p53-Abbaus mit der Aktivität von JNK möglich. Ein Modell um die Effekte von LMP1 auf p53 zu erklären, wäre die Aktivierung von JNK1 bzw. JNK2 durch LMP1, was zu einer Phosphorylierung von p53 mit anschließendem Abbau führen könnte.

Eine weitere Möglichkeit eines Mdm2-unabhängigen Abbaus könnte eine Degradation durch Calpain bieten. Neben dem Ubiquitin-vermittelten Abbau von p53 wurde dessen Degradation durch Proteasen aus der Familie der Calpaine beschrieben (Kubbutat und Vousden, 1997; Pariat *et al.*, 1997). Die Aktivierung von Calpain, das p53 *in vitro* ebenfalls innerhalb weniger Minuten abbaut, könnte einen möglichen Mechanismus darstellen, auf dem LMP1 die Aktivität von p53 inhibiert.

Interessanterweise ist der Mechanismus, über den LMP1 das p53 Protein destabilisiert, offensichtlich dominant über p53-stabilisierende Faktoren. UV-Bestrahlung von Zellen resultiert normalerweise in einer Stabilisierung und Akkumulation von p53 in der Zelle (Maltzman und Czyzyk, 1984). In Folge der Bestrahlung mit UV kommt es zu spezifischen Modifikationen des p53 Proteins wie Phosphorylierung und Acetylierung (Übersicht in Meek, 1999), wobei der genaue Mechanismus der Stabilisierung jedoch noch nicht geklärt ist. Eine Akkumulation von p53 in Folge von UV-Strahlung konnte hier auch in B64-19/3-Zellen beobachtet werden. Nach Induktion der NGF-R:LMP1-Aktivität wurde das p53 Protein jedoch trotz UV-Bestrahlung abgebaut (Abb. 4.20). Offenbar ist der LMP1-abhängige Signalweg zur Destabilisierung von p53 dominant über die p53-stabilisierenden Mechanismen in Folge von UV-Bestrahlung.

Der rasche, durch LMP1 vermittelte Abbau von p53 steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu dem relativ hohen p53 Proteinexpressionsniveau, das in LCLs beobachtet wird. In den meisten Zellen, wie auch in primären B-Zellen, ist das p53 Protein aufgrund der geringen Expression nur schwer nachweisbar (Allday *et al.*, 1995). In aktivierten B-Zellen und LCLs ist das p53-Expressionsniveau vergleichsweise hoch und kann problemlos im Immunoblot nachgewiesen werden (Allday *et al.*, 1995). Diese Tatsache erklärt, warum p53 in den B64-19/3-Zellen vor der Stimulierung im Immunoblot detektiert werden konnte (Abb. 4.18 bis 4.20). Es stellt sich jedoch die Frage, warum LCLs, in denen alle latenten EBV-Gene einschließlich LMP1 exprimiert werden, eine hohe p53 Proteinexpression aufweisen, obwohl LMP1 offensichtlich den Abbau von p53 Protein induzieren kann. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß LMP1 die Halbwertszeit des p53 Proteins wesentlich verkürzt, dessen „steady-state level“ jedoch nicht verändert. LMP1 könnte somit bei einer relativ hohen p53-Expression dessen Umsatzrate erhöhen und damit das Transaktivierungspotential von p53 regulieren. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß LMP1 nur während der anfänglichen EBV-Infektion der Zelle für eine Inaktivierung von p53 durch Degradation sorgt und die p53-Aktivität zu einem späteren Zeitpunkt der EBV-Latenz durch andere Mechanismen inhibiert wird. Dafür spricht, daß LCLs in Gegenwart hoher p53-Expression ohne extrazelluläre Sti-

muli keine apoptotischen Merkmale zeigen, wie es aufgrund der Aktivität von p53 zu erwarten wäre (Allday *et al.*, 1995). LMP1 wurde bereits als Inhibitor der p53-vermittelten Apoptose beschrieben. A20 und bcl-2, die als LMP1-induzierte Gene charakterisiert wurden, haben beide anti-apoptotische Wirkung und inhibieren p53-abhängige Apoptose (Henderson *et al.*, 1991; Okan *et al.*, 1995; Fries *et al.*, 1996).

LMP1 spielt offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Regulation von p53. Einerseits kann es, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, die Stabilität des p53 Proteins direkt beeinflussen, andererseits wirkt es indirekt der Funktion von p53 durch Induktion von anti-apoptotischen Proteinen entgegen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten erstmals zeigen, daß auch EBV über direkte Mechanismen zur Inaktivierung des p53 Proteins verfügt.

In weiterführenden Untersuchungen soll nun der Mechanismus dieses LMP1-vermittelten Abbauges und seine Bedeutung im Zusammenhang mit EBV analysiert werden. Um aufklären zu können, auf welchem Weg der Abbau von p53 erfolgt, soll der Effekt spezifischer Inhibitoren wie Proteasom-Inhibitoren und Calpain-Inhibitoren untersucht werden. In diesem Zusammenhang sind auch p53-Mutanten und die hier entwickelten dominant-negativen JNK-Mutanten von Interesse, um potentielle Abbauges zu blocken. Darüber hinaus soll das Expressionsniveau von p53 bei längerer LMP1-Aktivität beobachtet werden. In unserem Labor werden zur Zeit LMP1-induzierte Gene analysiert. Mit Hilfe dieser Resultate kann untersucht werden, ob in Folge von LMP1-Aktivität die Expression bekannter p53-Zielgene beeinflußt wird. Des Weiteren sollen Faktoren charakterisiert werden, die am p53-Abbau und an der Inaktivierung der p53-Aktivität beteiligt sind, um weiteren Aufschluß über die Effekte von LMP1 zu erhalten.

