

**Regulation von Apoptose und Überleben durch
Signalwege von LMP1 und TNF-Rezeptor 1**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

von

Julia Neugebauer

München, Februar 2007

Dissertation eingereicht am 08.02.2007

Erstgutachter Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachter Prof. Dr. Michael Boshart

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2007

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in Vorbereitung zur Veröffentlichung:

***Schneider, F. , *Neugebauer, J., Liefold, N., Briseño, C., Kutz, H. und Kieser, A. (2007)**

The TRADD binding domain of LMP1 determines a non-apoptotic type of TRADD signaling which is required for IKKbeta activation by LMP1 (*Manuskript in Vorbereitung*)

* Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

*für meine Eltern
und Andreas*

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Das Epstein-Barr-Virus</i>	<i>1</i>
1.2	<i>Das Latente Membranprotein 1 (LMP1).....</i>	<i>2</i>
1.2.1	Struktur von LMP1.....	3
1.2.2	Signalkomplex und Signaltransduktion von LMP1	5
1.3	<i>Der Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1).....</i>	<i>9</i>
1.3.1	Struktur von TNFR1.....	10
1.3.2	Signalkomplex und Signaltransduktion von TNFR1	11
1.4	<i>Gemeinsamkeiten und Unterschiede von LMP1 und TNFR1.....</i>	<i>14</i>
1.5	<i>Der TNFR assoziierte Faktor 7 (TRAF7)</i>	<i>17</i>
1.6	<i>Aufgabenstellung.....</i>	<i>20</i>
2	Material.....	22
2.1	<i>Antikörper</i>	<i>22</i>
2.2	<i>Plasmide</i>	<i>23</i>
2.3	<i>Oligonukleotide</i>	<i>26</i>
2.4	<i>Bakterien.....</i>	<i>28</i>
2.5	<i>Zelllinien.....</i>	<i>28</i>
2.6	<i>Chemikalien, Enzyme, Geräte und Reagenzien.....</i>	<i>28</i>
3	Methoden	31
3.1	<i>Bakterienkultur.....</i>	<i>31</i>
3.1.1	Vermehrung und Aufbewahrung.....	31
3.1.2	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i>	31
3.2	<i>Zellkultur</i>	<i>32</i>
3.2.1	Zellkulturbedingungen	32
3.2.1.1	Adhärente Zelllinien.....	32
3.2.1.2	Suspensionszelllinien	32
3.2.2	Aufbewahrung von Zellen.....	32
3.2.3	Transfektion von Zelllinien.....	32
3.2.3.1	Lipofektion.....	32
3.2.3.2	Transfektion mittels Elektroporation	33
3.2.3.3	Transfektion von siRNA Oligonukleotiden	33
3.2.4	Durchflusszytometrie (FACS) zur Bestimmung von Proteinexpression auf der Zelloberfläche.....	34

3.2.5	Zelltod-Analyse.....	34
3.3	DNA-Arbeitstechniken	35
3.3.1	Plasmid-Schnellaufreinigung.....	35
3.3.2	Präparative Plasmidaufreinigung.....	35
3.3.3	Sonstige DNA-Arbeitstechniken.....	35
3.4	RNA-Arbeitstechniken	36
3.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen.....	36
3.4.2	Reverse Transkription und RT-PCR.....	36
3.5	Klonierungen	37
3.5.1	Klonierung von pHEBO-hTNFR1, pHEBO-hTNFR1 Δ DD und pHEBO-hTNFR1 Δ DD-CTAR2.....	37
3.5.2	Klonierung von pHEBO-URA.....	38
3.5.3	Klonierung von pRK5-TNFR1, pRK5-TNFR1 Δ DD und pRK5-TNFR1-CTAR2.....	38
3.5.4	Klonierung von TRAF7 aus einer cDNA; Klonierung verschiedener Deletionsmutanten.....	39
3.6	Protein-Arbeitstechniken.....	41
3.6.1	Immunblot-Analyse.....	41
3.6.2	Immunkomplex-Kinaseversuch.....	42
3.6.3	Luziferase-Reportergenversuche.....	44
3.6.4	Co-Immunpräzipitation.....	45
3.6.5	Isolierung <i>Lipid Raft</i> assoziierter Proteine.....	46
4	Ergebnisse.....	48
4.1	„Domain Swapping“ der TRADD-Bindestellen von LMP1 und TNFR1.....	48
4.2	Die Aminosäuren 370-386 von LMP1 umfassen die vollständige TRADD Bindedomäne	52
4.2.1	Co-Immunpräzipitation.....	52
4.2.2	Rekrutierung von TRADD in <i>Lipid Rafts</i>	55
4.3	Charakterisierung der Signaltransduktion von LMP1-TNFR1-CTAR2.....	58
4.3.1	Aminosäuren 370-386 von LMP1 sind im LMP1-TNFR1 Kontext ausreichend für die Aktivierung von Signalwegen.....	58
4.3.2	Die TRAF2-Unabhängigkeit der JNK1 Induktion wird zusammen mit den Aminosäuren 370-386 von LMP1 übertragen.....	62

4.3.3	Die TRAF6-Abhängigkeit der JNK1 und der NF- κ B Induktion wird zusammen mit den Aminosäuren 370-386 von LMP1 übertragen.....	63
4.4	Analyse des apoptotischen Potenzials von CTAR2 und der Todesdomäne.....	67
4.5	„Domain Swapping“ im TNFR1 Wildtypkontext	69
4.5.1	Untersuchungen in HEK293 Zellen	71
4.5.1.1	Expression	71
4.5.1.2	TNFR1 Δ DD zeigt einen dominant negativen Effekt auf die Stimulierung des endogenen TNFR1	72
4.5.2	Untersuchungen in TNFR1/2 ^{-/-} Zellen.....	74
4.5.2.1	Expression und Membranlokalisierung.....	74
4.5.2.2	Aminosäuren 370-386 von LMP1 sind im TNFR1-Kontext ausreichend für die Aktivierung von Signalwegen.....	77
4.5.2.3	Induktion von Zelltod.....	81
4.6	TRAF7.....	83
4.6.1	Expression von TRAF7	83
4.6.2	Klonierung von TRAF7 und Deletionsmutanten	84
4.6.2.1	Klonierung von TRAF7 aus einer HEK293 cDNA	84
4.6.2.2	Klonierung von TRAF7-Deletionsmutanten.....	85
4.6.3	Expression von TRAF7 und Mutanten.....	86
4.6.4	Phosphorylierung von TRAF7(1-383)	87
4.6.5	Zelllokalisierung von TRAF7	90
4.6.6	Herunterregulierung von TRAF7 durch siRNA.....	92
4.6.7	Die Rolle von TRAF7 in der Aktivierung von JNK1 durch LMP1	92
5	Diskussion	95
5.1	Domain Swapping im LMP1-TNFR1-Kontext	96
5.1.1	Die Todesdomäne im LMP1-Kontext.....	96
5.1.2	Charakterisierung der TRADD-Bindedomäne von LMP1.....	97
5.1.3	Aktivierung der Signaltransduktion durch LMP1-TNFR1-CTAR2	99
5.1.4	Untersuchung der beteiligten Adaptermoleküle.....	101
5.1.5	Analyse der biologischen Effekte	104
5.2	Domain Swapping im TNFR1-Kontext.....	105
5.2.1	Untersuchungen in HEK293 Zellen	105
5.2.2	Untersuchungen in TNFR1/2 ^{-/-} Zellen	107

5.3	TRAF7	111
5.3.1	Klonierung von TRAF7 und Deletionsmutanten	112
5.3.2	Phosphorylierung von TRAF7(1-383)	112
5.3.3	Lokalisierung von TRAF7 in der Zelle	114
5.3.4	Beteiligung von TRAF7 an der Signaltransduktion von LMP1.....	114
6	Zusammenfassung	116
7	Abkürzungen	118
8	Literatur	121
9	Anhang	135

1 Einleitung

1.1 Das Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist ein humanes γ -Herpesvirus mit einem doppelsträngigen DNA-Genom von 172 kb. 90-95% der Weltbevölkerung sind mit dem Virus infiziert. Die natürlichen Wirtszellen von EBV sind humane B-Lymphozyten. Es konnte gezeigt werden, dass die Infektion der humanen B-Lymphozyten über eine Bindung der viralen Glycoproteine gp350/220 an das zelluläre CD21 erfolgt (Tanner et al., 1987). Zusätzlich konnte eine Bindung des viralen Glycoproteins gp42 an HLA Typ II Moleküle nachgewiesen werden (Borza und Hutt-Fletcher, 2002). Die Primärinfektion erfolgt über Epithelzellen im Nasen- und Rachenraum. Eine Infektion im Kindesalter verläuft meist symptomfrei. Bei einer Primärinfektion im Erwachsenenalter kann es zu einer infektiösen Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber) kommen, bei der sich EBV-infizierte Zellen stark vermehren. Nach einer lytischen Phase, in der Viruspartikel produziert und nach Lyse der infizierten Zellen freigesetzt werden, erfolgt der Übergang in die latente Phase. EBV persistiert lebenslang als Episom in B-Gedächtniszellen (Rickinson und Kieff, 2001; Thorley-Lawson, 2001). Gesunde latente Träger des Virus zeigen keine Symptome, da das zelluläre Immunsystem eine unkontrollierte Vermehrung infizierter Zellen verhindert. Ist allerdings kein voll funktionsfähiges Immunsystem vorhanden, wie es z.B. bei einer AIDS Erkrankung oder bei Immunsuppression nach einer Transplantation der Fall ist, kann es zur Entwicklung von malignen Erkrankungen kommen (Brinkmann und Schulz, 2006).

Aufgrund seiner ätiologischen Assoziation mit verschiedenen humanen malignen Erkrankungen wurde EBV als karzinogenes Virus (Gruppe 1, WHO International Agency for Research on Cancer) eingestuft. Es existieren verschiedene EBV-assoziierte B-Zell-Lymphome. Zu ihnen zählen das Burkitt-Lymphom, das Hodgkin-Lymphom sowie lymphoproliferative Erkrankungen in immunsupprimierten Patienten. Das Burkitt-Lymphom stellt in Äquatorialafrika und Neuguinea die häufigste Krebserkrankung bei Kindern dar. Neben dieser endemischen Form gibt es auch eine sporadische Form, die weltweit bei Erwachsenen beobachtet wird. Alle Burkitt-Lymphome weisen charakteristische Chromosomentranslokationen auf. Bei der endemischen Form sind 95% der transformierten Zellen EBV-positiv, bei der sporadischen Form sind es ca. 20%. Neben den B-Zell-

Erkrankungen ist EBV auch mit malignen Erkrankungen anderer Zelltypen assoziiert. Zu ihnen zählt das T-Zell Non-Hodgkin-Lymphom sowie das Nasopharynxkarzinom, das epithelialen Ursprungs ist. Hierbei handelt es sich um eine Krankheit, die vor allem in China sowie Südostasien weit verbreitet ist (Übersichtsartikel: Niedobitek et al., 2001; Young und Rickinson, 2004).

EBV kann B-Lymphozyten auch *in vitro* infizieren, was zur Transformation der B-Zellen und zur Etablierung lymphoblastoider Zelllinien, so genannter LCLs (*lymphoblastoid cell lines*) führt. In LCLs wird eine begrenzte Anzahl von viralen Proteinen, die so genannten latenten Proteine, exprimiert. Zu diesen Proteinen gehören die EBV-nukleären Antigene EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C und -LP sowie die Latenten Membranproteine LMP1, 2A und 2B. Außerdem werden die beiden kleinen nicht codierenden RNA-Moleküle EBER1 und 2 codiert. Für die Transformation von B-Zellen durch das Virus sind EBNA1, 2, 3A, 3C sowie LMP1 essentiell (Young et al., 2000; Young und Rickinson, 2004).

1.2 Das Latente Membranprotein 1 (LMP1)

Bei dem Latenten Membranprotein 1 (LMP1) handelt es sich um das primäre Onkogen des EBV. Mit Hilfe von rekombinantem EBV konnte gezeigt werden, dass LMP1 bei der Immortalisierung von B-Lymphozyten eine essentielle Rolle spielt (Kaye et al., 1993; Kilger et al., 1998). LMP1 hat zudem als einziges EBV-Protein das Potential, Nagerfibroblasten *in vitro* zu transformieren (Wang et al., 1985). Die ektopische Expression von LMP1 in B-Zellen bzw. Hautzellen transgener Mäuse führt zur Entwicklung von B-Zelllymphomen bzw. epithelialer Hyperplasie (Kulwichit et al., 1998; Stevenson et al., 2005; Wilson et al., 1990).

Die Expression von LMP1 hat sowohl mitogene als auch antiapoptotische und antiseneszente Wirkung, was dieses Protein zu einem potenten Onkogen macht. LMP1 aktiviert die Expression mitogener Transkriptionsfaktoren wie c-myc und Mitglieder der Jun/AP-1-Familie (Dirmeier et al., 2005). Über eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase kommt es zur Induktion der IL-6, IL-8 und IL-10 Produktion durch LMP1 (Eliopoulos et al., 1999b; Vockerodt et al., 2001). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Signaltransduktion von LMP1 in transformierten B-Zellen für den Übergang von der G₀/G₁-Phase zur S-Phase notwendig ist (Dirmeier et al., 2005; Everly et al., 2004; Kilger et al., 1998). Seine antiapoptotische Wirkung erreicht LMP1 durch die Aktivierung des NF-κB Signalweges. So führt die

Expression von LMP1 zu einer Hochregulierung der Expression antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2, Mcl-1, Bfl-1, A20 und cIAPs (Eliopoulos und Young, 2001). Zusätzlich konnte auch eine Herunterregulierung der Expression des proapoptotischen Proteins Bax gezeigt werden (Grimm et al., 2005). Seine antiseneszente Wirkung liegt z.B. in der Inhibierung der p16INK4a Expression (Yang et al., 2000). Weiter konnte gezeigt werden, dass LMP1 die Expression von Telomerase hochregulieren kann (Yang et al., 2004).

LMP1 wird oft mit dem zellulären Protein CD40 verglichen. Tatsächlich ist LMP1 in der Lage, CD40 teilweise funktionell zu ersetzen. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von LMP1 in CD40-defizienten Mäusen zu einer Induktion der B-Zell-Differenzierung führt. Auf der molekularen Ebene sind allerdings mehr Gemeinsamkeiten mit dem TNF-Rezeptor 1 vorhanden. Hierauf soll später noch näher eingegangen werden (siehe Abschnitte 1.2.2, 1.3.2 und 1.4).

1.2.1 Struktur von LMP1

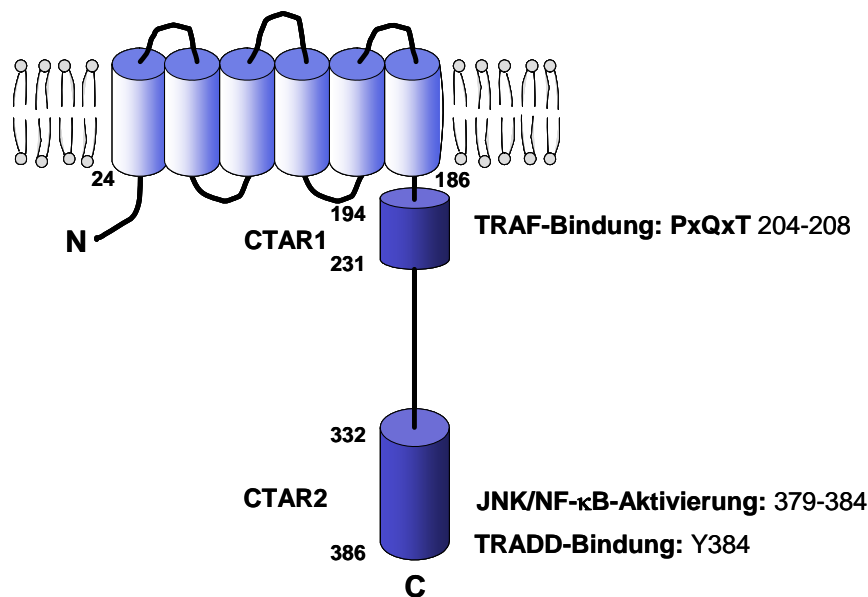


Abb. 1.1: Schematische Darstellung von LMP1

Nähere Erklärungen: siehe Text.

LMP1 ist ein Membranprotein mit 386 Aminosäuren und einem scheinbaren Molekulargewicht von 63 kDa. Es besteht aus einem kurzen cytoplasmatischen N-Terminus (Aminosäuren 1-24), sechs hydrophoben Transmembrandomänen (Aminosäuren 25-186)

sowie einem 200 Aminosäuren langen cytoplasmatischen C-Terminus (187-386). In Abb. 1.1 ist LMP1 mit seinen Domänen schematisch dargestellt.

Der hydrophile N-Terminus ist arginin- und prolinreich. Er ist für die korrekte Lokalisierung und Orientierung des Proteins in der Plasmamembran notwendig (Coffin et al., 2001; Izumi et al., 1994). Über den N-Terminus kommt es auch zu einem regulierten Abbau von LMP1. LMP1 wird dort ubiquitiniert und über einen Proteasom-abhängigen Weg degradiert (Aviel et al., 2000). Dies ist notwendig, da LMP1 in zu hoher Konzentration in der Zelle zytotoxisch wirkt (Hammerschmidt et al., 1989).

Die Transmembrandomänen führen nach der Expression von LMP1 zu einer spontanen Oligomerisierung mehrerer LMP1-Moleküle in der Membran. Diese Zusammenlagerung führt zur Induktion der Signaltransduktion (Floettmann und Rowe, 1997; Gires et al., 1997). LMP1 verhält sich wie ein konstitutiv aktives rezeptorähnliches Molekül. Ein Ligand ist daher für die Aktivierung von LMP1 nicht notwendig. Diese Eigenschaft der LMP1-Transmembrandomänen kann auf andere Rezeptormoleküle übertragen werden. Hierbei kommt es ebenfalls zu einer konstitutiv aktiven Signaltransduktion. Die Art der Signaltransduktion wird durch die Signaldomäne des jeweiligen Rezeptors festgelegt (Dudziak et al., 2003; Gires et al., 1997). Die Transmembrandomänen spielen auch eine wichtige Rolle in der Lokalisation von LMP1 in so genannten *Lipid Rafts*. Hierbei handelt es sich um Sphingolipid- und Cholesterin-reiche Membrankompartimente, die eine wichtige Rolle in der Aktivierung verschiedener Signalwege spielen (Simons und Ikonen, 1997; Simons und Toomre, 2000). Es wurde gezeigt, dass die ersten beiden Transmembrandomänen für eine Lokalisierung von LMP1 in die *Lipid Rafts* ausreichend sind (Coffin et al., 2003). FWLY₃₈₋₄₁ konnte als hierfür notwendiges Motiv identifiziert werden (Yasui et al., 2004). LMP1 weist eine konstitutive Lokalisierung in *Lipid Rafts* auf, wobei ca. 30% des in der Zelle vorhandenen LMP1 dort zu finden sind (Higuchi et al., 2001; Kaykas et al., 2001; Rothenberger et al., 2002). Diese Lokalisierung sowie die Rekrutierung von Adaptermolekülen in die *Lipid Rafts* sind für die Aktivierung verschiedener Signalwege durch LMP1 wichtig (Ardila-Osorio et al., 2005; Kaykas et al., 2001; Lam und Sugden, 2003; Rothenberger et al., 2002).

Der C-Terminus ist für die Bindung von Signaladaptermolekülen und für die Induktion verschiedener Signalwege zuständig. Der C-Terminus besteht aus zwei Domänen, den so genannten C-terminalen Aktivatorregionen CTAR1 (Aminosäuren 194-231) und CTAR2

(Aminosäuren 332-386). Es konnte gezeigt werden, dass die CTARs eine essentielle Rolle bei der Transformation von B-Zellen spielen. Ein mutiertes Epstein-Barr-Virus, das nur die ersten 231 Aminosäuren von LMP1 trägt, führt zwar zu einer initialen Proliferation von B-Zellen (Kaye et al., 1999). Es kommt allerdings nicht zu einer Langzeitproliferation (Kaye et al., 1995). Während CTAR1 also bereits für eine erste Proliferation notwendig ist, spielt CTAR2 eine essentielle Rolle in der Etablierung transformierter B-Zellen (Dirmeier et al., 2003; Izumi und Kieff, 1997). Auch Experimente mit dem Maxi-EBV System zeigen, dass LMP1 für eine effiziente Transformation essentiell ist (Dirmeier et al., 2003). Im folgenden Abschnitt soll detaillierter auf die Funktion der CTARs und auf die durch sie induzierten Signalwege eingegangen werden.

1.2.2 Signalkomplex und Signaltransduktion von LMP1

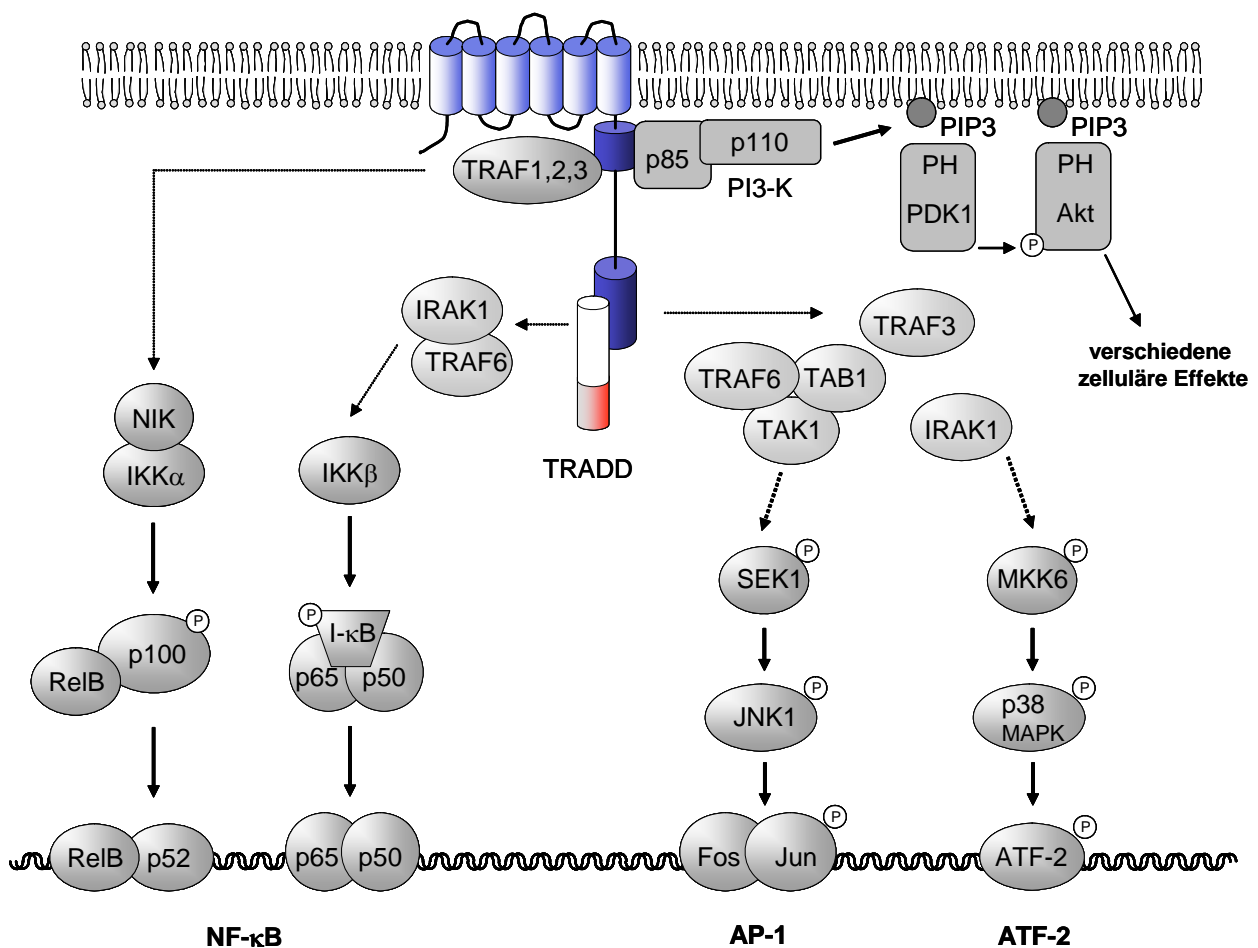


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der durch LMP1 induzierten Signalwege

In der Abbildung sind die wichtigsten Signalwege, die durch LMP1 aktiviert werden, dargestellt. Nähere Erklärungen: siehe Text.

Im Laufe der letzten Jahre wurden verschiedene Signalwege aufgeklärt, die durch LMP1 aktiviert werden. Außerdem konnte eine immer größer werdende Anzahl an Adaptermolekülen identifiziert werden, die für die Vermittlung der Signalweiterleitung von LMP1 in die Zelle verantwortlich sind. In Abb. 1.2 sind die wichtigsten Signalwege sowie die daran beteiligten Moleküle schematisch dargestellt. Auf die Einzelheiten wird im Folgenden eingegangen.

Bei der Familie der TRAFs (Tumornekrosefaktor-Rezeptor assoziierte Faktoren) handelt es sich um Adapterproteine, die eine Interaktion von Membranproteinen mit zellulären Proteinen wie z.B. Kinasen vermitteln. Sie spielen daher eine essentielle Rolle in der Signaltransduktion verschiedener Moleküle. Die Familie der TRAFs besteht aus sieben Mitgliedern (TRAF1 bis 7). TRAF1 bis 6 haben eine konservierte C-terminale Domäne, die für die Interaktion mit Rezeptoren verantwortlich ist. Zusätzlich wird über diese Domäne auch eine Homo- und Heterodimerisierung vermittelt (Wajant et al., 2001). Bis auf TRAF1 besitzen alle Mitglieder eine RING-Finger Domäne. Es konnte gezeigt werden, dass TRAF2, 5, 6 und 7 über diese RING-Finger Domäne als E3 Ubiquitin-Ligasen agieren können (Bouwmeester et al., 2004; Deng et al., 2000; Wajant et al., 2001; Xia und Chen, 2005). Auf TRAF7 wird im Abschnitt 1.5 noch näher eingegangen.

Mitglieder der TRAF-Familie wurden zuerst als Bindepartner von TNF-Rezeptor und CD40 identifiziert (Cheng et al., 1995; Rothe et al., 1994). 1995 wurden TRAF1 und TRAF2 als direkte Interaktionspartner von LMP1 beschrieben (Mosialos et al., 1995). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass auch TRAF3 und 5 direkt an CTAR1 binden können (Devergne et al., 1996; Mosialos et al., 1995). Als Bindestelle von LMP1 wurde eine Konsensussequenz identifiziert, die auch bei CD40 für die TRAF-Bindung essentiell ist (Devergne et al., 1996). Hierbei handelt es sich um ein so genanntes PxQxT-Motiv (x steht jeweils für eine beliebige Aminosäure). PQQAT₂₀₄₋₂₀₈ liegt in CTAR1 und vermittelt die Bindung der TRAFs. Die genaue Rolle der einzelnen TRAFs bei der Signaltransduktion von LMP1 ist umstritten und Gegenstand der aktuellen Forschung. Es konnte die Beteiligung eines weiteren Mitglieds dieser Familie, nämlich TRAF6, an der Signaltransduktion von LMP1 nachgewiesen werden (Schultheiss et al., 2001). TRAF6 spielt vor allem bei der Signaltransduktion durch CTAR2 eine essentielle Rolle. Eine direkte Bindung von TRAF6 an CTAR2 konnte bislang nicht gezeigt werden, hier handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine indirekte oder transiente Interaktion (Schultheiss et al., 2001). Die direkte Bindung von TRAF6 an CD40 erfolgt über

ein QxPxExxE/F-Konsensusmotiv (Pullen et al., 1999; Pullen et al., 1998). Dieses Motiv ist im LMP1 Molekül nicht vorhanden. Im Gegensatz zu CTAR1 hat CTAR2 kein PxQxT-Motiv.

Mit Hilfe von einem *Yeast Two Hybrid Screen* konnte das Adaptermolekül TRADD (TNF-receptor associated death domain protein) als direkter Bindepartner von CTAR2 identifiziert werden (Izumi und Kieff, 1997). Wie auch die TRAFs wurde TRADD zuerst als Bindepartner des TNF-Rezeptor 1 identifiziert (siehe 1.3.2). Im Gegensatz zum TNFR1 bindet TRADD über seinen N-Terminus an LMP1 (Kieser et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass Tyr384 von LMP1 für diese Bindung essentiell ist (Izumi und Kieff, 1997). Eine intakte Todesdomäne hingegen ist für die Bindung von TRADD an LMP1 nicht essentiell. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass eine Mutante mit Punktmutationen in der Todesdomäne (TRADD_{296-299A}) an LMP1 binden kann (Kieser et al., 1999).

Neben TRADD konnte RIP1 (Rezeptor-interagierendes Protein) als weiterer direkter Bindepartner von CTAR2 identifiziert werden (Izumi et al., 1999). Hierbei handelt es sich um ein Protein mit einer Todes- sowie einer Kinasedomäne. Seine Rolle in der Signaltransduktion von LMP1 ist noch weitgehend offen. 2006 wurde in einem *Yeast Two Hybrid Screen* von Wan *et al.* BS69 als direkter Bindepartner von LMP1 identifiziert und eine Rolle in der Aktivierung des JNK1 Signalweges postuliert (Wan et al., 2006).

Durch die Bindung der oben vorgestellten Adaptermoleküle an CTAR1 und CTAR2 von LMP1 kommt es zu einer Rekrutierung von zellulären Proteinen. Dies führt zur Aktivierung von Signalwegen und schließlich zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren. Zu ihnen gehört NF- κ B. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe heterodimerer Transkriptionsfaktoren, die aus Mitgliedern der NF- κ B/Rel Familie bestehen. Mitglieder dieser Familie sind p105/p50, p100/52, RelA, RelB und c-Rel (Bonizzi und Karin, 2004). NF- κ B wird sowohl über CTAR1 als auch über CTAR2 aktiviert, allerdings sind jeweils unterschiedliche Signalwege an der Aktivierung beteiligt. Über CTAR1 wird der alternative (nicht-kanonische) NF- κ B-Signalweg induziert (Saito et al., 2003). Welche TRAFs hieran beteiligt sind, ist umstritten. Lange Zeit ging man von einer Beteiligung von TRAF2 aus. Diese wurde durch Überexpressionsexperimente sowie Versuchen mit dominant negativem TRAF2 untersucht (Devergne et al., 1996; Kaye et al., 1996). Durch Untersuchungen in TRAF2- sowie TRAF3-defizienten Zellen wurde eine Beteiligung von TRAF2 an der

Induktion des NF- κ B Signalweges in Frage gestellt und TRAF3 eine essentielle Rolle zugesprochen (Xie et al., 2004). Neueste, noch unpublizierte Daten weisen jedoch wieder auf eine Rolle von TRAF2 hin (Soni et al., 2006). TRAF3 scheint als negativer Regulator der NF- κ B Aktivierung zu fungieren (Yasui et al., 2006). Über CTAR1 kommt es zur Aktivierung von NIK (NF- κ B induzierende Kinase). NIK phosphoryliert und aktiviert die Kinase IKK α (I- κ B-Kinase α), die wiederum p100 phosphoryliert (Luftig et al., 2004; Wu et al., 2006). Dies führt zu einer proteolytischen Spaltung von p100 in p52. p52 kann jetzt mit RelB ein Heterodimer bilden, das in den Nukleus transloziert und die Transkription p52/RelB abhängiger Gene aktiviert (Bonizzi und Karin, 2004).

Über CTAR2 wird der klassische (kanonische) NF- κ B Signalweg aktiviert. Eine TRADD-Mutante, der die Todesdomäne fehlt, blockiert die Aktivierung von NF- κ B durch CTAR2 (Kieser et al., 1999). Dies lieferte erste Hinweise auf eine Beteiligung von TRADD an der Aktivierung des NF- κ B Signalweges. Der endgültige Beweis für eine Beteiligung von TRADD konnte mit Hilfe von TRADD-defizienten Zellen durch Frank Schneider aus unserem Labor erbracht werden (Schneider, 2005). Des Weiteren sind TRAF6, IRAK1, TAK1 und IKK β (I- κ B-Kinase β) an der Aktivierung beteiligt (Luftig et al., 2003; Schultheiss et al., 2001; Wu et al., 2006). Aktiviertes IKK β phosphoryliert den Inhibitor I- κ B α , was zu dessen Degradation führt. Dadurch wird das Heterodimer p50/p65 freigesetzt und kann in den Nukleus translozieren, wo es die Transkription NF- κ B abhängiger Gene aktiviert (Bonizzi und Karin, 2004).

Ausschließlich über CTAR2 erfolgt die Aktivierung des c-Jun N-terminalen Kinase (JNK, SAPK) Signalwegs (Kieser et al., 1997). Die Aminosäuren 379-384 sind für die JNK1/2 Aktivierung notwendig (Kieser et al., 1999). Es wird postuliert, dass BS69 als Adaptorprotein dient und im JNK Signalweg die Interaktion zwischen LMP1 und TRAF6 vermittelt (Wan et al., 2006). Die Aktivierung von JNK erfolgt dann wahrscheinlich abhängig von TRAF3 und 6 sowie TAK1/TAB1 und SEK1 (MKK4) (Kieser et al., 1997; Uemura et al., 2006; Wan et al., 2004; Xie et al., 2004). JNK wird durch Phosphorylierung durch SEK1 aktiviert. JNK phosphoryliert und aktiviert daraufhin c-Jun. Bei c-Jun handelt es sich um einen Faktor des dimeren Transkriptionsfaktorkomplexes AP-1. Mit Hilfe von siRNA sowie TRADD-defizienten Zellen konnte gezeigt werden, dass TRADD an der Aktivierung von JNK1 durch LMP1 nicht beteiligt ist (Schneider, 2005; Wan et al., 2004). Lange Zeit war eine Rolle von

TRADD bei der JNK Aktivierung angenommen worden, da die TRADD-Bindedomäne und die für die JNK-Aktivierung notwendige Domäne überlappen.

Neben dem NF- κ B und dem JNK Signalweg induziert LMP1 auch noch den p38 MAP-Kinase Signalweg (Eliopoulos et al., 1999b). TRAF6 und MKK6 wurden als beteiligte Faktoren in diesem Signalweg nachgewiesen (Schultheiss et al., 2001). Aktiviertes MKK6 phosphoryliert die p38 MAPK, die dann wiederum den Transkriptionsfaktor ATF2 phosphoryliert und damit aktiviert. Zur vollen Aktivierung des p38 MAPK Signalweges ist eine Kooperation von CTAR1 und CTAR2 notwendig (Schultheiss et al., 2001).

Des Weiteren konnte eine Aktivierung des PI3-K/Akt Signalwegs nachgewiesen werden (Dawson et al., 2003). p85, die regulatorische Untereinheit der PI3-Kinase (Phosphoinositol 3-Kinase, PI3-K) wurde als Interaktionspartner von CTAR1 identifiziert. Die Aktivierung von PI3-K führt zur Bildung von PIP₃ (Phosphatidyinositol-3,4,5-Triphosphat) an der Plasmamembran. PIP₃ rekrutiert die Kinase Akt an die Plasmamembran, wo sie durch PDK1 phosphoryliert und aktiviert wird.

1.3 Der Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1)

Wie bereits beschrieben, sind an der Signaltransduktion von LMP1 Moleküle wie TRADD und TRAFs beteiligt, die ebenfalls bei der Signaltransduktion von Mitgliedern der TNF-Rezeptor Familie eine essentielle Rolle spielen. Auf einen Vertreter dieser Familie, den TNF-Rezeptor 1, soll im Folgenden näher eingegangen werden. Das Zytokin Tumornekrosefaktor α (TNF α) vermittelt in der Zelle ein breites Spektrum an Effekten wie Entzündungsreaktionen, Apoptose und Nekrose. TNF α spielt als proinflammatorisches Zytokin eine große Rolle bei Regulationsvorgängen des Immunsystems. TNF α ist aber auch als Auslöser von Krankheitszuständen bekannt. Wird es in sehr großen Mengen ausgeschüttet, kann dies zu einem septischen Schock und schließlich sogar zu Multiorganversagen führen (Aggarwal, 2003; Mannel und Echtenacher, 2000). Die Effekte von TNF α werden durch die beiden zellulären Oberflächenrezeptoren Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 und 2 (TNFR1, TNFR2) vermittelt.

1.3.1 Struktur von TNFR1

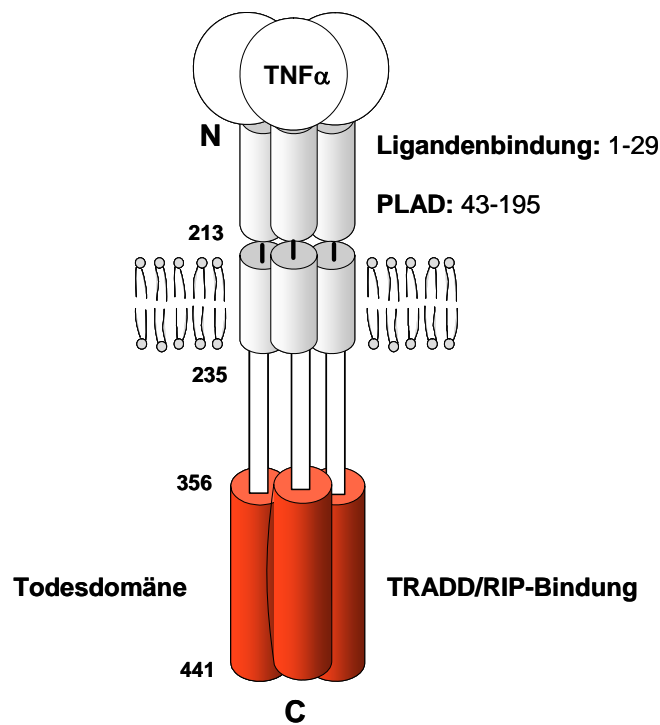


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des TNF-Rezeptor1

Nähere Erklärungen: siehe Text.

Beim TNFR1 handelt es sich um ein 55 kDa großes Transmembranprotein. Er wird in den meisten Zelltypen konstitutiv exprimiert. In Abb. 1.3 ist der TNFR1 mit seinen einzelnen Domänen dargestellt. Der TNFR1 besitzt eine extrazelluläre Ligandenbindedomäne sowie vier extrazelluläre cysteinreiche Domänen, die unter anderem für die Ligandenspezifität verantwortlich sind (Bodmer et al., 2002). Über diese auch als *pre-ligand-binding assembly domains* (PLAD) bezeichnete Domänen erfolgt bereits eine Trimerisierung des inaktiven Rezeptors (Chan et al., 2000). Durch die Bindung des Proteins *silencer of death domain* (SODD) wird aber eine Aktivierung des Rezeptors ohne Ligandenbindung verhindert (Jiang et al., 1999). Bindet trimeres TNF α an den Rezeptor, kommt es zu einer Konformationsänderung des bis dahin inaktiven Rezeptors. Diese führt dazu, dass der Inhibitor SODD von der Todesdomäne des Rezeptors freigesetzt wird. Dadurch werden die Bindung verschiedener Signalmoleküle und die Aktivierung der Signaltransduktion ermöglicht. Der TNFR1 besitzt eine intrazelluläre Todesdomäne (DD, Aminosäuren 356-441) und gehört damit zur Familie der Todesdomänen-Proteine. Diese Domäne ist für die

Rekrutierung von Adaptermolekülen sowie die Aktivierung verschiedener Signalwege verantwortlich. Im Gegensatz zum TNFR1 besitzt der 75 kDa große TNFR2 keine Todesdomäne. Über ein intrazelluläres PxQxT-Motiv kann er direkt TRAFs binden. Der TNFR2 wird vor allem in Zellen des Immunsystems exprimiert (Wajant et al., 2003).

1.3.2 Signalkomplex und Signaltransduktion von TNFR1

Im Folgenden soll ein Überblick über die Signaltransduktion sowie die beteiligten Signalmoleküle gegeben werden. In Abb. 1.4 sind die wichtigsten Signalwege sowie die daran beteiligten Moleküle schematisch dargestellt.

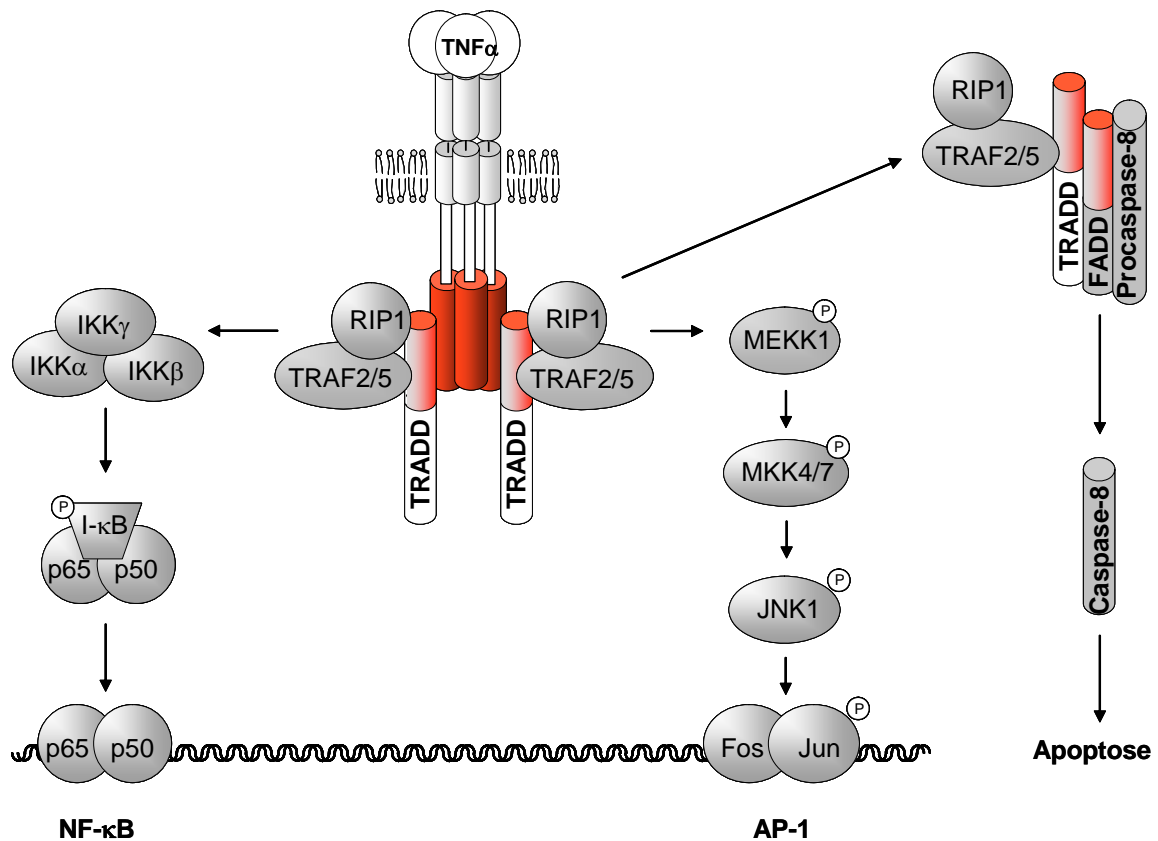


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der durch den TNF-Rezeptor 1 induzierten Signalwege

In der Abbildung sind die wichtigsten Signalwege, die durch TNFR1 aktiviert werden, dargestellt. Nähere Erklärungen: siehe Text.

Über seine eigene Todesdomäne kann das Adaptermolekül TRADD an den Rezeptor binden. TRADD dient dann als Plattform für die Bindung weiterer Signalmoleküle wie TRAF1 und

TRAF2, RIP1 sowie cIAP1/2. Es konnte gezeigt werden, dass RIP1 auch direkt an den TNFR1 binden kann (Hsu et al., 1996a; Stanger et al., 1995; Zheng et al., 2006). Die Bindung von RIP1 an TRADD ist allerdings stärker, daher wurde eine Bindung von RIP1 über TRADD an den TNFR1 postuliert (Hsu et al., 1996a). Eine direkte Bindung von TRAF1 und 2 an den TNFR1 konnte nicht gezeigt werden, auch hier wird eine Bindung über TRADD angenommen (Hsu et al., 1996b; Hsu et al., 1995; Rothe et al., 1995). Nach der Stimulierung des Rezeptors bildet sich ein membranständiger Komplex aus TNFR1, TRADD, TRAF2 und RIP, der auch als Komplex I bezeichnet wird (Micheau und Tschopp, 2003). Dieser Komplex kann in die *Lipid Rafts* translozieren und dort den NF- κ B Signalweg aktivieren (Legler et al., 2003). Durch den TNFR1 kommt es zu einer Aktivierung des klassischen (kanonischen) NF- κ B Signalweges (Hsu et al., 1996b; Hsu et al., 1995). Die Aktivierung des NF- κ B Signalweges ist abhängig von den *Lipid Rafts*. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die NF- κ B Aktivierung abhängig von RIP1, TRAF2/5 sowie von TRADD verläuft (Schneider, 2005; Ting et al., 1996; Yeh et al., 1997). In TRAF2/5 defizienten Zellen kommt es zu einem vollständigen Defekt in der Aktivierung von NF- κ B durch TNF α (Tada et al., 2001). Auch die essentielle Rolle von RIP1 konnte in RIP1-defizienten Zellen gezeigt werden (Kelliher et al., 1998). Während TRAF2 für die Rekrutierung des IKK-Komplexes (IKK α , β , γ) notwendig ist, ist RIP1 an der Aktivierung des Komplexes beteiligt (Devin et al., 2000). In Mäusen, die defizient für die einzelnen Komponenten des IKK-Komplexes sind, konnte die Bedeutung der einzelnen IKKs für die Aktivierung des NF- κ B Signalweges durch den TNFR1 aufgeklärt werden. IKK γ hat eine regulatorische Funktion, während IKK β die Kinase ist, die I- κ B α phosphoryliert (Li et al., 2000; Rudolph et al., 2000; Tanaka et al., 1999). IKK α spielt in diesem Signalweg nur eine untergeordnete Rolle (Hu et al., 1999). I- κ B α hält das inaktive p50/p65 Heterodimer durch die Maskierung der nukleären Lokalisationssequenz im Zytoplasma zurück. Nach der Phosphorylierung durch IKK β wird I- κ B α degradiert und p50/p65 kann in den Nukleus translozieren, wo es die Transkription NF- κ B abhängiger Gene induziert (Bonizzi und Karin, 2004).

Die Aktivierung des JNK1/AP-1 Signalweges durch den TNFR1 ist abhängig von TRAF2 (Lee et al., 1997; Natoli et al., 1997; Reinhard et al., 1997). In MKK7-defizienten Zellen konnte gezeigt werden, dass MKK7 die für die JNK1 Aktivierung durch TNF α essentielle Kinase ist. MKK4 ist notwendig für eine optimale und anhaltende Aktivierung von JNK1 (Tournier et al., 2001). Die Frage nach der an diesem Signalweg beteiligten MAP3-Kinase konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Es konnte eine Interaktion von MEKK1 mit

TRAF2 nachgewiesen werden (Baud et al., 1999). In MEKK1 defizienten Zellen konnte auch eine Rolle dieser Kinase an der JNK1 Aktivierung durch den TNF-Rezeptor 1 nachgewiesen werden (Xia et al., 2000; Yujiri et al., 2000). Dies scheint allerdings Zelltyp-abhängig zu sein (Baud und Karin, 2001). Auch für ASK1 konnte eine Rolle in der JNK1 Aktivierung durch den TNF-Rezeptor 1 gezeigt werden (Hoefflich et al., 1999; Nishitoh et al., 1998; Tobiume et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass AIP1 mit TRAF2 und ASK1 interagiert und so die Aktivierung von JNK1 durch TNF α vermittelt (Zhang et al., 2004). Frank Schneider aus unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Aktivierung des JNK1/AP-1 Signalweges auch unabhängig von TRADD erfolgen kann (Schneider, 2005). Neben dem JNK1/AP-1 Signalweg kann der TNFR1 noch den p38-MAPK sowie den ERK1/2 Signalweg induzieren. Auf diese Signalwege soll hier allerdings nicht genauer eingegangen werden.

Über seine Todesdomäne kann der TNFR1, wie auch andere Todesrezeptoren, Apoptose auslösen. Im Fall des TNFR1 wird dieses apoptotische Potential durch die Aktivierung des NF- κ B Signalweges moduliert. Die Induktion der Apoptose verläuft abhängig von TRADD, FADD und Caspase 8 (Hsu et al., 1996b; Hsu et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass FADD und Caspase 8 nicht direkt an den Rezeptor binden können (Harper et al., 2003). Stattdessen kommt es zur Ausbildung eines zytoplasmatischen Komplexes (Micheau und Tschopp, 2003). Während der NF- κ B Signalweg relativ schnell, d.h. innerhalb weniger Minuten, aktiviert wird, erfolgt die Ausbildung dieses Komplexes deutlich langsamer (nach 2-8 h). Erst nach der Dissoziation von TRADD und TRAF2 vom Rezeptor kommt es zur Bildung des zytoplasmatischen Komplexes. Dieser, auch als Komplex II bezeichnete Komplex setzt sich aus TRADD, FADD, TRAF2, Pro-Caspase 8/10 und cIAPs zusammen (Micheau und Tschopp, 2003). Die Bildung von Komplex II löst die Aktivierung einer Caspase-Kaskade aus, an deren Ende die Aktivierung von Caspase 3 steht. Dies führt letztendlich zur Apoptose der Zelle. Es konnte gezeigt werden, dass TNF α neben apoptotischem Zelltod auch nicht-apoptotischen programmierten Zelltod, die so genannte Nekrose, induzieren kann. Die Caspase 8-abhängige Induktion der Apoptose verläuft über die Moleküle TRADD und FADD. Bei der Induktion des nicht-apoptotischen Zelltodes spielt TRADD keine Rolle. Hier sind RIP1 sowie die Bildung von *Reactive Oxygen Species* (ROS) beteiligt (Zheng et al., 2006).

In Zellen, in denen neben dem TNFR1 zusätzlich auch der TNFR2 durch TNF α stimuliert wird, kommt es zu einer Verstärkung des apoptotischen Potentials des TNFR1 (Chan und

Lenardo, 2000; Wajant et al., 2003; Weiss et al., 1998). Der TNFR2 kann über sein PxQxT-Motiv größere Mengen an TRAF2 rekrutieren. Dies führt zu einer Verringerung der freien TRAF2-Menge im Zytoplasma. Eine Verringerung der TRAF2-Menge kann auch über einen Abbau von TRAF2 nach einer Polyubiquitinierung durch cIAP1 entstehen (Fotin-Mleczek et al., 2002; Li et al., 2002). Beide Mechanismen haben zur Folge, dass nicht mehr genügend TRAF2 für die Aktivierung des antiapoptotischen NF- κ B Signalweges durch den TNFR1 zur Verfügung steht. Dies führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichts hin zu einer Aktivierung von Caspasen und damit des apoptotischen Signalweges.

1.4 Gemeinsamkeiten und Unterschiede von LMP1 und TNFR1

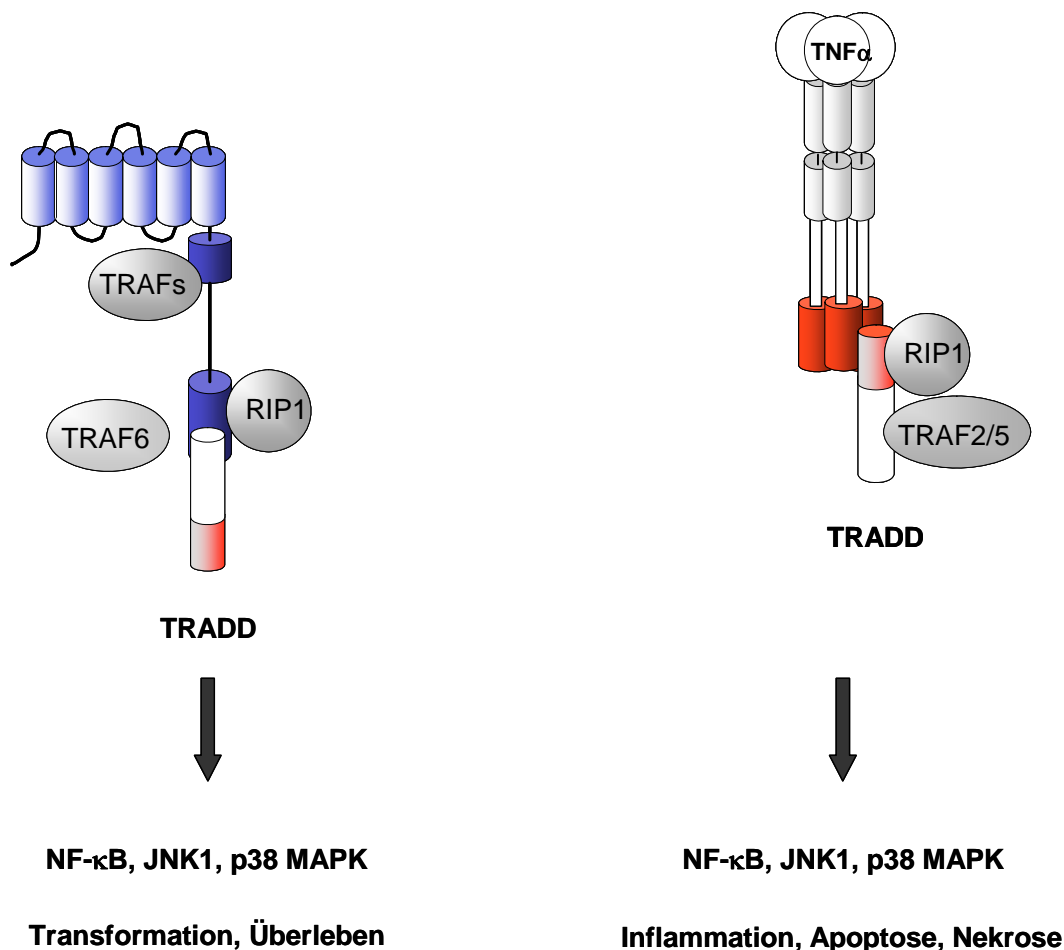


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Signalkomplexe von LMP1 und TNFR1

In der Abbildung sind die Signalkomplexe mit den beteiligten Signalmolekülen sowie die biologischen Phänotypen der Signaltransduktion dargestellt. Nähere Erklärungen: siehe Text.

Vergleicht man den Aufbau der Signalkomplexe und die aktivierten Signalwege des viralen LMP1 und des zellulären TNFR1, fallen viele Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede auf. Wie in Abbildung 1.5 zu sehen, sind Moleküle wie TRADD, RIP1 und TRAFs am Aufbau beider Signalkomplexe beteiligt. Auch bei den aktivierten Signalwegen gibt es deutliche Überschneidungen. LMP1 aktiviert unter anderem den NF- κ B, den JNK1/AP-1 sowie den p38 MAPK Signalweg (Eliopoulos et al., 1999b; Kaye et al., 1996; Kieser et al., 1997; Luftig et al., 2003; Saito et al., 2003). Auch durch den TNFR1 kommt es zu einer Aktivierung dieser drei Signalwege (Carpentier et al., 1998; Hsu et al., 1995; Legler et al., 2003; Natoli et al., 1997).

Allerdings gibt es auch Unterschiede zwischen LMP1 und dem TNFR1. Es konnte gezeigt werden, dass RIP1 eine essentielle Rolle bei der Aktivierung des NF- κ B Signalweges durch den TNFR1 spielt, indem es den IKK-Komplex aktiviert (Kelliher et al., 1998). Neueste Daten zeigen auch eine Beteiligung von RIP1 an der Induktion von Nekrose durch den TNFR1 (Zheng et al., 2006). Im Fall von LMP1 konnte zwar eine Bindung von RIP1 gezeigt werden. Im Gegensatz zum TNFR1 ist RIP1 allerdings an der Aktivierung des NF- κ B Signalweges durch LMP1 nicht beteiligt (Izumi et al., 1999). Die Rolle von RIP1 in der Signaltransduktion von LMP1 ist unklar.

Auch in Bezug auf die TRAFs werden Unterschiede in der Signaltransduktion von LMP1 und TNFR1 deutlich. TRAF2 ist essentiell für die Aktivierung des JNK1/AP-1 Signalweges durch den TNFR1 (Lee et al., 1997; Natoli et al., 1997). Auch bei der Aktivierung des NF- κ B Signalweges ist TRAF2 beteiligt, hier führt der gleichzeitige *knockout* von TRAF2 und TRAF5 zu einem Defekt in der Aktivierung dieses Signalweges durch den TNFR1 (Tada et al., 2001). Wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, ist die Rolle von TRAF2 in der Aktivierung von NF- κ B durch LMP1 umstritten. Bei der Aktivierung von JNK1 durch LMP1 spielt TRAF2 keine Rolle, hier konnte gezeigt werden, dass TRAF3 und TRAF6 essentiell sind (Kieser et al., 1999; Wan et al., 2004; Xie et al., 2004). Auch bei der Aktivierung des NF- κ B Signalweges konnte eine essentielle Rolle von TRAF6 nachgewiesen werden (Luftig et al., 2003; Schultheiss et al., 2001).

An der Aktivierung des JNK1/AP-1 Signalweges durch den TNFR1 spielen kleine G-Proteine aus der p21 Rho-Familie eine Rolle. In HEK293 Zellen konnte eine Beteiligung von Cdc42, welches zu dieser Familie gehört, nachgewiesen werden (Coso et al., 1995; Kieser et al.,

werden, dass die Aminosäuren 296-299, die in der Todesdomäne liegen, für die Aktivierung des NF- κ B Signalweges und die Induktion von Apoptose essentiell sind (Park und Baichwal, 1996). Die Bindung einer TRADD_{296-299A} Mutante an den TNFR1 ist stark eingeschränkt (Park und Baichwal, 1996). Am N-Terminus besitzt TRADD eine TRAF-Bindedomäne. Es wurde gezeigt, dass TRAF1, TRAF2 und TRAF3 an TRADD binden können (Inoue et al., 2000; Wajant et al., 1999; Wajant et al., 2001). Die Struktur der TRADD-TRAF2 Interaktion konnte kristallographisch aufgeklärt werden (Park et al., 2000). Neben Mitgliedern der TRAF-Familie bindet TRADD über seinen N-Terminus auch an LMP1 (Kieser et al., 1999).

Wie in den Abschnitten 1.2.2 und 1.3.2 beschrieben, spielt TRADD sowohl in der Signaltransduktion von LMP1 als auch vom TNFR1 eine wichtige Rolle. Beim TNFR1 dient TRADD als Plattform für den Aufbau des Signalkomplexes. Frank Schneider aus unserer Arbeitsgruppe konnte mit Hilfe von homologer Rekombination einen somatischen Knockout von TRADD in der Burkitt-Lymphom Zelllinie DG75 durchführen. Mit Hilfe dieser Zellen konnte gezeigt werden, dass TRADD für die Induktion des NF- κ B Signalweges durch LMP1 und TNFR1 essentiell ist. Außerdem ist TRADD für die Induktion von Apoptose durch den TNFR1 notwendig. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass TRADD bei der Aktivierung des JNK1 Signalwegs durch LMP1 und auch durch den TNFR1 keine Rolle spielt (Schneider, 2005).

Die Interaktion zwischen TRADD und dem TNFR1 wird über die jeweiligen Todesdomänen der beiden Proteine vermittelt. LMP1 besitzt im Gegensatz zum TNFR1 keine Todesdomäne. Trotzdem konnte eine direkte Bindung von TRADD an LMP1 gezeigt werden (Izumi und Kieff, 1997). Die Bindung erfolgt über den N-Terminus von TRADD an den C-Terminus von LMP1 (Kieser et al., 1999). Damit unterscheiden sich der Typ der TRADD Bindung sowie die TRADD-Bindedomänen von LMP1 und TNFR1 grundlegend.

1.5 Der TNFR assoziierte Faktor 7 (TRAF7)

Bei der TRAF-Familie handelt es sich um Adaptermoleküle, die in der Signaltransduktion unterschiedlicher Rezeptoren und Moleküle eine essentielle Rolle spielen. In Abschnitt 1.2.2 und 1.3.2 wurde bereits näher auf die Rolle von TRAFs in der Signaltransduktion von LMP1 und vom TNFR1 eingegangen. Ursprünglich wurden TRAF1 und 2 als Adaptermoleküle in der Signaltransduktion des TNF-Rezeptors identifiziert (Rothe et al., 1994). Inzwischen ist

auch eine Beteiligung von TRAFs an der Signaltransduktion von CD40, LMP1 sowie Toll-like Rezeptoren (TLR) und IL-1 Rezeptor beschrieben worden (Cao et al., 1996; Cheng et al., 1995; Ishida et al., 1996; Mosialos et al., 1995; Wajant et al., 2001). 2004 wurde parallel in zwei Publikationen TRAF7 als ein neues Mitglied der bis dahin sechs Mitglieder umfassenden TRAF-Familie beschrieben (Bouwmeester et al., 2004; Xu et al., 2004). Xu *et al.* konnten TRAF7 über einen Sequenzvergleich in einer Datenbank identifizieren. TRAF7 besitzt eine RING-Finger sowie eine Zink-Finger Domäne, die homolog zu den entsprechenden Domänen von TRAF2-6 sind. TRAF7 weist allerdings nicht die typische C-terminale TRAF-Domäne auf. Bouwmeester *et al.* konnten TRAF7 über einen systembiologischen Ansatz identifizieren. Dort konnte eine Interaktion von TRAF7 mit MEKK3, das an der Aktivierung des NF- κ B Signalweges durch TNF α beteiligt ist, nachgewiesen werden.

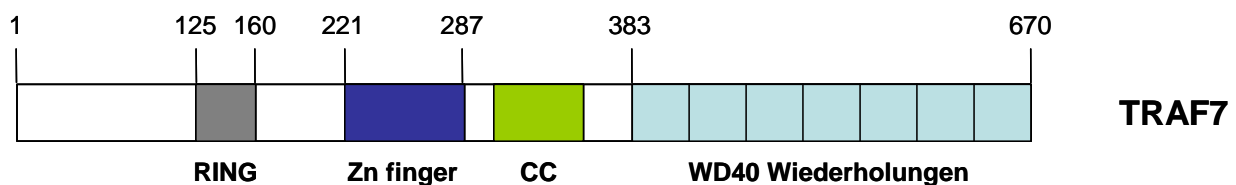


Abb. 1.7: Schematische Darstellung von TRAF7

Nähere Erklärungen: siehe Text.

Bei TRAF7 handelt es sich um ein 670 Aminosäuren großes Protein mit einer RING-Finger Domäne (As 125-160) und einer Zink-Finger Domäne (As 221-287). Der C-Terminus besteht aus sieben WD40 Wiederholungen (As 383-670) (Abb. 1.7). TRAF7 ist ein stark konserviertes Protein mit 97% bzw. 92% Sequenzhomologie zu dem Protein aus Maus bzw. *Xenopus*.

Es ist bekannt, dass TRAFs mit Mitgliedern der MAP3-Kinase Familie interagieren. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass TRAF2 mit MEKK1/3 sowie ASK1 interagiert (Baud et al., 1999; Nishitoh et al., 1998; Yang et al., 2001). TRAF6 kann mit TAK1 interagieren (Ninomiya-Tsuji et al., 1999). TRAF7 interagiert spezifisch mit MEKK3. In HeLa Zellen konnte eine Kolokalisierung der beiden Proteine in Vesikel-ähnlichen Strukturen gezeigt werden (Bouwmeester et al., 2004). Hierzu sind die WD40 Wiederholungen sowohl

notwendig als auch ausreichend. TRAF7 verstärkt die Autophosphorylierung von MEKK3 sowie die Aktivierung von JNK1 und p38 durch MEKK3. Auch hierfür sind die WD40 Wiederholungen notwendig.

Anders als die anderen TRAFs ist TRAF7 in der Lage, Caspase-abhängige Apoptose zu induzieren. Für diese apoptotische Aktivität ist die RING-Finger Domäne wichtig. Allerdings ist auch eine Mutante, in der diese Domäne deletiert wurde, in der Lage Apoptose zu induzieren, wenn auch in abgeschwächter Form. Die Induktion der Apoptose konnte durch den Caspase Inhibitor crmA inhibiert werden (Xu et al., 2004).

TRAF7 zeigt sich im Immunblot als mehrere hochmolekulare Banden. Es konnte gezeigt werden, dass TRAF7 ubiquitiniert und durch MEKK3 phosphoryliert werden kann (Bouwmeester et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass eine Mutante, bei der der C-Terminus deletiert wurde, ebenfalls durch MEKK3 phosphoryliert wird (Bouwmeester et al., 2004). Dies deutet auf eine Lage der Hauptphosphorylierungsstelle im N-Terminus. MEKK3 induziert auch die Ubiquitinierung von TRAF7. Zusätzlich konnte auch eine Auto-Ubiquitinierung von TRAF7 beobachtet werden, bei der TRAF7 selber als E3-Ubiquitin-Ligase fungieren (Bouwmeester et al., 2004). Hierzu ist die RING-Finger Domäne wichtig.

Bei MEKK3 handelt es sich um die MAP3K, die notwendig für die Induktion von NF- κ B durch TNF α ist. Eine Überexpression von MEKK3 und TRAF7 führt zu einer synergistischen Aktivierung des JNK1 sowie des NF- κ B Signalweges. Eine Herunterregulierung der TRAF7-Expression durch siRNA inhibiert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch TNF α (Bouwmeester et al., 2004). Es wurde gezeigt, dass TRAF7 Homodimere bilden kann. Hierzu ist die Zink-Finger Domäne notwendig. Neben der Bildung von Homodimeren ist TRAF7 auch in der Lage Heterodimere mit TRAF6 zu bilden (Yoshida et al., 2005). Eine Beteiligung von TRAF7 an der Signaltransduktion durch den Toll-like Rezeptor 2 konnte bereits nachgewiesen werden (Yoshida et al., 2005). Die Interaktion mit TRAF6 und die Regulation von NF- κ B und JNK1 ließ eine Beteiligung von TRAF7 an der Signaltransduktion durch LMP1 möglich erscheinen.

1.6 Aufgabenstellung

Wie in Abschnitt 1.4 beschrieben, weisen das virale Protein LMP1 und der zelluläre TNFR1 Gemeinsamkeiten in ihrer Signaltransduktion auf. Allerdings induzieren beide Proteine unterschiedliche biologische Phänotypen. Während LMP1 transformierende Eigenschaften aufweist, induziert der TNFR1 neben dem NF- κ B Signalweg vor allem Apoptose und Nekrose. TRADD ist das zentrale Adaptermolekül im Signalkomplex des TNF-Rezeptor 1 und spielt auch in der Signaltransduktion von LMP1 eine wichtige Rolle. Die Bindung von TRADD an LMP1 bzw. an den TNFR1 wird durch zwei strukturell stark unterschiedliche Bereiche innerhalb der Signaldomänen beider Moleküle vermittelt. Zusätzlich ist bekannt, dass TRADD über unterschiedliche Domänen an LMP1 und an den TNFR1 bindet. Der unterschiedliche Typ der Bindung von TRADD an LMP1 und an TNFR1 könnte der Schlüssel zum Verständnis der unterschiedlichen Phänotypen der Signaltransduktion sein. Es ist möglich, dass die TRADD-Bindestelle selbst den Phänotyp der Signaltransduktion festlegt. Es ist aber auch denkbar, dass dafür der Rezeptorkontext verantwortlich ist.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, diese Frage mit Hilfe von „*Domain-Swapping*“-Experimenten zu beantworten. Hierzu sollten die TRADD-Bindestellen von LMP1 und TNFR1 gegeneinander ausgetauscht werden. Dies sollte sowohl im Kontext des konstitutiv aktiven LMP1-TNFR1 als auch im Kontext des Wildtyp TNFR1 durchgeführt werden. Die so entstandenen Chimären sollten dann auf ihr Potential hin untersucht werden, TRADD zu rekrutieren und Signalwege zu induzieren. Um die molekularen Grundlagen für die unterschiedlichen biologischen Effekte der Signaltransduktion von LMP1 und TNFR1 aufzuklären, sollte die Beteiligung verschiedener Adapterproteine an der jeweiligen Signaltransduktion untersucht werden. Außerdem sollte das apoptotische Potential der verschiedenen Proteine und Signaldomänen analysiert werden. Auf diese Weise sollte aufgeklärt werden, ob der Typ der TRADD-Bindestelle selbst oder der Rezeptorkontext für den aus der Signaltransduktion resultierenden Phänotyp verantwortlich ist.

Ein weiteres Ziel dieser Doktorarbeit war es, eine mögliche Beteiligung von TRAF7 an der Signaltransduktion von LMP1 zu untersuchen. Hierfür sollte humanes TRAF7 zunächst kloniert und ein Expressionsvektor etabliert werden. Für die weitere Analyse sollten Expressionsvektoren für verschiedene Deletionsmutanten von TRAF7 sowie für ein Fusionsprotein aus mRFP und TRAF7 kloniert werden. Außerdem sollte unter Verwendung

von TRAF7-spezifischer siRNA die Beteiligung von TRAF7 an der Signaltransduktion von LMP1 untersucht werden.

2 Material

2.1 Antikörper

Primärantikörper

α -Actin (I-19); Ziege, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
α -ERK2 (D-2), Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
α -Flag (M2); Maus, monoklonal	Stratagene, Sigma
α -HA (12CA5); Maus, monoklonal	Roche
α -HA (3F10); Ratte, monoklonal	Roche
α -JNK1 (C-17); Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
α -LMP1 (CS 1-4); Maus, Mischung aus vier monoklonalen Antikörpern	Dako
α -TNFR1 (H-5); Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
α -TRADD; Maus, polyklonal	BD Transduction Laboratories
α -TRADD (H-278), Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
α -TRAF2 (C-20); Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
α -TRAF6	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Phosphospezifische Primärantikörper

α -Phospho-JNK1	Cell Signaling (NEB)
α -Phospho-I κ B α	Cell Signaling (NEB)
α -Phospho-Threonin	Cell Signaling (NEB)
α -Phospho-Tyrosin	Cell Signaling (NEB)

Sekundärantikörper

α -Maus IgG, Merettich-Peroxidase gekoppelt	Cell Signaling (NEB)/ Promega
α -Kaninchen IgG, Merettich-Peroxidase gekoppelt	Cell Signaling (NEB)/ Promega
α -Ratte IgG, Merettich-Peroxidase gekoppelt	

α -Maus IgG, CyTM5-gekoppelt
(subclasses 1, 2a, 2b, 3; Fc (gamma) Frag)

Jackson ImmunoResearch

2.2 Plasmide

<u>Plasmidbezeichnung</u>	<u>Beschreibung</u>
pRK5	Expressionsvektor mit CMV-Promotor (Schall et al., 1990)
pcDNA3.1	Expressionsvektor mit SV40-Promotor/Enhancer (Invitrogen)
pCR2.1	Vektor für die TA-Subclonierung von PCR-Produkten (Invitrogen)
pCMV-HA-LMP1	LMP1 Wildtyp (As 6-386) aus dem EBV-Stamm, B95.8 mit N-terminalem Hämagglutinin-Epitop (HA-Epitop) in pHEBO-Expressionsvektor; CMV-Promotor (Arnd Kieser)
pCMV-HA-LMP1 Δ 194-386	LMP1 Mutante, bei der die zytoplasmatische Signaldomäne von LMP1 deletiert wurde, in pHEBO Vektor; CMV-Promotor (Arnd Kieser)
pCMV-HA-LMP1 _{PQT→AAA}	LMP1 Mutante, bei der im PxQxT Motiv der TRAF-Interaktionsdomäne in CTAR1 die As Pro ²⁰⁴ , Gln ²⁰⁶ und Thr ²⁰⁸ jeweils zu Ala (AxAxA) mutiert wurden; CMV-Promotor (Arnd Kieser)
pCMV-HA-LMP1-TNFR1	chimäres Fusionsprotein zwischen den Transmembrandomänen von B95.8-LMP1 (As 6-190) und der zytoplasmatischen Signaldomäne (As 206-426) des TNF-Rezeptors 1 in pHEBO Vektor mit N-terminalem HA-Epitop; CMV-Promotor (Ferdinand Reicheneder und Arnd Kieser) (Dudziak et al., 2003; Schneider und Kieser, 2004)
pCMV-HA-LMP1-TNFR1 Δ DD	LMP1-TNFR1 Mutante, bei der die Todesdomäne deletiert wurde in pHEBO-Expressionsvektor; CMV-Promotor (Nicola Liefold und Arnd Kieser)

pCMV-HA-LMP1-TNFR1 ΔDD-CTAR2	LMP1-TNFR1 Mutante, bei der die Todesdomäne durch die As 370-386 von LMP1 ersetzt wurde in pHEBO-Expressionsvektor; CMV-Promotor (Nicola Liefold und Arnd Kieser)
pCMV-HA-LMP1Δ371	B95.8 LMP1 ohne As 371-386 der CTAR2-Domäne in pHEBO-Expressionsvektor; CMV-Promotor (Nicola Liefold und Arnd Kieser)
pCMV-HA-LMP1Δ371-DD	LMP1 Mutante, bei der die As 371-386 durch die Todesdomäne des TNFR1 (As 358-455) ersetzt wurde; CMV-Promotor (Nicola Liefold und Arnd Kieser)
pRK-TRAF2(87-501)	dominant negative TRAF2 Mutante (As 87-501), bei der der RING-Finger deletiert wurde (Rothe et al., 1995)
pcDNA3.1-TRAF6	TRAF6 in Expressionsvektor pcDNA3.1 (Schultheiss et al., 2001)
pEGFP-C1	modifizierter Expressionsvektor für EGFP (<i>enhanced green fluorescence protein</i>) mit Neomycin Phosphotransferasegen (Cormack et al., 1996) (Clontech)
pRK5-myc-hTRADD	humanes TRADD mit N-terminalem myc-Epitop in pRK5 (Hsu et al., 1995)
pRK5-myc-TRADD _{296-299A}	TRADD Mutante, bei der die As 296-299 zu Alanin mutiert wurden, mit N-terminalem myc-Epitop in pRK5 (Kieser et al., 1999)
pRK5-HA-JNK1	c-Jun N-terminale Kinase 1 mit N-terminalem HA-Epitop (wird nur durch 3F10 und nicht durch 12CA5 erkannt) in pRK5; CMV-Promotor (Ute Schultheiss)
pcDNA3.1-p35	Bakulovirus Protein p35 in pcDNA3.1(+)(Seshagiri und Miller, 1997)
pcDNA3-CrmA	CrmA in pcDNA3 (Hartmut Engelmann)
pGST-c-Jun	GST fusioniert mit der Transaktivierungsdomäne von c-Jun
κB-CONA-Luc	Luziferase-Reportergenkonstrukt mit minimalem Conalbumin Promotor und drei NF-κB Bindestellen (Arenzana-Seisdedos et al., 1993; Floettmann und Rowe, 1997)

p1768 (3xκB-Luc)	Luziferase-Reportergenkonstrukt mit minimalem <i>fos</i> Promotor und drei NF-κB Bindestellen (Bill Sugden, Madison, USA)
PGK-βGal	Galaktosidase-Reportergenkonstrukt unter Kontrolle eines Phosphoglyceratkinasepromotors (PGK) (Stefan Wagener)
pCMV-RL	<i>Renilla</i> Luziferase unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (Brzozka et al., 2006) (Promega)
SRD-MEKK1	C-terminales 687 As langes Fragment von MKK1; kinaseaktiv; SRα-Promotor (S.Hirai, Yokohama City Univ., Japan)
pRK5-mRFP-TRAF7	TRAF7 mit N-terminalem mRFP in pRK5, CMV-Promotor (Sascha Allwein und Arnd Kieser)
pRK5-mRFP-TRAF7(283-670)	TRAF7-Mutante mit N-terminalem mRFP in pRK5, CMV-Promotor (Sascha Allwein und Arnd Kieser)

Die folgenden Plasmide wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit kloniert.

<u>Plasmidbezeichnung</u>	<u>Beschreibung</u>
pHEBO-URA	Expressionsvektor mit CMV-Promotor (Sugden et al., 1985)
pHEBO-TNFR1	humaner TNF-Rezeptor 1 in pHEBO; CMV-Promotor
pHEBO-TNFR1ΔDD	humaner TNF-Rezeptor 1, bei dem die Todesdomäne deletiert wurde, in pHEBO; CMV-Promotor
pHEBO-TNFR1-CTAR2	humaner TNF-Rezeptor 1, bei dem die Todesdomäne durch die As 370-386 von LMP1 ersetzt wurden, in pHEBO; CMV-Promotor
pRK5-TNFR1	humaner TNF-Rezeptor 1 in pRK5; CMV-Promotor
pRK5-TNFR1ΔDD	humaner TNF-Rezeptor 1, bei dem die Todesdomäne deletiert wurde, in pRK5; CMV-Promotor
pRK5-TNFR1-CTAR2	humaner TNF-Rezeptor 1, bei dem die Todesdomäne durch die As 370-386 von LMP1 ersetzt wurden, in pRK5; CMV-Promotor

pRK5-Flag-TRAF7	humanes TRAF7 mit N-terminalem Flag-Epitop in pRK5; CMV-Promotor/Enhancer
pRK5-HA-TRAF7	humanes TRAF7 mit N-terminalem HA-Epitop in pRK5; CMV-Promotor/Enhancer
pRK5-Flag-TRAF7(162-670)	TRAF7-Mutante (162-670), bei der der RING-Finger deletiert wurde, in pRK5; CMV-Promotor/Enhancer
pRK5-Flag-TRAF7(1-383)	TRAF7-Mutante (1-383), bei der die WD40 Wiederholungen deletiert wurden, in pRK5; CMV-Promotor/Enhancer
pRK5-Flag-TRAF7(162-383)	TRAF7-Mutante (162-383), bei der der RING-Finger und die WD40 Wiederholungen deletiert wurden, in pRK5; CMV-Promotor/Enhancer

2.3 Oligonukleotide

Die in dieser Doktorarbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (München) synthetisiert. Die DNA-Sequenzen sind in 5'–3' Orientierung angegeben.

Primer für die Klonierung von pHEBO-TNFR1, pHEBO-TNFR1 Δ DD und pHEBO-TNFR1 Δ DD-CTAR2:

AK171: GGG GGA GCT CGT TTA GTG AAC CGT CAG ATC TAA TAC GAC
TCA CTA TAG GGC TTA AGC CAC CAT GGG CCT CTC CAC CGT GCC
TGA C

AK172: GGT GAA GCC TGG AGT GGG ACT GAA GC

Primer für die Klonierung von pRK5-TNFR1, pRK5-TNFR1 Δ DD und pRK5-TNFR1 Δ DD-CTAR2:

JN33: GGG GGG ATC GAT ACC ATG GGC CTC TCC ACC GTG CCT GAC

JN34: CCC CCC GAA TTC CTC GAG CTA TCA CTT AAG CGT CGC GGG GTC
ATC

JN35: CCC CCC GAA TTC CTC GAG TCA TTA GTC ATA GTA GCT TAG CTG
AAC

JN36: GGG GGG AGA TCT CTT CTT GCA CAG TGG ACC

JN37: GGG GGG CTC GAG CTA TCA TCT GAG AAG ACT GGG CGC G

Primer für die Klonierung von TRAF7 sowie Deletionsmutanten:

JN23: ATG AGC TCA GGC AAG AGT GCC CGC

JN24: TTA GCA AGT CCA AAC CTT CAC AGT

JN25: GGG GGG ATC GAT ACC ATG GAC TAC AAA GAC GAT GAC GAC
AAG ATG AGC TCA GGC AAG AGT GCC CGC

JN26: GGG GGG ATC GAT ACC ATG GAA TAT CCT TAT GAC GTT CCT GAC
TAT GCC ATG AGC TCA GGC AAG AGT GCC CGC

JN27: CCC CCC GAA TTC CTT AAG TTA GCA AGT CCA AAC CTT CAC AG

JN31: GGG GGG ATC GAT ACC ATG GAC TAC AAA GAC GAT GAC GAC
AAG CCC GTG GAC AAC GTC AAA CTG ACC

JN32: CCC CCC GAA TTC CTT AAG TTA CTG AGG GTC GTA GGA GCC TAG

Primer für die RT-PCR zum Nachweis von TRAF7 mRNA:

TRAF7-RTfow1: GGG AAC CAG GAC ACT TAC GA

TRAF7-RTrev1: GCC CTC CAG TGT CTT CTG AC

Primer für die RT-PCR zum Nachweis von GAPDH mRNA:

GAPDH 5'Primer: GCA CCA CCA ACT GCT TAG CAC C

GAPDH 3'Primer: GTC TGA GTG TGG CAG GGA CTC

2.4 Bakterien

E.coli DH5 α F-, *lacI*-, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*, Δ (*lacZYA-argF*), U169, F80d*lacZ* Δ M15, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1* (Hanahan, 1983)

2.5 Zelllinien

HEK293 humane embryonale Nierenepithel Zelllinie, transformiert durch Expression der Adenovirus Typ5 Proteine E1a und E1b (Graham et al., 1977)

BJAB humane EBV-negative Burkitt-Lymphom Zelllinie (Clements et al., 1975)

TNFR1/2^{-/-} Maus Fibroblasten Zelllinie mit jeweils homozygoter Deletion von TNFR1 und 2 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Männel, Regensburg), (Schneider-Brachert et al., 2004)

HeLa humane Zervixkarzinom Zelllinie (Scherer et al., 1953)

TRAF6^{-/-} embryonale Maus Fibroblasten Zelllinie aus TRAF6-defizienten Mäusen (Lomaga et al., 1999)

2.6 Chemikalien, Enzyme, Geräte und Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien von Sigma Chemie (München) oder Merck-Eurolab GmbH bezogen.

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

ECL-Westernblotting Reagenzien, Hybond-C-Nitrozellulosemembran für Westernblot, $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (3000 Ci/mmol), GammaBind-Plus Sepharose, Glutathion-Sepharose, Monolaurat (Tween-20), Röntgenfilme Hybond Hyperfilm für ECL und Autoradiographie

AppliChem, Darmstadt

Magermilchpulver (*nonfat dried milk powder*)

Beckman, Palo Alto, USA

Material 44, J25 Zentrifuge mit JA-10 und JA-25.50 Rotor, Coulter Particle Counter Z1 (Partikelzählgerät)

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Plastik-Reagenzgefäße (Falcon) 15 und 50 ml, Zellkulturflaschen, 96-Loch-, 48-Loch-, 24-Loch-, 6-Loch-Platten, Zellschaber, FACSCalibur

Berthold GmbH & Co, Wildbad 1

Microlumat LB96P

Biocat GmbH, Heidelberg

Caspase-Family Inhibitor (z-VAD-fmk), Cycloheximide (100 mM)

BioRad, München

Genepulser II, Elektroporationsküvetten, „*Prestained SDS-Page Standards Low Range*“ und „*Kaleidoskop*“ „*Bio-Spin® Disposable Chromatography Columns*“ (Catalog 732-6008)

Branson, USA

Digitaler Sonifikator (Model 250-D)

Dharmacon Inc., Rockford, USA

DharmaFECT1, TRAF7-spezifische siRNA (siGENOME SMARTpool)

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Bacto-Agar, Hefeextrakt, Trypton

Drol, Reichertshausen

PA-Ultrazentrifugationsröhrchen, dünnwandig, 11x60 mm; 4,4 ml

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Kühlzentrifuge 5415R, 1,5 ml und 2 ml Plastikreaktionsgefäße, BioPhotometer, Heizblock, Thermomixer compact

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Restriktionsenzyme, Taq-Polymerase

Fuji PhotoFilm Co., Ltd. Japan

PhosphoImager Fujix Bioimaging Analyser System (BAS-1000)

Genomed, Bad Oeynhausen

Maxi-Präparations-Kit für Plasmidpräparationen (Jetstar)

Gibco BLR, Life Technologies, Eggenstein

Amphotericin B (Fungizone), Fötale Kälberserum, L-Glutamin, Natrium-Pyruvat, Optimem I, Penicillin, Streptomycin, Trypsin-EDTA (1x), Versene, Zellkulturmedium RPMI 1640 und DMEM

Hoefler Scientific Instruments, San Francisco, USA

Mighty Small II Gel Elektrophorese Einheit

Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK

Lipofectamine™2000, 1 kb DNA Standard, TA-Cloning-Kit, SuperScript™III RNase H-Reverse Transkriptase

Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold

Heraeus Zentrifuge, Multifuge 3 L-R

Nunc GmbH, Wiesbaden

Cryotubes 3 ml, Impfösen, Plastikpetrischalen, Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen

New-England-Biolabs, Schwalbach

Restriktionsenzyme, Vent-DNA-Polymerase, 100 bp DNA Standard

Pierce Perbio Science, Rockford, USA

Dimethylpimelimidat·2HCl (DMP), ECL Western Blotting Substrate

Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg

OptiPrep™

Promega Corporation, Madison, USA

Dual-Luciferase® Reporter Assay System

Qiagen, Hilden

DNA-Gelextraktions Kit, PCR-Reinigungskit, RNAeasy RNA Extraktionskit, QIAshredder, PolyFect®

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Adenosin-5'-triphosphat (ATP), desoxy Nucleotidtriphosphat-Mix (dNTPs) PCR Grade, alkalische Schrimpsphosphatase, alkalische Kälberphosphatase, Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, humanes TNF α , Luziferin, Ribonuclease H

Roth, Karlsruhe

Roti-Block®

Stratagene, Heidelberg

Flag-Antikörper (M2)

Tropix, Massachusetts, USA

Galacton™-Plus, Emerald™-Lösung

Zeiss, Oberkochen

Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop mit hochauflösender Digital-Videokamera (Hamamats)

3 Methoden

3.1 Bakterienkultur

3.1.1 Vermehrung und Aufbewahrung

Bakterien wurden entweder als Suspensionskulturen in LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten kultiviert. Zur Selektion Ampicillin-resistenter Bakterien wurde dem Medium Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Für die Langzeitlagerung von Bakterien wurden dicht gewachsene Kulturen mit 15 % Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

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 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E.coli*

Die Herstellung chemisch kompetenter DH5α erfolgte nach einem Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983). Eine Bakterienkultur (100 ml) mit einer Dichte von etwa 0,6 OD wurde für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (5 min, 4000 g, 4°C) und das Pellet in 5 ml TSS-Medium resuspendiert. Nach dem Aliquotieren der Zellen wurden diese in flüssigem N₂ eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut. Je 100 µl Zellen pro Ansatz wurden mit der DNA gemischt und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 45 sec bei 42°C inkubiert und 1 ml LB-Medium zugegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubation im Schüttler bei 37°C wurden die Zellen auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

TSS-Medium: 85 % LB-Medium, 10 % PEG₄₀₀₀, 5 % DMSO, 50 mM MgCl₂

3.2 Zellkultur

3.2.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden bei 37°C unter einer Atmosphäre von 5 % CO₂ in einem Inkubator kultiviert. Die Kulturmedium RPMI 1640 und DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) wurden mit 10 % Kälberserum, 1 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Streptomycin, 50 IE/ml Penicillin sowie 1 UG/ml Amphotericin B (Fungizone) versetzt.

3.2.1.1 Adhärente Zelllinien

Die adhärent wachsenden Zelllinien HEK293 und Mausfibroblasten (TRAF6^{-/-}, TNFR1/2^{-/-}) wurden in RPMI 1640 kultiviert und alle drei Tage 1:4 bis 1:10 verdünnt. Die Zelllinie HeLa wurde in DMEM kultiviert und alle drei Tage 1:6 verdünnt. Zum Ablösen der Zellen wurde eine Trypsin-EDTA-Lösung verwendet, die auf die Zellen gegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit wurden die Zellen abgelöst und auf eine neue Platte mit frischem Medium überführt.

3.2.1.2 Suspensionszelllinien

Die Suspensionszelllinien BJAB, DG75 und Jurkat wurden in RPMI 1640 kultiviert und alle drei Tage 1:4 bis 1:10 mit frischem Medium verdünnt.

3.2.2 Aufbewahrung von Zellen

Zur Langzeitlagerung von Zellen wurden 1×10^7 Zellen in 1ml Einfriermedium (Medium mit 25 % Kälberserum und 7,5 % DMSO) aufgenommen und in spezielle Cryotubes überführt. Das Einfrieren erfolgte bei -80°C in einem mit 2-Propanol gefüllten Einfrierbehälter, der ein langsames und gleichmäßiges Herunterkühlen der Zellen gewährleistet. Zur längeren Lagerung wurden die Zellen nach dem Einfrieren in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.3 Transfektion von Zelllinien

3.2.3.1 Lipofektion

Alle adhärent wachsenden Zelllinien wurden mit Hilfe von Lipiden transfiziert. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen auf 6-Loch-Platten oder, falls angegeben, auf 10 cm-Platten ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion ca. 70 % konfluent waren. Für die

Transfektion in 6-Loch-Platten wurde die angegebene Menge DNA in 100 μl Medium ohne Zusätze verdünnt und mit 2 μl Polyfect pro μg DNA, das ebenfalls in 100 μl Medium verdünnt wurde, gemischt. Für die Transfektion in 10 cm-Platten wurden 2,5 μl Polyfect pro μg DNA sowie jeweils 200 μl Medium verwendet. Nach einer 15 minütigen Inkubation, in der sich der DNA-Lipid-Transfektionskomplex bildet, wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben und diese über Nacht inkubiert.

3.2.3.2 Transfektion mittels Elektroporation

Die Suspensionszelllinie BJAB wurden mittels Elektroporation transfiziert. Jeweils 3×10^6 bis 1×10^7 Zellen wurden in 250 μl Medium aufgenommen und mit 14-20 μg DNA gemischt. Nach einer zehnminütigen Inkubation wurden die Zellen in eine 4 mm Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 220 Volt und 975 μF . Sofort nach der Transfektion wurden 400 μl Kälberserum zum Transfektionsansatz gegeben und die Zellen in 3-4 ml Medium überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Elektroporation der Mausfibroblastenzelllinie TNFR1/2^{-/-} wurden die Zellen mit Trypsin von der Platte abgelöst und dann wie oben beschrieben weiter verfahren. Pro Transfektionsansatz wurden 1×10^7 Zellen verwendet. Die Elektroporation erfolgte wie angegeben bei 240V oder 250 V und 975 μF . Nach der Elektroporation wurden die Zellen auf 10 cm Zellkulturplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.3.3 Transfektion von siRNA Oligonukleotiden

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen auf 24-Loch oder 6-Loch Platten ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion etwa 70 % konfluent waren. Zellen, die an mehreren Tagen hintereinander transfiziert wurden, wurden so ausgesät, dass sie am Tag der ersten Transfektion etwa 30% konfluent waren. Die Transfektion erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Dharmacon, Inc.). Die entsprechende Menge der siRNA-Oligos (100 nM Endkonzentration) und des Transfektionsreagenz DharmaFECT1 wurde jeweils in Medium ohne Zusätze verdünnt. Pro Transfektionsansatz einer 6-Loch-Platte wurden 100 μl 2 μM siRNA-Oligos und 4 μl DharmaFECT jeweils mit Medium auf 200 μl aufgefüllt, für die Transfektion in 24-Loch-Platten wurden 25 μl 2 μM siRNA-Oligos und 1 μl DharmaFECT verwendet. Hier betrug das Endvolumen jeweils 50 μl . Die Ansätze mit den siRNA-Oligos und mit DharmaFECT wurden erst getrennt für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die beiden Ansätze gemischt und weitere 20 min inkubiert. Die Komplexbildung wurde durch Zugabe von Medium mit 10 % FKS ohne sonstige Zusätze abgestoppt (1,6 ml für 6-Loch-

Platten bzw. 400 µl für 24-Loch-Platten). Die Zellen wurden einmal mit Medium mit 10 % FKS ohne sonstige Zusätze gewaschen. Dann wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben und diese für die angegebene Zeit inkubiert.

3.2.4 Durchflusszytometrie (FACS) zur Bestimmung von Proteinexpression auf der Zelloberfläche

Transient transfizierte Zellen wurden mit Versen von der Platte abgelöst und einmal in FACS-Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen in 50 µl FACS-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 1,5 µl (200 µg/ml) des Primärantikörpers bzw. des Isotyp-Kontrollantikörpers für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen, in 50 µl Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 1 µl Sekundärantikörper (Cy5-gekoppelt) 30 min im Dunklen und auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen und dann im FACSCalibur (Becton Dickinson) durchflusszytometrisch analysiert. Bei den transienten Transfektionen wurde jeweils ein GFP-Expressionsvektor co-transfiziert, um nur die transfizierten Zellen untersuchen zu können. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Analyseprogramm Cellquest Pro™ (BD Biosciences Pharmingen).

FACS-Puffer: PBS, 3 % fötales Kälberserum (FKS)

3.2.5 Zelltod-Analyse

Die Analyse von Zelltod in BJAB-Zellen nach transienter Transfektion wurde wie beschrieben durchgeführt (Schneider und Kieser, 2004). 3×10^6 Zellen wurden mit den angegebenen Expressionsplasmiden sowie pEGFP-C1 cotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen gewaschen und mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Die Analyse der Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie in einem FACSCalibur (Becton Dickinson). Die Auswertung der Daten wurde mit dem Analyseprogramm Cellquest Pro™ (BD Biosciences Pharmingen) durchgeführt.

3.3 DNA-Arbeitstechniken

3.3.1 Plasmid-Schnellaufreinigung

Die Plasmid-Schnellaufreinigung im Mini-Maßstab erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von *Holmes* (Holmes und Quigley, 1981). 1,5 ml einer ÜN-Kultur wurde abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 350 µl M-Sted-Puffer gelöst. Anschließend wurden 25 µl Lysozym (10 mg/ml) zugegeben und die Proben sofort für 1 min auf 100°C erhitzt. Danach wurden die Ansätze für 15 min bei 13200 g abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde anschließend die Plasmid-DNA durch Zugabe von 280 µl Isopropanol und einen Zentrifugationsschritt (20 min, 13200 g, 4°C) gefällt und in 25 µl TE-Puffer mit RNase (25 µg/ml) aufgenommen.

M-Sted-Puffer: 0,5 % (v/v) Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 % (w/v) Sucrose, 25 mM EDTA (pH 8,0)

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)

3.3.2 Präparative Plasmidaufreinigung

Die präparative Plasmidaufreinigung im Maxi-Maßstab erfolgte mit Hilfe spezieller Säulen nach den Angaben des Herstellers (Genomed, Qiagen).

3.3.3 Sonstige DNA-Arbeitstechniken

Die Durchführung gängiger DNA-Arbeitstechniken, wie z.B. Verdau durch Restriktionsenzyme, Auftrennung von DNA-Fragmenten mit Hilfe von Agarosegelen, Aufreinigung von DNA-Fragmenten, Phenolextraktion, Ethanolpräzipitation, Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer, Dephosphorylierung und Phosphorylierung von DNA-Enden mit alkalischer Phosphatase bzw. Polynukleotidkinase, Ligierung freier DNA-Enden, etc. erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (Sambrook und Russell, 2001).

3.4 RNA-Arbeitstechniken

3.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Für die Isolierung von RNA aus Zellen wurde der „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

3.4.2 Reverse Transkription und RT-PCR

Für die reverse Transkription von mRNA in cDNA wurde die SuperScript™ II Reverse Transkriptase von Invitrogen nach den Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden jeweils 5-10 µl Gesamt-RNA verwendet. Um nur mRNA in DNA umzuschreiben, wurden Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer verwendet. Von der auf diese Weise erhaltenen cDNA wurden 2 µl als Matrize in die PCR-Reaktion eingesetzt. Es wurden folgender PCR-Ansatz sowie folgendes PCR-Programm verwendet:

PCR-Ansatz:

5 µl	10x Taq-Puffer
3 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1 µl	dNTPs (25 mM)
1 µl	Primer 1
1 µl	Primer 2
2 µl	cDNA
0,4 µl	Taq-Polymerase
add 50 µl	dd H ₂ O

PCR-Programm:

5 min	95°C	1 Zyklus
45 sec	95°C	
45 sec	58°C	25 Zyklen
1 min	72°C	
10 min	72°C	1 Zyklus

3.5 Klonierungen

3.5.1 Klonierung von pHEBO-hTNFR1, pHEBO-hTNFR1 Δ DD und pHEBO-hTNFR1 Δ DD-CTAR2

Für die Klonierung von pHEBO-TNFR1 wurde der N-terminale Anteil des TNFR1 mittels PCR amplifiziert. Mit diesem Fragment wurde dann der LMP1-Anteil von pCMV-HA-LMP1-TNFR1 ersetzt. Die Amplifizierung des N-Terminus des TNFR1 erfolgte mit Vent-Polymerase (New England Biolabs). Als Matrize diente TR60 pAD. Der 5'-Primer AK171 enthielt eine Bindestelle für den T7-Primer für die Sequenzierung, eine AflIII-Schnittstelle sowie eine Kozak-Sequenz. Außerdem wurde über den Primer eine SacI-Schnittstelle für die Klonierung des PCR-Fragmentes in den Vektor eingefügt. Über den 3'-Primer AK172 wurde ebenfalls eine Schnittstelle (HindIII) für die nachfolgende Klonierung eingefügt. Es wurden folgender PCR-Ansatz sowie folgendes PCR-Programm verwendet:

PCR-Ansatz:

10 μ l	10x Thermopol Puffer
2 μ l	dNTPs (25 mM)
1 μ l	Primer AK171 (100 pmol/ μ l)
1 μ l	Primer AK172 (100 pmol/ μ l)
20 ng	Matrize TR60 pAD
2 μ l	Vent-Polymerase
add 100 μ l	dd H ₂ O

PCR-Programm:

5 min	95°C	1 Zyklus
1 min	95°C	
1 min	58°C	33 Zyklen
1 min	72°C	
10 min	72°C	1 Zyklus

Das so erhaltene PCR-Fragment wurde aufgereinigt und über die *SacI*- sowie die *HindIII*-Schnittstelle in den Vektor pCMV-HA-LMP1-TNFR1 eingesetzt.