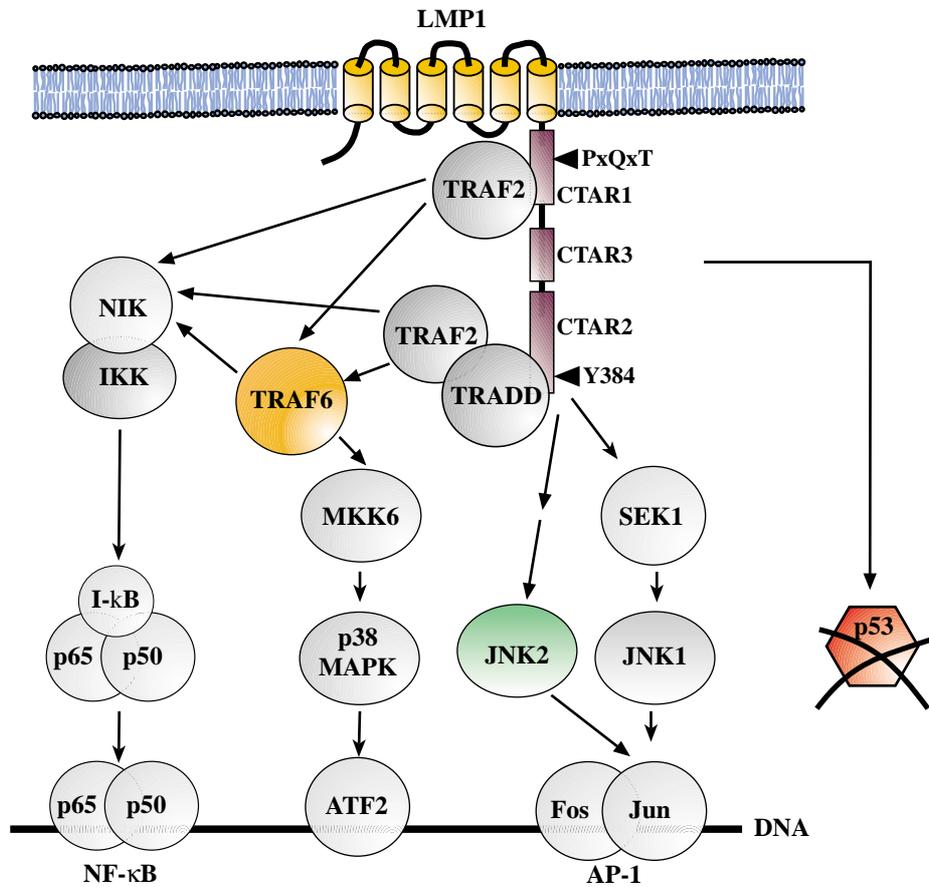


Abb. 5: Modell der Signaltransduktion von LMP1. Der C-Terminus des LMP1-Moleküls ist für die Induktion der Signalwege NIK/IKK/NF- κ B, JNK1/AP-1 und p38 MAPK essentiell. Die Aktivierung von p38 MAPK über MKK6 wird durch CTAR1 und CTAR2 vermittelt. TRAF2 bindet direkt an das PxQxT-Motiv innerhalb von CTAR1 und indirekt über Interaktion mit TRADD an Tyrosin 384 in CTAR2. TRAF6 interagiert nicht direkt mit LMP1, ist jedoch für die Aktivierung des LMP1 \rightarrow p38 MAPK-Signalweges essentiell und ebenfalls in der Induktion von NF- κ B durch LMP1 involviert. Die Aktivierung von JNK1 und JNK2 durch LMP1 wird hauptsächlich durch CTAR2 vermittelt. Darüber hinaus kann LMP1 auf einem bisher noch unbekanntem Weg die Degradation des p53 Proteins bewirken. Der JAK3/STAT-Signalweg und die Bindung von weiteren TRAF-Molekülen und RIP sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt. (Abb. modifiziert nach A. Kieser).

6. Zusammenfassung

LMP1 ist das Hauptonkogen des humanen DNA-Tumorvirus EBV (Epstein-Barr Virus). LMP1 ist essentiell für die Immortalisierung von B-Zellen durch das Virus. Darüber hinaus transformiert LMP1 Nagerfibroblasten in Kultur. LMP1 agiert wie ein konstitutiv aktives Rezeptormolekül in der Plasmamembran und induziert intrazelluläre Signaltransduktion durch die Bindung von Signalmolekülen der TNF-Rezeptor Familie. Die bekannten LMP1 Signalwege können die biologischen Funktionen von LMP1 jedoch nur teilweise erklären. In meiner Arbeit sollten daher neue Komponenten der LMP1 Signaltransduktion identifiziert werden.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte TRAF6 als essentielles und spezifisches Signalmolekül für die Induktion von p38 MAPK durch LMP1 auf einem MKK6-abhängigen Signalweg identifiziert werden. In TRAF6 defizienten Maus-Fibroblasten ist eine signifikante p38 MAPK-Aktivierung durch LMP1 von der ektopischen Expression von TRAF6 abhängig. Darüber hinaus ist TRAF6 ebenfalls in der Aktivierung von NF- κ B, jedoch nicht von JNK1/AP-1 durch LMP1 involviert. Das PxQxT-Motiv in CTAR1 ist zusammen mit Tyrosin 384 in CTAR2 essentiell für die Aktivierung des LMP1 \rightarrow p38 MAPK-Signalweges. Dominant-negatives TRADD, das direkt an CTAR2 bindet, inhibiert die Induktion von p38 MAPK durch LMP1. Zusammengefaßt zeigen diese Ergebnisse zum ersten Mal eine Rolle von TRAF6 als essentielles Signalmolekül in der Signalkaskade eines transformierenden Onkogens, das unterhalb von TRADD und TRAF2 agiert.

Im zweiten Teil meiner Arbeit konnte JNK2 als eine weitere, durch LMP1 induzierte MAPK in B-Zellen identifiziert werden. Im Zuge dieser Arbeit wurden dominant-negative Mutanten von JNK1 und JNK2 hergestellt, deren Expression eine Aktivierung von AP-1 durch LMP1 inhibieren und damit eine Rolle von JNK1 und 2 in der Induktion von AP-1 beweisen.

In einem konditionalen LMP1-System in B-Zellen induzierte NGF-R:LMP1 die Degradation des p53 Proteins. Dieser Effekt ist spezifisch für p53, erfolgt innerhalb weniger Minuten und ist dominant über der p53-stabilisierenden Wirkung von UV-Strahlung. Somit konnte erstmals ein EBV-spezifischer Mechanismus aufgedeckt werden, der zu einer Deaktivierung des Tumorsuppressors p53 beitragen könnte.

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivierungsprotein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF-2	aktivierter Transkriptionsfaktor 2
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin („ <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin“)
ca.	zirka
CD	Zell-Differenzierungsmarker („ <u>c</u> ell <u>d</u> ifferentiation marker“)
Ci	Curie
CTAR	Carboxyterminale Aktivierungsregion
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBNA	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen
EBNA-LP	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen Leader-Protein
EBV	Epstein-Barr Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor („ <u>e</u> pidermal <u>g</u> rowth <u>f</u> actor“)
FKS	Fötale Kälberserum
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 („ <u>i</u> nter <u>c</u> ellular <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule 1“)
I κ B	Inhibitor von NF- κ B
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
JAK3	Janus-Kinase 3
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaar(e)
kD	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LCL	lymphoblastoide Zelllinie („ <u>l</u> ymphoblastoid <u>c</u> ell <u>l</u> ine“)
LMP	Latentes Membranprotein
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute

mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
NGF-R	Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor („ <u>n</u> erv <u>g</u> rowth <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor“)
NIK	NF- κ B induzierende Kinase
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („ <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction“)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RIP	Rezeptor-interagierendes Protein
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
STAT	Signaltransduktions-aktivierter Transkriptionsfaktor
SV40	Simian Virus 40
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TNF-R	Tumornekrose Faktor-Rezeptor
TRADD	TNF-R-assoziiertes Death Domain Protein
TRAF	TNF-R-assoziiierter Faktor
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel

8. Literatur

- Abbot, S.D., Rowe, M., Cadwallader, K., Ricksten, A., Gordon, J., Wang, F., Rymo, L. and Rickinson, A.B. (1990) Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus- encoded latent membrane protein. *J. Virol.*, **64**, 2126-2134.
- Adler, V., Pincus, M.R., Minamoto, T., Fuchs, S.Y., Bluth, M.J., Brandt-Rauf, P.W., Friedman, F.K., Robinson, R.C., Chen, J.M., Wang, X.W., Harris, C.C. and Ronai, Z. (1997) Conformation-dependent phosphorylation of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1686-1691.
- Aicher, A., Shu, G.L., Magaletti, D., Mulvania, T., Pezzutto, A., Craxton, A. and Clark, E.A. (1999) Differential role for p38 mitogen-activated protein kinase in regulating CD40-induced gene expression in dendritic cells and B cells. *J. Immunol.*, **163**, 5786-5795.
- Aiyar, A., Tyree, C. and Sugden, B. (1998) The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *EMBO J.*, **17**, 6394-6403.
- Aizawa, S., Nakano, H., Ishida, T., Horie, R., Nagai, M., Ito, K., Yagita, H., Okumura, K., Inoue, J. and Watanabe, T. (1997) Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 5 and TRAF2 are involved in CD30-mediated NFkappaB activation. *J. Biol. Chem.*, **272**, 2042-2045.
- Allday, M.J., Crawford, D.H. and Thomas, J.A. (1993) Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 6 induces expression of the EBV latent membrane protein and an activated phenotype in Raji cells. *J. Gen. Virol.*, **74**, 361-369.
- Allday, M.J., Sinclair, A., Parker, G., Crawford, D.H. and Farrell, P.J. (1995) Epstein-Barr virus efficiently immortalizes human B cells without neutralizing the function of p53. *EMBO J.*, **14**, 1382-1391.
- Angel, P. and Karin, M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1072**, 129-157.
- Arch, R.H., Gedrich, R.W. and Thompson, C.B. (1998) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev.*, **12**, 2821-2830.
- Ashcroft, M. and Vousden, K.H. (1999) Regulation of p53 stability. *Oncogene*, **18**, 7637-7643.
- Aviel, S., Winberg, G., Massucci, M. and Ciechanover, A. (2000) Degradation of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *J. Biol. Chem.*, **275**, 23491-23499.

- Babcock, G.J., Decker, L.L., Freeman, R.B. and Thorley-Lawson, D.A.** (1999) Epstein-barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J. Exp. Med.*, **190**, 567-576.
- Baichwal, V.R. and Sugden, B.** (1988) Transformation of Balb 3T3 cells by the BNLF-1 gene of Epstein-Barr virus. *Oncogene*, **2**, 461-467.
- Baud, V., Liu, Z.G., Bennett, B., Suzuki, N., Xia, Y. and Karin, M.** (1999) Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev.*, **13**, 1297-1308.
- Berberich, I., Shu, G., Siebelt, F., Woodgett, J.R., Kyriakis, J.M. and Clark, E.A.** (1996) Cross-linking CD40 on B cells preferentially induces stress-activated protein kinases rather than mitogen-activated protein kinases. *EMBO J.*, **15**, 92-101.
- Bost, F., McKay, R., Bost, M., Potapova, O., Dean, N.M. and Mercola, D.** (1999) The Jun kinase 2 isoform is preferentially required for epidermal growth factor-induced transformation of human A549 lung carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1938-1949.
- Bost, F., McKay, R., Dean, N. and Mercola, D.** (1997) The JUN kinase/stress-activated protein kinase pathway is required for epidermal growth factor stimulation of growth of human A549 lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, **272**, 33422-33429.
- Boucher, L.M., Marengere, L.E., Lu, Y., Thukral, S. and Mak, T.W.** (1997) Binding sites of cytoplasmic effectors TRAF1, 2, and 3 on CD30 and other members of the TNF receptor superfamily. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **233**, 592-600.
- Briscoe, J., Kohlhuber, F. and Müller, M.** (1996) JAKs and STATs branch out. *Trends Cell Biol.*, **6**, 336-340.
- Brodeur, S.R., Cheng, G., Baltimore, D. and Thorley-Lawson, D.A.** (1997) Localization of the Major NF-kappaB-activating Site and the Sole TRAF3 Binding Site of LMP-1 Defines Two Distinct Signaling Motifs. *J. Biol. Chem.*, **272**, 19777-19784.
- Brown, J.P. and Pagano, M.** (1997) Mechanism of p53 degradation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1332**, O1-6.
- Brown, M.T. and Cooper, J.A.** (1996) Regulation, substrates and functions of src. *Biochim. Biophys. Acta*, **1287**, 121-149.
- Buechler, J.A. and Taylor, S.S.** (1988) Identification of aspartate-184 as an essential residue in the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*, **27**, 7356-7361.
- Butterfield, L., Storey, B., Maas, L. and Hesley, L.E.** (1997) C-Jun NH2-terminal kinase regulation of the apoptotic response of small cell lung cancer cells to ultraviolet radiation. *J. Biol. Chem.*, **272**, 10110-10116.

- Calender, A., Billaud, M., Aubry, J.P., Banchereau, J., Vuillaume, M. and Lenoir, G.M.** (1987) Epstein-Barr virus (EBV) induces expression of B-cell activation markers on in vitro infection of EBV-negative B-lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8060-8064.
- Canman, C.E., Gilmer, T.M., Coutts, S.B. and Kastan, M.B.** (1995) Growth factor modulation of p53-mediated growth arrest versus apoptosis. *Genes Dev.*, **9**, 600-611.
- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. and Goeddel, D.V.** (1996) TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature (London)*, **383**, 443-446.
- Cavigelli, M., Dolfi, F., Claret, F.X. and Karin, M.** (1995) Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO J.*, **14**, 5957-5964.
- Chan, E.D., Winston, B.W., Jarpe, M.B., Wynes, M.W. and Riches, D.W.** (1997) Preferential activation of the p46 isoform of JNK/SAPK in mouse macrophages by TNF alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 13169-13174.
- Chaudhuri, B., Xu, H., Todorov, I., Dutta, A. and Yates, J.L.** (2001) Human DNA replication initiation factors, ORC and MCM, associate with oriP of Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10085-10089.
- Chen, N., Nomura, M., She, Q.B., Ma, W.Y., Bode, A.M., Wang, L., Flavell, R.A. and Dong, Z.** (2001) Suppression of skin tumorigenesis in c-Jun NH(2)-terminal kinase-2-deficient mice. *Cancer Res.*, **61**, 3908-3912.
- Cheng, G., Cleary, A.M., Ye, Z.S., Hong, D.I., Lederman, S. and Baltimore, D.** (1995) Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling. *Science*, **267**, 1494-1498.
- Coffin, I.W., Erickson, K.D., Hoedt-Miller, M. and Martin, J.M.** (2001) The cytoplasmic amino-terminus of the Latent Membrane Protein-1 of Epstein-Barr Virus: relationship between transmembrane orientation and effector functions of the carboxy-terminus and transmembrane domain. *Oncogene*, **20**, 5313-5330.
- Craxton, A., Shu, G., Graves, J.D., Saklatvala, J., Krebs, E.G. and Clark, E.A.** (1998) p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *J. Immunol.*, **161**, 3225-3236.
- D'Souza, B., Rowe, M. and Walls, D.** (2000) The bfl-1 gene is transcriptionally upregulated by the Epstein-Barr virus LMP1, and its expression promotes the survival of a Burkitt's lymphoma cell line. *J. Virol.*, **74**, 6652-6658.
- Datta, S.R., Brunet, A. and Greenberg, M.E.** (1999) Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev.*, **13**, 2905-2927.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M.E.** (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, **91**, 231-241.