Für die Klonierung von pHEBO-TNFR1 Δ DD sowie pHEBO-TNFR1 Δ DD-CTAR2 wurde ein BamHI/HindIII-Fragment aus pCMV-HA-LMP1-TNFR1 Δ DD bzw. pCMV-HA-LMP1-TNFR1 Δ DD-CTAR2 herausgeschnitten und in pHEBO-TNFR1 eingesetzt. Die Vektorkarten sind im Anhang gezeigt.

3.5.2 Klonierung von pHEBO-URA

Aus dem Vektor pHEBO-TNFR1 wurde die codierende Sequenz für den TNF-Rezeptor mit AflII und SfiI herausgeschnitten. Anschließend wurde die Schnittstelle mit der T4 DNA Polymerase aufgefüllt und der Vektor durch eine „*Blunt End*“-Ligation geschlossen.

3.5.3 Klonierung von pRK5-TNFR1, pRK5-TNFR1 Δ DD und pRK5-TNFR1-CTAR2

Für die Klonierung von pRK5-TNFR1 Δ DD sowie pRK5-TNFR1-CTAR2 wurde jeweils der offene Leserahmen mittels PCR amplifiziert. Als Matrize wurden pHEBO-TNFR1 Δ DD bzw. pHEBO-TNFR1-CTAR2 und als Primer JN33/JN34 (für pRK5-TNFR1 Δ DD) bzw. JN33/JN35 (pRK5-TNFR1-CTAR2) verwendet. Es wurden folgender PCR-Ansatz sowie folgendes PCR-Programm verwendet:

PCR-Ansatz:

10 μ l	10x Thermopol Puffer
2 μ l	dNTPs (25 mM)
1 μ l	Primer JN33 (100 pmol/ μ l)
1 μ l	Primer JN34 bzw. JN35 (100 pmol/ μ l)
50 ng	Matrize
2 μ l	Vent-Polymerase
add 100 μ l	dd H ₂ O

PCR-Programm:

5 min	95°C	1 Zyklus
1 min	95°C	
1 min	57°C	30 Zyklen
3 min	72°C	
10 min	72°C	1 Zyklus

Anschließend wurden die PCR-Fragmente aufgereinigt und via ClaI/EcoRI in den Vektor pRK5-Flag-TRAF1 kloniert. Für die Klonierung von pRK5-TNFR1 wurde die Todesdomäne (DD) mittels PCR amplifiziert. Als Matrize wurde pHEBO-TNFR1 und als Primer JN36 sowie JN37 verwendet. PCR-Ansatz und PCR-Programm waren so wie oben angegeben. Das PCR-Fragment wurde aufgereinigt und über die XhoI- bzw. BglIII-Schnittstelle in pRK5-TNFR1 Δ DD eingesetzt. Die Vektorkarten sind im Anhang gezeigt.

3.5.4 Klonierung von TRAF7 aus einer cDNA; Klonierung verschiedener Deletionsmutanten

Der ORF von TRAF7 wurde aus einer cDNA aus HEK293 Zellen amplifiziert und in den Vektor pCR2.1 subkloniert. Für die Amplifikation von TRAF7 aus HEK293 cDNA wurden die Primer JN23 und JN24 sowie der folgende PCR-Ansatz und das folgende PCR-Programm verwendet. Die Isolierung von mRNA sowie das Umschreiben in cDNA erfolgte wie in 3.4.1 und 3.4.2 beschrieben.

PCR-Ansatz:

10 μ l	10x Thermopol Puffer
2 μ l	dNTPs (25 mM)
1 μ l	Primer JN23 (100 pmol/ μ l)
1 μ l	Primer JN24 (100 pmol/ μ l)
2 μ l	cDNA
0,6 μ l	Vent-Polymerase
1,4 μ l	Taq-Polymerase
add 100 μ l	dd H ₂ O

PCR-Programm:

5 min	95°C	1 Zyklus
45 sec	95°C	
1 min	55°C	30 Zyklen
3 min	72°C	
10 min	72°C	1 Zyklus

Anschließend wurde TRAF7 mittels PCR amplifiziert und über ClaI/EcoRI in den Expressionsvektor pRK5 eingesetzt. Die 5'-Primer enthielten eine ClaI-Schnittstelle sowie ein Flag-Epitop (JN25) oder ein HA-Epitop (JN26) um TRAF7 später im Immunblot nachweisen zu können. Der 3'-Primer JN27 enthielt eine EcoRI-Schnittstelle.

PCR-Ansatz:

10 µl	10x Thermopol Puffer
2 µl	dNTPs (25 mM)
1 µl	Primer JN25 bzw. JN26 (100 pmol/µl)
1 µl	Primer JN27 (100 pmol/µl)
20 ng	Matrize PCR2.1-TRAF7
1 µl	Vent-Polymerase
add 100 µl	dd H ₂ O

PCR-Programm:

5 min	95°C	1 Zyklus
1 min	95°C	
1 min	57°C	30 Zyklen
3 min	72°C	
10 min	72°C	1 Zyklus

Die Deletionsmutanten TRAF7 (162-670), TRAF7 (1-383) sowie TRAF7 (162-383) wurden auf dieselbe Weise mit folgenden Primern kloniert und enthalten alle ein N-terminales Flag-Epitop:

TRAF7 (162-670): JN31 / JN27

TRAF7 (1-383): JN25 / JN32

TRAF7 (162-383): JN31 / JN32

Die Vektorkarten sind im Anhang gezeigt.

3.6 Protein-Arbeitstechniken

3.6.1 Immunblot-Analyse

Je nach Versuch wurden 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen in einem entsprechenden Lysepuffer auf Eis lysiert. Durch Zentrifugation (10 min, 13000 g, 4°C) wurden die unlöslichen Zellbestandteile abgetrennt. Je nach Versuch wurden nur der Überstand oder auch das Pellet mit Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurden Gele mit einem 12,5 %igem Trenngel verwendet. Anschließend wurden die Proteine mittels Elektrottransfers auf eine Hybond-ECL-Nitrozellulosemembran transferiert. Um eine spätere unspezifische Bindung des Antikörpers an die Membran zu verhindern, wurde die Membran für 1 h in TBS mit 5 % Magermilchpulver inkubiert. Bei einer Verwendung von phosphospezifischen Antikörpern erfolgte diese Inkubation in Roti-Block®. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem entsprechenden Primärantikörper in TBS mit 5 % Magermilchpulver (w/v) und 0,02 % Natriumazid (w/v) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS mit 1 % Tween-20 (v/v) wurde sie für 1 h bei Raumtemperatur mit einem mit Merettichperoxidase gekoppeltem Sekundärantikörper in TBS mit 5 % Magermilchpulver (w/v) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Membran unter Verwendung von ECL-Reagenz entwickelt.

TBS: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl,
1 mM EDTA (pH 8,0)

<u>Laemmli-Puffer (4x):</u>	100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4 % SDS (w/v), 20 % Glycerin, 0,2 % Bromphenolblau (w/v), 0,1 M DTT (frisch zugeben oder Puffer nach der Zugabe bei -20°C lagern)
<u>Sammelgel-Mix (400 ml):</u>	307 ml H ₂ O, 60 ml 30 % Polyacrylamid, 25 ml 2 M Tris-HCl (pH 6,8), 4 ml 10 % (w/v) SDS, 4 ml 0,5 M EDTA
<u>12,5 % SDS-Trenngel (100 ml):</u>	41 ml H ₂ O, 41,6 ml 30 % Polyacrylamid, 16,6 ml 2 M Tris-HCl (pH8,9), 666 µl 0,5 M EDTA, 530 µl APS, 50 µl TEMED
<u>Einlegelösung für SDS-Gele:</u>	83,3 ml 2 M Tris-HCl (pH 8,9), 3,3 ml 0,5 M EDTA, 413,4 ml H ₂ O
<u>SDS-Laufpuffer (1x):</u>	30 g Tris, 144 g Glyzin, 100 ml SDS (10 %); ad 1 l H ₂ O
<u>Transferpuffer (10x):</u>	30 g Tris-OH, 95 g Glyzin; ad 1 l H ₂ O
<u>Waschpuffer:</u>	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 % Tween-20
<u>Blocklösung:</u>	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 5 % (w/v) Magermilchpulver

3.6.2 Immunkomplex-Kinaseversuch

Die Durchführung erfolgte nach einem Protokoll von Kieser und wird im Folgenden kurz beschrieben (Kieser, 2001).

Antikörper gegen das HA-Epitop (3F10) wurde an Protein G-Sepharose gebunden. Dazu wurden 300 µl Protein G-Sepharose Kügelchen (GammaBind®, Amersham Pharmacia) dreimal mit TBS gewaschen, mit 1 mg gelöstem 3F10 Antikörper versetzt und mit PBS mit 4 % (w/v) Saccharose und 0,02 % (w/v) auf 1,5 ml aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz

über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurden die Kügelchen dreimal mit TBS/T-Lysepuffer gewaschen und dann in 500 µl PBS mit 4% (w/v) Saccharose und 0,02% (w/v) aufgenommen. Eine Lagerung der Kügelchen bei 4°C ist für mehrere Monate möglich. Für Kinaseversuche in TNFR1/2^{-/-} Zellen erfolgte die Immunpräzipitation mit Protein G-Sepharose Kügelchen mit kovalent gebundenem 3F10 Antikörper. Dazu wurde der Antikörper wie oben beschrieben über Nacht mit den Kügelchen inkubiert. Das daran anschließende Protokoll für die kovalente Kopplung wird in Abschnitt 3.6.4 beschrieben.

Zellen wurden mit den zu untersuchenden Expressionsvektoren sowie mit pRK5-HA-JNK1 transfiziert. Nach 20-24 h Inkubation wurden die Zellen in 450 µl TBS/T-Lysepuffer aufgenommen und auf Eis lysiert. Durch einen Zentrifugationsschritt (10 min, 16000 upm, 4°C) wurden alle unlöslichen Zellfragmente abgetrennt. Um die Expression der transfizierten Konstrukte im Immunblot nachweisen zu können, wurde ein Aliquot der klaren Zelllysate abgenommen, mit Laemmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Der Rest des klaren Zelllysats wurde über Nacht mit 20 µl 3F10-gekoppelten Protein G-Sepharose bei 4°C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Protein G-Sepharose zweimal mit Lysepuffer und zweimal mit Kinasereaktionspuffer gewaschen und das Volumen mit Kinasereaktionspuffer auf 30 µl eingestellt.

Um die Aktivität der Kinase zu bestimmen, wurde anschließend eine *in vitro* Immunkomplex-Kinasereaktion durchgeführt. Hierzu wurde die Kinasereaktion durch Zugabe von 10 ml Reaktionsmix gestartet. Dieser Mix enthielt pro Ansatz 2 µg Substrat (GST-c-Jun) sowie 10 µCi γ -³²P-ATP (3000 Ci/mmol). Die Kinasereaktion wurde für 30 min bei 28°C durchgeführt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 15 µl 4x-Laemmli-Puffer und anschließendes Erhitzen für 5 min auf 95°C. Das radioaktiv phosphorylierte Substrat wurde dann über ein SDS-Gel aufgetrennt, auf einen Membran transferiert und mittels Autoradiographie nachgewiesen. Eine Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines Fuji Bass 1000 Phosphoimagers.

TBS/T-Lysepuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8,0),
Protease- und Phosphataseinhibitoren (immer frisch dazugegeben):
1 mM PMSF; 0,5 mM β -Glyzerophosphat, 0,5 mM Natriumorthovanadat, 0,5 mM Natriumfluorid, 0,5 mM Natriummolybdat

Kinasereaktionspuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM $MgCl_2$, 20 mM NaCl, 1 μ M DTT, 2 μ M ATP

3.6.3 Luziferase-Reporterversuche

Dieser Versuch wurde dazu verwendet, eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zu analysieren. Hierzu wurden zwei verschiedene Systeme eingesetzt. Zellen wurden mit den zu untersuchenden Expressionsvektoren sowie einem Reporterplasmid transfiziert. Als Reporterplasmid diente entweder das Plasmid 3 κ B-Luc oder das Reporterplasmid κ B-CONA-Luc. Das Plasmid 3 κ B-Luc trägt das Luziferasegen unter der Kontrolle eines minimalen c-fos-Promotors, der drei Bindestellen für den Transkriptionsfaktor NF- κ B enthält. Das Plasmid κ B-CONA-Luc trägt das Luziferasegen unter der Kontrolle eines minimalen Conalbumin Promotors und ebenfalls drei NF- κ B Bindestellen. Als interner Standard diente entweder das Plasmid PGK- β Gal oder das Plasmid pCMV-RL. Das Plasmid PGK- β Gal trägt das β -Galaktosidasegen unter der Kontrolle eines Phosphoglyzeratkinase-Promotors. pCMV-RL codiert für das *Renilla* Luziferasegen unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promotors.

20-24h nach der Transfektion wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 150 μ l Extraktionspuffer aufgenommen. Das Aufschließen der Zellen erfolgte durch Einfrieren der Zellen bei $-80^{\circ}C$ für 30 min. Anschließend wurden durch einen Zentrifugationsschritt (10 min, 16000 upm, $4^{\circ}C$) die unlöslichen Zellbestandteile abgetrennt. Die Messung der Luziferase- sowie der Galaktosidase-Aktivität erfolgte mit Hilfe eines Injektor-Luminometers. Zur Bestimmung der Luziferaseaktivität wurden 10 μ l Lysat mit 150 μ l Luziferase-Testpuffer gemischt. Die Zugabe von 50 μ l Luziferin erfolgte automatisch

durch das Luminometer. 10 sec nach der Zugabe wurde die Lichtemission gemessen. Für die Messung der Galaktosidaseaktivität wurden 5 µl Lysat mit 75 µl Galacton-Plus™-Lösung gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe von 50 µl Emerald-Lösung erfolgte automatisch durch den Injektor des Luminometers. Die Auswertung der Messung erfolgte durch das Programm EG&G Berthold Winglow.

Extraktionspuffer: 100 mM K₂HPO₄ (pH 7,8), 100 mM KH₂PO₄, 1 mM DTT,
1 % Triton X-100

Luziferase-Testpuffer: 25 mM Glyzylglyzin (pH 7,8), 15 mM MgSO₄, 5 mM ATP

Luziferin: Stocklösung: 50 mg d-Luziferin (Roche) gelöst in 17,85 ml
0,5 M Tris-HCl (pH 7,5);
Endkonzentration: Stocklösung 1:10 mit H₂O verdünnt

Galacton-Plus™-Lösung: 50 µl 0,01 M MgCl₂, 500 µl 1 M Na₃PO₄ (pH 8,0), 50 µl
Galacton-Plus™ (Tropix) auf 4,4 ml H₂O

Emerald™-Puffer: 1 ml 1 M NaOH, 500 µl Emerald™-Lösung (Tropix) auf 3,5 ml
H₂O

In den Versuchen, in denen das Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) verwendet wurde, wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

3.6.4 Co-Immunpräzipitation

Pro Ansatz wurden fünf 10 cm-Schalen HEK293 Zellen mit Hilfe von Lipofektion transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen direkt auf der Platte in je 750 µl Puffer lysiert und die fünf Ansätze vereint. Durch Zentrifugation (10 min, 13000 g, 4°C) wurden die unlöslichen Zellbestandteile abgetrennt und klare Lysate hergestellt, die anschließend noch über ein Säulchen (*Bio-Spin® Disposable Chromatography Column*, Biorad) gefiltert wurden. Die Immunpräzipitation erfolgte mit 37,5 µl Protein A-Sepharose Kügelchen, an die kovalent der Antikörper 12CA5 gegen das HA-Epitop gekoppelt war.

Die kovalente Kopplung des Antikörpers erfolgt an Protein A-Sepharose Kügelchen mit Hilfe von Dimethylpimelimidat (DMP). 2 mg des Antikörpers (12CA5) wurden mit 1 ml zuvor in

PBS äquilibrierter Kügelchen gemischt und unter Drehen für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten zwei Waschstufen mit je 10 ml 0,2 M Natriumborat. Danach wurden die Kügelchen in 10 ml 0,2 M Natriumborat aufgenommen und es erfolgte die Zugabe von 20 mM DMP (als Pulver). Nach einem 30 minütigen Inkubationsschritt bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch zweimaliges Waschen mit 0,2 M Ethanolamin und anschließendes zweistündiges Inkubieren mit 0,2 M Ethanolamin bei Raumtemperatur abgestoppt. Nach weiterem zweimaligen Waschen und Aufnehmen in 1 ml PBS mit 0,02 % (w/v) Natriumazid konnten die Kügelchen für längere Zeit bei 4°C gelagert werden.

Für die Immunpräzipitation wurden die Proben über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Kügelchen mit Lysepuffer wurden die Proben mit Laemmli-Puffer versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend die Proteine mit Hilfe von Immunblot analysiert.

Lysepuffer: 50 mM HEPES pH 7,5; 0,1 % NP40; 250 mM NaCl; 5 mM EDTA; Complete Mini Proteaseinhibitorcocktail EDTA frei (nach den Angaben des Herstellers)

3.6.5 Isolierung *Lipid Raft* assoziierter Proteine

HEK293 Zellen wurden in 10 cm Schalen transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden pro Ansatz 4×10^6 Zellen in 380 µl TNXE-Lysepuffer lysiert. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde das Lysat mit 520 µl OptiprepTM (Progen) gemischt und diese Mischung auf den Boden eines PA-Ultrazentrifugationsröhrchens (11x60 mm) gegeben. Anschließend wurde das Lysat erst mit 2,5 ml 30 % OptiprepTM in TXNE-Lysepuffer und dann mit 0,6 ml TXNE-Lysepuffer überschichtet. Danach erfolgte ein Ultrazentrifugationsschritt (160 000 g, 4 h, 4°C) in einem SW 60 Ti Beckman Rotor. Zur Analyse wurden von oben nach unten 8 Fraktionen mit je 500 µl entnommen. Die *Lipid Rafts* waren als weiße Flocken in der zweiten Fraktion sichtbar. Zum Nachweis der *Lipid Rafts* wurde je 1 µl auf Hybond ECL-Nitrozellulosemembran getropft und diese über Nacht mit HRP-gekoppelter Choleratoxin Untereinheit B (Sigma) inkubiert. Dies dient zum Nachweis des Raft-Markers GM1. Der Rest der Fraktionen wurde jeweils mit 167 µl 4xLaemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels Immunblot.

TXNE-Lysepuffer:

25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA,
0,5 % Triton-X100,

Complete Mini Proteaseinhibitorcocktail EDTA frei (nach den
Angaben des Herstellers)

4 Ergebnisse

4.1 „Domain Swapping“ der TRADD-Bindestellen von LMP1 und TNFR1

TRADD ist ein zentrales Adaptermolekül in der Signaltransduktion des TNFR1 und von LMP1. Wie in der Einleitung beschrieben, haben LMP1 und der TNFR1 noch weitere Gemeinsamkeiten. Bei beiden Molekülen spielen Proteine wie Mitglieder der TRAF-Familie und RIP1 eine Rolle in der Signaltransduktion. Zudem aktivieren beide Moleküle den NF- κ B Signalweg, den JNK1/AP-1 Signalweg sowie den p38 MAPK Signalweg. Betrachtet man allerdings die biologischen Effekte der Signaltransduktion, zeigen sich gravierende Unterschiede. Während das virale LMP1 transformierende und sogar antiapoptotische Eigenschaften besitzt, induziert der TNFR1 nach Stimulierung in bestimmten Situationen neben dem NF- κ B Signalweg auch Apoptose und Nekrose.

Die unterschiedliche Art der Bindung von TRADD an LMP1 bzw. an den TNFR1 diene als erster Anhaltspunkt für eine Analyse der Gründe für den unterschiedlichen Phänotyp der Signaltransduktion im Rahmen dieser Doktorarbeit. Um aufzuklären, ob die TRADD-Bindestelle selbst oder der Rezeptorkontext für den Phänotyp der Signaltransduktion verantwortlich ist, wurden in Zusammenarbeit mit Nicola Liefold (Liefold, 2003) die beiden TRADD-Bindestellen von LMP1 und dem TNFR1 in einem „Domain-Swapping“-Experiment ausgetauscht. Im Fall des TNFR1 konnte bereits die Todesdomäne als TRADD-Bindestelle identifiziert werden, im Fall von LMP1 war die genaue Domäne, die für eine TRADD-Bindung ausreichend ist, nicht bekannt (Hsu et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass TRADD an den C-Terminus von LMP1 bindet (Kieser et al., 1999). Tyr384 ist für die Bindung von TRADD an LMP1 essentiell. Außerdem ist Tyr384 auch notwendig für die Aktivierung des JNK1 Signalwegs sowie des klassischen IKK/NF- κ B Signalwegs (Izumi und Kieff, 1997; Kieser et al., 1999; Saito et al., 2003). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Aminosäuren 378-386 für die Aktivierung des JNK1 Signalwegs notwendig sind (Eliopoulos et al., 1999a; Kieser et al., 1999). Außerdem ist bekannt, dass die Aminosäuren 379-384 für die TRADD-abhängige Aktivierung des NF- κ B Signalwegs notwendig sind (Floettmann und Rowe, 1997). Für das „Domain Swapping“-Experiment wurde dieser Bereich auf die Aminosäuren 370-386, d.h. die C-terminalen 17 Aminosäuren, ausgeweitet.

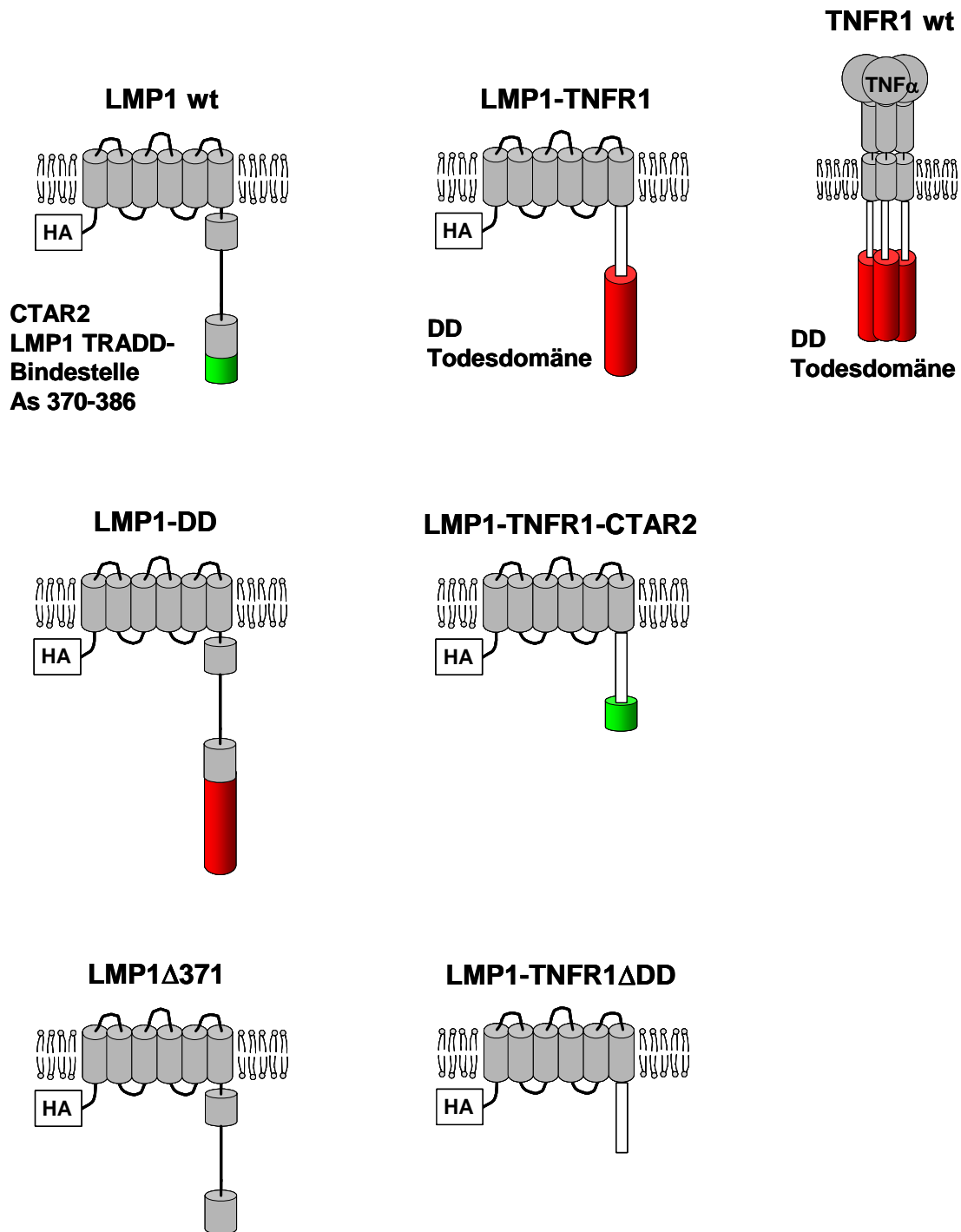


Abb. 4.1: „Domain Swapping“ im LMP1-TNFR1 Kontext

CTAR2 beinhaltet die TRADD-Bindedomäne von LMP1; es wurden die Aminosäuren 370-386 als putative TRADD-Bindedomäne ausgewählt. Die Todesdomäne von HA-LMP1-TNFR1 umfasst die TRADD-Bindedomäne. Die Todesdomäne und die Aminosäuren 370-386 von CTAR2, und damit die beiden TRADD-Bindedomänen, wurden ausgetauscht. Die so entstandenen Konstrukte werden als HA-LMP1-DD sowie HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 bezeichnet. Als Negativkontrollen wurden die beiden Konstrukte HA-LMP1 Δ 371 und HA-LMP1-TNFR1 Δ DD kloniert. Alle Konstrukte tragen ein Hämagglutinin-Epitop, das an den N-Terminus fusioniert wurde.

Die potentielle TRADD-Bindestelle von LMP1 wurde auf LMP1-TNFR1 transferiert, indem die Todesdomäne ersetzt wurde. Bei LMP1-TNFR1 handelt es sich um eine Chimäre aus der Transmembrandomäne von LMP1 und der Signaldomäne des TNFR1, die konstitutiv aktiv und TNF α -unabhängig TNF-Rezeptor 1 Signaltransduktion induziert. Die Aktivierung der Signaltransduktion erfolgt über die Autoaggregation der LMP1-Transmembrandomänen. Durch den zytosolischen Teil des TNFR1 wird die Art der Signaltransduktion festgelegt (Dudziak et al., 2003; Schneider und Kieser, 2004). Im Gegenzug wurde die Todesdomäne des TNFR1 auf LMP1 übertragen und ersetzt dort die C-terminalen 16 Aminosäuren. In Abbildung 4.1 sind die so entstandenen Fusionsproteine schematisch dargestellt. Als Negativkontrollen wurden die beiden Konstrukte LMP1-TNFR1 Δ DD und LMP1 Δ 371 kloniert. Beiden Proteinen fehlt die TRADD-Bindestelle, daher können sie keine TRADD-abhängige Signaltransduktion mehr induzieren. Die Fusionskonstrukte wurden von Nicola Liefold (Liefold, 2003) kloniert.

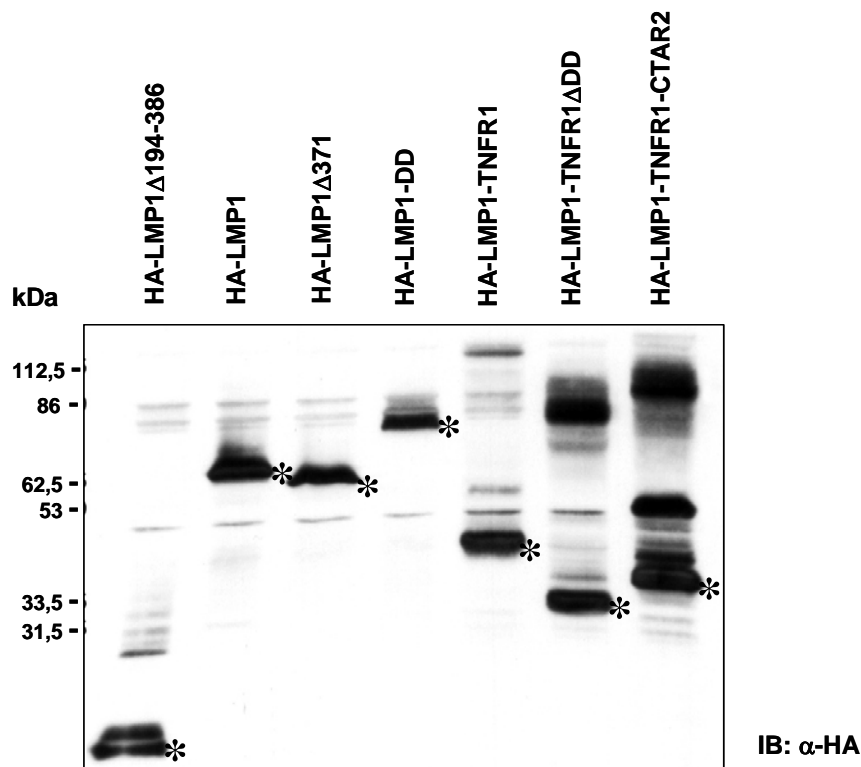


Abb. 4.2: Expression der klonierten Konstrukte in HEK293 Zellen

HEK293 Zellen wurden in 6-Loch Platten mit jeweils 2,5 μ g der angegebenen Expressionsplasmide (basierend auf pCMV-HA) sowie mit 0,5 μ g des p35 Expressionsplasmids pcDNA3.1-p35 transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen in Lämmli-Puffer aufgenommen und die Ganzzelllysate mittels Immunblot analysiert. Der Nachweis der Konstrukte erfolgte mit dem Antikörper 12CA5 (Roche), der das HA-Epitop am N-Terminus der Konstrukte erkennt. Die entsprechenden Banden sind mit Sternchen markiert.

Alle LMP1- und LMP1-TNFR1-Fusionsproteine tragen zur Nachweisbarkeit der Expression im Immunblot ein N-terminales Hämagglutinin (HA)-Epitop. Wie in Abb. 4.2 zu sehen, wurden alle Konstrukte nach transienter Expression in HEK293 Zellen in vergleichbaren Mengen exprimiert. Bei LMP1-TNFR1, LMP1-TNFR1 Δ DD sowie LMP1-TNFR1-CTAR2 konnte das Auftreten von hochmolekularen Banden neben den Banden auf der erwarteten Höhe beobachtet werden. Woher diese Banden kommen, konnte nicht aufgeklärt werden.

Obwohl das Konstrukt HA-LMP1-DD exprimiert wurde, war es nicht in der Lage, den JNK1/AP-1 Signalweg zu induzieren (Liefold, 2003). Bei der Analyse des NF- κ B Signalweges zeigte sich eine Aktivierung in derselben Größenordnung wie bei HA-LMP1 Δ 371. Da der NF- κ B Signalweg mit Hilfe von Reportergeräten analysiert wurde, konnte hier nicht zwischen kanonischem und nicht-kanonischem NF- κ B Signalweg unterschieden werden. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, kann LMP1 sowohl über CTAR1 den nicht-kanonischen NF- κ B Signalweg als auch über CTAR2 den kanonischen NF- κ B Signalweg aktivieren. Die Tatsache, dass das Konstrukt HA-LMP1 Δ 371 den NF- κ B Signalweg genau so stark aktivieren konnte, wie das Konstrukt HA-LMP1-DD, sprach für eine Aktivierung, die nicht durch die Todesdomäne, sondern durch CTAR1 vermittelt wurde. Diese Annahme konnte durch die Verwendung eines HA-LMP1-DD Konstruktes, bei dem zusätzlich das PQT-Motiv in CTAR1 mutiert wurde, bestätigt werden. Die Mutation des PQT-Motivs führt dazu, dass CTAR1 keine TRAFs mehr binden kann und deshalb auch keine Signaltransduktion mehr aktivieren kann. Das entsprechende Konstrukt mit einer mutierten CTAR1 Domäne (HA-LMP1_{PQT \rightarrow AAA}-DD) induzierte keine Aktivität des NF- κ B Signalweges (Liefold, 2003; Daten nicht gezeigt). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Todesdomäne im LMP1 Kontext keine Apoptose induzieren konnte (Liefold, 2003; Daten nicht gezeigt). Es musste also davon ausgegangen werden, dass die Todesdomäne des TNFR1 im LMP1-Kontext nicht funktionell ist. Aus diesem Grund wurden mit LMP1-DD keine weiteren Experimente durchgeführt. Im Folgenden wurde daher die LMP1-TRADD-Bindedomäne im TNFR1 Kontext, d.h. das Konstrukt LMP1-TNFR1-CTAR2, näher untersucht und charakterisiert.

4.2 Die Aminosäuren 370-386 von LMP1 umfassen die vollständige TRADD Bindedomäne

4.2.1 Co-Immunpräzipitation

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Bindung von TRADD an LMP1 von der an den TNFR1 grundlegend unterscheidet. Im Fall des TNFR1 kommt es zu einer Todesdomänen-Todesdomänen-Interaktion mit TRADD, wie sie von vielen Mitgliedern der Todesdomänenfamilie bekannt ist (Cleveland und Ihle, 1995; Reed, 2000). Mit Hilfe von GST-Pulldown-Experimenten konnte die Bindung von TRADD an LMP1 aufgeklärt werden. TRADD bindet an CTAR2 von LMP1 über seinen N-Terminus (Kieser et al., 1999). Tyr384 von LMP1 ist für diese Bindung essentiell. *In vivo* wurde die Bindung von TRADD an LMP1 noch nicht genauer untersucht.

Bei den für das „*Domain-Swapping*“-Experiment ausgewählten Aminosäuren 370-386 von LMP1 handelt es sich um die putative TRADD-Bindedomäne. Ob diese Aminosäuren tatsächlich ausreichend sind, um TRADD zu binden, musste zunächst experimentell nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationen sollte daher gezeigt werden, ob die Aminosäuren 370-386 von CTAR2 in der Lage sind, TRADD zu binden. Hierzu wurden HEK293 Zellen mit Expressionsvektoren für HA-LMP1 oder HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 sowie myc-TRADD Wildtyp transfiziert. Über ihr HA-Epitop wurden dann HA-LMP1 und HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 immunpräzipitiert. Als Negativkontrolle wurde HA-LMP1-TNFR1 Δ DD verwendet. Dieses Konstrukt kann ebenfalls über sein HA-Epitop präzipitiert werden. Mittels eines TRADD spezifischen Antikörpers wurde die Co-Präzipitation von TRADD untersucht.

In Abb. 4.3 ist zu sehen, dass die Konstrukte HA-LMP1, HA-LMP1-TNFR1 Δ DD und HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 in vergleichbaren Mengen über ihr N-terminales HA-Epitop präzipitiert wurden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass TRADD sowohl zusammen mit HA-LMP1 als auch zusammen mit HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 copräzipitiert wurde. Wie erwartet konnte also eine Bindung von TRADD an HA-LMP1 nachgewiesen werden. Durch die Bindung von TRADD an HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 konnten die Aminosäuren 370-386 von CTAR2 als ausreichende TRADD-Bindestelle von LMP1 identifiziert werden. CTAR2 rekrutierte sowohl im LMP1 als auch im TNFR1 Kontext eine vergleichbare Menge an TRADD. Die 17 C-terminalen Aminosäuren von CTAR2 umfassen also die komplette,

funktionelle TRADD-Bindestelle von LMP1. Im Kontrollansatz mit HA-LMP1-TNFR1 Δ DD zeigt sich nur eine sehr schwache Co-präzipitation von TRADD, die im Bereich des unspezifischen Hintergrundsignals des Leervektors liegt.

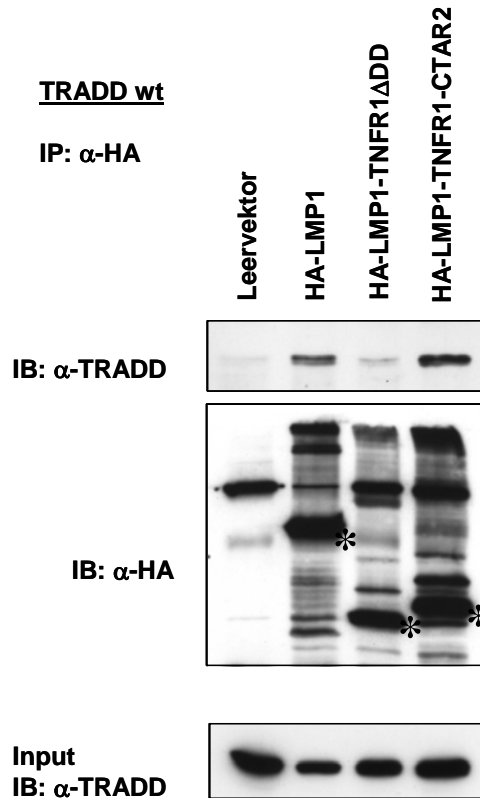


Abb. 4.3: Aa 370-386 von LMP1 umfassen die vollständige TRADD-Bindedomäne

Pro Ansatz wurden fünf 10 cm-Schalen HEK293-Zellen mit folgenden DNA-Mengen transfiziert: 3,5 μ g Leervektor, pCMV-HA-LMP1, pCMV-HA-LMP1-TNFR1 bzw. pCMV-HA-LMP1-TNFR1-CTAR2; zusätzlich 0,5 μ g pRK5-myc-TRADD sowie 1,5 μ g pCDNA3.1-p35. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen, wie in Abschnitt 3.6.4 beschrieben, lysiert. Die Immunpräzipitation wurde mit 37,5 μ l Protein A Sepharose Kügelchen, an die kovalent der Antikörper 12CA5 gekoppelt wurde (Abschnitt 3.6.4), durchgeführt. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Immunblot mit dem HA-spezifischen Antikörper 12CA5 (Roche) bzw. einem TRADD-spezifischen Antikörper (BD Transduction Laboratories). Die HA-Konstrukte sind mit Sternchen markiert.

Wie bereits beschrieben, bindet TRADD mit unterschiedlichen Domänen an LMP1 bzw. an den TNF-Rezeptor 1. Bei der Mutante TRADD_{296-299A} wurden die Aminosäuren 296-299, die in der Todesdomäne liegen, gegen Alanine ausgetauscht. Durch diese Mutation in der Todesdomäne kann keine Todesdomänen-Todesdomänen-Interaktion mehr stattfinden. Es

konnte gezeigt werden, dass TRADD_{296-299A} nur stark eingeschränkt an den TNFR1 bindet (Park und Baichwal, 1996). Da die Bindung von TRADD an LMP1 nicht über die Todesdomäne vermittelt wird, sollte diese Mutation keinen Einfluss auf diese Bindung haben. In Pull-down-Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die Bindung an GST-LMP1 durch diese Mutation nicht beeinträchtigt wird (Kieser et al., 1999). Nun soll die Bindung von TRADD_{296-299A} an LMP1 in einem Zellsystem untersucht werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob auch HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 diese TRADD-Mutanten binden kann. Dies wurde wiederum mittels transients Transfektion und anschließender Immunpräzipitation analysiert. Die Durchführung des Experiments erfolgte analog zu dem Experiment mit Wildtyp-TRADD.

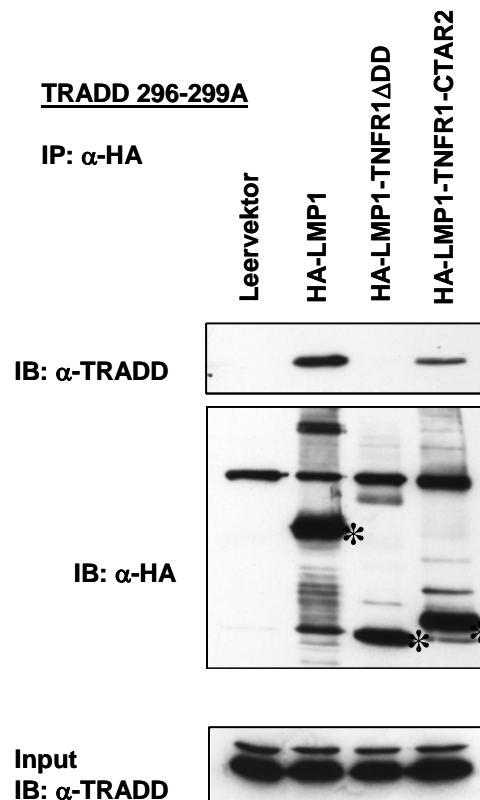


Abb. 4.4: TRADD_{296-299A} bindet an Aa370-386 von LMP1

Der Versuch wurde wie in Abb. 4.3 beschrieben, mit folgenden Änderungen durchgeführt. Anstelle von pRK5-myc-TRADD wurden die Zellen mit pRK5-myc-TRADD_{296-299A} cotransfiziert. Zum Nachweis von TRADD wurde folgender Antikörper verwendet: Antikörper H-278 von Santa Cruz Biotechnology, Inc. Die HA-Konstrukte sind mit Sternchen markiert.

Bei der Analyse der TRADD-Expression im Überstand fiel eine unspezifische Bande auf, die in Abb. 4.3 nicht zu sehen war. Dies lag an der Verwendung unterschiedlicher Antikörper für den Nachweis von TRADD in den beiden Experimenten. Wie in Abb. 4.4 zu sehen ist, wurde TRADD_{296-299A} zusammen mit LMP1 über das HA-Epitop co-präzipitiert. Dies bestätigt die Daten aus den Pull-down Experimenten *in vivo*. Es konnte auch eine Co-Präzipitation mit LMP1-TNFR1-CTAR2 nachgewiesen werden. Durch die Negativkontrolle LMP1-TNFR1 Δ DD wird die TRADD-Mutante nicht co-präzipitiert. Es konnte also gezeigt werden, dass TRADD_{296-299A} *in vivo* an LMP1 und an LMP1-TNFR1-CTAR2 bindet. Hiermit konnte bestätigt werden, dass die Aminosäuren 370-386 von CTAR2 die vollständige TRADD-Bindedomäne von LMP1 umfassen und dass diese Domäne auch im LMP1-TNFR1-Kontext TRADD bindet. Weiter konnte hiermit gezeigt werden, dass der Typ der Bindung von TRADD an LMP1-TNFR1-CTAR2 dem von TRADD an LMP1 und nicht dem von TRADD an den TNFR1 entspricht. Bei der Interaktion zwischen TRADD und den Aminosäuren 370-386 von LMP1 handelt es sich also um einen Bindungstyp, der sich grundlegend von der Bindung von TRADD an Todesdomänenproteine unterscheidet. Sowohl die Bindestelle selber als auch die Art der TRADD-Bindung sind unterschiedlich.

4.2.2 Rekrutierung von TRADD in *Lipid Rafts*

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist ein Teil des zellulären LMP1 Proteins konstitutiv in *Lipid Rafts* lokalisiert (Higuchi et al., 2001; Kaykas et al., 2001; Rothenberger et al., 2002). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass LMP1 in der Lage ist, verschiedene Adaptermoleküle in die *Lipid Rafts* zu rekrutieren (Ardila-Osorio et al., 2005; Lam und Sugden, 2003; Rothenberger et al., 2002). In Bezug auf TRADD konnte bis jetzt allerdings in der Literatur keine Rekrutierung durch LMP1 in die *Lipid Rafts* nachgewiesen werden (Higuchi et al., 2001; Rothenberger et al., 2002; Xie und Bishop, 2004). Bei der Aktivierung der Signaltransduktion durch LMP1 spielen *Lipid Rafts* wahrscheinlich ebenfalls eine wichtige Rolle (Kaykas et al., 2001; Rothenberger et al., 2002). Für den TNFR1 konnte gezeigt werden, dass dieser nach Stimulierung durch TNF α in *Lipid Rafts* lokalisiert (Doan et al., 2004; Legler et al., 2003). Diese Lokalisierung spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung von TNFR1 Signalwegen (Doan et al., 2004; Legler et al., 2003). Der Einfluss der *Lipid Rafts* auf die Induktion von Signalwegen ist zelltypabhängig (Muppidi et al., 2004).

Durch Cinthia Briseño aus unserer Arbeitsgruppe konnte allerdings, im Gegensatz zu den veröffentlichten Daten, gezeigt werden, dass es durch die Expression von LMP1 zu einer Rekrutierung von TRADD in die *Lipid Rafts* kommt (Briseño Franke, 2006). Daher stellte sich nun die Frage, ob die Aminosäuren 370-386 von LMP1 nicht nur ausreichend für die Bindung von TRADD sind, sondern auch für eine *Raft*-Lokalisierung von TRADD. In Zusammenarbeit mit Cinthia Briseño sollte untersucht werden, ob die Aminosäuren 370-386 von CTAR2 im LMP1-TNFR1 Kontext in der Lage sind, TRADD in die *Lipid Rafts* zu rekrutieren.

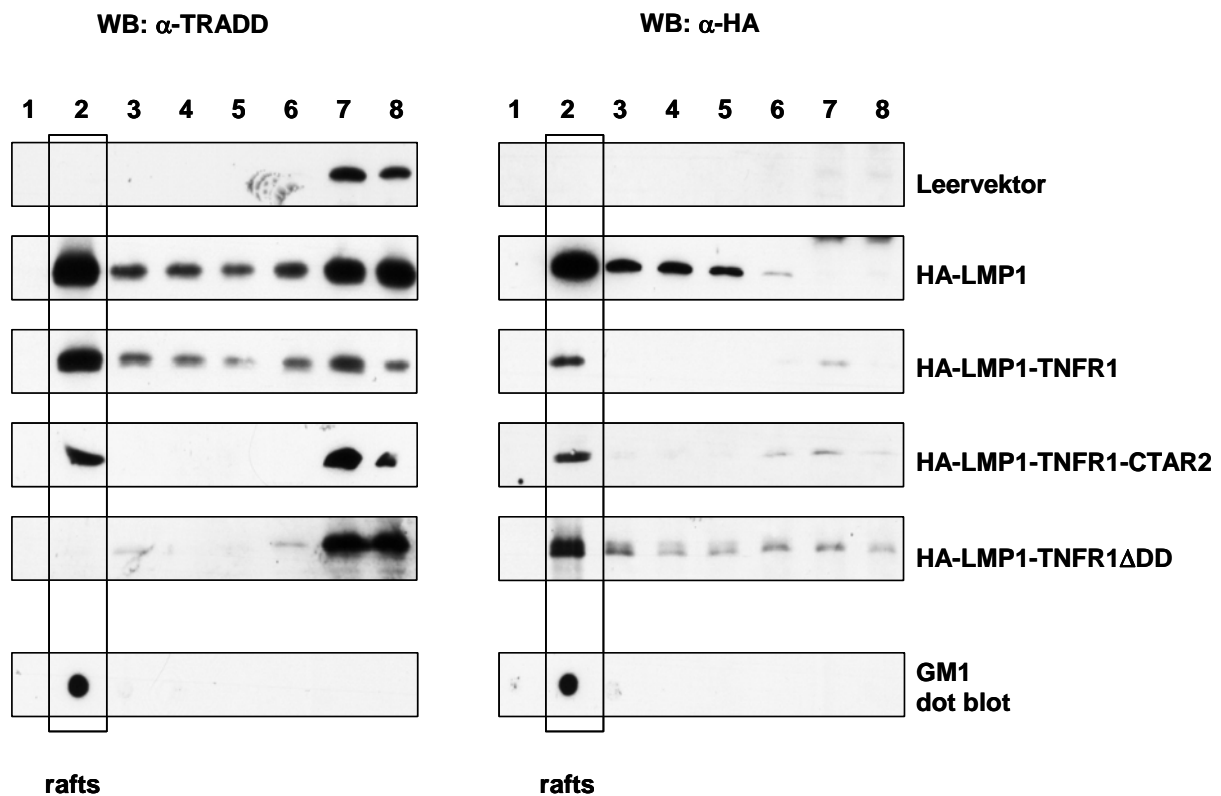


Abb. 4.5: Die Aminosäuren 370-386 von CTAR2 vermitteln die TRADD Rekrutierung in *Lipid Rafts*

HEK293 Zellen wurden in 10 cm Schalen mit 3,5 µg der angegebenen Expressionsvektoren (pCMV-HA-LMP1, pCMV-HA-LMP1-TNFR1, pCMV-HA-LMP1-TNFR1ΔDD, pCMV-HA-LMP1-TNFR1-CTAR2) sowie 0,5 µg pRK5-TRADD und 0,5 µg pcDNA3.1-p35 cotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden *Lipid Rafts* isoliert (siehe 3.6.5) und mit Hilfe von Immunblot analysiert. *Lipid Rafts* konnten in Fraktion 2 durch den Nachweis von GM1 mittels HRP-gekoppelter Cholera-Toxin Untereinheit B im Dot Blot nachgewiesen werden. Der Nachweis der LMP1-Konstrukte erfolgte mit dem α-HA-Antikörper 12CA5, der Nachweis von TRADD mit dem TRADD-spezifischen Antikörper H-278 (Santa Cruz Biotechnology, Inc).

Hierzu wurden HEK293 Zellen mit Expressionsvektoren für die HA-LMP1- und HA-LMP1-TNFR1-Konstrukte transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen noch mit einem TRADD-

Expressionsplasmid transfiziert, da endogenes TRADD in HEK293 Zellen nur schwer nachgewiesen werden konnte. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen in Tritonhaltigem Puffer lysiert und die *Lipid Rafts* mit Hilfe von Gradienten-Ultrazentrifugation isoliert (siehe Abschnitt 3.6.5). Nach der Zentrifugation wurden acht Fraktionen abgenommen, die *Lipid Rafts* befanden sich in Fraktion 2. In den Fraktionen 3-8 befanden sich zytosolische und andere Proteine, die nicht mit den *Lipid Rafts* assoziiert sind.

In Abb. 4.5 ist zu sehen, dass HA-LMP1 und HA-LMP1-TNFR1 in den *Lipid Rafts* lokalisiert waren. Zusätzlich war eine Verteilung über die Nicht-Raft-Fraktionen (Fraktion 3-8) zu beobachten. HA-LMP1-TNFR1 Δ DD und HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 zeigten eine vergleichbare Verteilung. Sie waren ebenfalls in Fraktion 2 lokalisiert, aber auch über die anderen Fraktionen verteilt. Ektopisch exprimiertes TRADD konnte nur in den Fraktionen 7 und 8 nachgewiesen werden. Erst durch die Coexpression von HA-LMP1 oder HA-LMP1-TNFR1 wurde TRADD in die *Lipid Rafts* rekrutiert. Auch HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 war in der Lage, TRADD in die *Lipid Rafts* zu rekrutieren. Durch Expression der Negativkontrolle HA-LMP1-TNFR1 Δ DD wurde die Lokalisierung von TRADD in den Fraktionen 7 und 8 nicht beeinflusst. Es konnte hiermit gezeigt werden, dass das Konstrukt HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 in der Lage ist, genau wie HA-LMP1 und HA-LMP1-TNFR1, TRADD in die *Lipid Rafts* zu rekrutieren. Die Aminosäuren 370-386 von LMP1 sind also für eine *Raft*-Lokalisierung von TRADD ausreichend.

Durch die Rekrutierung von TRADD in die *Lipid Rafts* sowie die Co-Immunpräzipitation (Abschnitt 4.2.1) konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren 370-386 von CTAR2 die vollständige TRADD-Bindestelle umfassen. Es handelt sich bei diesen Aminosäuren um eine eigenständige Domäne, die auch im LMP1-TNFR1 Kontext in der Lage ist, sowohl TRADD zu binden als auch ausreichend für die Rekrutierung von TRADD in die *Lipid Rafts* ist.

4.3 Charakterisierung der Signaltransduktion von LMP1-TNFR1-CTAR2

4.3.1 Aminosäuren 370-386 von LMP1 sind im LMP1-TNFR1 Kontext ausreichend für die Aktivierung von Signalwegen

In Zusammenarbeit mit Nicola Liefold sollte nun die Induktion bestimmter Signalwege durch LMP1-TNFR1-CTAR2 untersucht werden (Liefold, 2003). Es konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit gezeigt werden, dass die Aminosäuren 370-386 von CTAR2 die vollständige TRADD-Bindedomäne darstellen (siehe 4.2). Nun sollte untersucht werden, ob diese Aminosäuren auch ausreichen, die TRADD-abhängige Signaltransduktion zu aktivieren. Mittels einer TRADD defizienten Zelllinie wurde gezeigt, dass die Aktivierung des NF- κ B Signalweges durch CTAR2 abhängig von TRADD ist. Zusätzlich konnte bereits gezeigt werden, dass die Aminosäuren 379-384 für die Aktivierung des NF- κ B Signalweges notwendig sind (Floettmann und Rowe, 1997).

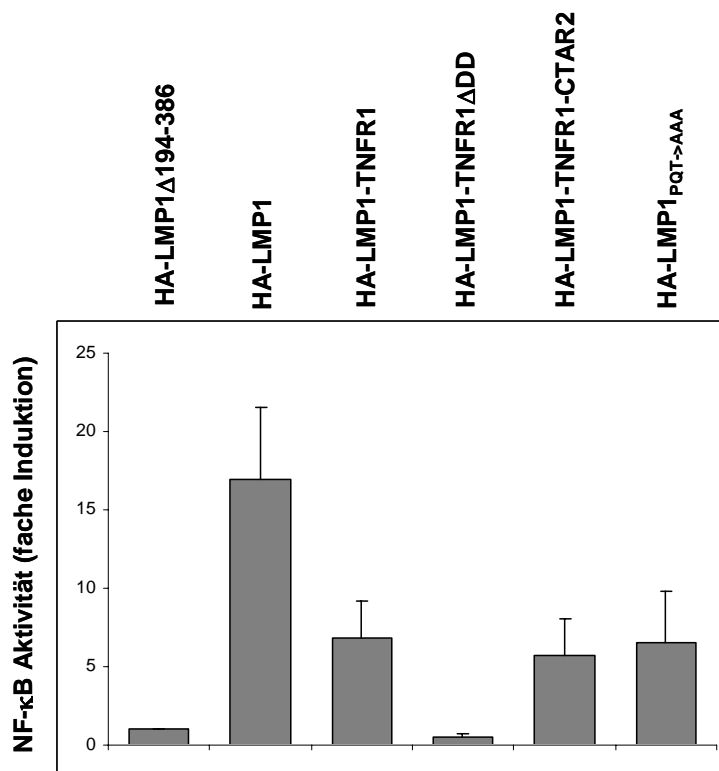


Abb. 4.6: Die Aminosäuren 370-386 von CTAR2 sind ausreichend, um den NF- κ B Signalweg zu induzieren

HEK293 Zellen wurden mit 1,5 μ g der angegebenen Expressionsplasmide transfiziert. 10 ng eines NF- κ B-Luziferase Reportergenplasmides (3 \times κ B-Luc), 50 ng eines β -Gal Reportergenplasmides sowie 0,5 μ g des p35 Expressionsplasmides pcDNA3.1-p35 wurden cotransfiziert. Die Messung der NF- κ B Aktivierung wurde wie in Abschnitt 3.6.3 beschrieben durchgeführt. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Mit Reporter-genversuchen sollte nun die Frage beantwortet werden, ob die Aminosäuren 370-386 von CTAR2 ausreichend sind, auch im LMP1-TNFR1-Kontext den NF- κ B Signalweg zu induzieren. HEK293 wurden transient mit Expressionsplasmiden für die verschiedenen HA-LMP1 und HA-LMP1-TNFR1 Konstrukte transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem NF- κ B Reporter-genplasmid cotransfiziert. Zur Standardisierung diente ein β -Gal Reporter-genplasmid, das das β -Galaktosidasegen unter der Kontrolle eines Phosphoglyzeratkinase (PGK) Promotors trägt.

Wie in Abb. 4.6 zu sehen ist, führte die Überexpression von HA-LMP1 und HA-LMP1-TNFR1 zu einer 17- bzw. 6,9-fachen Induktion des NF- κ B Signalwegs. HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 induzierte ebenfalls den NF- κ B Signalweg. Die Negativkontrollen HA-LMP1 Δ 194-386 sowie HA-LMP1-TNFR1 Δ DD konnten den Signalweg nicht induzieren. Die 5,7-fache und damit deutlich geringere Induktion durch HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 im Vergleich zu HA-LMP1 erklärt sich durch die Abwesenheit von CTAR1 im Konstrukt HA-LMP1-TNFR1-CTAR2. Durch HA-LMP1 wurde der Signalweg sowohl über CTAR1 als auch über CTAR2 induziert. Um nur den Beitrag von CTAR2 analysieren zu können, wurde das Konstrukt Konstrukt HA-LMP1_{PQT \rightarrow AAA} verwendet, das eine Mutation in CTAR1 trägt und daher Signalwege nur über CTAR2 aktivieren kann. Durch das Konstrukt HA-LMP1_{PQT \rightarrow AAA} kam es zu einer 6,5-fachen Induktion, die vergleichbar mit der durch HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 war. Es konnte daher gezeigt werden, dass die Aminosäuren 370-386 von CTAR2 im LMP1-TNFR1 Kontext ihre volle Aktivität besitzen. Diese Domäne stellt also nicht nur die vollständige TRADD-Bindedomäne dar, sondern ist auch in der Lage, TRADD-abhängige Signaltransduktion zu aktivieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren 370-386 von LMP1 als eigenständige Domäne auch im LMP1-TNFR1 Kontext voll funktionsfähig sind und den NF- κ B Signalweg im Vergleich zum LMP1 Kontext in vollen Umfang aktivieren können.

Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung des JNK1/AP-1 Signalweges durch LMP1 TRADD-unabhängig ist (Schneider, 2005). Allerdings liegt die JNK-Aktivierungsregion von LMP1 (Aminosäuren 379-384) innerhalb der auf LMP1-TNFR1 übertragenen Domäne (Eliopoulos et al., 1999a). Um die volle Funktionalität zu gewährleisten und um die Domäne näher zu charakterisieren, sollte untersucht werden, ob diese Domäne auch ausreichend ist, den JNK1/AP-1 Signalweg zu aktivieren. Die Aktivierung des Signalweges wurde mittels eines *in vitro* JNK1 Immunkomplex-Kinaseversuchs untersucht. HEK293 Zellen wurden mit

Expressionsplasmiden für die verschiedenen HA-LMP1 und HA-LMP1-TNFR1 Konstrukte transfiziert. Zusätzlich wurden sie mit einem Expressionsplasmid für HA-JNK1 cotransfiziert. HA-JNK1 wurde immunpräzipitiert und damit dann *in vitro* GST-c-Jun phosphoryliert. Die Phosphorylierung des Substrats mit ^{32}P wurde mittels Autoradiographie untersucht. Zur Verhinderung von apoptotischen Vorgängen wurden die Zellen mit dem Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK behandelt sowie mit einem Expressionsplasmid für das antiapoptotische Protein Bcl2 cotransfiziert.

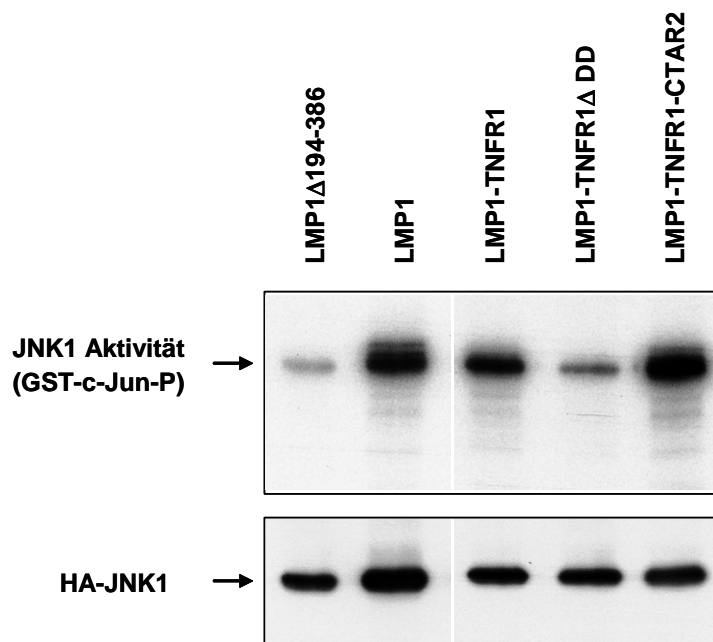


Abb. 4.7: Die Aminosäuren 370-386 von CTAR2 sind ausreichend, um den JNK1 Signalweg zu induzieren. HEK293 Zellen wurden mit 1,5 μg der angegebenen Expressionsplasmide sowie 1 μg pRK5-HA-JNK1 und 0,5 μg pRK5-bcl2 cotransfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem Pan-Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK in einer Endkonzentration von 10 μM behandelt. 24 h nach der Transfektion wurde ein *in vitro*-Kinaseversuch (siehe Abschnitt 3.6.2) durchgeführt. *In vitro* phosphoryliertes GST-c-Jun wurde durch Autoradiographie nachgewiesen. Als Transfektions- und Ladekontrolle wurde auf derselben Membran das präzipitierte HA-JNK1 mit dem JNK1-spezifischen Antikörper C-17 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) nachgewiesen.

Wie in Abb. 4.7 zu sehen, führte die ektopische Expression von HA-LMP1 und HA-LMP1-TNFR1 zu einer Phosphorylierung von GST-c-Jun durch präzipitierte HA-JNK1 in der *in vitro* Kinasereaktion. Dies zeigte eine Aktivierung des JNK1/AP-1 Signalweges. Die Expression von HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 führte ebenfalls zu einer Aktivierung von JNK1. Die Negativkontrollen HA-LMP1 Δ 194-386 sowie HA-LMP1-TNFR1 Δ DD konnten den

Signalweg nicht induzieren. Die Aminosäuren 370-386 von CTAR2 sind also im LMP1-TNFR1 Kontext ausreichend, um neben dem NF- κ B Signalweg auch den JNK1/AP-1 Signalweg zu aktivieren. Auch hier zeigten sich die Aminosäuren 370-386 von LMP1 als eigenständige Domäne, die ausreichend ist, um im LMP1-TNFR1 Kontext Signaltransduktion zu aktivieren.

Die Aminosäuren 370-386 von CTAR2 sind also auch im LMP1-TNFR1-Kontext in der Lage, TRADD zu rekrutieren und Signalwege zu induzieren. Diese Ergebnisse lassen allerdings noch keine direkten Rückschlüsse darüber zu, ob zusammen mit der TRADD Bindedomäne von LMP1 auch die spezifischen Eigenschaften dieser Domäne in Bezug auf Signaltransduktion sowie in Bezug auf den dadurch induzierten biologischen Phänotyp mit übertragen werden. Dies würde bedeuten, dass diese Eigenschaften intrinsisch in der Domäne festgelegt sind. Denkbar wäre allerdings auch, dass kein Transfer stattfindet, sondern die Entscheidung über Zelltod oder Überleben durch den Rezeptorkontext getroffen wird. Um diese Fragestellung zu bearbeiten, sollten im Rahmen dieser Doktorarbeit sowohl die molekularen Charakteristika der Signaltransduktion als auch die Induktion von Apoptose durch die Aminosäuren 370-386 von LMP1 im LMP1-TNFR1 Kontext untersucht werden.

Als erstes sollte die Beteiligung bestimmter Adaptermoleküle an der Signaltransduktion von LMP1-TNFR1-CTAR2 analysiert werden. Mitglieder der TRAF-Familie sind sowohl an der Signaltransduktion von LMP1 als auch vom TNFR1 beteiligt. Allerdings spielen bei der Aktivierung der Signale jeweils unterschiedliche Mitglieder dieser Familie eine wichtige Rolle. TRAF2 ist an der Induktion des JNK1/AP-1 Signalweges durch den TNFR1 beteiligt (Natoli et al., 1997). Bei der Aktivierung von JNK1 durch LMP1 spielt TRAF2 hingegen keine Rolle. TRAF6 ist für die Aktivierung des JNK1/AP-1 und des NF- κ B Signalweges durch LMP1 notwendig, an der Signaltransduktion des TNFR1 ist es hingegen nicht beteiligt (Lomaga et al., 1999; Luftig et al., 2003; Schultheiss et al., 2001; Wan et al., 2004). Daher wurden TRAF2 und TRAF6 als Kandidaten für eine nähere Untersuchung der molekularen Charakteristika der Signaltransduktion ausgewählt. Damit sollte analysiert werden, ob diese LMP1-typischen Merkmale der Signaltransduktion zusammen mit den Aminosäuren 370-386 von LMP1 auf den TNFR1-Kontext übertragen werden.

4.3.2 Die TRAF2-Unabhängigkeit der JNK1 Induktion wird zusammen mit den Aminosäuren 370-386 von LMP1 übertragen

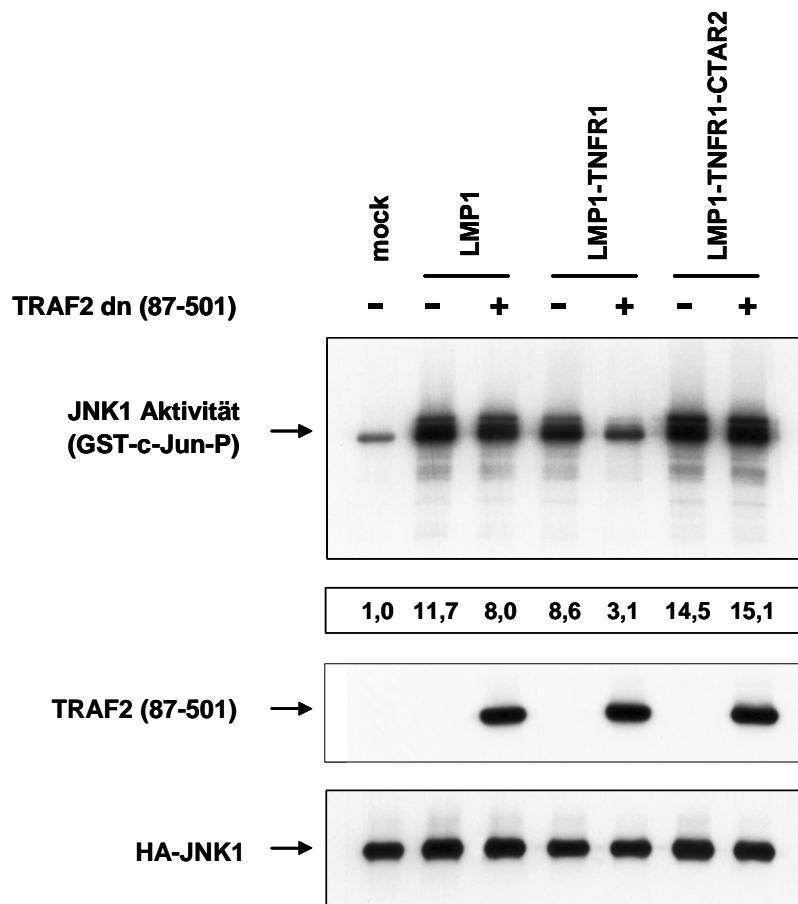


Abb. 4.8: JNK1 wird durch CTAR2 unabhängig von TRAF2 induziert

HEK293 Zellen wurden mit 0,5 µg der angegebenen Expressionsplasmide sowie 1 µg pRK5-HA-JNK1 und 0,5 µg eines p35 Expressionsplasmids transfiziert. Die dominant-negative Mutante TRAF2 (87-501) wurde in den entsprechenden Ansätzen cotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde ein *in vitro* Immunkomplex-Kinaseversuch (siehe Abschnitt 3.6.2) durchgeführt. *In vitro* phosphoryliertes GST-c-Jun wurde durch Autoradiographie nachgewiesen. Als Transfektions- und Ladekontrolle wurde auf derselben Membran das präzipitierte HA-JNK1 mit dem JNK1-spezifischen Antikörper C-17 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) nachgewiesen. Die Quantifizierung der GST-c-Jun-Phosphorylierung erfolgte mittels Phosphoimager. Der Nachweis der Expression von TRAF2 (87-501) erfolgte mittels eines polyklonalen TRAF2-Antikörpers (C-20, Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

Wie bereits beschrieben, ist TRAF2 für die Aktivierung des JNK1/AP-1 Signalweges durch den TNFR1 notwendig, jedoch nicht für die durch LMP1 (Natoli et al., 1997; Xie et al., 2004). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine dominant-negative TRAF2-Mutante (TRAF2(87-501); TRAF2dn) verwendet, um die Beteiligung von TRAF2 an der

Signaltransduktion zu untersuchen. Bei TRAF2(87-501) wurde der N-terminale RING-Finger deletiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression dieser Mutante die Aktivierung des JNK1/AP-1 Signalweges durch den TNFR1 inhibiert, jedoch nicht durch LMP1 (Hsu et al., 1996b; Kieser et al., 1999).

HEK293 Zellen wurden transient mit Expressionsplasmiden für die verschiedenen LMP1 und LMP1-TNFR1 Konstrukte sowie für TRAF2dn cotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde ein in vitro-Kinaseversuch durchgeführt und der Einfluss von TRAF2dn auf die Signaltransduktion untersucht.

Wie erwartet hat die Coexpression von TRAF2dn keinen Einfluss auf die JNK1/AP-1-Induktion durch HA-LMP1 (Abb. 4.8). Hingegen führt die Coexpression von TRAF2dn zu einer deutlich reduzierten JNK1/AP-1-Aktivierung durch HA-LMP1-TNFR1. Die Stärke der Aktivierung von JNK1/AP-1 durch HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 wird durch die Cotransfektion von TRAF2dn nicht beeinflusst. Die durch die Aminosäuren 370-386 von LMP1 induzierte JNK1/AP-1-Aktivierung ist also sowohl im LMP1- als auch im LMP1-TNFR1-Kontext TRAF2-unabhängig. Diese Unabhängigkeit der JNK1 Aktivierung von TRAF2 wurde also zusammen mit den Aminosäuren 370-386 von LMP1 auf LMP1-TNFR1 übertragen.

4.3.3 Die TRAF6-Abhängigkeit der JNK1 und der NF- κ B Induktion wird zusammen mit den Aminosäuren 370-386 von LMP1 übertragen

TRAF6 ist an der Aktivierung des NF- κ B Signalweges durch LMP1 beteiligt (Luftig et al., 2003; Schultheiss et al., 2001). Zu Beginn dieser Doktorarbeit wurde aufgrund von Versuchen mit dominant negativem TRAF6 angenommen, dass TRAF6 an der Induktion des JNK1 Signalweges durch LMP1 möglicherweise nicht beteiligt ist (Schultheiss et al., 2001). Dennoch sollte auch anhand dieses Faktors untersucht werden, ob bestimmte Merkmale der LMP1-Signaltransduktion zusammen mit den Aminosäuren 370-386 auf LMP1-TNFR1 übertragen werden. Es ist bekannt, dass die Signaltransduktion des TNFR1 unabhängig von TRAF6 verläuft (Lomaga et al., 1999; Wan et al., 2004). Um zu untersuchen, ob die TRAF6-Abhängigkeit der Signaltransduktion von LMP1 zusammen mit den Aminosäuren 370-386 auf LMP1-TNFR1 übertragen wird, wurde die Abhängigkeit der JNK1- bzw. NF- κ B-Induktion durch LMP1-TNFR1-CTAR2 von TRAF6 untersucht. Hierzu wurden TRAF6-defiziente Zellen verwendet (Lomaga et al., 1999).

Die Aktivierung des JNK1/AP-1 Signalwegs wurde mittels eines *in vitro* Immunkomplex-Kinaseversuchs untersucht. TRAF6^{-/-} Mausfibroblasten wurden mit Expressionsplasmiden für die entsprechenden LMP1 und LMP1-TNFR1 Konstrukte transfiziert. Um die Abhängigkeit der Signaltransduktion von TRAF6 zu untersuchen, wurde TRAF6 in den entsprechenden Ansätzen ektopisch exprimiert.

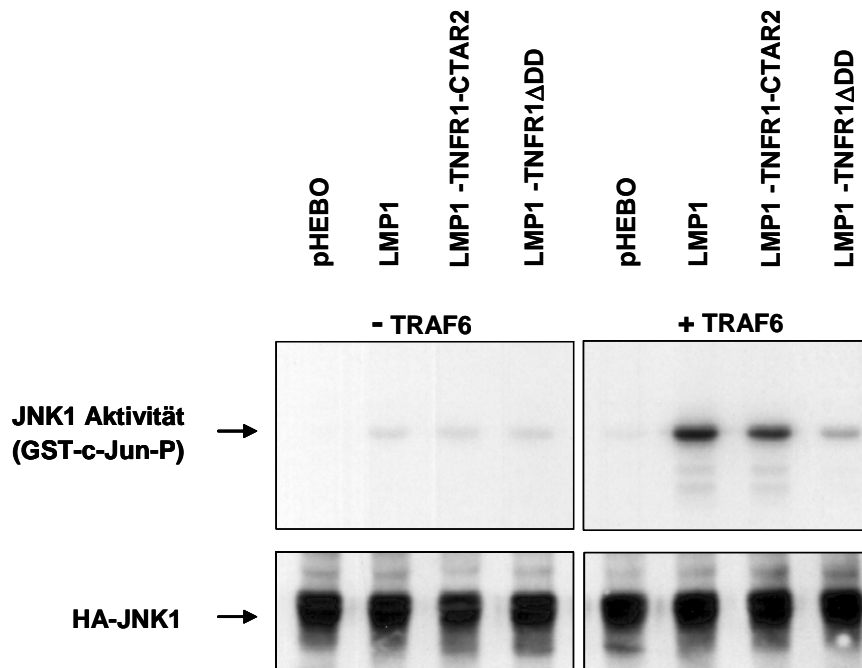


Abb. 4.9: JNK1 wird durch CTAR2 abhängig von TRAF6 induziert

TRAF6 defiziente Mousfibroblasten wurden in 10 cm-Platten mit 2 µg der angegebenen Expressionsplasmide, 2 µg pRK5-HA-JNK1 und 1 µg eines pcDNA3.1-p35 transfiziert. 1 µg TRAF6-Expressionsplasmid wurde in den entsprechenden Ansätzen cotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde ein *in vitro* Immunkomplex-Kinaseversuch (siehe Abschnitt 3.6.2) durchgeführt. *In vitro* phosphoryliertes GST-c-Jun wurde durch Autoradiographie nachgewiesen. Als Transfektions- und Ladekontrolle wurde auf derselben Membran das präzipitierte HA-JNK1 mit dem JNK1-spezifischen Antikörper C-17 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) nachgewiesen. Die Quantifizierung der GST-c-Jun-Phosphorylierung erfolgte mittels Phosphoimager.

Wie in Abbildung 4.9 zu sehen, führte die ektopische Expression von TRAF6 alleine nicht zu einer Induktion des JNK1/AP-1 Signalwegs. Außerdem konnte gezeigt werden, dass HA-LMP1 ohne TRAF6 nicht in der Lage war, JNK1 zu induzieren. Erst eine Coexpression von TRAF6 führte zur Induktion des Signalwegs. Dies zeigte, im Gegensatz zu den Versuchen mit dominant negativem TRAF6, deutlich eine Beteiligung von TRAF6 an der Aktivierung

des JNK1/AP-1 Signalweges durch LMP1. Inzwischen konnte auch von Wan *et al.* gezeigt werden, dass TRAF6 an der JNK1 Induktion durch LMP1 beteiligt ist (Wan et al., 2004). Auch HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 induzierte ohne TRAF6 den JNK1 Signalweg nicht. Genau wie bei HA-LMP1 führte ebenso hier erst die Coexpression von TRAF6 zu einer deutlichen Induktion der JNK1 Aktivität. Die Stärke der Aktivierung von JNK1 durch HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 in Gegenwart von TRAF6 entsprach der durch HA-LMP1 in Gegenwart von TRAF6. Das Kontrollkonstrukt HA-LMP1-TNFR1 Δ DD zeigte auch nach Coexpression von TRAF6 nur eine sehr geringe Induktion des JNK1 Signalweges. Die Aminosäuren 370-386 zeigten also auch im LMP1-TNFR1-Kontext eine Abhängigkeit von TRAF6 bei der Aktivierung von JNK1. Hier zeigte sich, wie auch schon im Abschnitt 4.3.2, dass der Typ der Signaltransduktion der Aminosäuren 370-386 von CTAR2 zu JNK1 vom Rezeptorkontext unabhängig und immer LMP1 spezifisch ist.

Anschließend wurde die Abhängigkeit der NF- κ B Induktion von TRAF6 untersucht. Es wurde gezeigt, dass TRAF6 in der Aktivierung des NF- κ B Signalweges durch CTAR2 von LMP1 eine Rolle spielt (Luftig et al., 2003; Schultheiss et al., 2001). Der NF- κ B Signalweg wurde mit Hilfe eines Reportergenversuchs in TRAF6-defizienten Zellen analysiert. Hierzu wurden die Zellen mit Expressionsplasmiden für die verschiedenen LMP1 und LMP1-TNFR1 Konstrukte transfiziert. Zusätzlich wurde das Reportergenkonstrukt 3 \times κ B-Luc cotransfiziert. Durch Coexpression von ektopischem TRAF6 wurde die Abhängigkeit der Signaltransduktion von TRAF6 analysiert.

Wie in Abb. 4.10 zu sehen, führte die ektopische Expression von TRAF6 zu einer Induktion des NF- κ B-Signalweges (7,3-fach). Auch HA-LMP1 alleine war in der Lage den NF- κ B Signalweg schwach zu induzieren, hier konnte eine 3,4-fache Induktion beobachtet werden. Diese Induktion wird wahrscheinlich über CTAR1 vermittelt, da dieser Signalweg TRAF6-unabhängig verläuft. Durch die Coexpression von HA-LMP1 und TRAF6 kam es zu einer 19-fachen Induktion des Signalweges. Dieser Wert lag deutlich über dem Wert, der sich durch eine Addition der Werte von TRAF6 und HA-LMP1 ergibt. Dadurch bestätigte sich die TRAF6-Abhängigkeit der Induktion des NF- κ B Signalweges durch LMP1 über CTAR2. Durch die Expression von HA-LMP1-TNFR1 wurde der NF- κ B Signalweg ebenfalls aktiviert (7,8-fach), eine Steigerung durch TRAF6-Coexpression über einen additiven Effekt hinaus konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die Aktivierung des NF- κ B Signalweges durch HA-LMP1-TNFR1 ist damit also, wie erwartet, TRAF6-unabhängig.

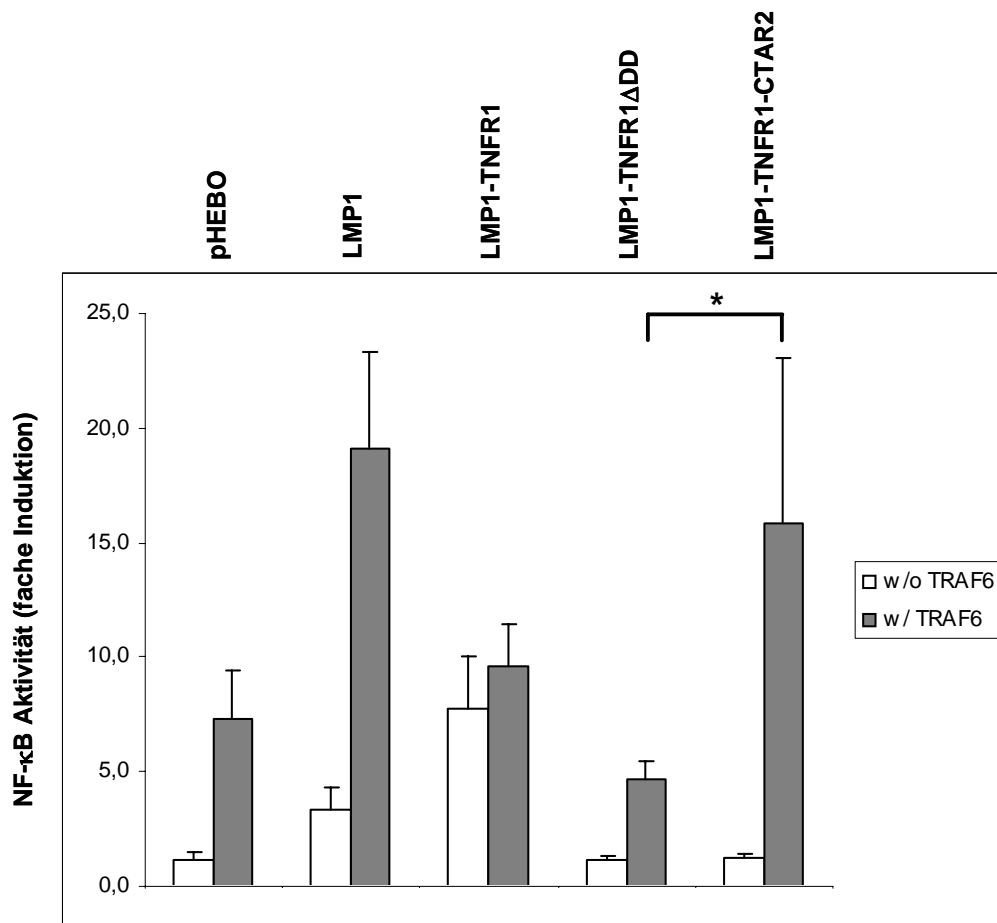


Abb. 4.10: NF- κ B wird durch CTAR2 abhängig von TRAF6 induziert

TRAF6 defiziente Mausfibroblasten wurden mit 1,5 μ g der angegebenen Expressionsplasmide, 0,9 μ g eines TRAF6 Expressionsplasmides bzw. des Leervektors, 0,5 μ g eines p35 Expressionsplasmides, 50 ng eines NF- κ B-Luziferase Reporterplasmides (3 \times κ B-Luc) sowie 200 ng eines β -Gal Reporterplasmides transfiziert. Die Messung der NF- κ B Aktivierung wurde wie in Abschnitt 3.6.3 beschrieben durchgeführt. Die Werte sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. Student T-Test * $p < 0,06$

Das Kontrollkonstrukt HA-LMP1-TNFR1 Δ DD induzierte den NF- κ B Signalweg nicht. Die Aktivierung von NF- κ B nach Coexpression von TRAF6 war allein auf TRAF6 zurückzuführen, da sie vergleichbar mit der Aktivierung durch TRAF6 in der Leervektor-Kontrolle (pHEBO) war. HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 alleine war nicht in der Lage, NF- κ B zu induzieren, da weder CTAR1 noch die Todesdomäne enthalten sind, die NF- κ B TRAF6-unabhängig induzieren. Erst nach Coexpression von TRAF6 konnte eine 15,9-fache Induktion beobachtet werden. Die Induktion des NF- κ B Signalweges durch HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 ist also ebenfalls TRAF6 abhängig. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Induktion des NF- κ B Signalweges sowohl durch HA-LMP1 als auch durch HA-LMP1-TNFR1-CTAR2

abhängig von TRAF6 ist. Dies bedeutet, dass die Aminosäuren 370-386 von LMP1 den NF- κ B Signalweg TRAF6-abhängig induzieren. Dies ist unabhängig vom Rezeptorkontext und wird zusammen mit den Aminosäuren 370-386 von LMP1 auf LMP1-TNFR1 übertragen.

Die Experimente in den TRAF6-defizienten Zellen konnten die Ergebnisse aus Abschnitt 4.3.2. bestätigen. Die durch die Aminosäuren 370-386 von LMP1 induzierte Signaltransduktion ist unabhängig vom Rezeptorkontext TRAF2-unabhängig sowie TRAF6-abhängig. Die Signaltransduktion dieser Domäne entspricht also auch im LMP1-TNFR1 Kontext der Signaltransduktion im LMP1 Kontext in Bezug auf molekulare Charakteristika. Hiermit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass der Typ der Signaltransduktion nicht vom Rezeptorkontext abhängt. Vielmehr wird er intrinsisch durch die TRADD-Bindedomäne festgelegt und kann zusammen mit den Aminosäuren 370-386 auf LMP1-TNFR1 übertragen werden.

4.4 Analyse des apoptotischen Potenzials von CTAR2 und der Todesdomäne

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren 370-386 von LMP1 ausreichend sind, um im LMP1-TNFR1-Kontext den JNK1/AP-1 sowie den NF- κ B Signalweg zu aktivieren. Dabei wird die LMP1-spezifische Signaltransduktion durch diese Domäne festgelegt und auch zusammen mit dieser Domäne auf LMP1-TNFR1 transferiert. Der Typ der Signaltransduktion ist also unabhängig vom Rezeptorkontext. Nun stellte sich die Frage, ob durch diese Domäne auch der durch die Signaltransduktion induzierte biologische Phänotyp festgelegt wird oder ob er vom Rezeptorkontext abhängig ist. Es sollte daher untersucht werden, ob die Aminosäuren 370-386 von LMP1 im LMP1-TNFR1-Kontext Apoptose induzieren können oder ob sie einen LMP1-Phänotyp zeigen und keine Apoptose induzieren.

Um das apoptotische Potential der konstitutiv aktiven Fusionskonstrukte zu analysieren, wurde eine speziell von Frank Schneider in unserem Labor entwickelte Methode zur Analyse von Zelltod nach transienter Transfektion von Lymphozyten verwendet (Schneider und Kieser, 2004). Hierbei werden Zellen mit Expressionsplasmiden für die zu untersuchenden Proteine sowie für GFP cotransfiziert. Im Kontrollansatz werden die Zellen mit einem Leervektor oder einem anderen Kontrollplasmid sowie mit einem GFP-Expressionsplasmid

transfiziert. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen werden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) angefärbt. Die Analyse erfolgt mittels Durchflusszytometrie. Hierbei wird eine festgelegte Zeit und damit ein definiertes Analysevolumen gemessen. Dadurch wird die Anzahl der grünen überlebenden Zellen in diesem Volumen bestimmt. Die Differenz zwischen der Anzahl der grünen überlebenden Zellen im zu untersuchenden Ansatz und im Kontrollansatz spiegelt die apoptotischen Zellen wieder. So lässt sich dann das apoptotische Potential der exprimierten Proteine bestimmen. Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Nicola Liefold und Frank Schneider durchgeführt (Liefold, 2003).

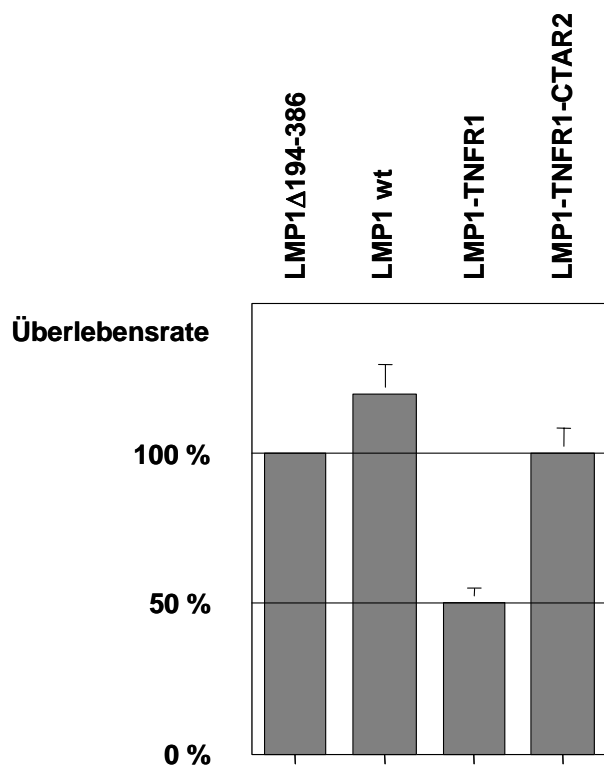


Abb. 4.11: Die Aminosäuren 370-386 von CTAR2 sind funktional, aber induzieren keine Apoptose im LMP1-TNFR1-Kontext

3×10^6 BJAB-Zellen pro Ansatz wurden mit $13 \mu\text{g}$ pCMV-HA-LMP1Δ194-386, pCMV-HA-LMP1, pCMV-HA-LMP1-TNFR1 oder pCMV-HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 sowie jeweils $1 \mu\text{g}$ pEGFP transfiziert. Die Zellen wurden mittels Elektroporation bei 220 V und $975 \mu\text{F}$ transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) gefärbt, im Durchflusszytometer analysiert und die Anzahl der grünen überlebenden Zellen (GFP+/PI-) aufgetragen. Es wurden zwei unabhängige Experimente mit jeweils drei Messungen durchgeführt und die Mittelwerte gebildet.

Wie beschrieben, wurde die Differenz zwischen der Anzahl der überlebenden grünen Zellen im jeweiligen Ansatz und der Anzahl der überlebenden grünen Zellen im Kontrollansatz als Maßstab für die Induktion von Zelltod verwendet (Abb. 4.11). Die Anzahl der überlebenden grünen Zellen im Kontrollansatz, in dem HA-LMP1 Δ 194-386 exprimiert wurde, wurde auf 100 % gesetzt. Die Expression von HA-LMP1 führte im Vergleich mit der Kontrolle sogar zu einer etwas höheren Anzahl an grünen Zellen, was auf einen proliferativen Effekt der LMP1 Expression schließen lässt. Durch die Expression von HA-LMP1-TNFR1 kam es zu einer um 50 % reduzierten Anzahl an grünen Zellen. Die Expression von HA-LMP1-TNFR1-CTAR2 hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der grünen Zellen, sie betrug 100 %. Wie erwartet führte die Expression von HA-LMP1 nicht zum Zelltod. Die verminderte Anzahl der überlebenden grünen Zellen nach Überexpression von HA-LMP1-TNFR1 zeigte deutlich das apoptotische Potential dieses Konstrukts. Dass es sich bei den Zelltodvorgängen, die durch LMP1-TNFR1 induziert werden, tatsächlich um Apoptose handelte, konnte durch den Einsatz des Caspaseinhibitors Z-VAD-FMK nachgewiesen werden. So wurde gezeigt werden, dass der durch die Expression von LMP1-TNFR1 induzierte Zelltod durch Zugabe dieses Caspaseinhibitors verhindert werden konnte (Schneider und Kieser, 2004). Obwohl gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 4.3.1), dass die Aminosäuren 370-386 im LMP1-TNFR1-Kontext funktionell sind, zeigte sich hier keine Verminderung der überlebenden grünen Zellen. Das bedeutet, dass das Konstrukt LMP1-TNFR1-CTAR2 keinen Zelltod induziert. Auch der biologische Phänotyp der durch die Signaltransduktion induziert wird, wird also durch die Domäne selber und nicht durch den Rezeptorkontext festgelegt.

4.5 „Domain Swapping“ im TNFR1 Wildtypkontext

In den Abschnitten 4.1 bis 4.4 wurden die Aminosäuren 370-386 von LMP1 im Kontext von LMP1-TNFR1, also einem konstitutiv aktivem TNFR1 Fusionsprotein, näher charakterisiert. Hierbei erfolgte die Aktivierung der Signaltransduktion durch die spontane Oligomerisierung der LMP1-Transmembrandomänen (Gires et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die Transmembrandomänen von LMP1 nur für die Aktivierung, aber nicht für die Spezifität der Signaltransduktion verantwortlich sind. Ein darüber hinaus gehender Einfluss der Transmembrandomänen auf die Signaltransduktion ist nicht belegt. Um einen direkten Einfluss auf die Signaltransduktion von LMP1-TNFR1-CTAR2 vollständig ausschließen zu können, sollten „Domain Swapping“-Experimente nun auch im Kontext von TNFR1 Wildtyp durchgeführt werden.

Im Gegensatz zu LMP1 erfolgt die Aktivierung des TNFR1 über eine Bindung des Liganden TNF α an den schon im inaktiven Zustand trimerisierten Rezeptor. Nun sollte die Frage beantwortet werden, ob die Aminosäuren 370-386 von CTAR2 als eigenständige Domäne auch über eine Trimerisierung aktiviert werden können, oder ob dazu die LMP1-Transmembrandomänen und eine Oligomerisierung notwendig sind. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Todesdomäne des Wildtyp-TNFR1 durch die Aminosäuren 370-386 von LMP1 ersetzt. Als Kontrolle wurde das Konstrukt TNFR1 Δ DD kloniert, indem die Todesdomäne deletiert wurde. Die Klonierung ist im Abschnitt 3.5.1 genauer beschrieben. In Abb. 4.12 sind die Konstrukte schematisch dargestellt.

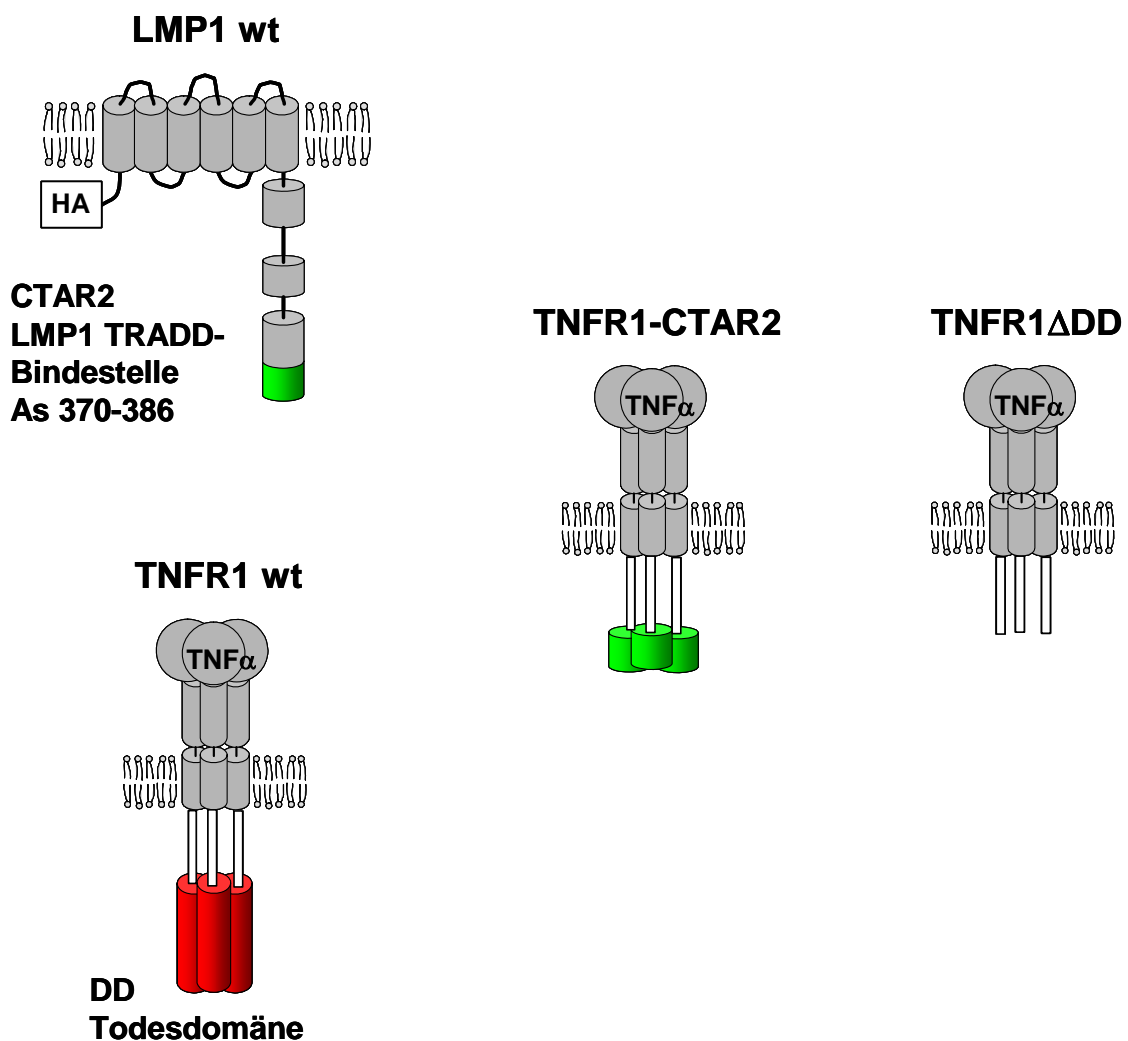


Abb. 4.12: „Domain Swapping“ im TNFR1-Kontext

Die Todesdomäne des TNF-Rezeptor 1 Wildtyps wurde durch die Aminosäuren 370-386 von LMP1 ersetzt. Das so entstandene Konstrukt wird als TNFR1-CTAR2 bezeichnet. Das Konstrukt TNFR1 Δ DD trägt keine TRADD-Bindedomäne und dient als Negativkontrolle.

4.5.1 Untersuchungen in HEK293 Zellen

4.5.1.1 Expression

Nach der Klonierung der Konstrukte pHEBO-TNFR1, pHEBO-TNFR1 Δ DD und pHEBO-TNFR1-CTAR2 wurde untersucht ob die entsprechenden Proteine exprimiert werden und durch einen Antikörper nachgewiesen werden können.