- Dawson, C.W., Rickinson, A.B. and Young, L.S.** (1990) Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial cell differentiation. *Nature (London)*, **344**, 777-780.
- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R. and Nunez, G.** (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*, **278**, 687-689.
- Delecluse, H.J., Hilsendegen, T., Pich, D., Zeidler, R. and Hammerschmidt, W.** (1998) Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 8245-8250.
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C. and Chen, Z.J.** (2000) Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, **103**, 351-361.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. and Davis, R.J.** (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*, **76**, 1025-1037.
- Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., Ulevitch, R.J. and Davis, R.J.** (1995) Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science*, **267**, 682-685.
- Devergne, O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K.M., Kaye, K.M., Kleijnen, M.F., Kieff, E. and Mosialos, G.** (1996) Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF- κ B activation. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 7098-7108.
- Devergne, O., McFarland, E.C., Mosialos, G., Izumi, K.M., Ware, C.F. and Kieff, E.** (1998) Role of the TRAF binding site and NF- κ B activation in Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-induced cell gene expression. *J. Virol.*, **72**, 7900-7908.
- Edwards, R.H. and Raab-Traub, N.** (1994) Alterations of the p53 gene in Epstein-Barr virus-associated immunodeficiency-related lymphomas. *J. Virol.*, **68**, 1309-1315.
- Effert, P., McCoy, R., Abdel-Hamid, M., Flynn, K., Zhang, Q., Busson, P., Tursz, T., Liu, E. and Raab-Traub, N.** (1992) Alterations of the p53 gene in nasopharyngeal carcinoma. *J. Virol.*, **66**, 3768-3775.
- Eliopoulos, A.G., Gallagher, N.J., Blake, S.M., Dawson, C.W. and Young, L.S.** (1999) Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J. Biol. Chem.*, **274**, 16085-16096.
- Eliopoulos, A.G., Stack, M., Dawson, C.W., Kaye, K.M., Hodgkin, L., Sihota, S., Rowe, M. and Young, L.S.** (1997) Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF- κ B pathway involving TNF receptor-associated factors. *Oncogene*, **14**, 2899-2916.

- Eliopoulos, A.G. and Young, L.S.** (1998) Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene*, **16**, 1731-1742.
- Fahraeus, R., Rymo, L., Rhim, J.S. and Klein, G.** (1990) Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus. *Nature (London)*, **345**, 447-449.
- Fielding, C.A., Sandvej, K., Mehl, A., Brennan, P., Jones, M. and Rowe, M.** (2001) Epstein-barr virus Imp-1 natural sequence variants differ in their potential to activate cellular signaling pathways. *J. Virol.*, **75**, 9129-9141.
- Floettmann, J.E., Eliopoulos, A.G., Jones, M., Young, L.S. and Rowe, M.** (1998) Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) signalling is distinct from CD40 and involves physical cooperation of its two C-terminus functional regions. *Oncogene*, **17**, 2383-2392.
- Floettmann, J.E. and Rowe, M.** (1997) Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) C-terminus activation region 2 (CTAR2) maps to the far C-terminus and requires oligomerisation for NF-kappaB activation. *Oncogene*, **15**, 1851-1858.
- Freshney, N.W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J. and Saklatvala, J.** (1994) Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*, **78**, 1039-1049.
- Fries, K.L., Miller, W.E. and Raab-Traub, N.** (1996) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene. *J. Virol.*, **70**, 8653-8659.
- Fritsche, M., Haessler, C. and Brandner, G.** (1993) Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene*, **8**, 307-318.
- Fuchs, S.Y., Adler, V., Buschmann, T., Yin, Z., Wu, X., Jones, S.N. and Ronai, Z.** (1998a) JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev.*, **12**, 2658-2663.
- Fuchs, S.Y., Adler, V., Pincus, M.R. and Ronai, Z.** (1998b) MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10541-10546.
- Garrington, T.P. and Johnson, G.L.** (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **11**, 211-218.
- Gibbs, C.S., Knighton, D.R., Sowadski, J.M., Taylor, S.S. and Zoller, M.J.** (1992) Systematic mutational analysis of cAMP-dependent protein kinase identifies unregulated catalytic subunits and defines regions important for the recognition of the regulatory subunit. *J. Biol. Chem.*, **267**, 4806-4814.

- Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M. and Hammerschmidt, W.** (1999) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J.*, **18**, 3064-3073.
- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D. and Hammerschmidt, W.** (1997) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J.*, **16**, 6131-6140.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R.** (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.*, **36**, 59-74.
- Grossman, S.R., Johannsen, E., Tong, X., Yalamanchili, R. and Kieff, E.** (1994) The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to response elements by the J kappa recombination signal binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 7568-7572.
- Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sluss, H.K., Derijard, B. and Davis, R.J.** (1996) Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.*, **15**, 2760-2770.
- Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B. and Davis, R.J.** (1995) Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science*, **267**, 389-393.
- Hammerschmidt, W., Sugden, B. and Baichwal, V.R.** (1989) The transforming domain alone of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus is toxic to cells when expressed at high levels. *J. Virol.*, **63**, 2469-2475.
- Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L. and Ulevitch, R.J.** (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, **265**, 808-811.
- Hanahan, D.** (1985) Techniques for transformation of *E.coli*. In Glover, D. (ed.), *DNA cloning. A practical approach*, Oxford, 109-135.
- Harris, C.C.** (1996) Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J. Natl. Cancer Inst.*, **88**, 1442-1455.
- Hatzivassiliou, E., Miller, W.E., Raab-Traub, N., Kieff, E. and Mosialos, G.** (1998) A fusion of the EBV latent membrane protein-1 (LMP1) transmembrane domains to the CD40 cytoplasmic domain is similar to LMP1 in constitutive activation of epidermal growth factor receptor expression, nuclear factor-kappa B, and stress-activated protein kinase. *J. Immunol.*, **160**, 1116-1121.
- Henderson, S., Rowe, M., Gregory, C., Croom-Carter, D., Wang, F., Longnecker, R., Kieff, E. and Rickinson, A.** (1991) Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell*, **65**, 1107-1115.

- Henkel, T., Ling, P.D., Hayward, S.D. and Peterson, M.G.** (1994) Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science*, **265**, 92-95.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. and Karin, M.** (1993) Identification of an onco-protein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.*, **7**, 2135-2148.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R.** (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, **77**, 51-59.
- Hoffmeyer, A., Grosse-Wilde, A., Flory, E., Neufeld, B., Kunz, M., Rapp, U.R. and Ludwig, S.** (1999) Different mitogen-activated protein kinase signaling pathways cooperate to regulate tumor necrosis factor alpha gene expression in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, **274**, 4319-4327.
- Holmes, D.S. and Quigley, M.** (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.*, **114**, 193-197.
- Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K. and Pease, L.R.** (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, **77**, 61-68.
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H.B., Baichwal, V. and Goeddel, D.V.** (1996a) TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*, **4**, 387-396.
- Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G. and Goeddel, D.V.** (1996b) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor-1 signal transduction pathways. *Cell*, **84**, 299-308.
- Hsu, H., Xiong, J. and Goeddel, D.V.** (1995) The TNF receptor-1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*, **81**, 495-504.
- Hu, M.C., Qiu, W.R. and Wang, Y.P.** (1997) JNK1, JNK2 and JNK3 are p53 N-terminal serine 34 kinases. *Oncogene*, **15**, 2277-2287.
- Huen, D.S., Henderson, S.A., Croom-Carter, D. and Rowe, M.** (1995) The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene*, **10**, 549-560.
- Ichijo, H.** (1999) From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene*, **18**, 6087-6093.
- Inoue, J.** (1997) [The TRAF family protein-mediated B cell proliferation signal and the mechanism of LMP1-induced B cell transformation]. *Nippon Rinsho*, **55**, 299-304.
- Inoue, J., Ishida, T., Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Naito, A., Azuma, S. and Yamamoto, T.** (2000) Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp. Cell Res.*, **254**, 14-24.

- Ip, Y.T. and Davis, R.J.** (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-- from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **10**, 205-219.
- Ishida, T., Mizushima, S., Azuma, S., Kobayashi, N., Tojo, T., Suzuki, K., Aizawa, S., Watanabe, T., Mosialos, G., Kieff, E., Yamamoto, T. and Inoue, J.** (1996) Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J. Biol. Chem.*, **271**, 28745-28748.
- Izumi, K.M., Kaye, K.M. and Kieff, E.D.** (1994) Epstein-Barr virus recombinant molecular genetic analysis of the LMP1 amino-terminal cytoplasmic domain reveals a probable structural role, with no component essential for primary B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.*, **68**, 4369-4376.
- Izumi, K.M., Kaye, K.M. and Kieff, E.D.** (1997) The Epstein-Barr virus LMP1 amino acid sequence that engages tumor necrosis factor receptor associated factors is critical for primary B lymphocyte growth transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1447-1452.
- Izumi, K.M. and Kieff, E.D.** (1997) The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF- kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12592-12597.
- Izumi, K.M., McFarland, E.C., Riley, E.A., Rizzo, D., Chen, Y. and Kieff, E.** (1999a) The Residues between the Two Transformation Effector Sites of Epstein- Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Are Not Critical for B-Lymphocyte Growth Transformation. *J. Virol.*, **73**, 9908-9916.
- Izumi, K.M., McFarland, E.C., Ting, A.T., Riley, E.A., Seed, B. and Kieff, E.D.** (1999b) The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated proteins TRADD and receptor-interacting protein (RIP) but does not induce apoptosis or require RIP for NF-kappaB activation. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 5759-5767.
- Jayachandra, S., Low, K.G., Thlick, A.E., Yu, J., Ling, P.D., Chang, Y. and Moore, P.S.** (1999) Three unrelated viral transforming proteins (vIRF, EBNA2, and E1A) induce the MYC oncogene through the interferon-responsive PRF element by using different transcription coadaptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 11566-11571.
- Jin, X.W. and Speck, S.H.** (1992) Identification of critical cis elements involved in mediating Epstein- Barr virus nuclear antigen 2-dependent activity of an enhancer located upstream of the viral BamHI C promoter. *J. Virol.*, **66**, 2846-2852.
- Johannsen, E., Koh, E., Mosialos, G., Tong, X., Kieff, E. and Grossman, S.R.** (1995) Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivation of the latent membrane protein 1 promoter is mediated by J kappa and PU.1. *J. Virol.*, **69**, 253-262.

- Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G.W. and Kempkes, B.** (1999) The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J. Virol.*, **73**, 4481-4484.
- Kallunki, T., Su, B., Tsigelny, I., Sluss, H.K., Derijard, B., Moore, G., Davis, R. and Karin, M.** (1994) JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev.*, **8**, 2996-3007.
- Karin, M.** (1999) How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene*, **18**, 6867-6874.
- Karin, M., Liu, Z. and Zandi, E.** (1997) AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 240-246.
- Kaye, K.M., Devergne, O., Harada, J.N., Izumi, K.M., Yalamanchili, R., Kieff, E. and Mosialos, G.** (1996) Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF-kappa B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11085-11090.
- Kaye, K.M., Izumi, K.M. and Kieff, E.** (1993) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9150-9154.
- Kaye, K.M., Izumi, K.M., Li, H., Johannsen, E., Davidson, D., Longnecker, R. and Kieff, E.** (1999) An Epstein-Barr virus that expresses only the first 231 LMP1 amino acids efficiently initiates primary B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.*, **73**, 10525-10530.
- Kaye, K.M., Izumi, K.M., Mosialos, G. and Kieff, E.** (1995) The Epstein-Barr virus LMP1 cytoplasmic carboxy terminus is essential for B-lymphocyte transformation; fibroblast cocultivation complements a critical function within the terminal 155 residues. *J. Virol.*, **69**, 675-683.
- Kaykas, A., Worringer, K. and Sugden, B.** (2001) CD40 and LMP-1 both signal from lipid rafts but LMP-1 assembles a distinct, more efficient signaling complex. *EMBO J.*, **20**, 2641-2654.
- Kern, S.E., Kinzler, K.W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C. and Vogelstein, B.** (1991) Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science*, **252**, 1708-1711.
- Khanna, R., Burrows, S.R. and Moss, D.J.** (1995) Immune regulation in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Microbiol. Rev.*, **59**, 387-405.
- Kieff, E., B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Chanock, R.M., Monath, T.P., Melnick, J.L., Roizman, B. and Straus, S.E.** (ed.), (1996) Epstein-Barr virus and its replication. In Fields, *Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, pp. 2343-2396.
- Kieser, A.** (2001) Assaying the activity of kinases regulated by LMP1. *Methods Mol. Biol.*, **174**, 325-336.