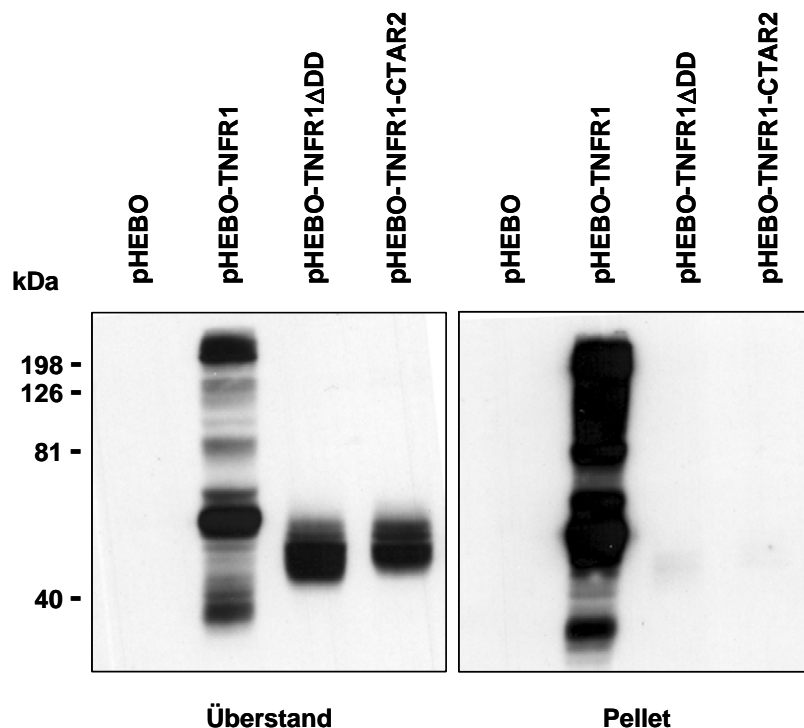


Abb. 4.13 Expression in HEK293 Zellen

HEK293 Zellen wurden mit 2,5 μ g der angegebenen Konstrukte sowie 0,5 μ g pcDNA3.1-p35 cotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde die Expression der Konstrukte, wie in Abschnitt 3.6.1 beschrieben, analysiert. Zum Nachweis der Konstrukte wurde der TNFR1-Antikörper H-5 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) verwendet.

Wie in Abb. 4.13 zu sehen ist, werden alle drei Konstrukte in HEK293 Zellen exprimiert. Während der TNFR1 sich sowohl im Überstand als auch im Triton-X100-unlöslichen Pellet befindet, können TNFR1 Δ DD und TNFR1-CTAR2 nur im Überstand gut nachgewiesen werden. Da die Proteine kein zusätzliches Epitop für einen Antikörper tragen, erfolgte der Nachweis im Immunblot durch einen TNFR1-spezifischen Antikörper (H-5, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Dieser Antikörper ist spezifisch für die extrazelluläre Domäne des TNFR1.

4.5.1.2 TNFR1 Δ DD zeigt einen dominant negativen Effekt auf die Stimulierung des endogenen TNFR1

Als nächstes wurden die Konstrukte auf ihr Potential hin untersucht, Signalwege zu induzieren. In HEK293 Zellen wurden Reporter-gen-Versuche durchgeführt, um die Aktivierung des NF- κ B Signalweges zu analysieren. Es erfolgte eine Stimulierung der Rezeptorkonstrukte mit TNF α . Es konnte gezeigt werden, dass HEK293 Zellen endogen nur den TNFR1 aber nicht den TNFR2 exprimieren (Chandel et al., 2001; McFarlane et al., 2002; Schneider, 2005). Daher kann ausgeschlossen werden, dass durch die TNF α -Stimulierung auch der TNFR2 aktiviert wird, was zu Mischsignalen führen würde.

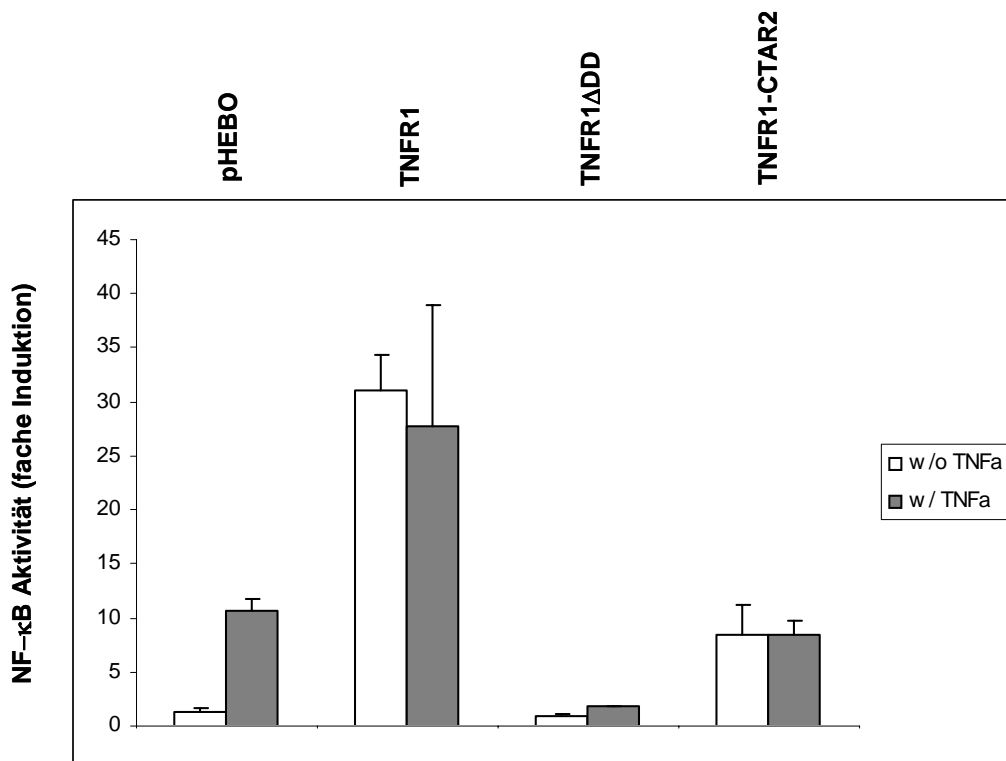


Abb. 4.14: TNFR1 Δ DD hat einen dominant negativen Effekt auf die Stimulierung des endogenen TNFR1 durch TNF α

HEK293 Zellen wurden mit 2 μ g der angegebenen Expressionsplasmide transfiziert. 10 ng eines NF- κ B-Luziferase Reporter-gen-plasmides (3 \times κ B-Luc), 50 ng eines β -Gal Reporter-gen-plasmides sowie 0,5 μ g eines p35 Expressionsplasmides wurden cotransfiziert. 10 h nach der Transfektion wurden die Zellen wie angegeben für weitere 20 h mit 10 ng/ml TNF α stimuliert. Die Messung der NF- κ B Aktivierung wurde wie in Abschnitt 3.6.3 beschrieben durchgeführt. Die Werte sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Transfektionen.

Wie in Abbildung 4.14 zu sehen ist, führte die Stimulierung mit $\text{TNF}\alpha$ ohne die ektopische Expression eines Rezeptorkonstrukts zu einer 10,7-fachen Induktion des NF- κ B Signalweges. Dieser Effekt entstand durch die Stimulierung des endogenen TNFR1, der wie bereits beschrieben, in HEK293 Zellen exprimiert wird. Die ektopische Expression von TNFR1 führte bereits ohne $\text{TNF}\alpha$ -Stimulierung zu einer 31,0-fachen Induktion des NF- κ B Signalweges. Wurden die Zellen nach der Expression des TNFR1 zusätzlich noch mit $\text{TNF}\alpha$ stimuliert, konnte keine weitere Aktivierung des Signalweges erreicht werden (27,7-fach). Da der NF- κ B Signalweg durch die Expression von TNFR1 schon sehr stark aktiviert wurde, war wahrscheinlich eine weitere Stimulierung nicht mehr möglich. Die Frage, ob der TNFR1 auch wirklich auf der Zelloberfläche exprimiert wird, wird in Abschnitt 4.5.2.1 näher adressiert. Die Expression der Negativkontrolle TNFR1 Δ ADD führte nicht zu einer Aktivierung des Signalweges. Wurden Zellen, die TNFR1 Δ ADD exprimieren, mit $\text{TNF}\alpha$ stimuliert, kam es nicht zu einer Aktivierung des NF- κ B Signalweges. Es war also auch keine Stimulierung des endogenen Rezeptors zu beobachten, wie dies bei der Transfektion mit dem Leervektor der Fall war. TNFR1 Δ ADD hatte also einen dominant-negativen Effekt auf die Stimulierung des endogenen Rezeptors. Die ektopische Expression von TNFR1-CTAR2 führte zu einer Aktivierung des NF- κ B Signalweges (8,5-fach). Im Fall der Expression von TNFR1-CTAR2 mit zusätzlicher $\text{TNF}\alpha$ -Stimulierung kam es ebenfalls zu einer Aktivierung des Signalweges (8,4-fach). Allerdings war die Aktivierung nicht so stark, wie man sie im Fall einer Addition der konstitutiven Aktivität von TNFR1-CTAR2 und der Stimulierung des endogenen Rezeptors erwarten würde. Auch hier scheint es also zu Interferenzen zwischen TNFR1-CTAR2 und dem endogenen Rezeptor zu kommen.

Die Aktivierung des NF- κ B Signalweges durch die Expression von TNFR1-CTAR2 zeigte, dass die Aminosäuren 370-386 von LMP1 auch im Kontext des Wildtyp-TNFR1 ausreichend sind, um diesen Signalweg zu induzieren. Dies bestätigte, dass es sich bei den Aminosäuren 370-386 von LMP1 um eine eigenständige Domäne handelt, die sowohl im LMP1-TNFR1 sowie auch im TNFR1 Kontext funktional ist. Allerdings zeigte sich auch, dass das Konstrukt TNFR1 Δ ADD einen dominant negativ Effekt auf die Stimulierung des endogenen Rezeptors durch $\text{TNF}\alpha$ hatte und es auch im Fall von TNFR1-CTAR2 zu Interferenzen mit dem endogenen Rezeptor kam. Es war also anzunehmen, dass es in der Zelle zu Heterokomplexen aus den ektopisch exprimierten Rezeptorkonstrukten und dem endogenen Rezeptor kam.

Daher war es nötig, die Signaltransduktion der WT-Konstrukte in einer Zelllinie zu untersuchen, die keinen endogenen TNF-Rezeptor exprimiert.

4.5.2 Untersuchungen in TNFR1/2^{-/-} Zellen

Um die Aktivierung der Signaltransduktion durch TNFR1-CTAR2 ohne eine Wechselwirkung mit dem endogenen TNF-Rezeptor untersuchen zu können, sollte eine Zelllinie verwendet werden, die keinen endogenen TNF-Rezeptor exprimiert. Da die meisten im Labor verwendeten Zelllinien vor allem den TNFR1 endogen exprimieren (Schneider, 2005), ist in diesen Zelllinien eine Untersuchung der Signaltransduktion durch TNFR1-CTAR2 nach Stimulierung mit TNF α nicht möglich. Daher wurden weitere Experimente in einer TNFR1 und 2 defiziente Mausfibroblasten-Zelllinie durchgeführt.

4.5.2.1 Expression und Membranlokalisierung

Beim Einsatz der bisher verwendeten pHEBO-Vektoren in TNFR1/2^{-/-} Zellen konnte keine Expression der TNFR1-Konstrukte nachgewiesen werden. Ebenso gelang es nicht, verschiedenste andere Proteine zu exprimieren, die in demselben Vektor vorlagen (Daten nicht gezeigt). Es konnte schließlich empirisch gezeigt werden, dass der Expressionsvektor pRK5 für die Expression verschiedener Proteine in diesen Zellen geeignet ist (Daten nicht gezeigt). Daher wurden die drei Konstrukte in den Expressionsvektor pRK5 umklontiert.

Durch eine Nutzung des Vektors pRK5 als Expressionsvektor war es möglich, die drei Proteine TNFR1, TNFR1 Δ DD sowie TNFR1-CTAR2 in der TNFR1/2 defizienten Mausfibroblasten-Zelllinie zu exprimieren (Abb. 4.15). Am Anfang der Versuche mit TNFR1/2^{-/-} Zellen wurden die Zellen, wie alle anderen adhären Zellen auch, mit Hilfe von Lipofektion transfiziert. Im Verlauf der weiteren Versuche zeigte sich allerdings bei der Transfektion durch Elektroporation eine deutlich höhere Effizienz, die bei etwa 45 % lag. Daher wurde ab diesem Zeitpunkt die Methode der Elektroporation zur Transfektion verwendet. Der Nachweis der TNFR1-Konstrukte erfolgte mittels eines TNFR1-spezifischen Antikörpers (H5) im Immunblot.

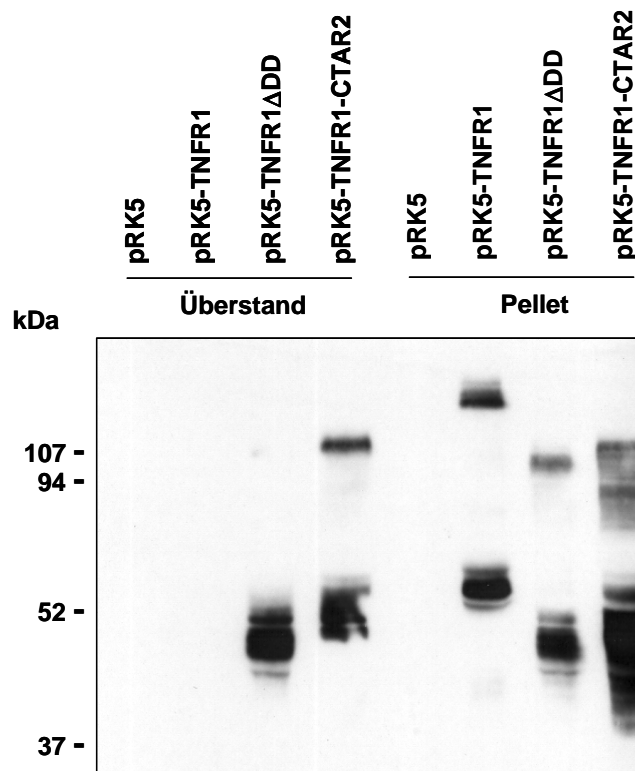


Abb. 4.15 Expression in TNFR1/2 defizienten Mausfibroblasten

1×10^7 Zellen wurden mit 3 μg der angegebenen Expressionsplasmide, 2 μg pRK5-HA-JNK1 und 2 μg eines Expressionsplasmids für p35 elektroporiert. Die Gesamt-DNA-Menge wurde mit Lachsspermien-DNA auf 20 μg aufgefüllt. Die Transfektion der Zellen erfolgte durch Elektroporation mit 250 V und 975 μF . 24 h nach der Transfektion wurde die Expression der Konstrukte, wie in Abschnitt 3.6.1 beschrieben, analysiert. Zum Nachweis der Konstrukte wurde der TNFR1-Antikörper H-5 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) verwendet.

Das Verteilungsmuster der einzelnen Konstrukte in Überstand und Pellet unterschied sich etwas von dem Muster, das in HEK293 beobachtet wurde (siehe Abb. 4.13). In Abb. 4.15 war zu sehen, dass der TNFR1 nur im Triton-X100 unlöslichen Pellet nachgewiesen werden konnte. TNFR1 Δ DD sowie TNFR1-CTAR2 konnten sowohl im Überstand als auch im Pellet detektiert werden.

In HEK293 Zellen konnte keine Stimulierung des TNFR1 durch TNF α gezeigt werden (siehe Abb. 4.14). Wie bereits angesprochen, könnte ein möglicher Grund sein, dass der Rezeptor nicht auf der Zelloberfläche exprimiert wurde. Als nächster Schritt sollte daher geklärt werden, ob die Rezeptorkonstrukte auf der Zelloberfläche von TNFR1/2 $^{-/-}$ Zellen exprimiert werden.

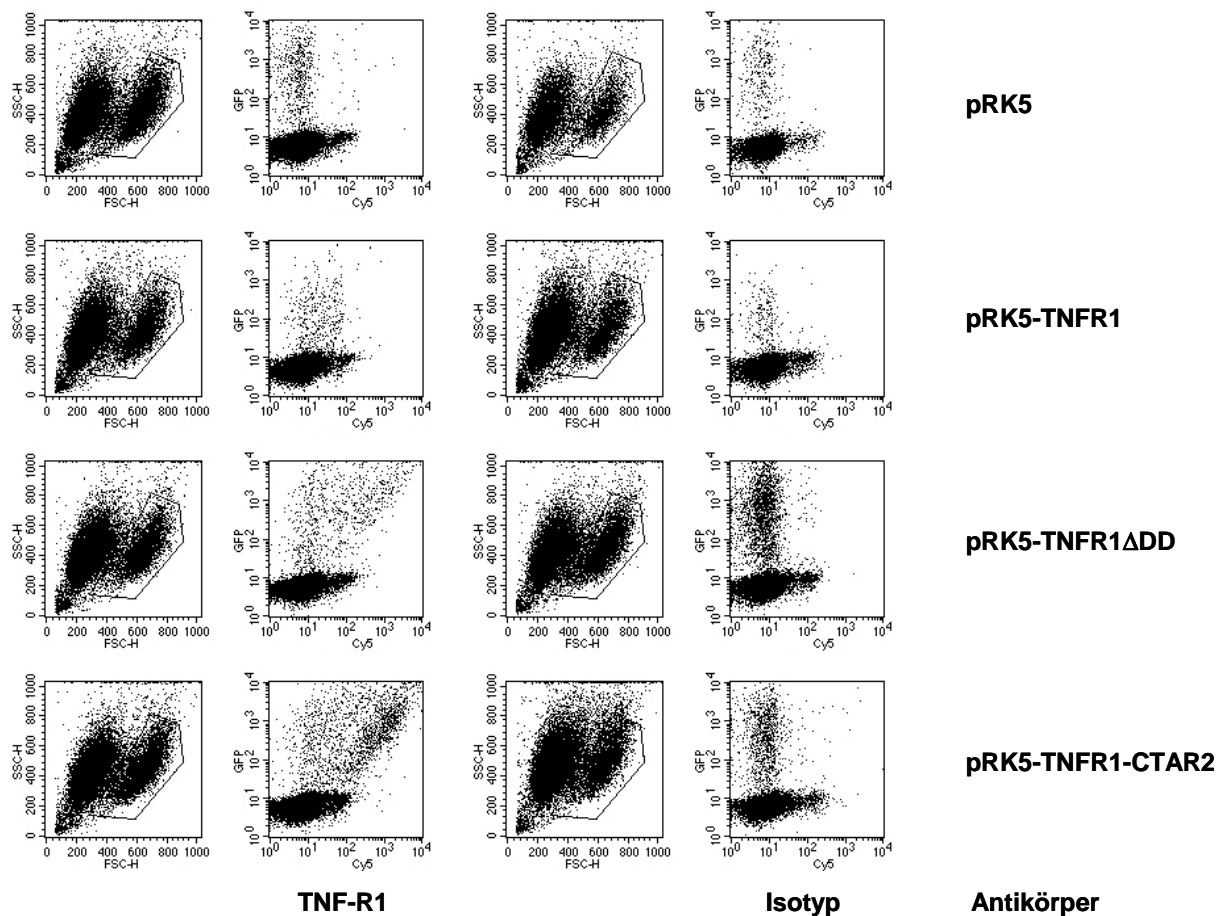


Abb. 4.16: TNFR1-CTAR2 und TNFR1 Δ DD werden auf der Zelloberfläche exprimiert

TNFR1/2 defiziente Mausfibroblasten wurden mit 1,5 μ g der angegebenen Expressionsvektoren, 1 μ g eines GFP-Expressionsvektor sowie 0,5 μ g eines p35-Expressionsvektors mittels Lipofektion transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben gefärbt. Als Primärantikörper wurde der α -TNFR1-Antikörper H-5 verwendet, als Isotypkontrolle der α -ERK2-Antikörper D-2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Als Sekundärantikörper wurde ein CyTM5-konjugierter α -Maus-Antikörper verwendet (Jackson ImmunoResearch). In der ersten sowie dritten Spalte sind FACS-Profile gezeigt, in denen SSC gegen FSC aufgetragen wurde. Die dort markierten Zellen stellten die Population der überlebenden Zellen dar. Von den Zellen dieser Population wurde dann jeweils in der zweiten und vierten Spalte GFP gegen CyTM5 aufgetragen.

Um die Lokalisierung der Konstrukte auf der Zelloberfläche analysieren zu können, wurde ein Antikörper (H5, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) verwendet, der ein Epitop in der extrazellulären Domäne des TNFR1 erkennt. Zur Detektion diente ein CyTM5-konjugierter Sekundärantikörper. Nach dem Färben der Zellen (siehe Abschnitt 3.2.5) wurden sie mittels Durchflusszytometrie analysiert. Um auch in diesem Experiment keinen Hintergrund durch endogenen Rezeptor zu bekommen, wurden die TNFR1/2-defizienten Mausfibroblasten verwendet. Die Zellen wurden mit Expressionsvektoren für die verschiedenen Konstrukte

bzw. pRK5-Leervektor als Kontrolle transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit pEGFP-C1 transfiziert. Als Isotypkontrolle wurde anstelle des spezifischen α -TNFR1-Antikörpers der Antikörper α -ERK2 verwendet.

Wie in Abb. 4.16 zu sehen, konnte eine Expression von TNFR1-CTAR2 und TNFR1 Δ DD auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Bei den Zellen, die positiv für GFP und CyTM5 waren, konnte eine Korrelation zwischen der Intensität des GFP-Signals und des CyTM5-Signals beobachtet werden. Dies bedeutet, dass die Menge der GFP-Expression proportional zu der Menge der exprimierten TNFR1-Konstrukte war. Allerdings konnte auch eine GFP-positive Population beobachtet werden, die CyTM5-negativ war und daher kein TNFR1-Konstrukt auf der Oberfläche exprimiert. Der TNFR1 Wildtyp konnte nicht auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund dafür war, dass nur die lebenden Zellen nach GFP und CyTM5 aufgetragen wurden, da die sterbenden und toten Zellen eine hohe Eigenfluoreszenz in dem Kanal aufwiesen, in dem auch die CyTM5 Fluoreszenz analysiert wurde. Die Überexpression des TNFR1 Wildtyp könnte dazu geführt haben, dass es in den transfizierten Zellen zur Induktion von Zelltod gekommen ist. Ein Hinweis darauf ist auch die Tatsache, dass im TNFR1-Ansatz deutlich weniger und schwächer GFP-positive Zellen vorhanden waren. Auf diese Beobachtung soll zu einem späteren Zeitpunkt noch genauer eingegangen werden.

Es konnte also gezeigt werden, dass TNFR1, TNFR1 Δ DD und TNFR1-CTAR2 bei Verwendung von pRK5 als Expressionsvektor in TNFR1/2^{-/-} Zellen exprimiert werden können. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass TNFR1 Δ DD und TNFR1-CTAR2 auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Diese Konstrukte und die TNFR1/2^{-/-} Zellen stellen also ein System dar, in dem nun die Signaltransduktion der verschiedenen Rezeptorkonstrukte näher charakterisiert werden kann.

4.5.2.2 Aminosäuren 370-386 von LMP1 sind im TNFR1-Kontext ausreichend für die Aktivierung von Signalwegen

In den TNFR1/2^{-/-} Zellen sollte nun die Induktion der Signaltransduktion nach Expression der TNFR1-Konstrukte untersucht werden. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B wurde mit Hilfe von Reportergeräten analysiert.

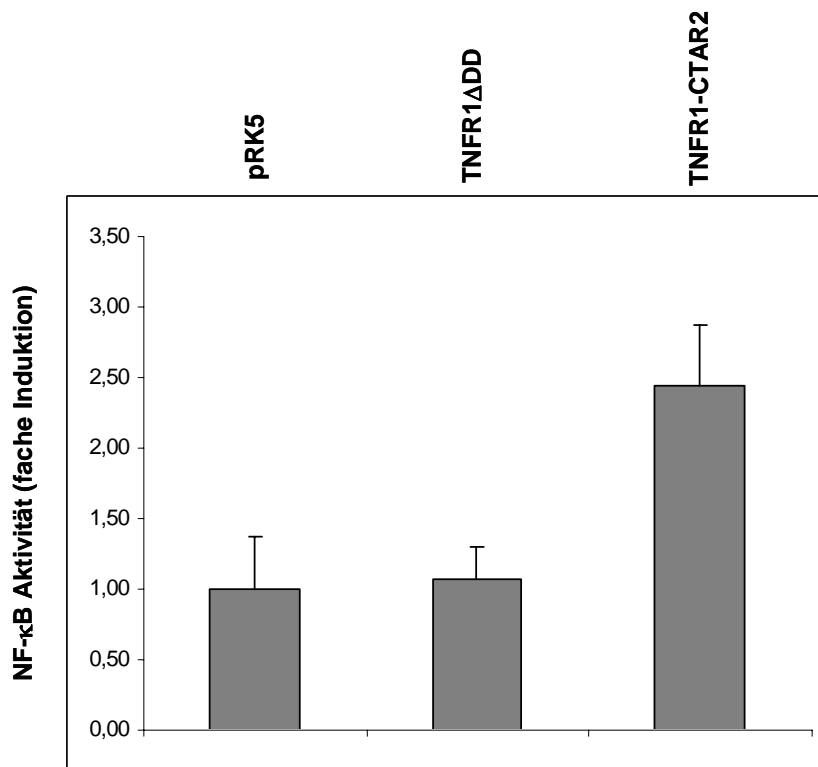


Abb. 4.17: Die Aminosäuren 370-386 von CTAR2 sind ausreichend, um im TNFR1-WT Kontext den NF-κB Signalweg zu induzieren

1×10^7 TNFR1/2^{-/-} Zellen wurden mit 3 μg der angegebenen Expressionsplasmide, 3 μg des Reporterplasmids κB-CONA-Luc und 2 μg pCMV-RL transfiziert. Die Gesamt-DNA-Menge wurde mit Lachsspermien-DNA auf 20 μg aufgefüllt. Die Transfektion der Zellen erfolgte durch Elektroporation mit 250 V und 975 μF. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte mit Hilfe des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems (Promega). Die Werte sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten mit je zwei unabhängigen Transfektionen.

Wie in Abbildung 4.17 zu sehen ist, führte die Expression von TNFR1-CTAR2 in TNFR1/2-defizienten Mausfibroblasten im Vergleich zum Leervektor sowie zu TNFR1ΔDD zu einer 3,4-fachen Induktion des NF-κB Signalweges. Diese Induktion ergab sich alleine durch die Überexpression des Konstruktes ohne weitere TNFα Stimulierung. Die messbare NF-κB Aktivität nach Expression des TNFR1 lag deutlich unter der des pRK5 Leervektor und TNFR1ΔDD. Es war zu beobachten, dass die Expression des TNFR1 zu einer stark verringerten Aktivität des Kontrollreportergens pCMV-RL führte (Daten nicht gezeigt). Es war anzunehmen, dass es durch die Expression des TNFR1 nicht nur zu einer stark verringerten Aktivität des Kontrollreportergens kam, sondern auch zu einer stark verringerten Aktivität des NF-κB Reportergens. Obwohl bei allen Werten eine Standardisierung mittels

der internen Kontrolle pCMV-RL durchgeführt wurde, war im Fall des TNFR1 die Aktivität des Kontrollreportergens so gering, dass eine Standardisierung nicht zu einem sinnvollen Ergebnis führte. Daher konnte in diesem Versuch über die Aktivierung des NF- κ B Signalweges durch die Expression von TNFR1 keine Aussage getroffen werden. Wie auch schon bei der Abb. 4.16 ist es möglich, dass es auch hier durch die ektopische Expression des TNFR1 zur Induktion von Zelltod kam. Dies würde den starken Einbruch in der Aktivität der Reportergene erklären. Bevor der Einfluss einer Stimulierung der Konstrukte mit TNF α untersucht werden kann, muss ein Expressionslevel für den TNFR1 gefunden werden, bei dem es nicht zu konstitutiver Aktivität und Induktion von Zelltod kommt. Dies war leider im Rahmen dieser Doktorarbeit aus zeitlichen Gründen nicht möglich.

Es konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren 370-386 von LMP1 im TNFR1 Kontext ausreichend sind, um den NF- κ B Signalweg zu induzieren. Dabei konnte ohne TNF α Stimulierung eine konstitutive Aktivität beobachtet werden, die alleine durch die ektopische Expression von TNFR1-CTAR2 vermittelt wurde. Diese Induktion verläuft unabhängig von der Expression eines endogenen TNFR1 Wildtyps. Anschließend sollte untersucht werden, ob die Aminosäuren 370-386 von LMP1 wie im LMP1-TNFR1-Kontext auch im TNFR1-Kontext ausreichend sind, um den JNK1/AP-1 Signalweg zu induzieren. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 wurde wiederum mit Hilfe eines transienten JNK1-Immunkomplex-Kinaseversuchs untersucht.

Wie in Abbildung 4.18 zu sehen ist, führte die Expression von TNFR1 Δ DD nur zu einer sehr geringen Aktivierung des JNK1 Signalweges. Es kam kaum zu einer c-Jun-Phosphorylierung. Wie in der Expressionskontrolle von JNK1 zu sehen, bewirkt die Expression des TNFR1 eine sehr stark verminderte Expression von JNK1. Auch hier zeigte sich, wie auch schon bei der Untersuchung des NF- κ B Signalweges, dass die ektopische Expression des TNFR1 wohl zytotoxisch wirkte und die transfizierten Zellen zum Zeitpunkt des Experiments bereits gestorben waren. Dies war eine mögliche Ursache dafür, dass die Expression des TNFR1 nicht zur c-Jun-Phosphorylierung führte. Durch die ektopische Expression von TNFR1-CTAR2 kam es zu einer 5,4-fachen Induktion des JNK1/AP-1-Signalweges. Als Positivkontrolle wurde MEKK1 gewählt, welches in HEK293 Zellen zu einer sehr starken Aktivierung des JNK1 Signalweges führt (Daten nicht gezeigt). Wurden die Zellen nach der Expression der Rezeptorkonstrukte noch mit TNF α stimuliert, konnte keine weitere Stimulierung des JNK1 Signalweges erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

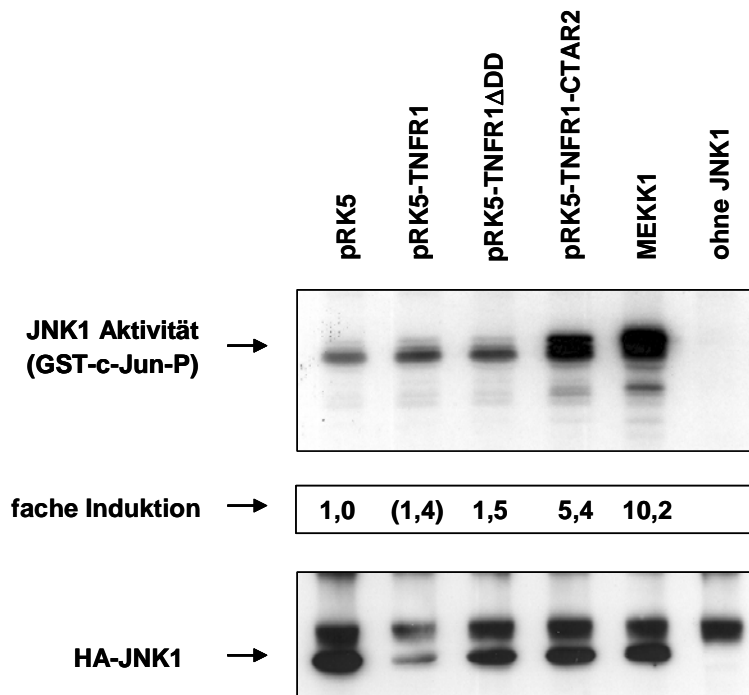


Abb. 4.18: Die Aminosäuren 370-386 von CTAR2 sind ausreichend um im TNFR1-WT Kontext den JNK1 Signalweg zu induzieren

1×10^7 Zellen wurden mit 3 μ g der angegebenen Expressionsplasmide, 2 μ g pRK5-HA-JNK1 und 2 μ g eines Expressionsplasmids für p35 transfiziert. Die Gesamt-DNA-Menge wurde mit Lachsspermien-DNA auf 20 μ g aufgefüllt. Die Transfektion der Zellen erfolgte durch Elektroporation mit 250 V und 975 μ F. 24 h nach der Transfektion wurde ein *in vitro*-Immunkomplex-Kinaseversuch (siehe Abschnitt 3.6.2) durchgeführt. Für die Immunpräzipitation wurden Protein G-Sepharose Kügelchen mit kovalent gebundenem 3F10 Antikörper verwendet. *In vitro* phosphoryliertes GST-c-Jun wurde durch Autoradiographie nachgewiesen. Als Transfektions- und Ladekontrolle wurde auf derselben Membran das präzipitierte HA-JNK1 mit dem JNK1-spezifischen Antikörper C-17 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) nachgewiesen. Die Quantifizierung der GST-c-Jun-Phosphorylierung erfolgte mittels Phosphoimager.

Die Aminosäuren 370-386 von LMP1 bilden also eine eigenständige Signaldomäne und sind auch im TNFR1-Wildtyp Kontext ausreichend, um den JNK1 Signalweg zu induzieren. Auch diese Aktivierung ist unabhängig von einem endogenen TNFR1. Hiermit konnten die Ergebnisse, die im LMP1-TNFR1-Kontext gewonnen wurden, bestätigt und erweitert werden.

4.5.2.3 Induktion von Zelltod

Die Beobachtungen im NF- κ B-Reporter-genversuch sowie im JNK1-Immunkomplex-Kinaseversuch wiesen darauf hin, dass die ektopische Expression von TNFR1 für die TNFR1/2^{-/-} Zellen toxisch ist. Im Reporter-genversuch führte die Überexpression von TNFR1 zu einem sehr deutlichen Einbruch in der Aktivität des internen Kontrollreporter-genkonstruktes pCMV-RL. Im JNK1-Kinaseversuch führte sie zu einem Einbruch der JNK1-Expression. Der Einfluss der Expression von TNFR1 soll nun näher analysiert und quantifiziert werden. Außerdem soll der Einfluss von TNFR1-CTAR2 auf die Zellviabilität untersucht werden, nachdem gezeigt werden konnte, dass dieses Konstrukt den NF- κ B- und den JNK1-Signalweg aktiviert. Hierzu wurden TNFR1/2^{-/-} Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden sowie einem GFP-Expressionsplasmid cotransfiziert. Die Expression von GFP wurde mit Hilfe von Durchflusszytometrie analysiert. Nach Cotransfektion der Zellen mit einem GFP-Expressionsplasmid und pRK5-Leervektor betrug die Anzahl der GFP-positiven Zellen etwa 45 %, was die Transfektionseffizienz widerspiegelte. Durch Cotransfektion mit einem TNFR1-Expressionsplasmid sank die Anzahl der GFP-positiven Zellen auf 30 %. Die Cotransfektion mit dem Kontrollplasmid pRK5-TNFR1 Δ DD hatte keinen negativen Einfluss auf die Anzahl der GFP-positiven Zellen. Auch die Coexpression von TNFR1-CTAR2 führte nicht zu einer Reduktion der Anzahl GFP-positiver Zellen. Auf die Anzahl der Zellen mit starker GFP-Expression (R3) hat die Coexpression vom TNFR1 einen noch deutlicheren Einfluss. Hier sinkt die Anzahl der stark GFP-positiven Zellen um den Faktor 10 von etwa 15 % auf 1,4 %. Auch hier zeigt sich kein Einfluss einer Coexpression von TNFR1-CTAR2 (Abb. 4.19). Es konnte durch diesen Versuch bestätigt werden, dass die ektopische Expression von TNFR1 eine zytotoxische Wirkung auf die TNFR1/2-defizienten Zellen hat. Dies ist wahrscheinlich die Erklärung dafür, dass die Expression des TNFR1 nicht zu einer Induktion des NF- κ B- und des JNK1-Signalweges führte. In Abschnitt 4.4 konnte gezeigt werden, dass die Expression des konstitutiv aktiven LMP1-TNFR1 Apoptose induziert. Außerdem ist bekannt, dass der TNFR1 Apoptose und Nekrose induzieren kann (Zheng et al., 2006). Daher ist anzunehmen, dass es sich bei der zytotoxischen Wirkung der ektopischen Expression des TNFR1 ebenfalls um apoptotische sowie eventuell nekrotische Vorgänge handelt. Die Expression von TNFR1-CTAR2 führte nicht zu einer Reduktion der GFP-Expression. Allerdings führte die Expression derselben Menge nach ebenfalls 24 h zu einer Induktion des NF- κ B und des JNK1 Signalweges. Daraus konnte geschlossen werden, dass TNFR1-CTAR2 funktional ist, aber keinen Zelltod induziert.

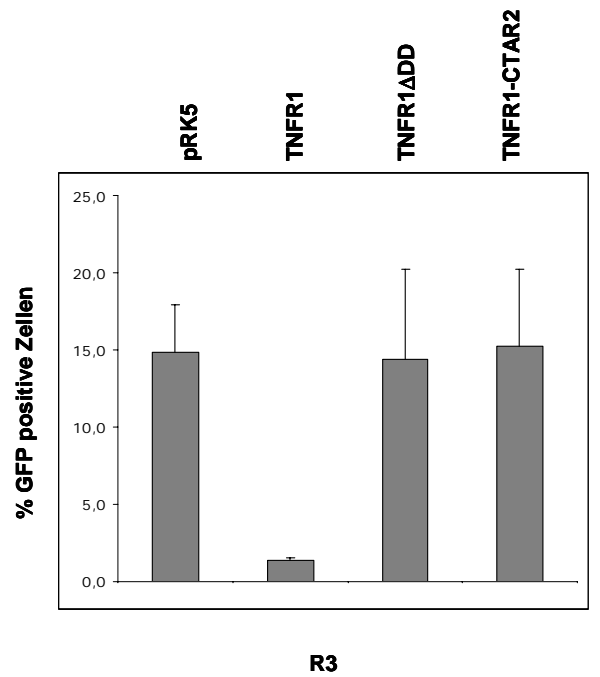
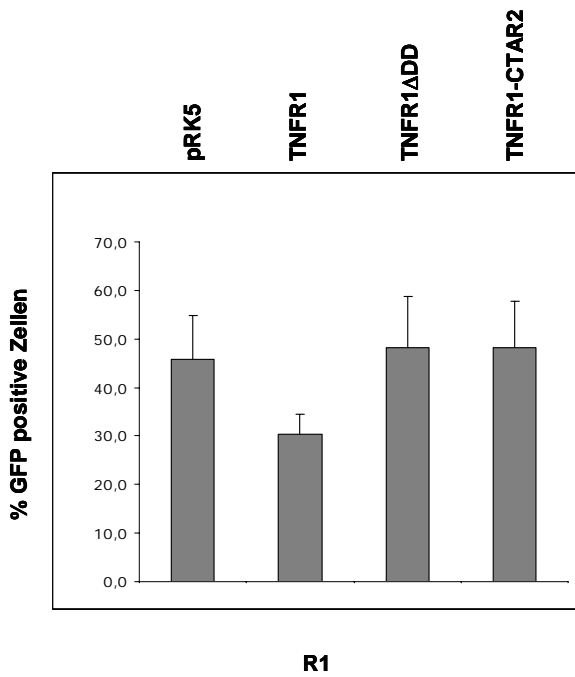
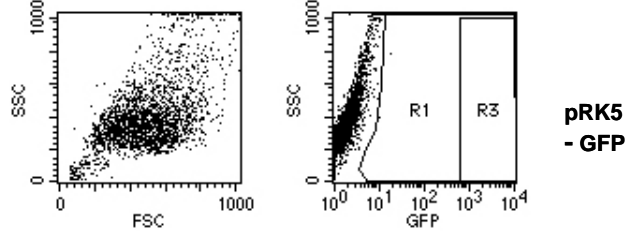
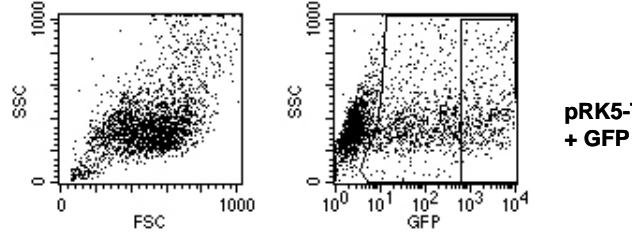
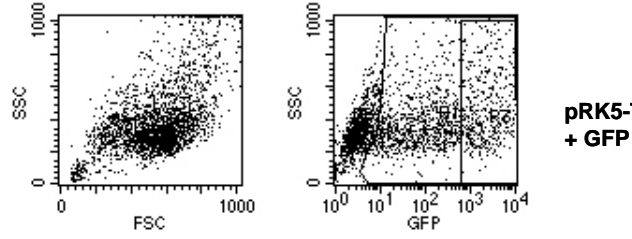
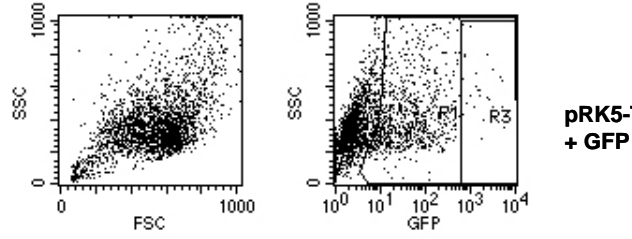
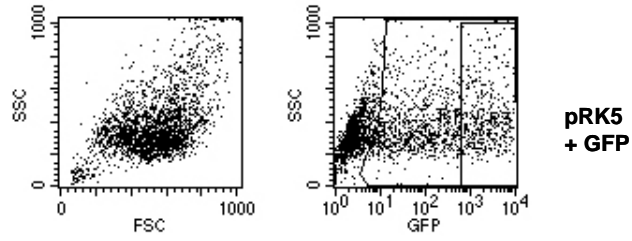


Abb. 4.19: Die Expression von TNFR1 führt zu einer stark verringerten Anzahl an GFP-positiven Zellen

1×10^7 Zellen wurden mit 3 μg der angegebenen Expressionsplasmide sowie 3 μg eines GFP-Expressionsplasmids elektroporiert. Die Gesamt-DNA-Menge wurde mit Lachsspermien-DNA auf 20 μg aufgefüllt. Die Transfektion der Zellen erfolgte durch Elektroporation mit 240 V und 975 μF . Die Anzahl der GFP-positiven Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Gesamtanzahl der GFP-positiven Zellen wurde durch R1 festgelegt, die der stark GFP-positiven Zellen durch R3. Das FACS-Profil zeigt eine von drei unabhängigen Transfektionen. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit Lachsspermien-DNA transfiziert wurden und daher kein GFP exprimierten.

Die TRADD-Bindedomäne von LMP1 wurde in Domain Swapping-Experimenten auf LMP1-TNFR1 und TNFR1 übertragen. Es konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren 370-386 von LMP1 eine eigenständige Domäne bilden, die ausreichend ist, um den NF- κB und den JNK1 Signalweg zu induzieren. Dies konnte sowohl im LMP1-TNFR1-Kontext als auch im TNFR1-WT-Kontext nachgewiesen werden. Unabhängig vom Rezeptorkontext zeigt diese Domäne eine LMP1-spezifische Signaltransduktion in Bezug auf Beteiligung von Adaptermolekülen und in Bezug auf Induktion von Apoptose. Die TRADD-Bindestelle von LMP1 trägt also selbst intrinsisch die Art der Signaltransduktion in sich und legt den biologischen Phänotyp, der durch diese Signaltransduktion induziert wird, fest. Der Rezeptorkontext spielt dabei keine Rolle, der LMP1-spezifische Typ der Signaltransduktion wird zusammen mit den Aminosäuren 370-386 von LMP1 übertragen.

4.6 TRAF7

Die Familie der TRAFs (*TNF-receptor associated factor*) umfasst sieben Mitglieder (TRAF1 bis 7). Wie in der Einleitung beschrieben, spielen sie unter anderem eine Rolle in der Signaltransduktion des TNFR sowie von LMP1 und CD40. 2004 wurde TRAF7 erstmals beschrieben (Bouwmeester et al., 2004; Xu et al., 2004). Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte TRAF7 näher untersucht werden.

4.6.1 Expression von TRAF7

Xu *et al.* konnten eine TRAF7-Expression in allen von ihnen untersuchten menschlichen Geweben wie zum Beispiel Herz, Skelettmuskulatur, Niere und Leber zeigen (Xu et al., 2004). Dies spricht bereits für eine ubiquitäre Expression von TRAF7. Die Expression von TRAF7 in verschiedenen in unserem Labor verwendeten Zelllinien sollte nun untersucht werden. Hierzu wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit eine RT-PCR verwendet, um TRAF7 auf der mRNA-Ebene nachweisen zu können.

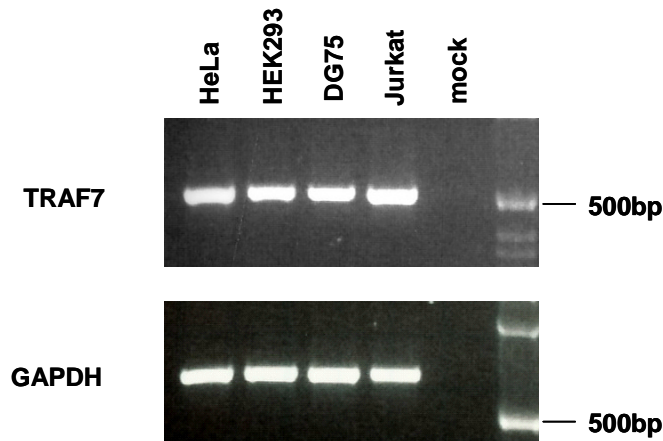


Abb. 4.20: TRAF7 wird in allen untersuchten Zelllinien exprimiert

Die Genexpression von TRAF7 wurde auf mRNA Ebene untersucht. Aus HeLa, HEK293, DG75 und Jurkat Zellen wurde RNA isoliert und mit Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. TRAF7-mRNA wurde durch PCR mit spezifischen Primern nachgewiesen. Als Kontrolle dienten spezifische Primer für den Nachweis von GAPDH-mRNA.

Aus den Zelllinien HeLa, HEK293, DG75 und Jurkat wurde RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und TRAF7 in einer PCR-Reaktion durch spezifische Primer nachgewiesen. Als Kontrolle dienten Primer, die spezifisch für GAPDH sind. Es konnte gezeigt werden, dass TRAF7 in allen untersuchten Zelllinien vorhanden ist und in vergleichbaren Mengen exprimiert wird (Abb. 4.20).

4.6.2 Klonierung von TRAF7 und Deletionsmutanten

4.6.2.1 Klonierung von TRAF7 aus einer HEK293 cDNA

Um die Funktion eines Proteins näher zu untersuchen, ist es von großem Nutzen das Protein in Zellen exprimieren zu können. Da kein TRAF7-Expressionsvektor erhältlich war, sollte TRAF7 aus einer cDNA kloniert werden. Wie in Abschnitt 3.5.4 genauer beschrieben, wurde der offene Leserahmen für TRAF7 aus einer HEK293 cDNA mit Hilfe von PCR amplifiziert. Dieses PCR-Produkt wurde nach Subklonierung in den Vektor pCRII.1 (TA-Klonierung) in den Expressionsvektor pRK5 umklont. Zur besseren Nachweisbarkeit des Proteins wurde ein N-terminales Flag- bzw. Hämagglutinin-Epitop fusioniert.

4.6.2.2 Klonierung von TRAF7-Deletionsmutanten

Wie bereits in der Einleitung (siehe 1.5) beschrieben, ist TRAF7 aus einzelnen Domänen aufgebaut. TRAF7 besteht aus einer RING-Finger Domäne, einer Zink-Finger Domäne, einer *Coiled-Coil* (CC) Domäne sowie einer Domäne mit sieben WD40 Wiederholungen. Zum Teil konnten diesen Domänen bereits einzelne Funktionen zugeordnet werden, zum Teil ist die Bedeutung der Domänen noch nicht bekannt. Um die Funktionen der einzelnen Domänen näher untersuchen zu können, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit verschiedene Deletionsmutanten kloniert.

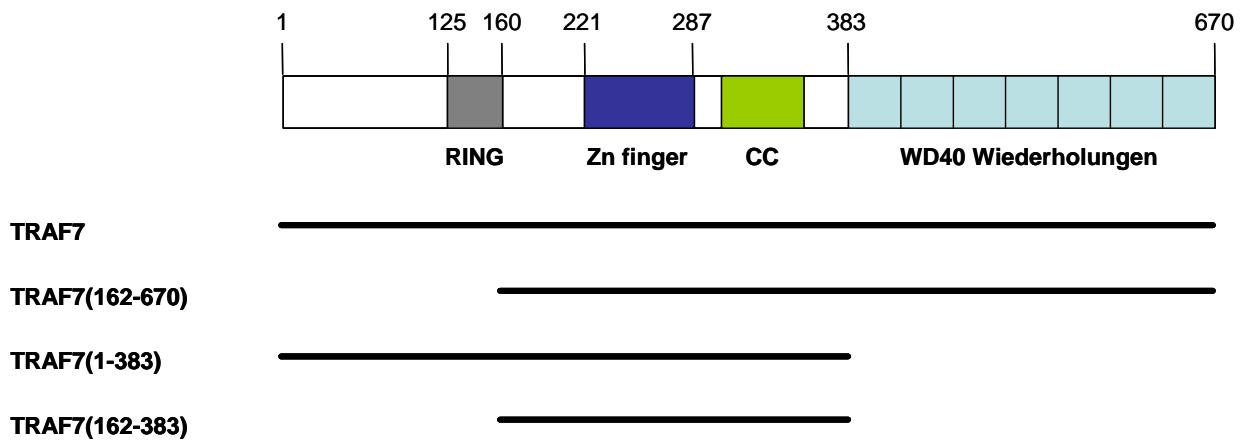


Abb. 4.21: Schematische Darstellung der TRAF7-Deletionsmutanten

TRAF7 besteht aus vier Domänen, der RING-Finger Domäne, der Zink-Finger Domäne, der *Coiled-Coil* Domäne (CC) und sieben WD40 Wiederholungen. Die einzelnen Mutanten sind im Text näher beschrieben.

In Abb. 4.21 sind die einzelnen Deletionsmutanten schematisch dargestellt. Es wurden jeweils einzelne Domänen deletiert, um dann Rückschlüsse auf die Funktion der einzelnen Domänen ziehen zu können. Bei der Mutante TRAF7(162-670) wurde der N-terminale RING-Finger deletiert. Im Fall von TRAF2 und TRAF6 wurden Mutanten, bei denen der RING-Finger deletiert wurde, als dominant negative Mutanten verwendet (Rothe et al., 1995; Schultheiss et al., 2001). Diese dominant negativen Mutanten haben die Eigenschaft, dass sie zwar noch mit den bekannten TRAF-bindenden Proteinen interagieren können, aber es nicht zu einer Weiterleitung von Signalen kommt (Arch et al., 1998; Inoue et al., 2000). Bei der Mutante TRAF7(1-383) fehlen die C-terminalen WD40 Wiederholungen. Da TRAF7 das einzige Mitglied der TRAF-Familie ist, in dem WD40 Wiederholungen vorhanden sind, sollte auch

diese Domäne deletiert werden, um ihre Funktion näher untersuchen zu können. Die Mutante TRAF7(162-383) besteht nur aus dem Zink-Finger und der CC-Domäne, der RING-Finger und die WD40 Wiederholungen fehlen. Alle Mutanten tragen zum Nachweis im Immunblot ein N-terminales Flag-Epitop.

4.6.3 Expression von TRAF7 und Mutanten

Als nächstes sollte untersucht werden, ob TRAF7 und die TRAF7-Mutanten nach der Transfektion der klonierten Expressionsvektoren in Zelllinien exprimiert werden. Die Expression der Konstrukte erfolgte in HEK293 sowie in HeLa Zellen. Bis zum Ende dieser Arbeit war kein kommerzieller Antikörper erhältlich, der endogenes TRAF7 im Immunblot nachweisen konnte. In Zusammenarbeit mit Elisabeth Kremmer sollte daher ein monoklonaler TRAF7-spezifischer Antikörper in Ratten generiert werden. Erste Antikörper waren zwar in der Lage, überexprimiertes TRAF7 Protein zu erkennen. Bis zum Abschluss dieser Arbeit gelang es allerdings nicht, einen Antikörper zu generieren, der auch das endogene Protein erkannte. Daher erfolgte der Nachweis von TRAF7 und der TRAF7-Mutanten mittels eines spezifischen Antikörpers gegen das N-terminale Flag- bzw. HA-Epitop.

In Abb. 4.22 (A) ist die Expression von TRAF7 zu sehen. Der Nachweis des Proteins erfolgte mittels eines Flag- bzw. HA-spezifischen Antikörpers. In Abb. 4.22 (B) ist die Expression der TRAF7-Deletionsmutanten gezeigt. Es ist zu sehen, dass alle Konstrukte exprimiert und über ihr N-terminales Epitop nachgewiesen werden konnten. TRAF7 und TRAF7(162-670) sind im Immunblot vor allem als hochmolekulare Banden zu sehen. Dieses Verhalten von TRAF7 wurde bereits in der Literatur beschrieben. Dort konnte auch gezeigt werden, dass es sich bei den hochmolekularen Banden um stark modifizierte Formen handelt. Als Modifikationen wurden Ubiquitinierung und Phosphorylierung nachgewiesen (Bouwmeester et al., 2004). Im Laufe dieser Doktorarbeit wurden Variationen im Mengenverhältnis zwischen der hochmolekularen Form und der Form, die auf Höhe des theoretischen Molekulargewichts (ca. 67 kDa) läuft, beobachtet. Gründe für diese Variationen konnten nicht ermittelt werden. TRAF7(1-383) wies eine sehr starke Expression auf und trat im Immunblot als Doppelbande auf. Im Vergleich dazu wurde TRAF7(162-383) deutlich schwächer exprimiert. Es lief in der SDS-PAGE als Einzelbande auf der erwarteten Höhe und ist daher wohl nicht modifiziert.

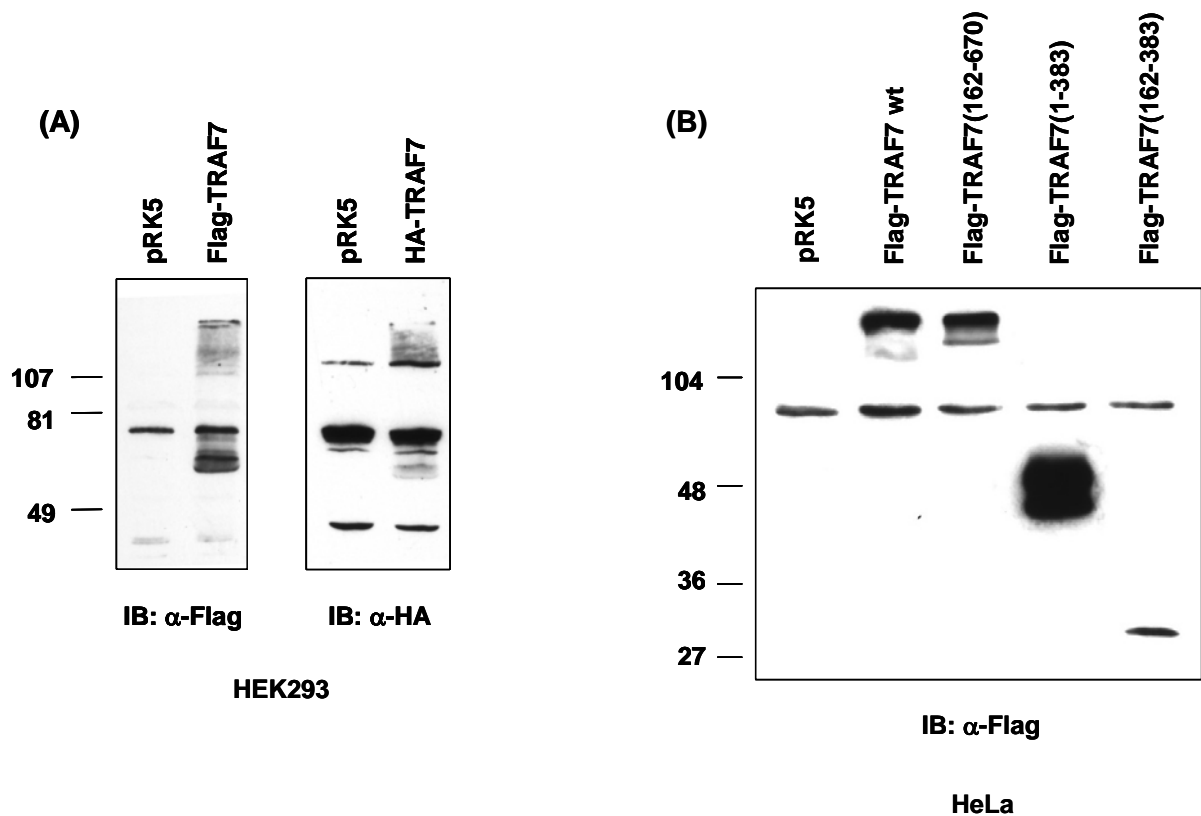


Abb. 4.22: Expression von TRAF7 und Mutanten

(A) HEK293 Zellen wurden mit 3 µg pRK5, pRK5-Flag-TRAF7 oder pRK5-HA-TRAF7 transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Proteinexpression im Überstand mittels Immunblot analysiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch einen Flag-spezifischen Antikörper (M2, Stratagene) und den HA-spezifischen Antikörper 12CA5 (Roche).

(B) HeLa Zellen wurden mit 1 µg pRK5, pRK5-Flag-TRAF7, pRK5-Flag-TRAF7(162-670), pRK5-Flag-TRAF7(1-383) oder pRK5-Flag-TRAF7(162-383) transfiziert. Zusätzlich wurden sie noch mit 1 µg eines crmA-Expressionsplasmides und 1 µg pRK5 transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Proteinexpression im Überstand mittels Immunblot analysiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch einen Flag-spezifischen Antikörper (M2, Stratagene).

4.6.4 Phosphorylierung von TRAF7(1-383)

Wie in Abb. 4.22 (B) zu sehen, tritt TRAF7(1-383) im Immunblot als Doppelbande auf. Es konnte bereits gezeigt werden, dass TRAF7 ein Phosphoprotein darstellt (Bouwmeester et al., 2004). Daher sollte untersucht werden, ob eine Phosphorylierung der Grund für die Doppelbande ist. Die TRAF7-Mutanten wurden in HEK293 und in HeLa Zellen exprimiert und über das Flag-Epitop immunpräzipitiert. Die Analyse der Phosphorylierung erfolgte mittels eines Phospho-Threonin-spezifischen Antikörpers.

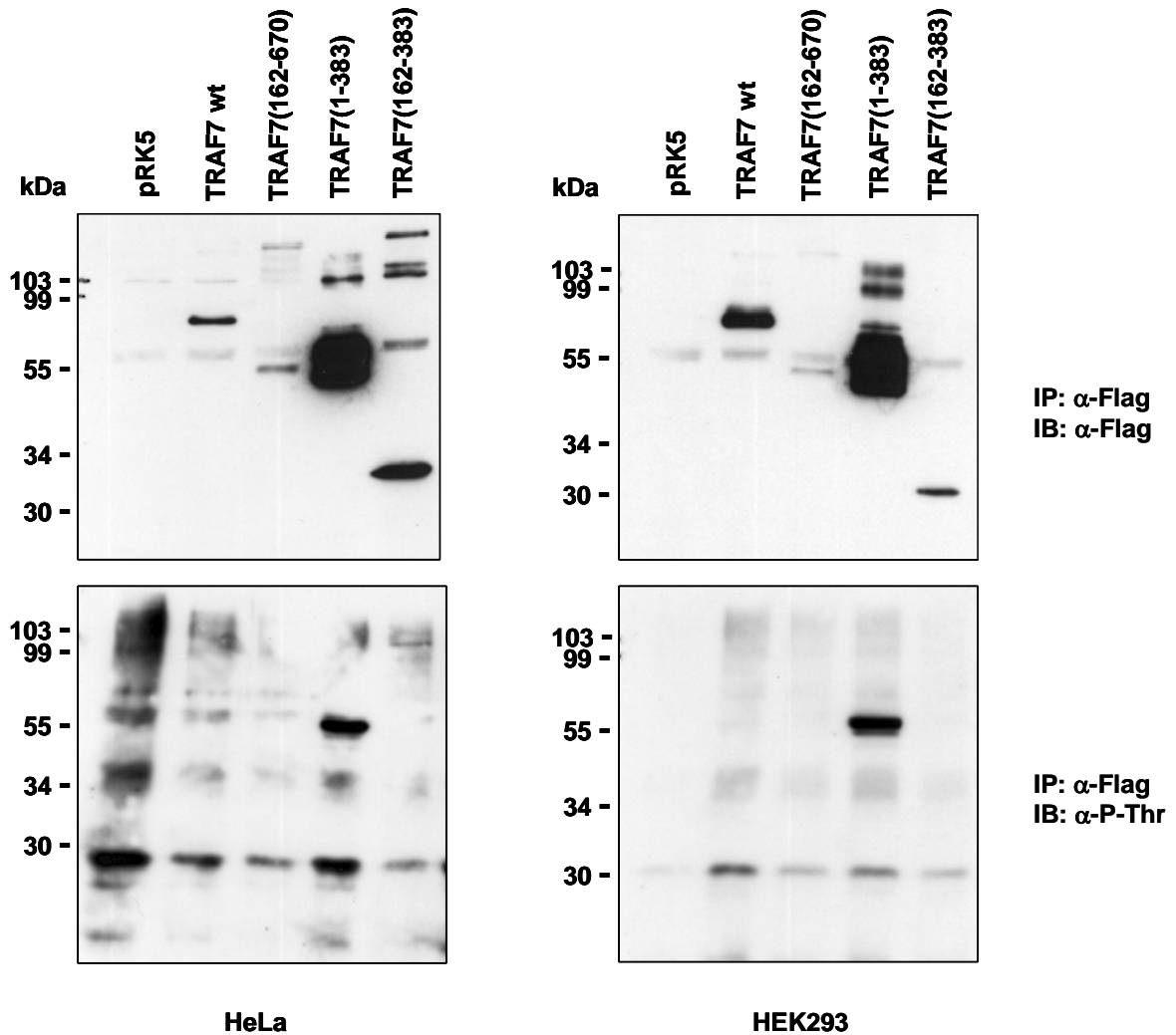


Abb. 4.23: TRAF7(1-383) trägt eine Threonin-Phosphorylierung

HEK293 und HeLa Zellen wurden mit 1 µg pRK5, pRK5-Flag-TRAF7, pRK5-Flag-TRAF7(162-670), pRK5-Flag-TRAF7(1-383) oder pRK5-Flag-TRAF7(162-383) transfiziert. Zusätzlich wurden sie noch mit 1 µg eines crmA-Expressionsplasmids und 1 µg pRK5 transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen in Lysepuffer (TBS, 1% Triton-X100) lysiert und die TRAF7-Proteine über das Flag-Epitop mit 2 µl Antikörper (Antikörper M2, Stratagene) und 6,5 µl Protein G-Sepharose Kügelchen (GammaBind®, Amersham Pharmacia) immunpräzipitiert. Der Nachweis der präzipitierten Proteine erfolgte im Immunblot mit einem Flag-spezifischen Antikörper (M2, Stratagene), der Nachweis der Phosphorylierung erfolgte mit einem Phospho-Threonin-spezifischen Antikörper (Cell Signaling).

In Abb. 4.23 ist die Immunpräzipitation der TRAF7-Konstrukte zu sehen. Immunpräzipitiertes TRAF7 war als einzelne Bande im Immunblot zu sehen. Es war aufgrund der Größe anzunehmen, dass es sich hierbei um eine nicht modifizierte Form handelt. Die hochmolekularen Formen, die im Immunblot beobachtet wurden (siehe Abb. 4.22), konnten nicht präzipitiert werden. Dasselbe galt für TRAF7(162-670). Die Mutante TRAF7(1-383)

wurde im Vergleich zum Wildtyp in größeren Mengen präzipitiert. Bei dieser Mutante konnte aber auch eine deutlich stärkere Expression als beim Wildtyp beobachtet werden (siehe Abb. 4.22). Im Immunblot konnte eine Doppelbande beobachtet werden. Beide Formen dieser Doppelbande konnten gut präzipitiert werden. TRAF7(162-383) wurde nur in geringeren Mengen präzipitiert. Bei dieser Mutante wurde aber auch eine geringere Expression beobachtet, was dieses Ergebnis erklären könnte.

Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen Phospho-Threonin wurde die Phosphorylierung der einzelnen TRAF7-Konstrukte analysiert. Im Fall von TRAF7(1-383) konnte die obere Bande der Doppelbande als phosphorylierte Form identifiziert werden. Bei TRAF7 wt und den restlichen Mutanten konnte keine Phosphorylierung detektiert werden. Bei der Phosphorylierung von TRAF7(1-383) handelte es sich um eine Threonin-Phosphorylierung. Um zu bestätigen, dass es sich um Phospho-Threonin handelt, wurde der Immunblot mit einem Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörper wiederholt. Hierbei konnte keinerlei Phosphorylierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Ein Ziel dieser Doktorarbeit war es, TRAF7 näher zu charakterisieren und seine Rolle in der Signaltransduktion von LMP1 zu untersuchen. Um eventuell Hinweise auf eine Interaktion von LMP1 und TRAF7 zu erhalten, sollte untersucht werden, ob die Coexpression von LMP1 einen Einfluss auf die Phosphorylierung von TRAF7(1-383) hat. Zusätzlich wurde auch ein möglicher Einfluss der Coexpression von LMP1-TNFR1 analysiert. Die Analyse der Phosphorylierung erfolgte wie oben beschrieben.

Wie in Abbildung 4.24 zu sehen ist, hatte die Coexpression von LMP1 oder von LMP1-TNFR1 keinerlei Einfluss auf die Phosphorylierung von TRAF7(1-383). Die TRAF7 Mutante konnte in allen Ansätzen etwa in gleicher Menge immunpräzipitiert werden. Der Nachweis der Phosphorylierung erfolgte, wie schon in Abb. 4.23, mit Hilfe eines Phospho-Threonin spezifischen Antikörpers. Die Menge der phosphorylierten Form von TRAF7(1-383) in den Ansätzen, in denen LMP1 oder LMP1-TNFR1 coexprimiert wurden, ist vergleichbar mit der Menge in dem Ansatz, in dem der pHEBO-Leervektor cotransfiziert wurde.

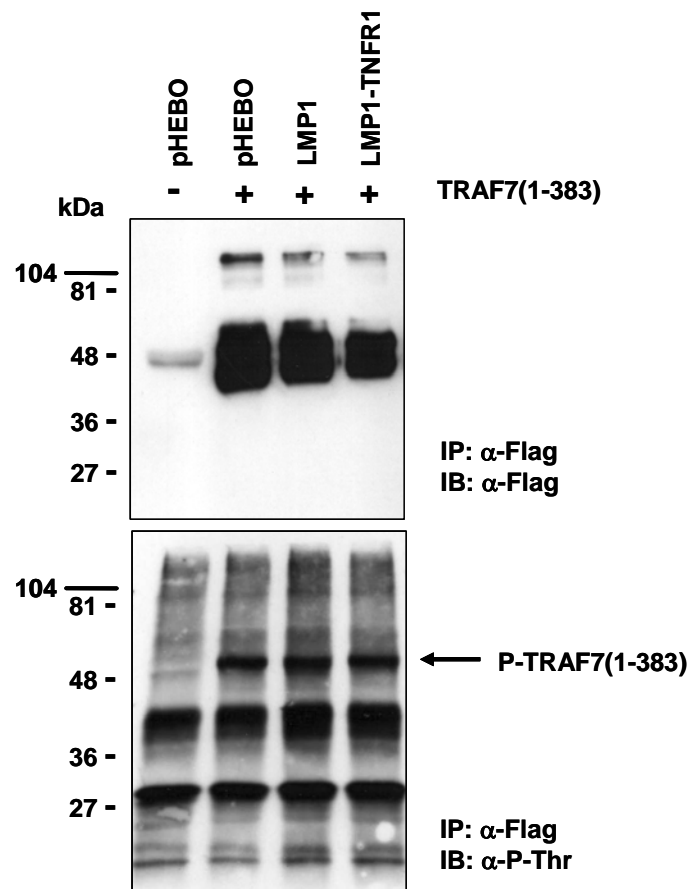


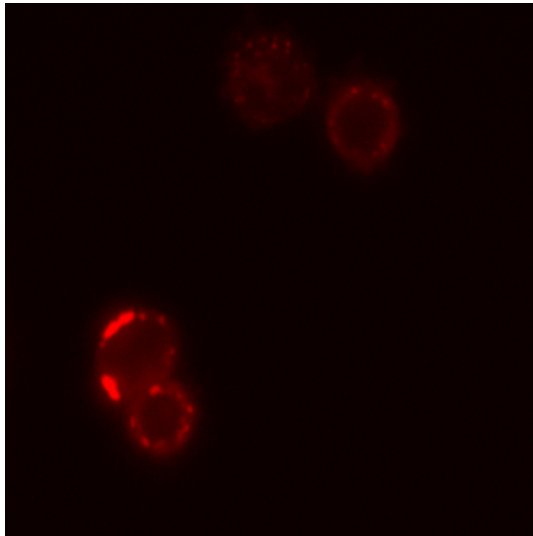
Abb. 4.24: Die Phosphorylierung von TRAF7(1-383) wird durch die Coexpression von LMP1 oder LMP1-TNFR1 nicht beeinflusst

HEK293 wurden mit 1 μ g pCMV-HA-LMP1, pCMV-HA-LMP1-TNFR1 oder einem Leervektor transfiziert. Zusätzlich wurden sie noch mit 1 μ g pRK5-Flag-TRAF7(1-383) oder dem Leervektor pRK5 sowie mit 1 μ g eines crmA-Expressionsplasmids transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen in Lysepuffer (TBS, 1% Triton-X100) lysiert und TRAF7(1-383) über das Flag-Epitop mit 2 μ l Antikörper (Antikörper M2, Stratagene) und 6,5 μ l Protein G-Sepharose Kügelchen (GammaBind®, Amersham Pharmacia) immunpräzipitiert. Der Nachweis der präzipitierten Proteine erfolgte im Immunblot mit einem Flag-spezifischen Antikörper (M2, Stratagene), der Nachweis der Phosphorylierung erfolgte mit einem Phospho-Threonin-spezifischen Antikörper (Cell Signaling).

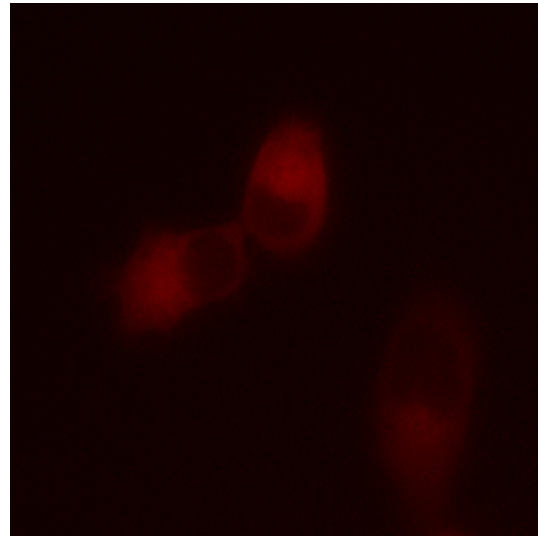
4.6.5 Zelllokalisierung von TRAF7

Um TRAF7 im Fluoreszenzmikroskop nachweisen zu können, wurden TRAF7 und die Deletionsmutante TRAF7(283-670) mit einem N-terminalen mRFP (*red fluorescence protein*)

fusioniert. Mit Hilfe dieser Konstrukte wurde die Verteilung von TRAF7 in der Zelle analysiert.



mRFP-TRAF7 wt



mRFP-TRAF7 (283-670)

Abb. 4.25: TRAF7 ist in vesikulären Strukturen lokalisiert

HeLa Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für mRFP-TRAF7 und mRFP-TRAF7(283-670) transfiziert. Die transfizierten Zellen zeigten unter dem Fluoreszenzmikroskop eine rote Fluoreszenz. Die Abbildung wurde nachträglich mit dem Programm Openlab (Improvision) eingefärbt.

Wie in Abb. 4.25 zu sehen ist, war TRAF7 in vesikulären Strukturen lokalisiert, während bei TRAF7(283-670) eine gleichmäßige zytosolische Verteilung beobachtet werden konnte. Diese Lokalisierung in vesikulären Strukturen wurde auch von Bouwmeester *et al.* beschrieben (Bouwmeester *et al.*, 2004).

Außerdem konnten im Fall von mRFP-TRAF7 viele apoptotische Zellen beobachtet werden. Dieser Effekt zeigte sich auch deutlich bei der Generierung stabiler Zellen. In einer Kultur, die aus einem mRFP-TRAF7 positiven Einzelklon entstanden war, konnten nach etwa 14 Tagen fast keine mRFP positiven Zellen mehr nachgewiesen werden. Dies konnte auch durch Selektionsdruck nicht verhindert werden (Daten nicht gezeigt).

4.6.6 Herunterregulierung von TRAF7 durch siRNA

Um eine Beteiligung von TRAF7 an verschiedenen Signalwegen untersuchen zu können, sollte ein System zur Herunterregulierung der TRAF7-Expression etabliert werden. Dies soll mit Hilfe einer Mischung aus vier sequenzoptimierten siRNA-Oligos (Dharmacon, Inc.) erreicht werden.

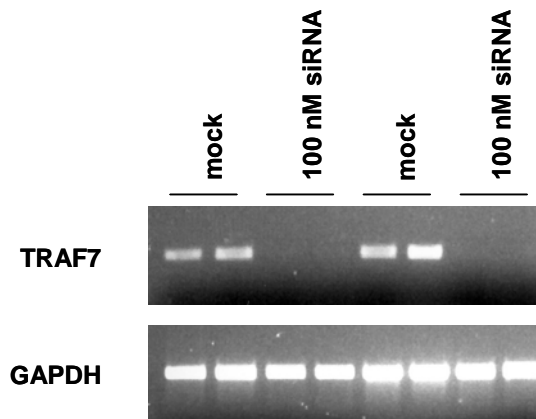


Abb. 4.26: Die Expression von TRAF7 wird durch spezifische siRNA herunterreguliert

HeLa Zellen wurden in 24-Loch Platten in zwei verschiedenen Zelldichten mit 100 nM TRAF7-spezifischer siRNA wie in Abschnitt 3.2.3.3 beschrieben transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde RNA isoliert und die TRAF7 mRNA durch RT-PCR nachgewiesen. Als Kontrolle wurde die GAPDH mRNA-Expression untersucht. Jeder Ansatz wurde als Duplikat ausgeführt.

Auf dem mRNA-Level konnte eine sehr gute Herunterregulierung erreicht werden. In der RT-PCR war 48 h nach der Transfektion keine TRAF7 mRNA mehr detektierbar (Abb. 4.26). Da, wie bereits erwähnt, kein TRAF7-spezifischer Antikörper erhältlich war, konnte die Herunterregulierung der Expression auf Proteinebene nicht verifiziert werden.

4.6.7 Die Rolle von TRAF7 in der Aktivierung von JNK1 durch LMP1

Mit Hilfe von TRAF7 siRNA (siehe Abschnitt 4.6.6) sollte nun eine mögliche Beteiligung von TRAF7 an der Signaltransduktion von LMP1 untersucht werden. Hierzu wurden HeLa Zellen zweimal im Abstand von 24 h mit siRNA transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit Expressionsplasmiden für LMP1 und HA-JNK1 transfiziert und die Aktivierung

von JNK1 durch LMP1 mittels *in vitro* Immunkomplex-Kinaseversuch analysiert. Als Kontrolle diente eine unspezifische siRNA.

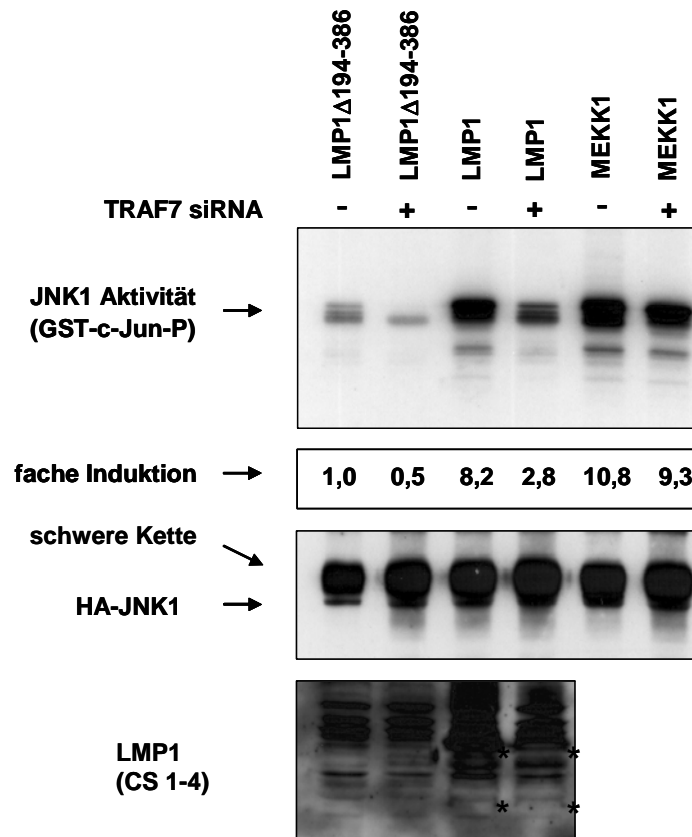


Abb. 4.27: TRAF7 spielt eine Rolle in der Aktivierung von JNK1 durch LMP1

HeLa Zellen wurden in 6-Loch Platten zweimal im Abstand von 24 h mit TRAF7-spezifischer siRNA oder mit unspezifischer Kontroll-siRNA transfiziert (siehe Abschnitt 3.2.3.3). 24 h nach der zweiten Transfektion wurden die Zellen mit 1 µg Expressionsplasmid für LMP1Δ194-386, LMP1 oder MEKK1 sowie mit 1 µg pRK5-HA-JNK1, 0,5 µg pcDNA3.1-p35 und 0,5 µg pEGFP-C1 transfiziert (siehe Abschnitt 3.2.3.1). 24 h nach dieser Transfektion wurde ein *in vitro*-Immunkomplex-Kinaseversuch (siehe Abschnitt 3.6.2) durchgeführt. *In vitro* phosphoryliertes GST-c-Jun wurde durch Autoradiographie nachgewiesen. Als Transfektions- und Ladekontrolle wurde auf derselben Membran das präzipitierte HA-JNK1 mit dem JNK1-spezifischen Antikörper C-17 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) nachgewiesen. Die Quantifizierung der GST-c-Jun-Phosphorylierung erfolgte mittels Phosphoimager. Die Expression von LMP1 wurde mit dem LMP1-spezifischen Antikörper CS 1-4 (Dako) nachgewiesen. LMP1 sowie eine Abbaubande sind mit Sternchen markiert.

Wie in Abbildung 4.27 zu sehen ist, führte die Expression von LMP1 in Zellen, die vorher mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, zu einer 8,2-fachen Induktion von JNK1. In Zellen, die vorher mit TRAF7-siRNA transfiziert wurden, führte die Expression von LMP1 nur zu einer 2,8-fachen Induktion von JNK1. Bei der Induktion von JNK1 durch LMP1Δ194-386 kam es

durch die Transfektion mit TRAF7-siRNA auch zu einer Reduktion der JNK1 Aktivierung. Allerdings war diese Reduktion deutlich schwächer als die bei LMP1. Auch auf die Induktion der JNK1 Aktivität durch MEKK1 hatte die Transfektion mit TRAF7-spezifischer siRNA kaum einen Einfluss. Es zeigte sich, dass TRAF7 bei der Induktion des JNK1 Signalweges durch LMP1 eine Rolle spielen könnte. Damit konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit TRAF7 als möglicher neuer Faktor in der Signaltransduktion von LMP1 identifiziert werden. Eine eingehende Untersuchung der Rolle von TRAF7 in der Signaltransduktion von LMP1 war aus Zeitgründen im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht möglich. Diese Untersuchung sollte der Gegenstand weiterer Arbeiten sein.

5 Diskussion

Bei TRADD handelt es sich um das zentrale Adaptermolekül im Signalkomplex von TNFR1 und es spielt auch eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion von LMP1. Auch darüber hinaus gibt es Gemeinsamkeiten von LMP1 und TNFR1. Bei beiden Molekülen gehören neben TRADD auch RIP1 und Mitglieder der TRAF-Familie zu den Bestandteilen des Signalkomplexes (Devergne et al., 1996; Hsu et al., 1996b; Hsu et al., 1995; Izumi et al., 1999; Izumi und Kieff, 1997; Mosialos et al., 1995; Zheng et al., 2006). Auch in Bezug auf die aktivierten Signalwege gibt es Übereinstimmungen. Das virale Protein LMP1 induziert eine konstitutive Aktivierung des NF- κ B, des JNK1 sowie des p38 MAPK Signalweges (Eliopoulos et al., 1999b; Kieser et al., 1997; Luftig et al., 2004; Saito et al., 2003; Schultheiss et al., 2001; Wu et al., 2006). Der zelluläre TNFR1 führt nach Stimulierung durch seinen Liganden TNF α ebenfalls zu einer Aktivierung des NF- κ B, des JNK1 und des p38 MAPK Signalweges (Legler et al., 2003; Natoli et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass TRADD für die Aktivierung des NF- κ B Signalweges durch LMP1 und durch den TNFR1 essentiell ist (Schneider, 2005). Neben diesen Gemeinsamkeiten gibt es aber auch Unterschiede. Der Hauptunterschied liegt im biologischen Phänotyp, der durch die beiden Moleküle induziert wird. Wie in der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei LMP1 um ein transformierendes und antiapoptotisches Protein (Eliopoulos und Young, 2001). LMP1 ist essentiell für die Immortalisierung von B-Lymphozyten durch EBV (Kilger et al., 1998). Außerdem ist es in der Lage, Nagerfibroblasten in Kultur zu transformieren (Wang et al., 1985). Nach Stimulierung des TNFR1 kann es neben der Induktion des NF- κ B Signalweges auch zur Induktion einer Caspase-Kaskade und zur Aktivierung von Apoptose kommen. Zusätzlich konnte auch die Aktivierung von nicht-apoptotischem Zelltod (z.B. Nekrose) gezeigt werden (Zheng et al., 2006).

Einen ersten Anhaltspunkt für die molekulare Basis dieses unterschiedlichen Phänotyps stellte die Art der TRADD-Bindung an die beiden Proteine dar. TRADD bindet mit seinem N-Terminus an den C-Terminus von LMP1, das keine Todesdomäne besitzt (Kieser et al., 1999). Im Gegensatz dazu erfolgt die Bindung an den TNFR1 über eine Todesdomänen-Todesdomänen-Interaktion, wie sie bei vielen Mitgliedern dieser Familie beobachtet wird (Hsu et al., 1995; Reed, 2000). TRADD bindet also an zwei strukturell vollständig verschiedene Domänen. Auch auf der Seite von TRADD sind jeweils unterschiedliche Domänen für die Bindung verantwortlich. Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war nun,

ob die Art der Bindung und der Bindestelle oder der Rezeptorkontext den biologischen Phänotyp der TRADD-abhängigen Signaltransduktion bestimmt.

5.1 Domain Swapping im LMP1-TNFR1-Kontext

5.1.1 Die Todesdomäne im LMP1-Kontext

In den beschriebenen *Domain Swapping* Experimenten (siehe Abschnitt 4.1) wurde nicht nur die TRADD-Bindestelle von LMP1 auf den TNFR1 übertragen, sondern im Gegenzug auch die Todesdomäne des TNFR1 auf LMP1. Die 16 C-terminalen Aminosäuren von LMP1 wurden durch die Todesdomäne ersetzt. Das Konstrukt LMP1-DD befand sich im Gegensatz zum Kontrollkonstrukt LMP1 Δ 371 nach der Zellyse mit einem Triton-X100-haltigen Puffer fast ausschließlich in der unlöslichen Fraktion (Liefold, 2003). Bei der Untersuchung der Signaltransduktion zeigte sich, dass das Konstrukt LMP1-DD nicht in der Lage war, den JNK1/AP1 Signalweg zu aktivieren. In NF- κ B Reportergerätenversuchen konnte zwar eine Aktivierung des Signalweges durch LMP1-DD beobachtet werden. Allerdings konnte diese Aktivität auf die funktionelle CTAR1 Domäne zurückgeführt werden, die in diesem Konstrukt vorhanden ist. Durch die Mutante LMP1_{PQT} \rightarrow _{AAA}-DD, bei der CTAR1 mutiert ist, kam es nicht zu einer Aktivierung des NF- κ B Signalweges. Ebenso kam es durch LMP1-DD nicht zur Induktion von Zelltod (Daten nicht gezeigt; Liefold, 2003).

Eine mögliche Erklärung für die fehlende Funktionalität der Todesdomäne im LMP1 Kontext könnte die unterschiedliche Art der Aktivierung von LMP1 und TNFR1 sein. Während LMP1 über eine Oligomerisierung konstitutiv aktiviert wird, ist der TNFR1 in der trimeren Form aktiv und wird durch die Bindung seines Liganden TNF α aktiviert. Die Aktivität des Konstruktes LMP1-TNFR1 zeigt allerdings deutlich, dass die Aktivierung der Todesdomäne auch über eine Oligomerisierung erfolgen kann (Dudziak et al., 2003). Dies ist also als Grund für die fehlende Funktionalität nicht anzunehmen. Ebenso kann ausgeschlossen werden, dass LMP1-DD insgesamt nicht funktional ist, da dieses Konstrukt, wie bereits beschrieben, in der Lage ist, über CTAR1 den NF- κ B Signalweg zu induzieren. Auch eine inhibitorische Wirkung von CTAR1 auf die Todesdomäne könnte der Grund für die fehlende Funktionalität sein. Es konnte gezeigt werden, dass über CTAR1 der NF- κ B Signalweg induziert wird (Luftig et al., 2004; Saito et al., 2003). Durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B kommt es zur Aktivierung von antiapoptotischen Genen, wie zum Beispiel c-iaps, c-flip und bcl-2 (Mattson

und Meffert, 2006; Micheau et al., 2001). Es könnte damit über CTAR1 zu einer Inhibierung der Todesdomäne kommen. Das könnte auch eine mögliche Erklärung dafür darstellen, warum die Signaltransduktion von LMP1 nicht zur Induktion von Zelltod führt. Auch in dem Fall könnte es sein, dass es durch die Aktivierung des NF- κ B Signalweges über CTAR1 zu einer Inhibierung von apoptotischen Vorgängen kommt. Bei LMP1-DD spricht allerdings gegen eine inhibitorische Wirkung von CTAR1 auf die Todesdomäne, dass Mutationen in der TRAF-Bindedomäne von CTAR1 (PxQxT) zwar zu einer nicht-funktionellen CTAR1 Domäne führen, aber es durch LMP1_{PQT→AAA}-DD ebenfalls nicht zur Aktivierung von Signaltransduktionswegen und zur Induktion von Apoptose kommt. Da bei LMP1_{PQT→AAA}-DD durch CTAR1 keine TRAF-abhängige Signaltransduktion stattfinden kann, ist eine inhibitorische Wirkung von CTAR1 auf die Todesdomäne über TRAFs ausgeschlossen. Es ist jedoch nicht völlig auszuschließen, dass eine inhibitorische Funktion nicht über die TRAF-Bindestelle von CTAR1 vermittelt wird, sondern über eine andere Domäne.

Cottin *et al.* konnten mit der Hilfe von Deletionsmutanten zeigen, dass die Todesdomäne für eine Lokalisierung des TNFR1 in den *Lipid Raft* notwendig ist. Hierfür ist eine korrekte Faltung der Todesdomäne notwendig (Cottin et al., 2002). Die *lrp* (*lymphoproliferative*) Punktmutation in der Todesdomäne verhindert eine korrekte Faltung dieser Domäne und gleichzeitig auch eine *Raft* Lokalisierung. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die *Raft* Lokalisierung der unterschiedlichen Mutanten auch die Fähigkeit widerspiegelt, Apoptose zu induzieren (Cottin et al., 2002). Die Lokalisierung von LMP1-DD in der Triton X100-unlöslichen Fraktion könnte einen Hinweis auf eine korrekte Faltung der Todesdomäne im LMP1-Kontext geben. Ob die Todesdomäne im LMP1-Kontext auch ausreichend für eine Lokalisierung des Konstruktes in *Lipid Rafts* ist, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Todesdomäne ausreichend ist, um den TNFR2 in *Lipid Rafts* zu rekrutieren (Cottin et al., 2002). Ob die Todesdomäne im TNFR2 Kontext auch für die Induktion von Apoptose ausreichend ist, wurde nicht untersucht. Offensichtlich ist die Todesdomäne nicht in der Lage, als eigenständige Domäne im LMP1-Kontext die Aktivierung von Signalwegen sowie die Induktion von Apoptose zu vermitteln.

5.1.2 Charakterisierung der TRADD-Bindedomäne von LMP1

Um die Frage zu beantworten, was den biologischen Phänotyp bestimmt, wurden die TRADD-Bindestellen von LMP1 und des konstitutiv aktiven LMP1-TNFR1 in einem *Domain*

Swapping Experiment ausgetauscht. Im Fall von LMP1-TNFR1 war die Todesdomäne des Rezeptorkonstruktes als TRADD-Bindedomäne bekannt. Im Fall von LMP1 konnte der C-Terminus von LMP1 als Bindedomäne identifiziert werden (Kieser et al., 1999). Außerdem war bekannt, dass Tyr384 für die Bindung von TRADD essentiell ist. Die genaue, für eine TRADD-Bindung ausreichende Domäne war allerdings nicht bekannt. Für das *Domain Swapping* Experiment wurden die 17 C-terminalen Aminosäuren (Aminosäuren 370-386) von LMP1 ausgewählt (siehe Abschnitt 4.1).

Durch Immunpräzipitationen konnte erstmals gezeigt werden, dass die ausgewählten Aminosäuren 370-386 tatsächlich die vollständige Domäne darstellen, die für eine TRADD-Bindung nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend ist (siehe Abschnitt 4.2.1). Um zu untersuchen, auf welche Art die Aminosäuren 370-386 von LMP1 an TRADD binden, wurde die Mutante TRADD_{296-299A} verwendet. Sie hat eine mutierte Todesdomäne und ihre Bindung an den TNFR1 ist stark beeinträchtigt (Park und Baichwal, 1996). Dass die Bindung an LMP1 durch diese Mutation nicht beeinträchtigt wird, konnte bereits *in vitro* in *Pull-Down* Experimenten gezeigt werden (Kieser et al., 1999). Durch Immunpräzipitationen konnte diese Bindung jetzt auch *in vivo* nachgewiesen werden. Auch an die Aminosäuren 370-386 von LMP1 im LMP1-TNFR1-Kontext konnte eine Bindung der TRADD-Mutante nachgewiesen werden. Dadurch wurde bestätigt, dass es sich bei dieser Domäne um eine neuartige TRADD-Bindestelle handelt, die sich stark von der des TNFR1 unterscheidet. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die Aminosäuren 370-386 von LMP1 eine eigenständige Domäne darstellen, die auch im LMP1-TNFR1 Kontext ausreichend ist, um TRADD zu binden. Durch Untersuchungen mit der Mutante TRADD_{296-299A} konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei der Bindung von TRADD an die Aminosäuren 370-386 von CTAR2 im LMP1-TNFR1-Kontext um eine Interaktion handelt, die vom Typ her der Interaktion von TRADD mit LMP1 entspricht.

Die Ergebnisse aus der Immunpräzipitation sollten durch *Lipid Raft* Analysen bestätigt und erweitert werden (siehe Abschnitt 4.2.2). Bislang konnte in der Literatur keine Rekrutierung von TRADD in die *Lipid Rafts* nachgewiesen werden (Higuchi et al., 2001; Rothenberger et al., 2002; Xie und Bishop, 2004). Cinthia Briseño aus unserem Labor konnte allerdings zeigen, dass TRADD durch LMP1 in die *Lipid Rafts* rekrutiert wird und dass diese Rekrutierung von den letzten 16 Aminosäuren von LMP1 abhängt (Briseño Franke, 2006). Bei der Methode zur Isolierung von *Lipid Rafts*, die in unserem Labor von Cinthia Briseño

etabliert werden konnte, wurden ein Lysepuffer mit 0,5 % Triton sowie eine Fraktionierung in 8 Fraktionen verwendet. Außerdem wurde TRADD in den verwendeten HEK293 Zellen überexprimiert. Rothenberger *et al.* verwendeten 1 % Triton in ihrem Lysepuffer (Rothenberger *et al.*, 2002). Es ist möglich, dass aufgrund der höheren Triton-Konzentration TRADD bereits aus dem LMP1 Signalkomplex herausgelöst wurde und daher nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Higuchi *et al.* verwendeten einen Lysepuffer mit nur 0,2 % Triton. Allerdings wird TRADD in den verwendeten LCLs endogen nur sehr schwach exprimiert und es erfolgte auch keine zusätzliche ektopische Expression von TRADD. Daher ist es denkbar, dass die Menge an TRADD, die in die *Lipid Raft* Fraktion lokalisiert war, unterhalb der Nachweisgrenze lag. Dieser Effekt könnte durch die in dieser Arbeit erfolgte Fraktionierung in 12 Fraktionen noch verstärkt worden sein (Higuchi *et al.*, 2001).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte in Zusammenarbeit mit Cinthia Briseño gezeigt werden, dass für die *Raft*-Rekrutierung von TRADD die Aminosäuren 370-386 von LMP1 nicht nur notwendig sondern auch ausreichend sind. Damit wurden die Ergebnisse der Immunpräzipitation bestätigt und erweitert. Bei den Aminosäuren 370-386 von LMP1 handelt es sich um eine eigenständige Domäne, die auch im LMP1-TNFR1 Kontext ausreichend für eine TRADD-Bindung sowie eine Rekrutierung von TRADD in *Lipid Rafts* ist.

Es ist bekannt, dass die *Lipid Raft* Lokalisierung von LMP1 wichtig für die Rekrutierung von Adaptermolekülen ist (Ardila-Osorio *et al.*, 2005; Kaykas *et al.*, 2001; Lam und Sugden, 2003; Rothenberger *et al.*, 2002). Die Tatsache, dass LMP1-TNFR1-CTAR2 in den *Rafts* lokalisiert ist und TRADD dorthin rekrutiert, gab bereits einen ersten Hinweis auf eine Funktionalität von LMP1-TNFR1-CTAR2.

5.1.3 Aktivierung der Signaltransduktion durch LMP1-TNFR1-CTAR2

In dieser Doktorarbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Aminosäuren 370-386 von CTAR2 die vollständige TRADD-Bindedomäne von LMP1 umfassen. Nun sollte untersucht werden, ob diese Domäne auch in der Lage ist, im LMP1-TNFR1-Kontext Signaltransduktion zu induzieren. Da bekannt war, dass die Aktivierung des klassischen NF- κ B Signalweges durch LMP1 TRADD-abhängig ist, wurde zuerst der NF- κ B Signalweg analysiert (Schneider, 2005). Mit Hilfe von Reporterassays konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren 370-386 ausreichend sind, um den NF- κ B Signalweg zu induzieren (siehe Abschnitt 4.3.1).

Die Expression von LMP1-TNFR1-CTAR2 führte zu einer 5,7-fachen Induktion des Signalweges. Die Expression von LMP1 führte zu einer 17-fachen Induktion des Signalweges. Allerdings kann LMP1 den NF- κ B Signalweg sowohl über CTAR1 als auch über CTAR2 aktivieren. Über CTAR1 wird der alternative Weg aktiviert (Saito et al., 2003). Diese Aktivierung verläuft über NIK und IKK α (Luftig et al., 2004). Im Gegensatz dazu aktiviert CTAR2 den klassischen (kanonischen) Weg unter Beteiligung von TRAF6, IRAK1, TAK1 und IKK β (Luftig et al., 2003; Schultheiss et al., 2001). Durch die Verwendung des Reportergens 3xkB-Luc konnte nicht zwischen den beiden Signalwegen unterschieden werden, sie führen beide zu einer Aktivierung des Reportergens. Daher war anzunehmen, dass sich die 17-fache Induktion aus einem Beitrag von CTAR1 und einem Beitrag von CTAR2 zusammensetzt. Um herauszufinden, wie stark die Aktivierung nur über CTAR2 ist, wurde die Mutante LMP1_{PQT \rightarrow AAA} verwendet. Durch die Mutation der TRAF-Bindestelle in CTAR1 kann diese Mutante den NF- κ B Signalweg nur über CTAR2 induzieren. Die Induktion des NF- κ B Signalweges durch LMP1_{PQT \rightarrow AAA} lag bei 6,5-fach und damit in derselben Größenordnung wie die Induktion durch LMP1-TNFR1-CTAR2 (5,7-fach). Es konnte daher erstmals gezeigt werden, dass die Aminosäuren 370-386 von LMP1 auch im LMP1-TNFR1 Kontext ausreichend sind, um den NF- κ B Signalweg über CTAR2 in vollem Umfang zu aktivieren.