- Kieser, A., Kaiser, C. and Hammerschmidt, W.** (1999) LMP1 signal transduction differs substantially from TNF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2. *EMBO J.*, **18**, 2511-2521.
- Kieser, A., Kilger, E., Gires, O., Ueffing, M., Kolch, W. and Hammerschmidt, W.** (1997) Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *EMBO J.*, **16**, 6478-6485.
- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M. and Hammerschmidt, W.** (1998) Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J.*, **17**, 1700-1709.
- Knutson, J.C.** (1990) The level of c-fgr RNA is increased by EBNA-2, an Epstein-Barr virus gene required for B-cell immortalization. *J. Virol.*, **64**, 2530-2536.
- Kolch, W.** (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.*, **351 Pt 2**, 289-305.
- Kubbutat, M.H. and Vousden, K.H.** (1997) Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 460-468.
- Kulwichit, W., Edwards, R.H., Davenport, E.M., Baskar, J.F., Godfrey, V. and Raab-Traub, N.** (1998) Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11963-11968.
- Laherty, C.D., Hu, H.M., Opiari, A.W., Wang, F. and Dixit, V.M.** (1992) The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J. Biol. Chem.*, **267**, 24157-24160.
- Laux, G., Dugrillon, F., Eckert, C., Adam, B., Zimmer-Strobl, U. and Bornkamm, G.W.** (1994) Identification and characterization of an Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-responsive cis element in the bidirectional promoter region of latent membrane protein and terminal protein 2 genes. *J. Virol.*, **68**, 6947-6958.
- Levine, A.J.** (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88**, 323-331.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P.M., Klein, G., Kurilla, M.G. and Masucci, M.G.** (1995) Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature (London)*, **375**, 685-688.
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A. and Masucci, M.G.** (1997) Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12616-12621.
- Liebowitz, D., Kopan, R., Fuchs, E., Sample, J. and Kieff, E.** (1987) An Epstein-Barr virus transforming protein associates with vimentin in lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 2299-2308.

- Liebowitz, D., Wang, D. and Kieff, E.** (1986) Orientation and patching of the latent infection membrane protein encoded by Epstein-Barr virus. *J. Virol.*, **58**, 233-237.
- Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V. and Karin, M.** (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*, **87**, 565-576.
- Livingstone, C., Patel, G. and Jones, N.** (1995) ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J.*, **14**, 1785-1797.
- Lohrum, M.A. and Vousden, K.H.** (2000) Regulation and function of the p53-related proteins: same family, different rules. *Trends Cell. Biol.*, **10**, 197-202.
- Lomaga, M.A., Yeh, W.C., Sarosi, I., Duncan, G.S., Furlonger, C., Ho, A., Morony, S., Capparelli, C., Van, G., Kaufman, S., van der Heiden, A., Itie, A., Wakeham, A., Khoo, W., Sasaki, T., Cao, Z., Penninger, J.M., Paige, C.J., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Boyle, W.J., Goeddel, D.V. and Mak, T.W.** (1999) TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev.*, **13**, 1015-1024.
- Maki, C.G., Huibregtse, J.M. and Howley, P.M.** (1996) In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res.*, **56**, 2649-2654.
- Malinin, N.L., Boldin, M.P., Kovalenko, A.V. and Wallach, D.** (1997) MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature (London)*, **385**, 540-544.
- Maltzman, W. and Czyzyk, L.** (1984) UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 1689-1694.
- Marston, N.J., Crook, T. and Vousden, K.H.** (1994) Interaction of p53 with MDM2 is independent of E6 and does not mediate wild type transformation suppressor function. *Oncogene*, **9**, 2707-2716.
- May, P. and May, E.** (1999) Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*, **18**, 7621-7636.
- McLaughlin, M.M., Kumar, S., McDonnell, P.C., Van Horn, S., Lee, J.C., Livi, G.P. and Young, P.R.** (1996) Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 8488-8492.
- Meek, D.W.** (1999) Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene*, **18**, 7666-7675.
- Miller, W.E., Mosialos, G., Kieff, E. and Raab-Traub, N.** (1997) Epstein-Barr virus LMP1 induction of the epidermal growth factor receptor is mediated through a TRAF signaling pathway distinct from NF-kappaB activation. *J. Virol.*, **71**, 586-594.

- Milne, D.M., Campbell, D.G., Caudwell, F.B. and Meek, D.W.** (1994) Phosphorylation of the tumor suppressor protein p53 by mitogen- activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **269**, 9253-9260.
- Minden, A., Lin, A., McMahon, M., Lange-Carter, C., Derijard, B., Davis, R.J., Johnson, G.L. and Karin, M.** (1994) Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science*, **266**, 1719-1723.
- Mitchell, T. and Sugden, B.** (1995a) Stimulation of NF-kappa B-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus. *J. Virol.*, **69**, 2968-2976.
- Mitchell, T. and Sugden, B.** (1995b) Stimulation of NF-κB-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus. *J. Virol.*, **69**, 2968-2976.
- Miyashita, E.M., Yang, B., Babcock, G.J. and Thorley-Lawson, D.A.** (1997) Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J. Virol.*, **71**, 4882-4891.
- Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C. and Kieff, E.** (1995) The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell*, **80**, 389-399.
- Nakagomi, H., Dolcetti, R., Bejarano, M.T., Pisa, P., Kiessling, R. and Masucci, M.G.** (1994) The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) induces interleukin-10 production in Burkitt lymphoma lines. *Int. J. Cancer*, **57**, 240-244.
- Natoli, G., Costanzo, A., Ianni, A., Templeton, D.J., Woodgett, J.R., Balsano, C. and Leverro, M.** (1997) Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2- dependent pathway. *Science*, **275**, 200-203.
- Nebreda, A.R. and Porras, A.** (2000) p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 257-260.
- Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z. and Matsumoto, K.** (1999) The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature (London)*, **398**, 252-256.
- Okan, I., Wang, Y., Chen, F., Hu, L.F., Imreh, S., Klein, G. and Wiman, K.G.** (1995) The EBV-encoded LMP1 protein inhibits p53-triggered apoptosis but not growth arrest. *Oncogene*, **11**, 1027-1031.
- Ono, K. and Han, J.** (2000) The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell. Signal.*, **12**, 1-13.
- Pariat, M., Carillo, S., Molinari, M., Salvat, C., Debussche, L., Bracco, L., Milner, J. and Piechaczyk, M.** (1997) Proteolysis by calpains: a possible contribution to degradation of p53. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 2806-2815.