Erst kürzlich konnte in unserem Labor und durch andere nachgewiesen werden, dass die Induktion des JNK1/AP-1 Signalweges durch LMP1 und durch den TNFR1 unabhängig von TRADD verläuft (Schneider, 2005; Wan et al., 2004). Allerdings ist auffällig, dass sich die TRADD-Bindedomäne (Aminosäuren 370-386) und die JNK1-Aktivierungsdomäne (Aminosäuren 379-384) von LMP1 überschneiden (Eliopoulos et al., 1999a). Auch aus diesem Grund ging man lange Zeit von einer Beteiligung von TRADD an der JNK1-Aktivierung aus. Erst mit Hilfe von TRADD-defizienten Zellen konnte das Gegenteil endgültig nachgewiesen werden (Schneider, 2005). Es sollte nun untersucht werden, ob die Aminosäuren 370-386 von LMP1 im LMP1-TNFR1-Kontext neben dem NF- κ B Signalweg auch den JNK1/AP-1 Signalweg induzieren können (siehe Abschnitt 4.3.1). Mittels eines *in vitro* Immunkomplex-Kinaseversuchs wurde gezeigt, dass die Aminosäuren 370-386 von LMP1 ausreichend sind, auch im LMP1-TNFR1-Kontext den JNK1 Signalweg zu aktivieren. Da dieser Signalweg nur über CTAR2 induziert wird, kann man die Induktionsniveaus durch LMP1 und durch LMP1-TNFR1-CTAR2 direkt miteinander vergleichen. Es zeigt sich, dass die Aminosäuren 370-386 von LMP1 im LMP1-TNFR1 Kontext in vollem Umfang den

Signalweg induzieren können. Die Aminosäuren 370-386 von LMP1 konnten also als eine eigenständige Domäne charakterisiert werden, die auch im LMP1-TNFR1 Kontext nicht für eine TRADD-Bindung und Rekrutierung ausreichend ist, sondern auch für die Induktion des NF- κ B und des JNK1 Signalweges. Die Aktivierung der Signalwege durch diese Domäne im Vergleich zur Aktivierung der Signalwege durch CTAR2 im LMP1 Kontext erfolgt in voller Stärke.

Es wurde bereits gezeigt, dass die C-terminale Signaldomäne von LMP1 in der Lage ist, Signalwege zu induzieren, wenn sie mit der Transmembrandomäne von anderen Rezeptoren fusioniert wird. Ein Fusionskonstrukt aus extrazellulärer Domäne und der Transmembrandomäne von CD40 sowie der intrazellulären Domäne von LMP1 induziert nach Stimulierung mit einem agonistischen Antikörper Signalwege wie JNK, p38 MAPK und NF- κ B (Xie et al., 2004). Ein weiteres System, in dem die Signaltransduktion der intrazellulären Domäne von LMP1 untersucht wurde, bestand aus dem Fusionskonstrukt NGF-R:LMP1, das mit der Hilfe von Antikörpern quervernetzt wurde (Gires et al., 1997). Auch hier war die Quervernetzung durch Antikörper ausreichend, um die Signaltransduktion durch den intrazellulären Teil von LMP1 zu aktivieren. So wurden unter anderem der JNK Signalweg, der p38 MAPK Signalweg sowie der NF- κ B Signalweg induziert (Dirmeier et al., 2005). Auch ein Fusionskonstrukt aus der extrazellulären Domäne sowie der Transmembrandomäne von Ratten CD2 und der gesamten intrazellulären Domäne von LMP1 bzw. nur CTAR2 wurde analysiert. Nach einer Quervernetzung der Rezeptormoleküle mittels Antikörper kam es zu einer Aktivierung des NF- κ B Signalweges (Floettmann und Rowe, 1997).

Es wurde also in verschiedenen Veröffentlichungen gezeigt, dass die gesamte intrazelluläre Domäne von LMP1 bzw. CTAR2 als Fusion mit den Transmembrandomänen verschiedener Rezeptoren in der Lage ist, Signalwege zu induzieren. In diese Doktorarbeit konnte jetzt erstmals gezeigt werden, dass dafür auch die Aminosäuren 370-386 von LMP1, d.h. also nur die c-terminalen 17 Aminosäuren, ausreichend sind.

5.1.4 Untersuchung der beteiligten Adaptermoleküle

Im Abschnitt 4.3.1 wurde gezeigt, dass die Aminosäuren 370-386 von LMP1 ausreichend sind, um im LMP1-TNFR1-Kontext den NF- κ B und den JNK1 Signalweg zu induzieren.

Allerdings können sowohl LMP1 als auch der TNFR1 diese Signalwege aktivieren. Daher beantwortet dies noch nicht die Frage, ob die TRADD-Bindedomäne selber intrinsisch oder der Rezeptorkontext den Phänotyp der Signaltransduktion festlegen. Zwar können beide Proteine die Signalwege induzieren, allerdings sind daran jeweils unterschiedliche Adaptermoleküle beteiligt (siehe Abschnitt 1.4). Daher wurde nun analysiert, welche Adaptermoleküle an der Signaltransduktion durch LMP1-TNFR1-CTAR2 beteiligt sind. Die Ergebnisse sollten Schlussfolgerungen zulassen, ob zusammen mit den Aminosäuren 370-386 von LMP1 auch die spezifische Signaltransduktion übertragen wird oder ob dies durch den Rezeptorkontext festgelegt wird.

Die Beteiligung von TRAF2 an der Signaltransduktion wurde mit Hilfe einer dominant-negativen TRAF2-Mutante, bei der der RING-Finger deletiert wurde, untersucht (siehe Abschnitt 4.3.2). Im Gegensatz zu LMP1, wo TRAF2 keine Rolle bei der JNK1 Aktivierung spielt, ist für den TNFR1 bekannt, dass die Aktivierung des JNK1 Signalweges abhängig von TRAF2 ist (Kieser et al., 1999; Natoli et al., 1997). Wie erwartet wurde die Aktivierung von JNK1 durch das konstitutiv aktive LMP1-TNFR1 durch die Coexpression von TRAF2dn herunterreguliert. Auf die Aktivierung des JNK1 Signalweges durch LMP1 und LMP1-TNFR1-CTAR2 hatte die Coexpression von TRAF2dn keinen Einfluss. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des JNK1 Signalweges durch die Aminosäuren 370-386 von LMP1 unabhängig von TRAF2 verläuft. Dies trifft wie erwartet für den LMP1-Kontext zu, aber auch für den LMP1-TNFR1-Kontext. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass zusammen mit den Aminosäuren 370-386 von LMP1 die TRAF2-Abhängigkeit der JNK1-Aktivierung auf den LMP1-TNFR1 Kontext übertragen wurde.

Als nächstes wurde mit TRAF6 ein Faktor ausgewählt, der in der Signaltransduktion von LMP1 eine wichtige Rolle spielt. Für die Aktivierung des NF- κ B Signalweges über CTAR2 konnte eine Beteiligung von TRAF6 gezeigt werden (Luftig et al., 2003; Schultheiss et al., 2001). In Bezug auf JNK1 war die Beteiligung von TRAF6 an der Signaltransduktion von LMP1 zu Beginn dieser Doktorarbeit unklar. Versuche mit dominant-negativem TRAF6 ergaben, dass TRAF6 an der Aktivierung des JNK1 Signalweges nicht beteiligt ist (Schultheiss et al., 2001). In dieser Doktorarbeit konnte mit Hilfe von TRAF6-defizienten Zellen gezeigt werden, dass TRAF6 für die Induktion des JNK1/AP-1 Signalweges essentiell ist. Inzwischen konnte auch durch Wan und Kollegen die TRAF6-Abhängigkeit der JNK1-Aktivierung durch LMP1 nachgewiesen werden (Wan et al., 2004).

Bei Schultheiss *et al.* wurde TRAF6(300-524) als dominant negative Mutante für die Analyse der Beteiligung von TRAF6 an verschiedenen Signalwegen verwendet (Schultheiss *et al.*, 2001). Bei dieser Mutante ist der N-terminale RING-Finger deletiert. Bei dieser Domäne handelt es sich um eine Domäne mit Ubiquitin Ligase Aktivität. Für die Aktivierung des NF- κ B Signalweges ist diese Domäne notwendig (Deng *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). Ebenso konnte eine Funktion dieser Domäne bei der Aktivierung des p38 MAPK Signalweges gezeigt werden (Wang *et al.*, 2001). Es ist allerdings möglich, dass diese Domäne für die Aktivierung von JNK1 durch LMP1 nicht essentiell ist, sondern dies über andere Domänen von TRAF6 vermittelt wird. Dies würde erklären, warum man bei der Verwendung von TRAF6(300-524) keinen Effekt auf die JNK1 Aktivierung durch LMP1 sieht, bei der Verwendung einer TRAF6^{-/-} Zelllinie aber schon.

Auch für andere Mitglieder der TRAF-Familie gab es falsche Annahmen über ihre Rolle in der Aktivierung verschiedener Signalwege durch LMP1. So wurde lange Zeit davon ausgegangen, dass TRAF3 an der Aktivierung des JNK1 Signalweges durch LMP1 nicht beteiligt ist. Diese Annahme beruhte auf Versuchen mit überexprimiertem TRAF3 (Eliopoulos *et al.*, 2003). Mit Hilfe von TRAF3-defizienten Zellen konnte allerdings inzwischen die Beteiligung von TRAF3 an der Aktivierung von JNK1 durch LMP1 gezeigt werden (Xie *et al.*, 2004).

Bei der Untersuchung des JNK1 Signalweges in TRAF6^{-/-} Zellen konnte in dieser Doktorarbeit gezeigt werden, dass die Aktivierung von JNK1 durch die Aminosäuren 370-386 von LMP1 TRAF6-abhängig ist (siehe Abschnitt 4.3.3). Diese Bedeutung von TRAF6 für den JNK1 Signalweg ist unabhängig vom Rezeptorkontext. Die Expression von LMP1 oder LMP1-TNFR1-CTAR2 alleine oder TRAF6 alleine war nicht ausreichend für eine Aktivierung von JNK1. Erst nach der Coexpression von LMP1 bzw. LMP1-TNFR1-CTAR2 und TRAF6 kam es zu einer Aktivierung des Signalweges. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren 370-386 von LMP1 bei der JNK1 Aktivierung nicht nur in Bezug auf TRAF2 sondern auch in Bezug auf TRAF6 einen LMP1-Phänotyp zeigen.

Auch bei der Analyse des NF- κ B Signalweges in TRAF6^{-/-} Zellen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung durch die Aminosäuren 370-386 von LMP1 TRAF6-abhängig ist (siehe Abschnitt 4.3.3). Dies trifft, wie schon beim JNK1 Signalweg, unabhängig vom

Rezeptorkontext für LMP1 und für LMP1-TNFR1-CTAR2 zu. Nach Überexpression von TRAF6 alleine wurde eine 7,3-fache Induktion der NF- κ B Aktivität beobachtet. Dies rührt wahrscheinlich von einer Oligomerisierung des überexprimierten TRAF6 über seine C-terminale TRAF-Domäne her, die zur konstitutiven Aktivierung von NF- κ B führen kann (Baud et al., 1999). Auch die Expression von LMP1 alleine führte zu einer 3,4-fachen Induktion von NF- κ B. Es ist anzunehmen, dass diese Induktion durch CTAR1 vermittelt wird, da über CTAR1 der alternative NF- κ B Signalweg aktiviert wird, der unabhängig von TRAF6 ist (Saito et al., 2003). Durch die Coexpression von LMP1 und TRAF6 kam es zu einer 19,1-fachen Induktion von NF- κ B. Dieser Wert liegt deutlich über einem Wert, der sich durch Addition der Induktionen durch die beiden Proteine alleine ergeben würde. Dieser Synergismus zeigt die TRAF6-Abhängigkeit der NF- κ B Induktion durch LMP1. Für LMP1-TNFR1-CTAR2 konnte ebenfalls eine TRAF6-Abhängigkeit beobachtet werden. LMP1-TNFR1 zeigte wie erwartet keine Abhängigkeit von TRAF6 bei der Induktion des NF- κ B Signalweges.

Es konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit erstmals gezeigt werden, dass die Festlegung der für die Art der Signaltransduktion typischen Charakteristika auf molekularer Ebene durch die TRADD Bindestelle von LMP1 erfolgt (siehe Abschnitt 4.3.2 und 4.3.3). Dies ist intrinsisch in den Aminosäuren 370-386 von LMP1 festgelegt und wird auch mit ihnen zusammen auf einen anderen Rezeptorkontext übertragen.

5.1.5 Analyse der biologischen Effekte

Wie bereits beschrieben, kommt es durch die Signaltransduktion von LMP1 und dem TNFR1 zur Induktion von vollkommen unterschiedlichen Effekten in der Zelle. Während LMP1 transformierende Eigenschaften besitzt, kann der TNFR1 Apoptose induzieren. Nachdem in dieser Doktorarbeit gezeigt werden konnte, dass zusammen mit den Aminosäuren 370-386 die LMP1-spezifische Signaltransduktion auf LMP1-TNFR1 übertragen wurde, sollte nun untersucht werden, wie sich diese Domäne in Bezug auf die indizierten biologischen Effekte verhält. Durch die Analyse des apoptotischen Potentials der verschiedenen Konstrukte sollte herausgefunden werden, ob die TRADD-Bindestelle auch intrinsisch den biologischen Phänotyp der Signaltransduktion festlegt. Es konnte beobachtet werden, dass LMP1-TNFR1-CTAR2 keinen Zelltod induziert (siehe Abschnitt 4.4). Zusammen mit der Beobachtung, dass die Aminosäuren 370-386 von LMP1 auch im LMP1-TNFR1-Kontext den JNK1 sowie den

NF- κ B Signalweg in vollem Umfang induzieren können, lässt sich daraus schließen, dass der LMP1 Phänotyp zusammen mit den Aminosäuren 370-386 auf LMP1-TNFR1 übertragen wurde.

Für die transformierenden Eigenschaften von LMP1 sind sowohl CTAR1 als auch CTAR2 notwendig (Cahir McFarland et al., 1999; Dirmeier et al., 2003; Kaye et al., 1999). Während CTAR1 für die Initiierung der Proliferation notwendig ist, spielt CTAR2 bei der Langzeitproliferation eine entscheidende Rolle (Izumi und Kieff, 1997; Kaye et al., 1995). Aus diesem Grund war es nicht möglich, LMP1-TNFR1-CTAR2 auch auf den Aspekt hin zu analysieren, ob der transformierende Effekt der Signaltransduktion von LMP1 zusammen mit den Aminosäuren 370-386 auf LMP1-TNFR1 übertragen wird. Bei LMP1-TNFR1-CTAR2 fehlt CTAR1, welches, wie oben beschrieben, für eine erste Proliferation notwendig ist. Daher konnte bei der Analyse des biologischen Phänotyps, der durch LMP1-TNFR1-CTAR2 induziert wird, nur die Induktion von Zelltod aber nicht die von Proliferation oder Transformation untersucht werden.

5.2 Domain Swapping im TNFR1-Kontext

Die Ergebnisse aus den *Domain Swapping* Experimenten im LMP1-TNFR1-Kontext sollten zusätzlich im TNFR1-Kontext bestätigt werden, um einen direkten Einfluss der LMP1-Transmembrandomänen über die Aktivierung der Signaltransduktion hinaus ausschließen zu können. Zusätzlich sollte mit diesen Experimenten ein weiterer wichtiger Aspekt beleuchtet werden. Ein wichtiger Unterschied zwischen LMP1-TNFR1 und TNFR1 liegt in der Art der Aktivierung. Während LMP1-TNFR1 über die LMP1-Transmembrandomänen spontan oligomerisiert und dadurch konstitutiv aktiviert wird, braucht der TNFR1 die Bindung des Liganden TNF α für eine Aktivierung (Floettmann und Rowe, 1997; Gires et al., 1997). Daher handelt es sich beim TNFR1 um eine transiente Aktivierung der Signaltransduktion. Der Einfluss der Art der Aktivierung sollte durch *Domain Swapping* Experimente im TNFR1 Wildtyp Kontext analysiert werden. Hierzu wurde die Todesdomäne des TNFR1 durch die Aminosäuren 370-386 von LMP1 ersetzt (siehe Abschnitt 4.5).

5.2.1 Untersuchungen in HEK293 Zellen

Wie bereits beschrieben, ist in HEK293 der TNF-Rezeptor 2 nicht endogen exprimiert. Allerdings exprimieren diese Zellen endogen den TNF-Rezeptor 1 (Chandel et al., 2001; McFarlane et al., 2002; Schneider, 2005).

Bei der Expression der Konstrukte TNFR1, TNFR1 Δ DD sowie TNFR1-CTAR2 fiel auf, dass sich TNFR1 Δ DD sowie TNFR1-CTAR2 nach der Zellyse nur im Triton-X100 löslichen Überstand befanden, während der TNFR1 sowohl im Überstand als auch im Pellet nachgewiesen werden konnte. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Konstrukte, die eine Todesdomäne enthalten, bevorzugt im Pellet sind (Liefold, 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Todesdomäne eine wichtige Rolle bei der Lokalisierung des TNFR1 in den *Lipid Rafts* spielt (Cottin et al., 2002).

Bei der Analyse der Induktion des NF- κ B Signalweges durch TNFR1-CTAR2 in HEK293 Zellen konnten Wechselwirkungen zwischen dem endogenen TNFR1 und den überexprimierten Rezeptorkonstrukten beobachtet werden (siehe Abschnitt 4.5.1.2). Das Kontrollkonstrukt TNFR1 Δ DD zeigte einen dominant-negativen Effekt in Bezug auf die Aktivierung des NF- κ B Signalweges durch eine Stimulierung des endogenen Rezeptors mit TNF α . Eine Aktivierung des NF- κ B Signalweges durch TNFR1-CTAR2 konnte zwar beobachtet werden, allerdings musste davon ausgegangen werden, dass es auch hier zur Bildung von Heterokomplexen aus dem endogenen Rezeptor und TNFR1-CTAR2 kommt. Nach Überexpression von TNFR1-CTAR2 und zusätzlicher Stimulierung mit TNF α zeigte sich nämlich nicht, wie erwartet, eine Addition der beiden Effekte, sondern nur eine geringere Stimulierung. Dies könnte auf eine Interaktion zwischen dem endogenen Rezeptor und TNFR1-CTAR2 zurückzuführen sein. Beim TNFR1 kommt es bereits ohne die Bindung des Liganden TNF α zu einer Trimerisierung. Ob es im Falle einer Überexpression von TNFR1 zu einer Trimerisierung oder zur Bildung von größeren Komplexen kommt, ist unklar. Die Trimerisierung wird normalerweise über die so genannten *pre-ligand assembly domains* (PLADs) vermittelt (Chan et al., 2000). Die PLADs liegen im extrazellulären Teil des TNFR1 und sind daher auch in den Konstrukten TNFR1 Δ DD und TNFR1-CTAR2 enthalten. Es ist also vorstellbar, dass es über eine Assoziation dieser Domäne zur Bildung von Heterokomplexen kommt. Eventuell bindet TNF α zwar an einen Heterokomplex aus endogenem TNFR1 und TNFR1 Δ DD, da die Ligandenbindestelle ja in beiden Rezeptorkonstrukten vorhanden ist. Nach der Bindung des Liganden kommt es dann allerdings nicht zu einer Aktivierung von Signalwegen. Es ist anzunehmen, dass nur ein trimerisierter TNFR1 oder aber ein größerer TNFR1-Komplex in der Lage ist, über seine Todesdomäne Signalwege zu induzieren, aber nicht ein Komplex aus TNFR1 und TNFR1 Δ DD. Durch die ektopische Expression von TNFR1-CTAR2 kam es zwar zu einer

Aktivierung des NF- κ B Signalweges, allerdings konnte auch hier keine weitere Stimulierung durch TNF α erreicht werden. Auch im Fall von TNFR1-CTAR2 ist es wahrscheinlich, dass ein Heterokomplex aus endogenem TNFR1 und ektopisch exprimiertem TNFR1-CTAR2 nicht durch TNF α stimuliert werden kann. Aufgrund der Überexpression von TNFR1-CTAR2 ist es anzunehmen, dass dieses Konstrukt in größerer Anzahl vorliegt als der endogene Rezeptor. Daher bilden sich wohl neben Heterokomplexen aus beiden Rezeptormolekülen auch Komplexe, die nur aus TNFR1-CTAR2 bestehen. Ob die konstitutive Aktivität von solchen Komplexen ausgeht, ist unklar.

Es fiel in diesem Experiment auf, dass die Überexpression von TNFR1 und TNFR1-CTAR2 bereits ohne eine Stimulierung mit TNF α zu einer Aktivierung des NF- κ B Signalweges führte. Besonders im Falle des TNFR1 wurde deutlich, dass eine weitere Aktivierung über das bereits konstitutiv vorhandene Niveau hinaus durch eine Stimulierung nicht erreicht werden konnte. Denkbar ist, dass der Signalweg durch die Überexpression bereits so stark aktiviert wurde, dass eine weitere Aktivierung nicht mehr möglich war. Dafür spricht das sehr hohe Induktionsniveau (31-fach), welches z.B. deutlich höher lag, als das, das durch die Stimulierung des endogenen Rezeptors erreicht wurde (10,7-fach). Auch in anderen Publikationen wurde beobachtet, dass eine Überexpression des TNFR1 ohne Stimulierung durch TNF α zur Induktion von Signalwegen sowie zur Induktion von Zelltod führt (Cottin et al., 2002; Jiang et al., 1999).

5.2.2 Untersuchungen in TNFR1/2^{-/-} Zellen

Aufgrund der in Abschnitt 5.2.1 beschriebenen Interaktion der überexprimierten Rezeptorkonstrukte mit dem endogenen Rezeptor war es notwendig, diese *Domain Swapping* Experiment in einer Zelllinie durchzuführen, die keinen endogenen TNF-Rezeptor 1 exprimiert. Zusätzlich zum TNFR1 wird durch TNF α auch der TNFR2 stimuliert. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, kommt es durch die Stimulierung des TNFR2 zu einer Verstärkung des apoptotischen Potentials von TNFR1. Dies könnte in Zellen, die den TNFR2 exprimieren, einen störenden Einfluss auf die Stimulierung der ektopisch exprimierten Konstrukte haben. Aus diesen Gründen wurde eine TNFR1/2 defiziente Mausfibroblasten-Zelllinie gewählt (siehe Abschnitt 4.5.2) (Schneider-Brachert et al., 2004).

Da es nicht möglich war, den pHEBO-Expressionsvektor in dieser Zelllinie zu verwenden, mussten die Rezeptorkonstrukte in den pRK5-Expressionsvektor umkloniert werden. Die Gründe für die mangelnde Expression der Konstrukte bei einer Verwendung des pHEBO-Expressionsvektors blieben bis heute unklar. Da beide Expressionsvektoren einen CMV-Promotor tragen, kann dies als Grund ausgeschlossen werden (Schall et al., 1990; Sugden et al., 1985). Durch die Verwendung des Expressionsvektors pRK5 konnten die Rezeptorkonstrukte in den TNFR1/2-defizienten Zellen exprimiert werden. Dabei fiel auf, dass das Expressionsmuster sich etwas von dem in HEK293 Zellen unterschied. Während TNFR1 Δ ADD und TNFR1-CTAR2 sowohl im Überstand als auch im Triton-X100 unlöslichen Pellet nachgewiesen werden konnten, wurde der TNFR1 nur im Pellet detektiert. Auch hier bestätigten sich die Beobachtungen, dass Rezeptorkonstrukte mit Todesdomäne bevorzugt im Pellet zu finden sind (Liefold, 2003).

Wie in Abschnitt 5.2.1 beschrieben, konnte keine Stimulierung der Rezeptorkonstrukte durch TNF α erreicht werden. Dort wurden auch bereits einige mögliche Gründe diskutiert. Möglich war aber auch, dass die Rezeptorkonstrukte nicht auf der Zelloberfläche exprimiert wurden und daher nicht stimuliert werden konnten. Mittels FACS-Analysen konnte die Expression von TNFR1-CTAR2 und TNFR1 Δ ADD auf der Zelloberfläche gezeigt werden (siehe Abschnitt 4.5.2.1). Da die FACS-Analyse nach transienter Transfektion durchgeführt wurde, wurden die Zellen zusätzlich zu Expressionsplasmiden für die Rezeptorkonstrukte auch noch mit einem GFP-Expressionsplasmid transfiziert. Dabei fiel auf, dass nicht alle GFP-positiven Zellen auch CyTM5 positiv waren. Ein möglicher Grund dafür ist, dass der TNFR1 internalisiert werden kann. So wurde gezeigt, dass die Stimulierung des TNFR1 mit TNF α innerhalb weniger Minuten zu Endozytose über Clathrin-*coated* Vesikel sowie über Caveolen führt (D'Alessio et al., 2005; Jones et al., 1999; Schneider-Brachert et al., 2004). Als Domäne, die für diese Internalisierung notwendig ist, wurden die Aminosäuren 205-214 identifiziert. Diese Aminosäuren liegen direkt distal zur Transmembrandomäne und sind daher in den Konstrukten TNFR1 Δ ADD und TNFR1-CTAR2 ebenfalls enthalten (Schneider-Brachert et al., 2004). Es wurde bis jetzt nicht untersucht, ob auch die Aktivierung des TNFR1 nur durch Überexpression zu einer Internalisierung führt oder ob hierzu die Stimulierung mit TNF α ausreichend ist. Allerdings wurde gezeigt, dass TNFR1 Δ ADD nach Stimulierung internalisiert wird, obwohl dieses Konstrukt keine Signaldomäne mehr trägt (Schneider-Brachert et al., 2004). Daher lässt alleine die Aktivierung eines Rezeptorkonstrukts noch keine direkten Rückschlüsse auf Internalisierungsvorgänge zu. Möglicherweise ist also die Internalisierung

des Rezeptors der Grund, weshalb er nicht mehr in allen Zellen auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte. Im Fall des TNFR1 Wildtyp bewirkt wohl auch noch ein anderer Effekt, dass keine Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte. Es wurde beobachtet, dass es durch die ektopische Expression von TNFR1 in TNFR1/2 defizienten Zellen zur Induktion von Zelltod kommt. Bei der Untersuchung der Oberflächenexpression wurde nur die Population der lebenden Zellen untersucht. Daher ist es anzunehmen, dass die Zellen, die den TNFR1 exprimieren, gar nicht mit in die Analyse miteinbezogen wurden. Hierfür spricht auch die deutlich geringere und schwächere GFP-Expression in den Ansätzen, in denen GFP und TNFR1 coexprimiert wurden.

Wie bereits beschrieben (siehe Abschnitt 4.5.1.2) wurde in HEK293 Zellen ein dominant negativer Effekt von TNFR1 Δ ADD auf die Stimulierung des endogenen TNFR1 durch TNF α beobachtet. Und auch bei der Expression von TNFR1-CTAR2 konnte von der Bildung von Heterokomplexen ausgegangen werden. Auch diese Ergebnisse wiesen bereits daraufhin, dass sich TNFR1 Δ ADD und TNFR1-CTAR2 zumindest in Assoziation mit dem endogenen TNFR1 auf der Zelloberfläche befinden.

Bei der Untersuchung der Signaltransduktion in TNFR1/2^{-/-} Zellen konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren 370-386 von LMP1 als eigenständige Domäne auch im TNFR1-Kontext ausreichen, um den NF- κ B und den JNK1/AP-1 Signalweg zu aktivieren. Die Konstrukte zeigten durch die Überexpression eine konstitutive Aktivität ohne eine Stimulierung mit TNF α . Die Bildung von Mischkomplexen mit einem endogenen Rezeptor und damit eine eventuelle Aktivierung von Signalwegen durch die Todesdomäne konnte in dieser Zelllinie ausgeschlossen werden. Damit konnten die Ergebnisse im LMP1-TNFR1-Kontext bestätigt und erweitert werden.

Bereits bei der Untersuchung der Oberflächenexpression der Konstrukte fiel auf, dass die Überexpression vom TNFR1 wohl eine zytotoxische Wirkung auf die Zelle hat. Auch bei der Analyse des NF- κ B Signalweges konnte beobachtet werden, dass nach Coexpression von TNFR1 die *Renilla*-Aktivität, die als interner Standard diente, drastisch einbrach. Im JNK1 Immunkomplex-Kinaseversuch kam es zu einer stark verringerten Menge von JNK1 durch die Coexpression von TNFR1. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass die Überexpression von TNFR1 zum Zelltod führte. Dieser Effekt sollte durch die Coexpression von GFP näher analysiert und quantifiziert werden. Durch die Coexpression von TNFR1 kam

es zu einer deutlichen Abnahme der GFP-positiven Zellen. Diese Abnahme zeigte sich in der Population der stark GFP-positiven Zellen besonders deutlich. Die Überexpression des TNFR1 führt zu dessen Aktivierung, was dann zum Zelltod führt. Die deutlichen Effekte auf die stark GFP-positive Population sind dadurch zu erklären, dass diese Zellen wohl auch den TNFR1 stark exprimiert haben, was zum Zelltod führte. Auch für HeLa Zellen führte die Überexpression von TNFR1 bereits ohne weitere Stimulierung durch TNF α zur Induktion von Apoptose (Cottin et al., 2002).

Die Signaltransduktion des TNFR1 kann sowohl zu Apoptose als auch zu Nekrose führen (Zheng et al., 2006). Welche Art von Zelltod durch die Überexpression von TNFR1 in TNFR1/2^{-/-} Zellen induziert wird, ist unklar und sollte weiter analysiert werden. Ein direkter Nachweis von Apoptose kann zum Beispiel durch den Einsatz von Annexin V erfolgen (van Engeland et al., 1998). Hierbei handelt es sich um einen Marker für frühe Apoptose. Bei lebenden Zellen befindet sich das Phospholipid Phosphatidylserin auf der Innenseite der Zellmembran. Während der Apoptose kommt es zu einem frühen Zeitpunkt zu einer Translokation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran. Dort kann es dann mittels Annexin V nachgewiesen werden (van Engeland et al., 1998; Vermes et al., 1995). Da es sich um einen frühen Marker für Apoptose handelt, erfolgt eine Analyse meist etwa 2-5 Stunden nach der Induktion der Apoptose (Roulston et al., 1998; Zhu et al., 1998). Bei Zellen, bei denen die Apoptose weiter fortgeschritten ist, wird die Zellmembran durchlässig für Propidiumiodid. Somit können diese Zellen dann nicht mehr von nekrotischen Zellen unterschieden werden, da bei nekrotischen Zellen ein Eindringen von Annexin V in die Zelle und ein Erkennen von Phosphatidylserin auf der Innenseite der Membran erfolgen kann. Bei den Experimenten, die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden, erfolgte die Induktion von Zelltod durch die transiente Expression der Rezeptorkonstrukte. Daher konnte kein eindeutiger Zeitpunkt für eine Messung festgelegt werden, da die Expression erst einige Stunden nach der Transfektion der Zellen beginnt und dann kontinuierlich ansteigt. Man muss auch davon ausgehen, dass die transfizierten Zellen unter anderem auf Grund von unterschiedlichen Expressionslevels sich bei der Induktion von Apoptose nicht vollständig synchron verhalten. Aus diesen Gründen konnte kein verlässlicher Nachweis von Apoptose durch Annexin V Färbung erfolgen.

Die Überexpression von TNFR1-CTAR2 führt nicht zum Zelltod. In Zusammenhang mit der Tatsache, dass dieses Konstrukt Signaltransduktion induzieren kann, zeigt sich auch hier, dass

der LMP1-Phänotyp zusammen mit den Aminosäuren 370-386 auf den TNFR1 übertragen wurde.

Es ist unbekannt, welche Art von Komplexen sich durch die Überexpression von TNFR1 und TNFR1-CTAR2 bildet. Denkbar ist zum einen eine Trimerisierung. Wahrscheinlicher ist jedoch eine Oligomerisierung, die eher eine mit LMP1 vergleichbare Art der Aktivierung bewirken würde. Daher konnte aus den Überexpressionsdaten nicht geschlossen werden, ob eine Trimerisierung und Stimulierung mit TNF α für die Aktivität der Aminosäuren 370-386 von LMP1 im TNFR1-Kontext ausreicht. Es gibt bereits Hinweise darauf, dass die Signaldomäne von LMP1 nicht durch eine Trimerisierung aktiviert werden kann. So konnten Kaykas *et al.* zeigen, dass die Fusion der LMP1-Signaldomäne an die Transmembrandomäne von CD40 und eine Trimerisierung nach Stimulierung mit CD40 Ligand für eine Aktivierung nicht ausreichend ist (Kaykas et al., 2001). Um zu entscheiden ob im Fall von TNFR1-CTAR2 eine Trimerisierung für die Aktivierung ausreichend ist, ist ein Expressionslevel des Konstruktes notwendig, das nicht zu einer konstitutiven Aktivierung der Signaltransduktion führt. Außerdem ist es auch notwendig, das Kontrollkonstrukt TNFR1 so gering zu exprimieren, dass es nicht zu einer konstitutiven Aktivierung und zum Zelltod kommt. Nach dem Austitrieren der entsprechenden Mengen von TNFR1 und TNFR1-CTAR2 könnte dann die Aktivierung der Signaltransduktion durch Stimulierung mit TNF α untersucht werden. Aus Zeitgründen konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit die für weitere Untersuchungen geeignete Menge von TNFR1 und TNFR1-CTAR2 leider nicht mehr ermittelt werden.

Durch die *Domain Swapping* Experimente im TNFR1-Kontext konnten die Erkenntnisse, die im LMP1-TNFR1-Kontext gewonnen wurden, bestätigt werden. Bei den Aminosäuren 370-386 von LMP1 handelt es sich um eine Domäne, die intrinsisch den Phänotyp der Signaltransduktion festlegt. Es konnte gezeigt werden, dass das virale LMP1 das zelluläre pro-apoptotische TRADD-Molekül in einer anderen Art und Weise verwendet als der TNFR1. Während über TRADD im zellulären Kontext auch Apoptose induziert wird, nutzt EBV dieses Signalmolekül zur Zelltransformation.

5.3 TRAF7

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte auch TRAF7 näher charakterisiert werden und seine Rolle in der Signaltransduktion von LMP1 untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass

TRAF7 in allen untersuchten Zelllinien exprimiert wird. Auch von Xu *et al.* wurde gezeigt, dass es sich bei TRAF7 um ein ubiquitär exprimiertes Protein handelt. Sie konnten TRAF7 in allen von ihnen untersuchten Geweben nachweisen (Xu et al., 2004).

5.3.1 Klonierung von TRAF7 und Deletionsmutanten

Da kein Expressionsvektor für TRAF7 erhältlich war, wurde TRAF7 im Rahmen dieser Doktorarbeit aus einer HEK293 cDNA kloniert. Zusätzlich wurden noch verschiedene Deletionsmutanten kloniert, um die Funktionen der einzelnen Domänen untersuchen zu können (siehe Abschnitt 4.6.2). Da kein funktionierender TRAF7-spezifischer Antikörper erhältlich ist, wurden alle TRAF7-Proteine mit einem N-terminalen Flag- bzw. HA-Epitop versehen. In Zusammenarbeit mit Elisabeth Kremmer sollte ein monoklonaler TRAF7-spezifischer Rattenantikörper generiert werden. Leider führte dies bis zum Abschluss dieser Doktorarbeit nicht zur Generierung eines α -TRAF7 Antikörpers, der auch endogenes TRAF7 verlässlich und spezifisch erkennt.

5.3.2 Phosphorylierung von TRAF7(1-383)

Bei der Expression der TRAF7-Mutanten und der Analyse im Immunblot fiel auf, dass TRAF7(1-383) als Doppelbande auftritt. Da gezeigt werden konnte, dass TRAF7 phosphoryliert ist, war es nahe liegend, eine Phosphorylierung als Grund für die Doppelbande anzunehmen. Mit einem Phospho-Threonin-spezifischen Antikörper gelang es, eine Phosphorylierung von TRAF7(1-383) nachzuweisen (siehe Abschnitt 4.6.4). Da bereits gezeigt werden konnte, dass TRAF7 durch MEKK3 phosphoryliert werden kann und es sich bei MEKK3 um eine Serin-/Threonin-Kinase handelt, ist möglich, dass die Phosphorylierung von TRAF7(1-383) durch MEKK3 erfolgte. Ein weiterer Hinweis auf eine Phosphorylierung durch MEKK3 ist die Tatsache, dass Bouwmeester *et al.* eine Phosphorylierung der Mutante TRAF7(1-416) durch MEKK3 zeigen konnten (Bouwmeester et al., 2004). Sowohl bei TRAF7(1-383) als auch bei TRAF7(1-416) wurden die C-terminalen WD40 Wiederholungen deletiert.

Bei den WD40 Wiederholungen handelt es sich um eine konservierte Protein-Protein-Interaktionsdomäne, die in allen Eukaryonten vorhanden sind (Lambright et al., 1996). Diese Domäne, die auch als β -Transducin-Wiederholungen bezeichnet werden, weist eine propellerartige Struktur auf. Proteine mit WD40 Wiederholungen spielen bei einer Vielzahl

von verschiedenen zellulären Prozessen eine Rolle, wobei die Funktion der jeweiligen Proteine nicht durch die WD40 Wiederholungen sondern durch andere Domänen festgelegt wird (Denisenko et al., 1998; Smith et al., 1999). Beispiele für Proteine mit WD40 Wiederholungen sind die Kinase LRRK2 (*Leucine-rich repeat kinase 2*), die β -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen oder auch Komponenten von Histonmethylierungskomplexen (Higa et al., 2006; Lambright et al., 1996; Li und Beal, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die WD40 Wiederholungen von TRAF7 notwendig für eine Interaktion mit MEKK3 sind (Bouwmeester et al., 2004; Xu et al., 2004). Daher stellt sich die Frage, wie die Mutanten TRAF7(1-416) und TRAF7(1-383), die aufgrund ihrer fehlenden WD40 Domäne nicht mehr mit MEKK3 interagieren können, durch MEKK3 phosphoryliert werden können. Möglich ist eine transiente Interaktion, die mit Hilfe von Immunpräzipitationen nicht gezeigt werden kann, aber für eine Phosphorylierung ausreichend ist. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass neben MEKK3 auch noch eine oder mehrere weitere Kinasen in der Lage sind, TRAF7 zu phosphorylieren. Möglicherweise wird diese Kinase im TRAF7 Wildtyp durch die WD40 Wiederholungen inhibiert. In anderen Fällen konnte eine Rekrutierung von inhibitorischen Proteinen durch die WD40 Wiederholungen beobachtet werden. So wird für LRRK2 die Bindung von inhibitorischen Proteinen über die WD40 Wiederholungen postuliert (Li und Beal, 2005). Im Fall von TRAF7 konnten bereits einige Interaktionspartner identifiziert werden, unter ihnen TRAF6 sowie c-Myb. Während für c-Myb eine Bindung an TRAF7 über die WD40 Wiederholungen gezeigt werden konnte, ist dies für die Bindung an TRAF6 noch unklar (Morita et al., 2005; Yoshida et al., 2005). Allerdings konnten bislang keine Wechselwirkungen mit Proteinen identifiziert werden, die das Phosphorylierungsmuster von TRAF7(1-383) erklären. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde auch der Einfluss von LMP1 sowie LMP1-TNFR1 auf die Phosphorylierung von TRAF7(1-383) untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass es durch die Expression von LMP1 nicht zu einer Veränderung der Phosphorylierung von TRAF7(1-383) kommt.

Bouwmeester *et al.* konnten eine Phosphorylierung des TRAF7 Wildtyps durch MEKK3 nachweisen (Bouwmeester et al., 2004). Im Rahmen dieser Doktorarbeit gelang es nicht, eine Phosphorylierung des TRAF7 Wildtyps zu zeigen. Möglich sind technische Gründe, die bewirkten, dass eine eventuell vorhandene Phosphorylierung des TRAF7 Wildtyps nicht nachgewiesen werden konnte. Von TRAF7 Wildtyp wurden geringere Mengen immunpräzipitiert als von TRAF7(1-383). Außerdem ist auch nur eine Bande sichtbar, obwohl gezeigt werden konnte, dass TRAF7 mehrere Banden bildet und starke

Modifikationen trägt (siehe Abb. 4.19). Es ist möglich, dass bestimmte modifizierte Formen, zum Beispiel aus sterischen Gründen, nicht durch den Flag-spezifischen Antikörper präzipitiert wurden.

Ein nächster Schritt wäre es jetzt, die genaue Stelle der Phosphorylierung herauszufinden. Dies könnte mit Hilfe von Massenspektrometrie geschehen. Durch gezielte Mutation der Phosphorylierungsstelle könnten Hinweise auf die Funktion der Phosphorylierung gewonnen werden.

5.3.3 Lokalisierung von TRAF7 in der Zelle

Um die Verteilung und Lokalisation von TRAF7 in der Zelle beobachten zu können, wurde TRAF7 sowie eine Mutante N-terminal mit mRFP fusioniert (siehe Abschnitt 4.6.5). Bei der Expression von mRFP-TRAF7 wurden vesikuläre Strukturen beobachtet, wie sie auch bereits in der Literatur beschrieben sind (Bouwmeester et al., 2004). In dieser Doktorarbeit wurde die Mutante mRFP-TRAF7(283-670) generiert und exprimiert. Hierfür wurden der N-terminale RING-Finger sowie der Zink-Finger deletiert. Diese Mutante zeigt im Gegensatz zum Wildtyp eine gleichmäßige zytosolische Verteilung. Auch bei Bouwmeester *et al.* wurde die Verteilung von verschiedenen Mutanten untersucht. Sie konnten zeigen, dass TRAF7(217-670) und TRAF7(1-416) eine mit dem Wildtyp vergleichbare vesikuläre Verteilung aufwiesen. Bei TRAF7(1-199) und TRAF7(417-670) hingegen konnte dies nicht beobachtet werden. Daraus schlossen sie, dass der mittlere Teil von TRAF7, der den Zink-Finger und die *Coiled-coil*-Domäne enthält, für eine Lokalisierung in vesikuläre Strukturen notwendig ist. Dass die RING-Finger Domäne nicht notwendig ist, konnten Bouwmeester *et al.* mit Hilfe der Mutante TRAF7(217-670) zeigen. Hier ist nur der RING-Finger deletiert und es zeigt sich eine Lokalisation wie beim Wildtyp (Bouwmeester et al., 2004). In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass die Mutante TRAF7(283-670) nicht in vesikulären Strukturen lokalisiert ist. Aus den veröffentlichten Daten und den Ergebnissen im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte geschlossen werden, dass nur der Zink-Finger für eine Lokalisierung von TRAF7 in vesikulären Strukturen notwendig ist.

5.3.4 Beteiligung von TRAF7 an der Signaltransduktion von LMP1

Um die Beteiligung von TRAF7 an der Signaltransduktion von LMP1 zu untersuchen, wurde die Expression von TRAF7 mit Hilfe von TRAF7-spezifischer siRNA herunterreguliert (siehe

Abschnitt 4.6.6). Die gleiche sequenzoptimierte siRNA wurde bereits bei der Untersuchung der Signaltransduktion des Toll-like Rezeptor 2 verwendet (Yoshida et al., 2005). Mittels RT-PCR konnte eine sehr gute Herunterregulierung der TRAF7-Genexpression auf der mRNA Ebene nachgewiesen werden. Durch den Einsatz dieser siRNA konnte gezeigt werden, dass TRAF7 an der Aktivierung des JNK1 Signalweges durch LMP1 beteiligt ist (siehe Abschnitt 4.6.7). An welcher Stelle TRAF7 im JNK1 Signalweg involviert ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden und muss Bestandteil zukünftiger Analysen sein.

6 Zusammenfassung

TRADD spielt als Adaptermolekül eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion von LMP1 und TNF-Rezeptor 1. Während es allerdings durch den TNFR1 neben der Aktivierung verschiedener Signalwege auch zur Induktion von Apoptose und Nekrose kommt, handelt es sich bei LMP1 um ein Protein mit transformierendem Potential. Bei den jeweiligen TRADD-Bindestellen von LMP1 und TNFR1 handelt es sich um zwei strukturell vollkommen unterschiedliche Domänen. Und auch auf der Seite von TRADD wird die Bindung über zwei verschiedene Domänen vermittelt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob die TRADD-Bindestelle intrinsisch die biologischen Effekte der Signaltransduktion bestimmt oder ob diese durch den Rezeptorkontext festgelegt werden.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde in einem *Domain Swapping* Experiment die TRADD-Bindestelle des konstitutiv aktiven LMP1-TNFR1 sowie des TNFR1 gegen die putative TRADD-Bindestelle von LMP1 ausgetauscht. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die Aminosäuren 370-386 die vollständige TRADD-Bindestelle von LMP1 umfassen. Weiter konnte gezeigt werden, dass diese Aminosäuren im LMP1-TNFR1- sowie im TNFR1-Kontext ausreichend sind, um den NF- κ B und den JNK1 Signalweg zu aktivieren. Die Aktivierung des JNK1 Signalweges durch LMP1-TNFR1-CTAR2 verläuft unabhängig von TRAF2 und abhängig von TRAF6 und auch die Aktivierung des NF- κ B Signalweges durch dieses Rezeptorkonstrukt verläuft TRAF6-abhängig. Damit konnte gezeigt werden, dass die LMP1-spezifischen Charakteristika der Signaltransduktion durch die TRADD-Bindestelle festgelegt und mit ihr zusammen übertragen werden. Obwohl die Aminosäuren 370-386 von LMP1 funktionell sind, sind sie auch im LMP1-TNFR1 sowie im TNFR1 Kontext nicht in der Lage Apoptose zu induzieren. Damit konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit gezeigt werden, dass die Aminosäuren 370-386 von LMP1 intrinsisch und unabhängig vom Rezeptorkontext den nicht-apoptotischen Phänotyp der Signaltransduktion festlegen.

Außerdem wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die Beteiligung von TRAF7 an der Signaltransduktion von LMP1 untersucht. Dazu wurde TRAF7 aus einer cDNA kloniert. Zusätzlich wurden verschiedene Deletionsmutanten sowie Fusionen mit dem fluoreszierenden Protein mRFP hergestellt. Es konnte eine Threonin-Phosphorylierung von TRAF7(1-383) nachgewiesen werden. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte eine Lokalisierung von TRAF7 in vesikulären Strukturen beobachtet werden. Eine Mutante, der der RING- sowie der

Zink-Finger fehlen, zeigte hingegen eine gleichmäßige zytosolische Verteilung. Außerdem konnte in dieser Doktorarbeit mit Hilfe von spezifischer siRNA gezeigt werden, dass TRAF7 an der Aktivierung des JNK1 Signalweges durch LMP1 beteiligt ist.

7 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AIP1	ASK- <i>interacting protein</i> 1
AP-1	Aktivierungsprotein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
As	Aminosäure
ASK1	<i>apoptosis signal-regulating kinase</i> 1
ATF-2	aktivierter Transkriptionsfaktor 2
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
bcl-2	<i>b cell lymphoma-2</i>
CC	<i>coiled coil</i>
CD	Zell-Differenzierungsmarker („ <i>cell differentiation marker</i> “)
cDNA	<i>copy</i> DNA
Ci	Curie
cIAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis</i>
CMV	Cytomegalievirus
CTAR	carboxyterminale Aktivierungsregion
DD	Todesdomäne (<i>death domain</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle medium</i>
DMP	Dimethylpimelimidat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	dominant-negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy Nucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBNA	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>extra-cellular regulated kinase</i>
F	Farad
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
FKS	Fötale Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>Green fluorescent protein</i>)
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinetan-sulfonsäure
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HRP	<i>horse redish peroxidase</i>
I-κB	Inhibitor von NF-κB
IKK	I-κB Kinase
IL	Interleukin

IRAK1	<i>interleukin-1-receptor associated kinase 1</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LCL	lymphoblastoide Zelllinie (<i>lymphoblastoid cell line</i>)
LMP1	Latentes Membranprotein 1
M	molar
MADD	Mitogen aktivierendes Todesdomänen Protein (<i>mitogen activating death domain protein</i>)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
MEKK	MEK Kinase
MKK	MAPK Kinase
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NIK	NF- κ B induzierende Kinase
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PEG	Polyethylenglykol
PI	Propidium Iodid
PI3-K	Phosphoinositol 3-Kinase
PIP ₃	Phosphatidyinositol-3,4,5-Triphosphat
PLAD	<i>pre-ligand-binding assembly domains</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RFP	Rot fluoreszierendes Protein (<i>red fluorescent protein</i>)
RIP1	Rezeptor-interagierendes Protein 1
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Reverse Transkriptase
SAPK	<i>stress activated protein kinase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEK1	SAPK/ERK Kinase 1
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SODD	<i>silencer of death domains</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
SV40	Simian Virus 40
TAB1	<i>TAK1-binding protein 1</i>
TAK1	<i>transforming growth factor β activated kinase 1</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRADD	TNF-Rezeptor 1 assoziiertes Todesdomänen Protein
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
Tris	Tri-Hydroxymethyl-Aminomethan
ÜN	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

v/v	<i>volume/volume</i>
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight/volume</i>

8 Literatur

- Aggarwal, B.B. (2003) Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, **3**, 745-756.
- 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.
- Ardila-Osorio, H., Pioche-Durieu, C., Puvion-Dutilleul, F., Clause, B., Wiels, J., Miller, W., Raab-Traub, N. and Busson, P. (2005) TRAF interactions with raft-like buoyant complexes, better than TRAF rates of degradation, differentiate signaling by CD40 and EBV latent membrane protein 1. *Int J Cancer*, **113**, 267-275.
- Arenzana-Seisdedos, F., Fernandez, B., Dominguez, I., Jacque, J.M., Thomas, D., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J. and Virelizier, J.L. (1993) Phosphatidylcholine hydrolysis activates NF-kappa B and increases human immunodeficiency virus replication in human monocytes and T lymphocytes. *J Virol*, **67**, 6596-6604.
- 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.
- Baud, V. and Karin, M. (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*, **11**, 372-377.
- 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.
- Bodmer, J.L., Schneider, P. and Tschopp, J. (2002) The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci*, **27**, 19-26.
- Bonizzi, G. and Karin, M. (2004) The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*, **25**, 280-288.
- Borza, C.M. and Hutt-Fletcher, L.M. (2002) Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med*, **8**, 594-599.
- Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P.O., Bergamini, G., Croughton, K., Cruciat, C., Eberhard, D., Gagneur, J., Ghidelli, S., Hopf, C., Huhse, B., Mangano, R., Michon, A.M., Schirle, M., Schlegl, J., Schwab, M., Stein, M.A., Bauer, A., Casari, G., Drewes, G., Gavin, A.C., Jackson, D.B., Joberty, G., Neubauer, G., Rick, J., Kuster, B. and Superti-Furga, G. (2004) A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol*, **6**, 97-105.