- Park, A. and Baichwal, V.R.** (1996) Systematic mutational analysis of the death domain of the tumor necrosis factor receptor 1-associated protein TRADD. *J. Biol. Chem.*, **271**, 9858-9862.
- Parker, G.A., Crook, T., Bain, M., Sara, E.A., Farrell, P.J. and Allday, M.J.** (1996) Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)3C is an immortalizing oncoprotein with similar properties to adenovirus E1A and papillomavirus E7. *Oncogene*, **13**, 2541-2549.
- Peng, M. and Lundgren, E.** (1992) Transient expression of the Epstein-Barr virus LMP1 gene in human primary B cells induces cellular activation and DNA synthesis. *Oncogene*, **7**, 1775-1782.
- Peng, M. and Lundgren, E.** (1993) Transient expression of the Epstein-Barr virus LMP1 gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells, T cells, and hematopoietic cell lines: cell-type-independent-induction of CD23, CD21, and ICAM-1. *Leukemia*, **7**, 104-112.
- Potapova, O., Gorospe, M., Dougherty, R.H., Dean, N.M., Gaarde, W.A. and Holbrook, N.J.** (2000) Inhibition of c-Jun N-terminal kinase 2 expression suppresses growth and induces apoptosis of human tumor cells in a p53-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 1713-1722.
- Prives, C.** (1998) Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell*, **95**, 5-8.
- Pullen, S.S., Dang, T.T., Crute, J.J. and Kehry, M.R.** (1999a) CD40 signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). Binding site specificity and activation of downstream pathways by distinct TRAFs. *J. Biol. Chem.*, **274**, 14246-14254.
- Pullen, S.S., Labadia, M.E., Ingraham, R.H., McWhirter, S.M., Everdeen, D.S., Alber, T., Crute, J.J. and Kehry, M.R.** (1999b) High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization. *Biochemistry*, **38**, 10168-10177.
- Pullen, S.S., Miller, H.G., Everdeen, D.S., Dang, T.T.A., Crute, J.J. and Kehry, M.R.** (1998) CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF heterooligomerization. *Biochemistry*, **37**, 11836-11845.
- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J.H., Ulevitch, R.J. and Davis, R.J.** (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.*, **270**, 7420-7426.
- Raingeaud, J., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Derijard, B. and Davis, R.J.** (1996) MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1247-1255.

- Rickinson, A. and Kieff, E.** (1996) Epstein-Barr virus. In In Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Chanock, R.M., Monath, T.P., Melnick, J.L., Roizman, B. and Straus, S.E. (ed.), *Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, pp. 2397-2446.
- Robertson, E.S., Grossman, S., Johannsen, E., Miller, C., Lin, J., Tomkinson, B. and Kieff, E.** (1995) Epstein-Barr virus nuclear protein 3C modulates transcription through interaction with the sequence-specific DNA-binding protein J kappa. *J. Virol.*, **69**, 3108-3116.
- Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V.M. and Goeddel, D.V.** (1995) TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science*, **269**, 1424-1427.
- Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J. and Goeddel, D.V.** (1994) A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, **78**, 681-692.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T. and Nebreda, A.R.** (1994) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*, **78**, 1027-1037.
- Rowe, M., Evans, H.S., Young, L.S., Hennessy, K., Kieff, E. and Rickinson, A.B.** (1987) Monoclonal antibodies to the latent membrane protein of Epstein-Barr virus reveal heterogeneity of the protein and inducible expression in virus-transformed cells. *J. Gen. Virol.*, **68**, 1575-1586.
- Rowe, M., Khanna, R., Jacob, C.A., Argat, V., Kelly, A., Powis, S., Belich, M., Croom-Carter, D., Lee, S., Burrows, S.R. and et al.** (1995) Restoration of endogenous antigen processing in Burkitt's lymphoma cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1: coordinate up-regulation of peptide transporters and HLA-class I antigen expression. *Eur. J. Immunol.*, **25**, 1374-1384.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sandberg, M., Hammerschmidt, W. and Sugden, B.** (1997) Characterization of LMP-1's association with TRAF1, TRAF2, and TRAF3. *J. Virol.*, **71**, 4649-4656.
- Schepers, A., Ritzi, M., Bousset, K., Kremmer, E., Yates, J.L., Harwood, J., Diffley, J.F. and Hammerschmidt, W.** (2001) Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *EMBO J.*, **20**, 4588-4602.
- Schultheiss, U., Puschner, S., Kremmer, E., Mak, T.W., Engelmann, H., Hammerschmidt, W. and Kieser, A.** (2001) TRAF6 is a critical mediator of signal transduction by the viral oncogene latent membrane protein 1. *EMBO J.*, **20**, 5678-5691.
- Seshagiri, S. and Miller, L.K.** (1997) Baculovirus inhibitors of apoptosis (IAPs) block activation of Sf-caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 13606-13611.

- Shaulian, E. and Karin, M.** (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, **20**, 2390-2400.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y. and Prives, C.** (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, **91**, 325-334.
- Silins, S.L. and Sculley, T.B.** (1994) Modulation of vimentin, the CD40 activation antigen and Burkitt's lymphoma antigen (CD77) by the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-4. *Virology*, **202**, 16-24.
- Simons, K. and Ikonen, E.** (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature (London)*, **387**, 569-572.
- Song, X., Sheppard, H.M., Norman, A.W. and Liu, X.** (1999) Mitogen-activated protein kinase is involved in the degradation of p53 protein in the bryostatin-1-induced differentiation of the acute promyelocytic leukemia NB4 cell line. *J. Biol. Chem.*, **274**, 1677-1682.
- Su, B. and Karin, M.** (1996) Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr. Opin. Immunol.*, **8**, 402-411.
- Sung, N.S., Kenney, S., Gutsch, D. and Pagano, J.S.** (1991) EBNA-2 transactivates a lymphoid-specific enhancer in the BamHI C promoter of Epstein-Barr virus. *J. Virol.*, **65**, 2164-2169.
- Sylla, B.S., Hung, S.C., Davidson, D.M., Hatzivassiliou, E., Malinin, N.L., Wallach, D., Gilmore, T.D., Kieff, E. and Mosialos, G.** (1998) Epstein-Barr virus-transforming protein latent infection membrane protein 1 activates transcription factor NF-kappaB through a pathway that includes the NF-kappaB-inducing kinase and the IkappaB kinases IKKalpha and IKKbeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10106-10111.
- Szekely, L., Selivanova, G., Magnusson, K.P., Klein, G. and Wiman, K.G.** (1993) EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5455-5459.
- Takeshita, H., Yoshizaki, T., Miller, W.E., Sato, H., Furukawa, M., Pagano, J.S. and Raab-Traub, N.** (1999) Matrix metalloproteinase 9 expression is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 C-terminal activation regions 1 and 2. *J. Virol.*, **73**, 5548-5555.
- Takeuchi, M., Rothe, M. and Goeddel, D.V.** (1996) Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *J. Biol. Chem.*, **271**, 19935-19942.
- Tao, W. and Levine, A.J.** (1999) Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3077-3080.
- Teodoro, J. and Branton, P.E.** (1997) Regulation of Apoptosis by Viral Gene Products. *J. Virol.*, **71**, 1739-1746.

- Thomas, S.M. and Brugge, J.S.** (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **13**, 513-609.
- Thorley-Lawson, D.A. and Mann, K.P.** (1985) Early events in Epstein-Barr virus infection provide a model for B cell activation. *J. Exp. Med.*, **162**, 45-59.
- Tomkinson, B., Robertson, E. and Kieff, E.** (1993) Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.*, **67**, 2014-2025.
- Tournier, C., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Barrett, T. and Davis, R.J.** (1997) Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7337-7342.
- Vockerodt, M., Haier, B., Buttgereit, P., Tesch, H. and Kube, D.** (2001) The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces interleukin-10 in Burkitt's lymphoma cells but not in Hodgkin's cells involving the p38/SAPK2 pathway. *Virology*, **280**, 183-198.
- Wajant, H. and Scheurich, P.** (2001) Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **33**, 19-32.
- Waltzer, L., Logeat, F., Brou, C., Israel, A., Sergeant, A. and Manet, E.** (1994) The human J kappa recombination signal sequence binding protein (RBP-J kappa) targets the Epstein-Barr virus EBNA2 protein to its DNA responsive elements. *EMBO J.*, **13**, 5633-5638.
- Wang, D., Liebowitz, D. and Kieff, E.** (1985) An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell*, **43**, 831-840.
- Wang, D., Liebowitz, D., Wang, F., Gregory, C., Rickinson, A., Larson, R., Springer, T. and Kieff, E.** (1988) Epstein-Barr virus latent infection membrane protein alters the human B-lymphocyte phenotype: deletion of the amino terminus abolishes activity. *J. Virol.*, **62**, 4173-4184.
- Wang, F., Gregory, C., Sample, C., Rowe, M., Liebowitz, D., Murray, R., Rickinson, A. and Kieff, E.** (1990) Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J. Virol.*, **64**, 2309-2318.
- Wang, J. and Friedman, E.** (2000) Downregulation of p53 by sustained JNK activation during apoptosis. *Mol. Carcinog.*, **29**, 179-188.
- Wang, X.Z. and Ron, D.** (1996) Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science*, **272**, 1347-1349.
- Whitmarsh, A.J. and R.J., D.** (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.*, **74**, 589-607.
- Whitmarsh, A.J., Shore, P., Sharrocks, A.D. and Davis, R.J.** (1995) Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science*, **269**, 403-407.

- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. and Greenberg, M.E.** (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, **270**, 1326-1331.
- Xie, X., Gu, Y., Fox, T., Coll, J.T., Fleming, M.A., Markland, W., Caron, P.R., Wilson, K.P. and Su, M.S.** (1998) Crystal structure of JNK3: a kinase implicated in neuronal apoptosis. *Structure*, **6**, 983-991.
- Yan, M., Dai, T., Deak, J.C., Kyriakis, J.M., Zon, L.I., Woodgett, J.R. and Templeton, D.J.** (1994) Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature (London)*, **372**, 798-800.
- Yates, J.L., Warren, N. and Sugden, B.** (1985) Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature (London)*, **313**, 812-815.
- Yoshizaki, T., Sato, H., Furukawa, M. and Pagano, J.S.** (1998) The expression of matrix metalloproteinase 9 is enhanced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3621-3626.
- Young, L.S., Dawson, C.W. and Eliopoulos, A.G.** (2000) The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *Mol. Pathol.*, **53**, 238-247.
- Yuan, J.** (1997) Transducing signals of life and death. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **9**, 247-251.
- Zervos, A.S., Faccio, L., Gatto, J.P., Kyriakis, J.M. and Brent, R.** (1995) Mxi2, a mitogen-activated protein kinase that recognizes and phosphorylates Max protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10531-10534.
- Zhang, Q., Gutsch, D. and Kenney, S.** (1994) Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: implications for Epstein-Barr virus latency. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1929-1938.
- Zhao, B. and Sample, C.E.** (2000) Epstein-barr virus nuclear antigen 3C activates the latent membrane protein 1 promoter in the presence of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 through sequences encompassing an spi-1/Spi-B binding site. *J. Virol.*, **74**, 5151-5160.
- Zheng, J., Knighton, D.R., ten Eyck, L.F., Karlsson, R., Xuong, N., Taylor, S.S. and Sowadski, J.M.** (1993) Crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MgATP and peptide inhibitor. *Biochemistry*, **32**, 2154-2161.
- Zimber-Strobl, U., Suentzenich, K.O., Laux, G., Eick, D., Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Lenoir, G.M. and Bornkamm, G.W.** (1991) Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 activates transcription of the terminal protein gene. *J. Virol.*, **65**, 415-423.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Dr. Arnd Kieser für die stets hervorragende wissenschaftliche Betreuung sowie für seine unermüdliche Unterstützung und seinen Beistand bei allen Problemen dieser Arbeit,

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt für seine Unterstützung (auch computerlicher Natur und in Form von Cookies), wissenschaftlichen Rat sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft,

Herrn Prof. Dr. Georg Bornkamm für die guten Arbeitsbedingungen in seinem Institut,

Herrn Prof. Dr. Dirk Eick dafür, daß er die Aufgaben und Pflichten des offiziellen Betreuers der Arbeit übernommen hat,

der gesamten Arbeitsgruppe Hammerschmidt / Kieser, die durch aufbauende Worte und Nervenahrung wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Z. Janz für ihre vielen selbstgebackenen Rotweinkuchen, meiner Ex-Laborgenossin Eva, Madelaine (Blondie), Markus (wie schmeckt Dein Snickers heute?), Uli für unerschöpflichen Nachschub der kostbaren Zellen, Sibille und MAB143 (dem Stier) für eine schöne Zeit trotz der unvermeidbaren Durchhänger. Während der Anfangsphase war mir unser Feuerwehrmann Christian Kaiser eine große Hilfe, nicht zuletzt beim Erlernen der etwas eigenartigen Arbeitszeiten. Durch die Endphase meiner Arbeit halfen mir „Mona“ Knöfel und „Freddy“ Reichender, die mir verf... viel Beistand geleistet haben. Vielen Dank auch an Carmen Schneider und Thomas Müller (der „Praktikant“), die mir ebenfalls sehr geholfen haben. Herzlich bedanken möchte ich mich natürlich auch für die Leute der Kaffeerrunde, insbesondere Marcus, Rob und Schleeli und allen weiteren Kollegen und Kolleginnen des Instituts, ohne die mir die Laborarbeit nicht so viel Spaß gemacht hätte.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Ute Schultheiß
Geburtsdatum: 04.07.1972
Geburtsort: Augsburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

1978-1982 Grundschole Grafrath
1982-1983 Teilhauptschole I Grafrath
1983-1992 Viscardi-Gymnasium Fürstenfeldbruck
Juli 1992 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)
1992-1994 Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg
Oktober 1994 Abschluß des Vordiploms
1994-1998 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität
München
Juli 1998 Abschluß des Studiums der Biologie (Diplom)

November 1998 bis Oktober 2001:

Promotion in der Arbeitsgruppe von Dr. Arnd Kieser an der GSF, Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, München.