- Brinkmann, M.M. and Schulz, T.F. (2006) Regulation of intracellular signalling by the terminal membrane proteins of members of the Gammaherpesvirinae. *J Gen Virol*, **87**, 1047-1074.
- Briseño Franke, C. (2006) Untersuchungen zur Rolle von Membran-Mikrodomänen für die Signaltransduktion des Latenten Membranproteins 1 des Epstein-Barr Virus. Dissertation. Universität Witten/Herdecke.
- Brzozka, K., Finke, S. and Conzelmann, K.K. (2006) Inhibition of interferon signaling by rabies virus phosphoprotein P: activation-dependent binding of STAT1 and STAT2. *J Virol*, **80**, 2675-2683.
- Cahir McFarland, E.D., Izumi, K.M. and Mosialos, G. (1999) Epstein-barr virus transformation: involvement of latent membrane protein 1-mediated activation of NF-kappaB. *Oncogene*, **18**, 6959-6964.
- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. and Goeddel, D.V. (1996) TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature*, **383**, 443-446.
- Carpentier, I., Declercq, W., Malinin, N.L., Wallach, D., Fiers, W. and Beyaert, R. (1998) TRAF2 plays a dual role in NF-kappaB-dependent gene activation by mediating the TNF-induced activation of p38 MAPK and IkappaB kinase pathways. *FEBS Lett*, **425**, 195-198.
- Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L. and Lenardo, M.J. (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, **288**, 2351-2354.
- Chan, F.K. and Lenardo, M.J. (2000) A crucial role for p80 TNF-R2 in amplifying p60 TNF-R1 apoptosis signals in T lymphocytes. *Eur J Immunol*, **30**, 652-660.
- Chandel, N.S., Schumacker, P.T. and Arch, R.H. (2001) Reactive oxygen species are downstream products of TRAF-mediated signal transduction. *J Biol Chem*, **276**, 42728-42736.
- 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.
- Clements, G.B., Klein, G. and Povey, S. (1975) Production by EBV infection of an EBNA-positive subline from an EBNA-negative human lymphoma cell line without detectable EBV DNA. *Int J Cancer*, **16**, 125-133.
- Cleveland, J.L. and Ihle, J.N. (1995) Contenders in FasL/TNF death signaling. *Cell*, **81**, 479-482.
- Coffin, W.F., 3rd, 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.

- Coffin, W.F., 3rd, Geiger, T.R. and Martin, J.M. (2003) Transmembrane domains 1 and 2 of the latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus contain a lipid raft targeting signal and play a critical role in cytotostasis. *J Virol*, **77**, 3749-3758.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H. and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, **173**, 33-38.
- Coso, O.A., Chiariello, M., Yu, J.C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T. and Gutkind, J.S. (1995) The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell*, **81**, 1137-1146.
- Cottin, V., Doan, J.E. and Riches, D.W. (2002) Restricted localization of the TNF receptor CD120a to lipid rafts: a novel role for the death domain. *J Immunol*, **168**, 4095-4102.
- D'Alessio, A., Al-Lamki, R.S., Bradley, J.R. and Pober, J.S. (2005) Caveolae participate in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and internalization in a human endothelial cell line. *Am J Pathol*, **166**, 1273-1282.
- Dawson, C.W., Tramountanis, G., Eliopoulos, A.G. and Young, L.S. (2003) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J Biol Chem*, **278**, 3694-3704.
- 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.
- Denisenko, O., Shnyreva, M., Suzuki, H. and Bomsztyk, K. (1998) Point mutations in the WD40 domain of Eed block its interaction with Ezh2. *Mol Cell Biol*, **18**, 5634-5642.
- 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.
- Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M. and Liu, Z. (2000) The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity*, **12**, 419-429.
- Dirmeier, U., Hoffmann, R., Kilger, E., Schultheiss, U., Briseno, C., Gires, O., Kieser, A., Eick, D., Sugden, B. and Hammerschmidt, W. (2005) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus coordinately regulates proliferation with control of apoptosis. *Oncogene*, **24**, 1711-1717.
- Dirmeier, U., Neuhierl, B., Kilger, E., Reisbach, G., Sandberg, M.L. and Hammerschmidt, W. (2003) Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein-Barr virus. *Cancer Res*, **63**, 2982-2989.
- Doan, J.E., Windmiller, D.A. and Riches, D.W. (2004) Differential regulation of TNF-R1 signaling: lipid raft dependency of p42mapk/erk2 activation, but not NF- κ B activation. *J Immunol*, **172**, 7654-7660.

- Dudziak, D., Kieser, A., Dirmeier, U., Nimmerjahn, F., Berchtold, S., Steinkasserer, A., Marschall, G., Hammerschmidt, W., Laux, G. and Bornkamm, G.W. (2003) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus induces CD83 by the NF-kappaB signaling pathway. *J Virol*, **77**, 8290-8298.
- Eliopoulos, A.G., Blake, S.M., Floettmann, J.E., Rowe, M. and Young, L.S. (1999a) Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates the JNK pathway through its extreme C terminus via a mechanism involving TRADD and TRAF2. *J Virol*, **73**, 1023-1035.
- Eliopoulos, A.G., Gallagher, N.J., Blake, S.M., Dawson, C.W. and Young, L.S. (1999b) 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., Waites, E.R., Blake, S.M., Davies, C., Murray, P. and Young, L.S. (2003) TRAF1 is a critical regulator of JNK signaling by the TRAF-binding domain of the Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 but not CD40. *J Virol*, **77**, 1316-1328.
- Eliopoulos, A.G. and Young, L.S. (2001) LMP1 structure and signal transduction. *Semin Cancer Biol*, **11**, 435-444.
- Everly, D.N., Jr., Mainou, B.A. and Raab-Traub, N. (2004) Induction of Id1 and Id3 by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus and regulation of p27/Kip and cyclin-dependent kinase 2 in rodent fibroblast transformation. *J Virol*, **78**, 13470-13478.
- 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.
- Fotin-Mleczek, M., Henkler, F., Samel, D., Reichwein, M., Hausser, A., Parmryd, I., Scheurich, P., Schmid, J.A. and Wajant, H. (2002) Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J Cell Sci*, **115**, 2757-2770.
- 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.
- Grimm, T., Schneider, S., Naschberger, E., Huber, J., Guenzi, E., Kieser, A., Reitmeir, P., Schulz, T.F., Morris, C.A. and Sturzl, M. (2005) EBV latent membrane protein-1 protects B cells from apoptosis by inhibition of BAX. *Blood*, **105**, 3263-3269.
- 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.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.

- Harper, N., Hughes, M., MacFarlane, M. and Cohen, G.M. (2003) Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **278**, 25534-25541.
- Higa, L.A., Wu, M., Ye, T., Kobayashi, R., Sun, H. and Zhang, H. (2006) CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation. *Nat Cell Biol*.
- Higuchi, M., Izumi, K.M. and Kieff, E. (2001) Epstein-Barr virus latent-infection membrane proteins are palmitoylated and raft-associated: protein 1 binds to the cytoskeleton through TNF receptor cytoplasmic factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4675-4680.
- Hoeflich, K.P., Yeh, W.C., Yao, Z., Mak, T.W. and Woodgett, J.R. (1999) Mediation of TNF receptor-associated factor effector functions by apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK1). *Oncogene*, **18**, 5814-5820.
- Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*, **114**, 193-197.
- 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, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R. and Karin, M. (1999) Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science*, **284**, 316-320.
- 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.
- 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., Cahir McFarland, E.D., Ting, A.T., Riley, E.A., Seed, B. and Kieff, E.D. (1999) 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.

- 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. 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 U S A*, **94**, 12592-12597.
- Jiang, Y., Woronicz, J.D., Liu, W. and Goeddel, D.V. (1999) Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science*, **283**, 543-546.
- Jones, S.J., Ledgerwood, E.C., Prins, J.B., Galbraith, J., Johnson, D.R., Pober, J.S. and Bradley, J.R. (1999) TNF recruits TRADD to the plasma membrane but not the trans-Golgi network, the principal subcellular location of TNF-R1. *J Immunol*, **162**, 1042-1048.
- 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 U S A*, **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 U S A*, **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.
- Kelliher, M.A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B.Z. and Leder, P. (1998) The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity*, **8**, 297-303.
- 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.
- 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 U S A*, **95**, 11963-11968.
- Lam, N. and Sugden, B. (2003) LMP1, a viral relative of the TNF receptor family, signals principally from intracellular compartments. *EMBO J*, **22**, 3027-3038.
- Lambright, D.G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N.P., Hamm, H.E. and Sigler, P.B. (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature*, **379**, 311-319.
- Lee, S.Y., Reichlin, A., Santana, A., Sokol, K.A., Nussenzweig, M.C. and Choi, Y. (1997) TRAF2 is essential for JNK but not NF-kappaB activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity*, **7**, 703-713.
- Legler, D.F., Micheau, O., Doucey, M.A., Tschopp, J. and Bron, C. (2003) Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Immunity*, **18**, 655-664.
- Li, C. and Beal, M.F. (2005) Leucine-rich repeat kinase 2: a new player with a familiar theme for Parkinson's disease pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 16535-16536.
- Li, Q., Estepa, G., Memet, S., Israel, A. and Verma, I.M. (2000) Complete lack of NF-kappaB activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice: additional defect in neurulation. *Genes Dev*, **14**, 1729-1733.
- Li, X., Yang, Y. and Ashwell, J.D. (2002) TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature*, **416**, 345-347.
- Liefold, N. (2003) Untersuchungen zur Funktion der TRADD-Bindestellen des Latenten Membranproteins 1 des Epstein-Barr-Virus und des humanen Tumornekrosefaktor-Rezeptors 1. Diplomarbeit. Technische Universität, München.
- 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.
- Luftig, M., Prinarakis, E., Yasui, T., Tschritzis, T., Cahir-McFarland, E., Inoue, J., Nakano, H., Mak, T.W., Yeh, W.C., Li, X., Akira, S., Suzuki, N., Suzuki, S., Mosialos, G. and Kieff, E. (2003) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activation of NF-kappaB through IRAK1 and TRAF6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15595-15600.

- Luftig, M., Yasui, T., Soni, V., Kang, M.S., Jacobson, N., Cahir-McFarland, E., Seed, B. and Kieff, E. (2004) Epstein-Barr virus latent infection membrane protein 1 TRAF-binding site induces NIK/IKK alpha-dependent noncanonical NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 141-146.
- Mannel, D.N. and Echtenacher, B. (2000) TNF in the inflammatory response. *Chem Immunol*, **74**, 141-161.
- Mattson, M.P. and Meffert, M.K. (2006) Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ*, **13**, 852-860.
- McFarlane, S.M., Pashmi, G., Connell, M.C., Littlejohn, A.F., Tucker, S.J., Vandenabeele, P. and MacEwan, D.J. (2002) Differential activation of nuclear factor-kappaB by tumour necrosis factor receptor subtypes. TNFR1 predominates whereas TNFR2 activates transcription poorly. *FEBS Lett*, **515**, 119-126.
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K. and Tschopp, J. (2001) NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol*, **21**, 5299-5305.
- Micheau, O. and Tschopp, J. (2003) Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. *Cell*, **114**, 181-190.
- Morita, Y., Kanei-Ishii, C., Nomura, T. and Ishii, S. (2005) TRAF7 sequesters c-Myb to the cytoplasm by stimulating its sumoylation. *Mol Biol Cell*, **16**, 5433-5444.
- 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.
- Muppidi, J.R., Tschopp, J. and Siegel, R.M. (2004) Life And Death Decisions; Secondary Complexes and Lipid Rafts in TNF Receptor Family Signal Transduction. *Immunity*, **21**, 461-465.
- Natoli, G., Costanzo, A., Ianni, A., Templeton, D.J., Woodgett, J.R., Balsano, C. and Levrero, M. (1997) Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway. *Science*, **275**, 200-203.
- Niedobitek, G., Meru, N. and Delecluse, H.J. (2001) Epstein-Barr virus infection and human malignancies. *Int J Exp Pathol*, **82**, 149-170.
- 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*, **398**, 252-256.
- Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K. and Ichijo, H. (1998) ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell*, **2**, 389-395.
- 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.

- Park, Y.C., Ye, H., Hsia, C., Segal, D., Rich, R.L., Liou, H.C., Myszka, D.G. and Wu, H. (2000) A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD-TRAF2 interaction. *Cell*, **101**, 777-787.
- Pullen, S.S., Labadia, M.E., Ingraham, R.H., McWhirter, S.M., Everdeen, D.S., Alber, T., Crute, J.J. and Kehry, M.R. (1999) 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., 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 hetero-oligomerization. *Biochemistry*, **37**, 11836-11845.
- Reed, J.C. (2000) Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*, **157**, 1415-1430.
- Reinhard, C., Shamon, B., Shyamala, V. and Williams, L.T. (1997) Tumor necrosis factor alpha-induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2. *EMBO J*, **16**, 1080-1092.
- Rickinson, A.B. and Kieff, E. (2001) Epstein-Barr virus. 4th ed. in "Fields virology" (D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman and S.E. Straus, Eds.), Vol. 2, pp. 2575-2627. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, PA.
- 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.
- Rothenberger, S., Rousseaux, M., Knecht, H., Bender, F.C., Legler, D.F. and Bron, C. (2002) Association of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 with lipid rafts is mediated through its N-terminal region. *Cell Mol Life Sci*, **59**, 171-180.
- Roulston, A., Reinhard, C., Amiri, P. and Williams, L.T. (1998) Early activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem*, **273**, 10232-10239.
- Rudolph, D., Yeh, W.C., Wakeham, A., Rudolph, B., Nallainathan, D., Potter, J., Elia, A.J. and Mak, T.W. (2000) Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes Dev*, **14**, 854-862.
- Saito, N., Courtois, G., Chiba, A., Yamamoto, N., Nitta, T., Hironaka, N., Rowe, M. and Yamaoka, S. (2003) Two carboxyl-terminal activation regions of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activate NF-kappaB through distinct signaling pathways in fibroblast cell lines. *J Biol Chem*, **278**, 46565-46575.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

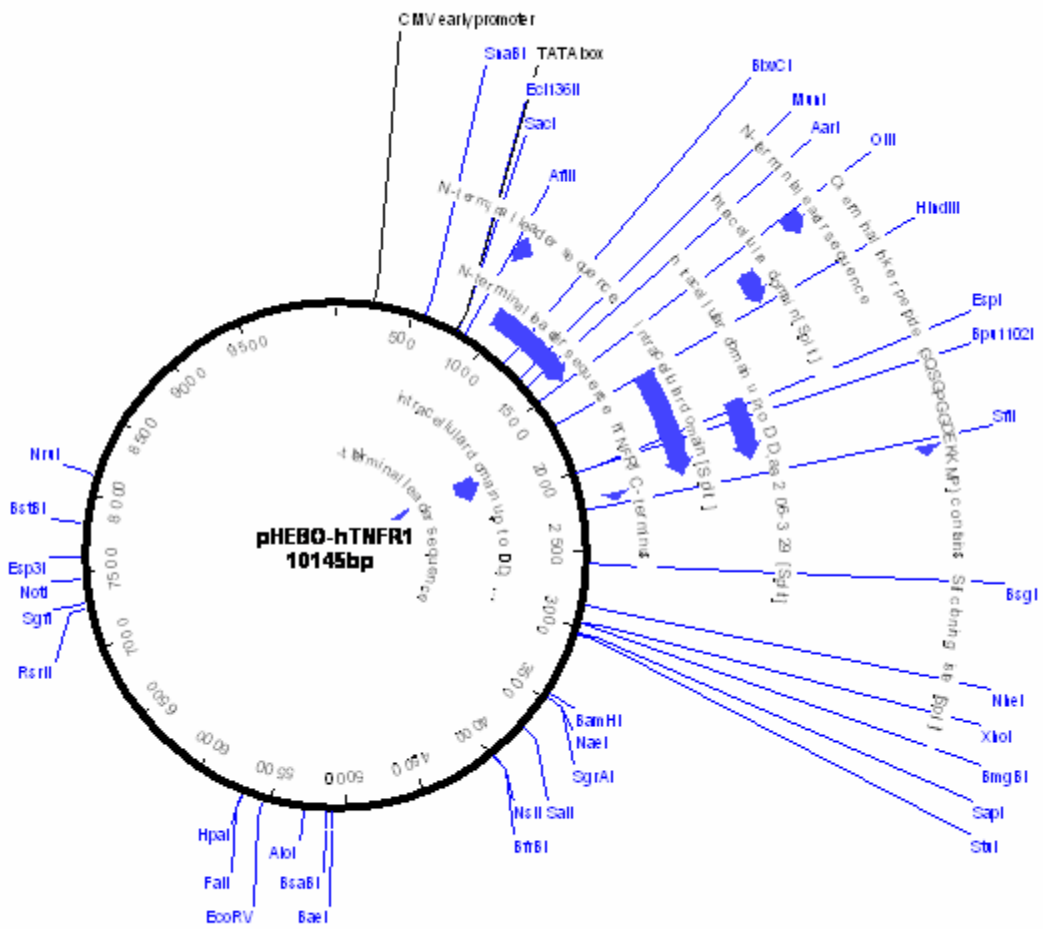
- Schall, T.J., Lewis, M., Koller, K.J., Lee, A., Rice, G.C., Wong, G.H., Gatanaga, T., Granger, G.A., Lentz, R., Raab, H. and et al. (1990) Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell*, **61**, 361-370.
- Scherer, W.F., Syverton, J.T. and Gey, G.O. (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med*, **97**, 695-710.
- Schneider, F. (2005) Die Rolle des TRADD Adapterproteins in der Signaltransduktion des zellulären TNF-Rezeptors 1 und des Latenten Membranproteins 1 des Epstein-Barr-Virus. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Schneider, F. and Kieser, A. (2004) A novel assay to quantify cell death after transient expression of apoptotic genes in B- and T-lymphocytes. *J Immunol Methods*, **292**, 165-174.
- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschwender, M., Adam, D., Mentlein, R., Kabelitz, D. and Schutze, S. (2004) Compartmentalization of TNF Receptor 1 Signaling; Internalized TNF Receptosomes as Death Signaling Vesicles. *Immunity*, **21**, 415-428.
- 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 U S A*, **94**, 13606-13611.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.
- Simons, K. and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 31-39.
- Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K. and Neer, E.J. (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci*, **24**, 181-185.
- Soni, V., Song, Y.J., Cahir-McFarland, E., Kang, M.S., Kieff, E. (2006) Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 C-Terminal Sites 1 and 2 Activate NF-kB through TRAF2/NIK/IKK α /p52 and TRAF6/TAK1/Another Kinase. Abstract "The 12th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases". Boston/Cambridge, Massachusetts, USA.
- Stanger, B.Z., Leder, P., Lee, T.H., Kim, E. and Seed, B. (1995) RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell*, **81**, 513-523.
- Stevenson, D., Charalambous, C. and Wilson, J.B. (2005) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (CAO) up-regulates VEGF and TGF alpha concomitant with hyperlasia, with subsequent up-regulation of p16 and MMP9. *Cancer Res*, **65**, 8826-8835.

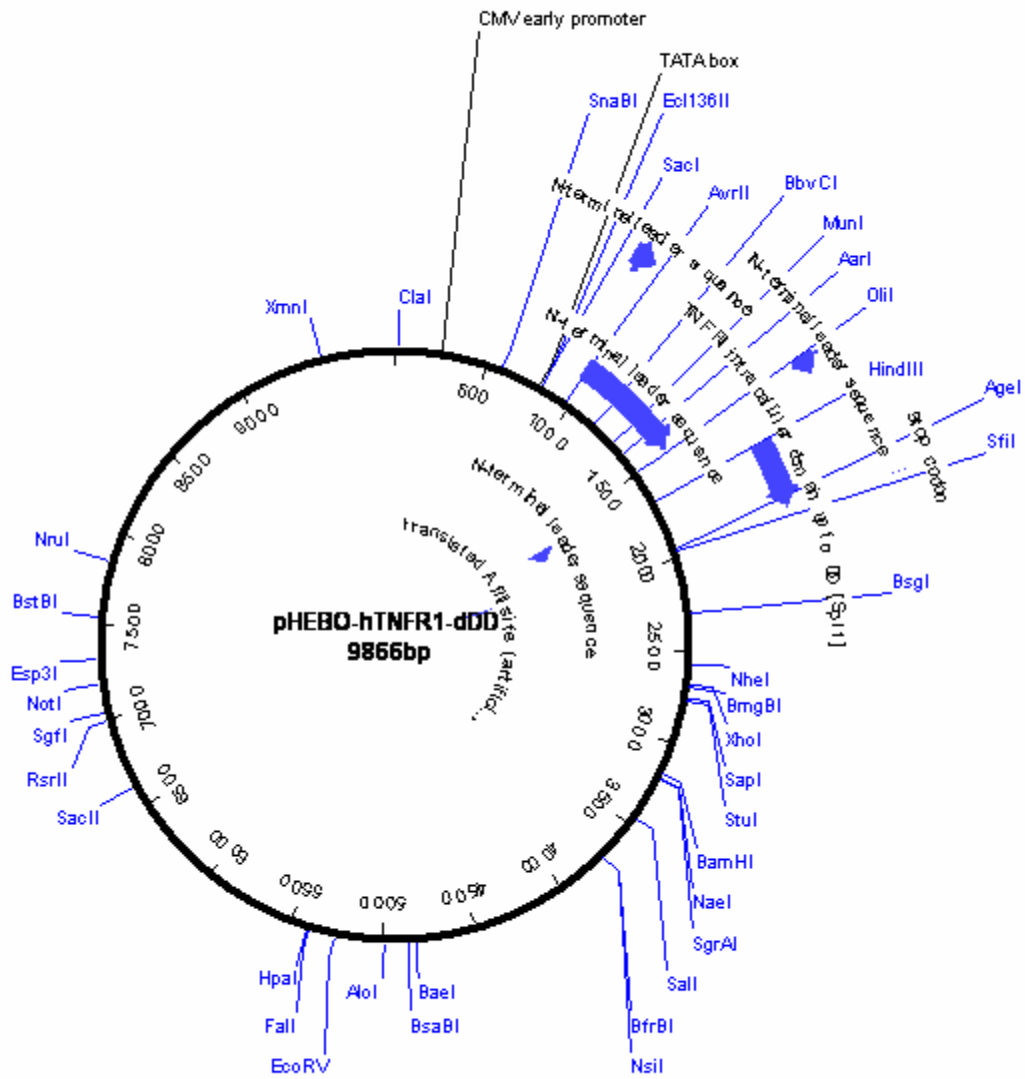
- Sugden, B., Marsh, K. and Yates, J. (1985) A vector that replicates as a plasmid and can be efficiently selected in B-lymphoblasts transformed by Epstein-Barr virus. *Mol Cell Biol*, **5**, 410-413.
- Tada, K., Okazaki, T., Sakon, S., Kobarai, T., Kurosawa, K., Yamaoka, S., Hashimoto, H., Mak, T.W., Yagita, H., Okumura, K., Yeh, W.C. and Nakano, H. (2001) Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. *J Biol Chem*, **276**, 36530-36534.
- Tanaka, M., Fuentes, M.E., Yamaguchi, K., Durnin, M.H., Dalrymple, S.A., Hardy, K.L. and Goeddel, D.V. (1999) Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-kappa B activation in IKK-beta-deficient mice. *Immunity*, **10**, 421-429.
- Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y. and Kieff, E. (1987) Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell*, **50**, 203-213.
- Thorley-Lawson, D.A. (2001) Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol*, **1**, 75-82.
- Ting, A.T., Pimentel-Muinos, F.X. and Seed, B. (1996) RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J*, **15**, 6189-6196.
- Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T. and Ichijo, H. (2001) ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep*, **2**, 222-228.
- Tournier, C., Dong, C., Turner, T.K., Jones, S.N., Flavell, R.A. and Davis, R.J. (2001) MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev*, **15**, 1419-1426.
- Uemura, N., Kajino, T., Sanjo, H., Sato, S., Akira, S., Matsumoto, K. and Ninomiya-Tsuji, J. (2006) TAK1 is a component of the Epstein-Barr virus LMP1 complex and is essential for activation of JNK but not of NF-kappaB. *J Biol Chem*, **281**, 7863-7872.
- van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B. and Reutelingsperger, C.P. (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, **31**, 1-9.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutelingsperger, C. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, **184**, 39-51.
- 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., Grell, M. and Scheurich, P. (1999) TNF receptor associated factors in cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, **10**, 15-26.

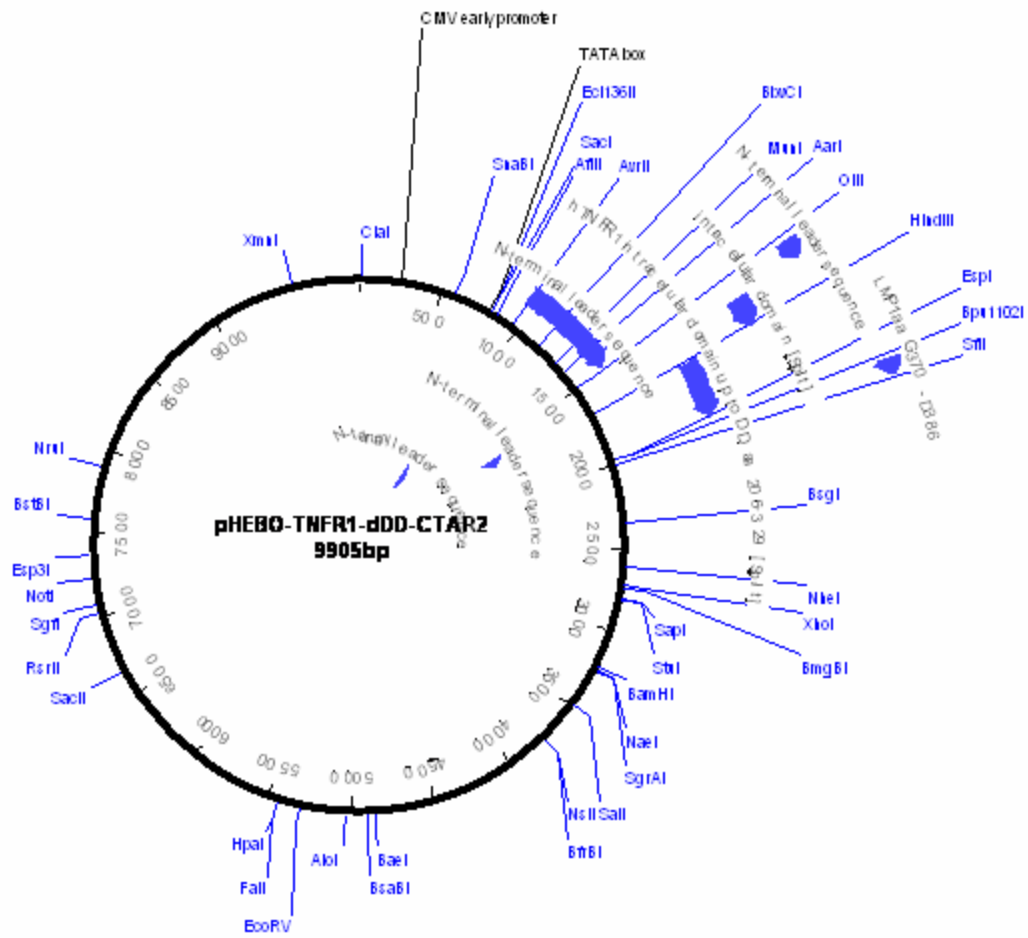
- Wajant, H., Henkler, F. and Scheurich, P. (2001) The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell Signal*, **13**, 389-400.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, **10**, 45-65.
- Wan, J., Sun, L., Mendoza, J.W., Chui, Y.L., Huang, D.P., Chen, Z.J., Suzuki, N., Suzuki, S., Yeh, W.C., Akira, S., Matsumoto, K., Liu, Z.G. and Wu, Z. (2004) Elucidation of the c-Jun N-terminal kinase pathway mediated by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1. *Mol Cell Biol*, **24**, 192-199.
- Wan, J., Zhang, W., Wu, L., Bai, T., Zhang, M., Lo, K.W., Chui, Y.L., Cui, Y., Tao, Q., Yamamoto, M., Akira, S. and Wu, Z. (2006) BS69, a specific adaptor in the latent membrane protein 1-mediated c-Jun N-terminal kinase pathway. *Mol Cell Biol*, **26**, 448-456.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J. and Chen, Z.J. (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, **412**, 346-351.
- Wang, D., Liebowitz, D. and Kieff, E. (1985) An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell*, **43**, 831-840.
- Weiss, T., Grell, M., Siemienski, K., Muhlenbeck, F., Durkop, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P. and Wajant, H. (1998) TNFR80-dependent enhancement of TNFR60-induced cell death is mediated by TNFR-associated factor 2 and is specific for TNFR60. *J Immunol*, **161**, 3136-3142.
- Wilson, J.B., Weinberg, W., Johnson, R., Yuspa, S. and Levine, A.J. (1990) Expression of the BNLF-1 oncogene of Epstein-Barr virus in the skin of transgenic mice induces hyperplasia and aberrant expression of keratin 6. *Cell*, **61**, 1315-1327.
- Wu, L., Nakano, H. and Wu, Z. (2006) The C-terminal activating region 2 of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates NF-kappaB through TRAF6 and TAK1. *J Biol Chem*, **281**, 2162-2169.
- Xia, Y., Makris, C., Su, B., Li, E., Yang, J., Nemerow, G.R. and Karin, M. (2000) MEK kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5243-5248.
- Xia, Z.P. and Chen, Z.J. (2005) TRAF2: a double-edged sword? *Sci STKE*, **2005**, pe7.
- Xie, P. and Bishop, G.A. (2004) Roles of TNF Receptor-Associated Factor 3 in Signaling to B Lymphocytes by Carboxyl-Terminal Activating Regions 1 and 2 of the EBV-Encoded Oncoprotein Latent Membrane Protein 1. *J Immunol*, **173**, 5546-5555.
- Xie, P., Hostager, B.S. and Bishop, G.A. (2004) Requirement for TRAF3 in Signaling by LMP1 But Not CD40 in B Lymphocytes. *J Exp Med*, **199**, 661-671.
- Xu, L.G., Li, L.Y. and Shu, H.B. (2004) TRAF7 potentiates MEKK3-induced AP1 and CHOP activation and induces apoptosis. *J Biol Chem*, **279**, 17278-17282.

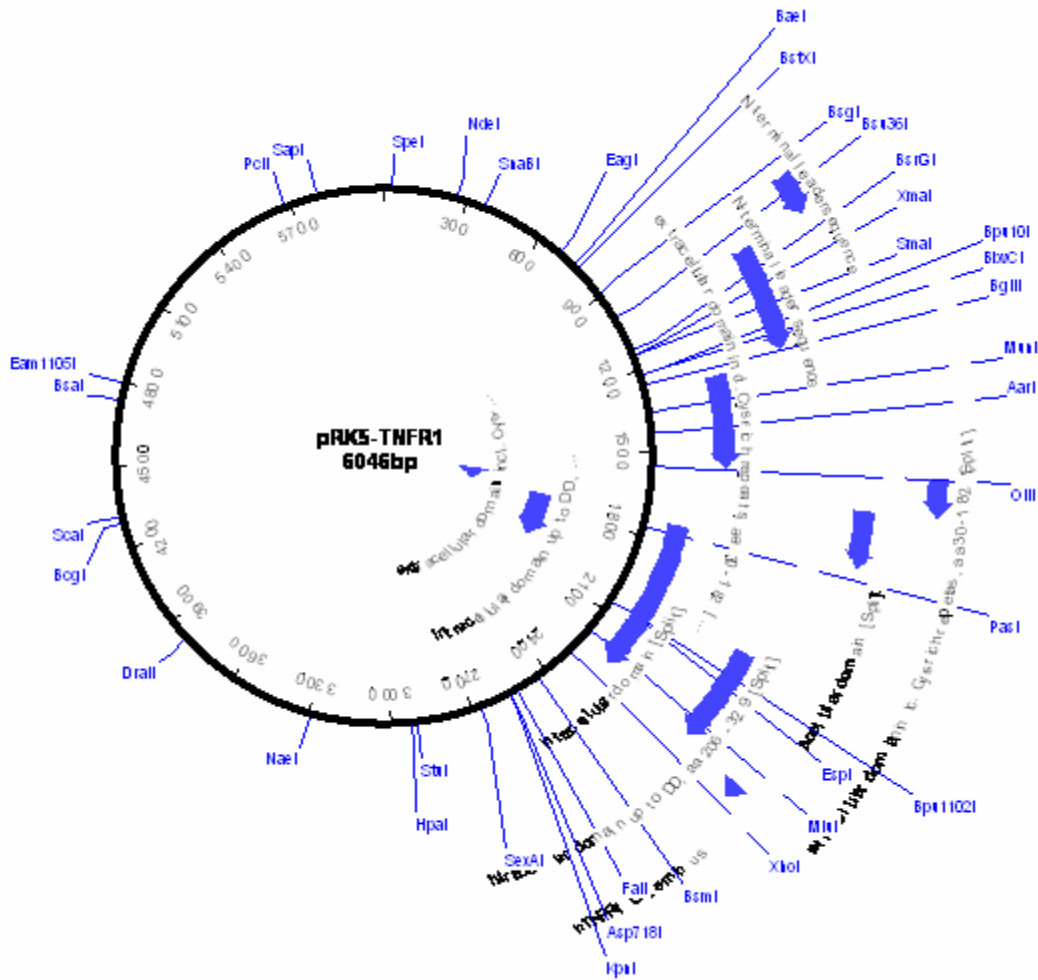
- Yang, J., Deng, X., Deng, L., Gu, H., Fan, W. and Cao, Y. (2004) Telomerase activation by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is associated with c-Myc expression in human nasopharyngeal epithelial cells. *J Exp Clin Cancer Res*, **23**, 495-506.
- Yang, J., Lin, Y., Guo, Z., Cheng, J., Huang, J., Deng, L., Liao, W., Chen, Z., Liu, Z. and Su, B. (2001) The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat Immunol*, **2**, 620-624.
- Yang, X., He, Z., Xin, B. and Cao, L. (2000) LMP1 of Epstein-Barr virus suppresses cellular senescence associated with the inhibition of p16INK4a expression. *Oncogene*, **19**, 2002-2013.
- Yasui, T., Kieff, E., Kikutani, H. (2006) Role of TRAF3 in EBV LMP1 Signaling and B Lymphocyte Development. Abstract "The 12th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases". Boston/Cambridge, Massachusetts, USA.
- Yasui, T., Luftig, M., Soni, V. and Kieff, E. (2004) Latent infection membrane protein transmembrane FWLY is critical for intermolecular interaction, raft localization, and signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 278-283.
- Yeh, W.C., Shahinian, A., Speiser, D., Kraunus, J., Billia, F., Wakeham, A., de la Pompa, J.L., Ferrick, D., Hum, B., Iscove, N., Ohashi, P., Rothe, M., Goeddel, D.V. and Mak, T.W. (1997) Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity*, **7**, 715-725.
- Yoshida, H., Jono, H., Kai, H. and Li, J.D. (2005) The tumor suppressor cylindromatosis (CYLD) acts as a negative regulator for toll-like receptor 2 signaling via negative cross-talk with TRAF6 AND TRAF7. *J Biol Chem*, **280**, 41111-41121.
- 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.
- Young, L.S. and Rickinson, A.B. (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, **4**, 757-768.
- Yujiri, T., Ware, M., Widmann, C., Oyer, R., Russell, D., Chan, E., Zaitso, Y., Clarke, P., Tyler, K., Oka, Y., Fanger, G.R., Henson, P. and Johnson, G.L. (2000) MEK kinase 1 gene disruption alters cell migration and c-Jun NH2-terminal kinase regulation but does not cause a measurable defect in NF-kappa B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7272-7277.
- Zhang, H., Zhang, R., Luo, Y., D'Alessio, A., Pober, J.S. and Min, W. (2004) AIP1/DAB2IP, a novel member of the Ras-GAP family, transduces TRAF2-induced ASK1-JNK activation. *J Biol Chem*.
- Zheng, L., Bidere, N., Staudt, D., Cubre, A., Orenstein, J., Chan, F.K. and Lenardo, M. (2006) Competitive control of independent programs of tumor necrosis factor receptor-induced cell death by TRADD and RIP1. *Mol Cell Biol*, **26**, 3505-3513.

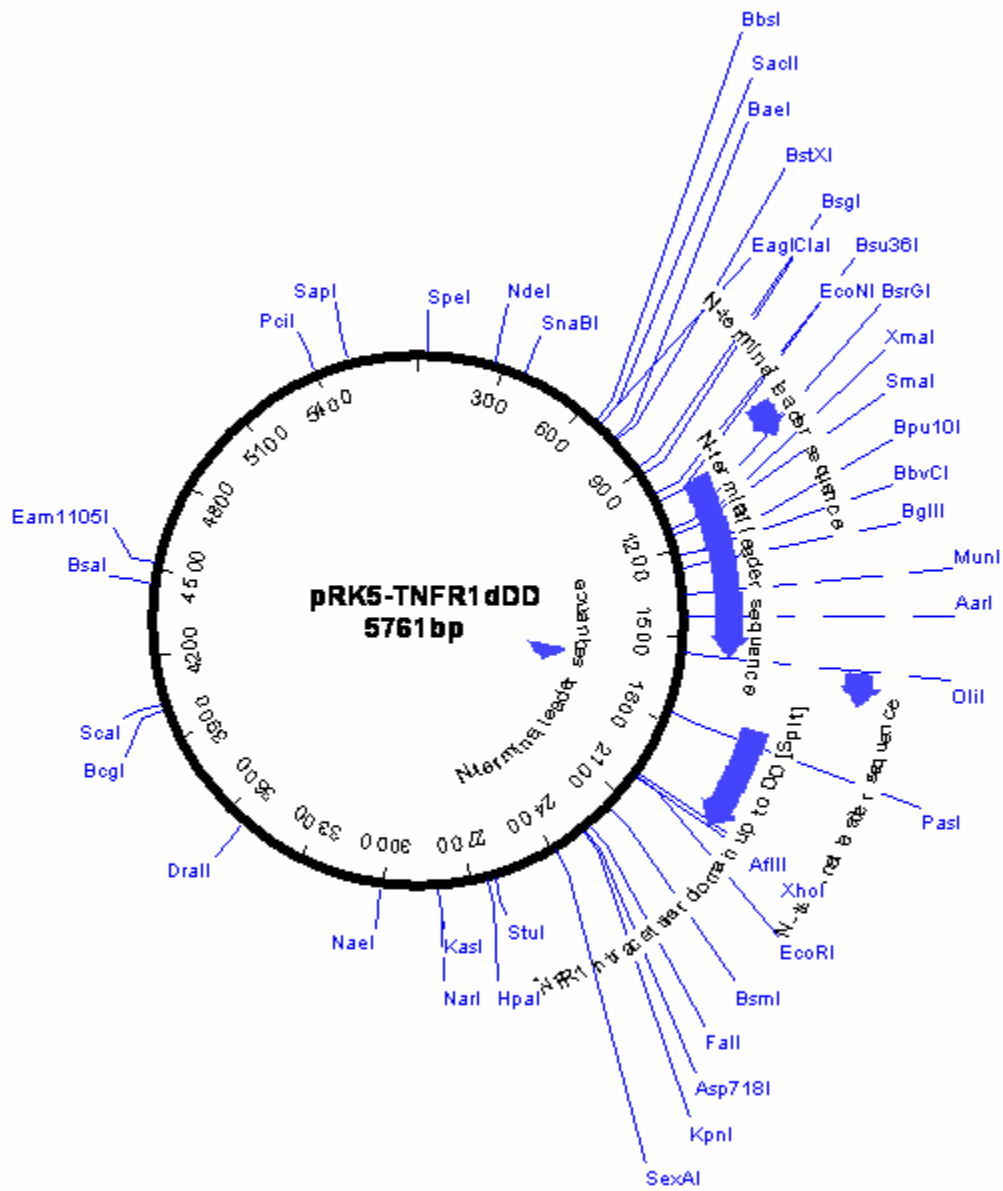
Zhu, N., Khoshnan, A., Schneider, R., Matsumoto, M., Dennert, G., Ware, C. and Lai, M.M. (1998) Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol*, **72**, 3691-3697.

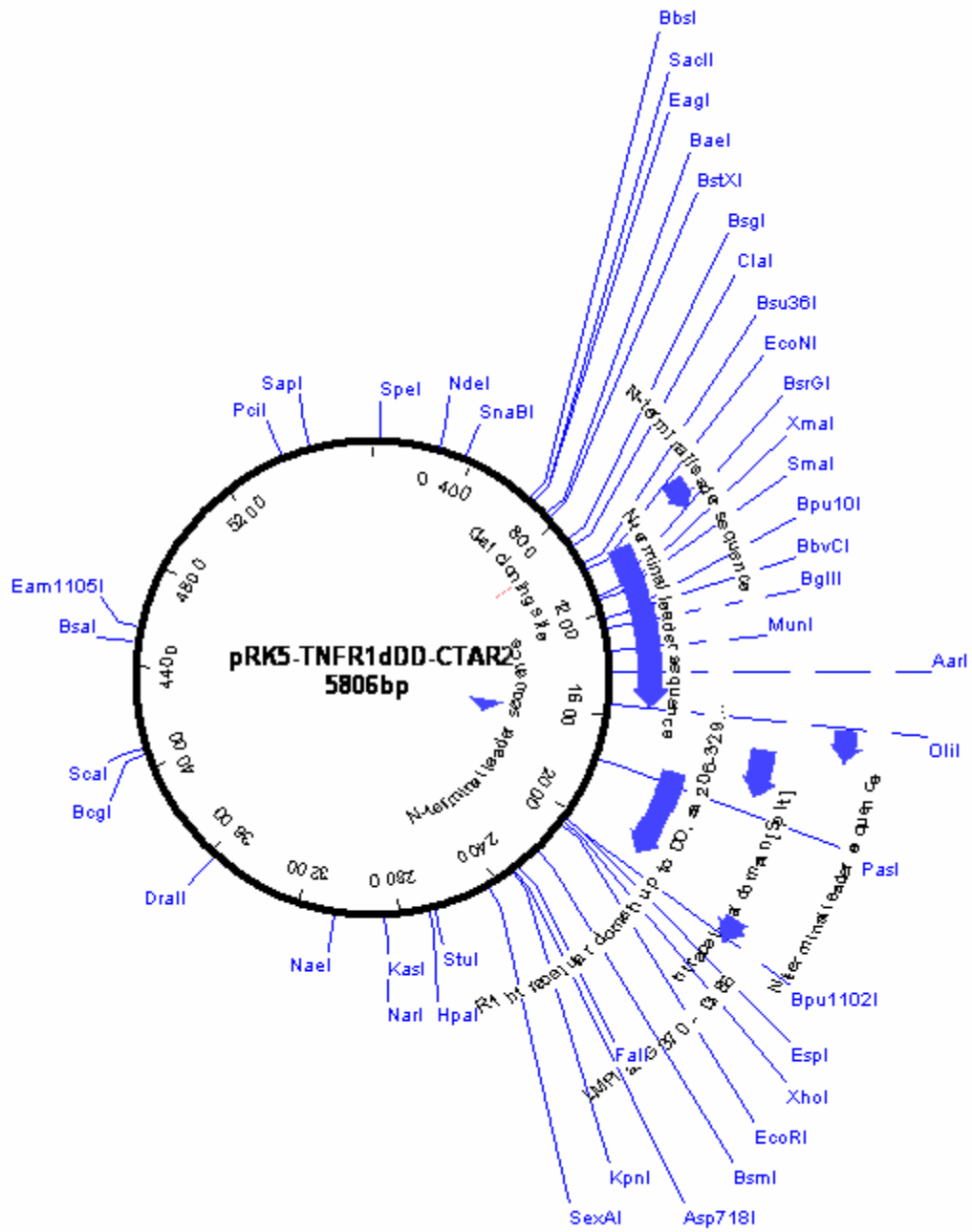


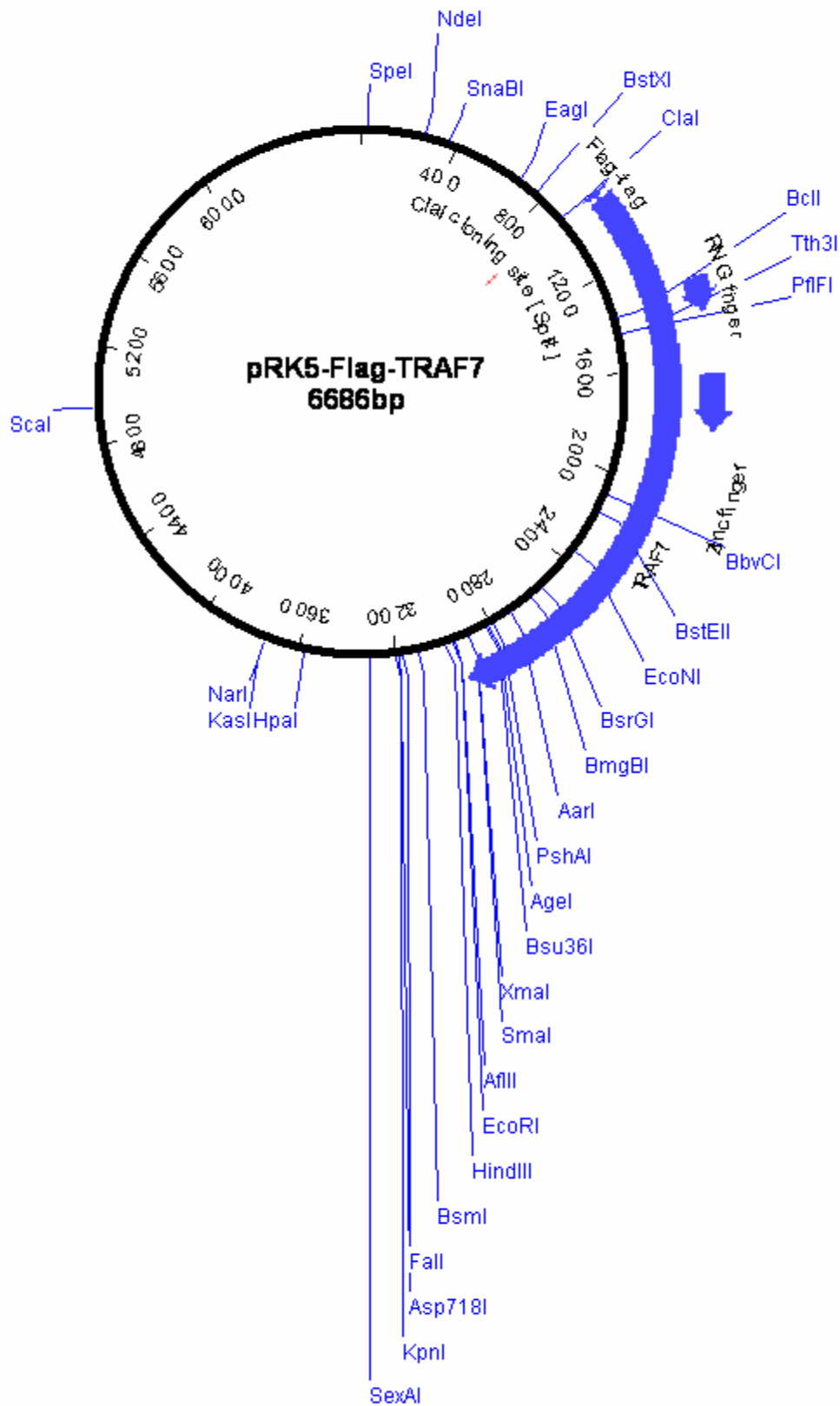


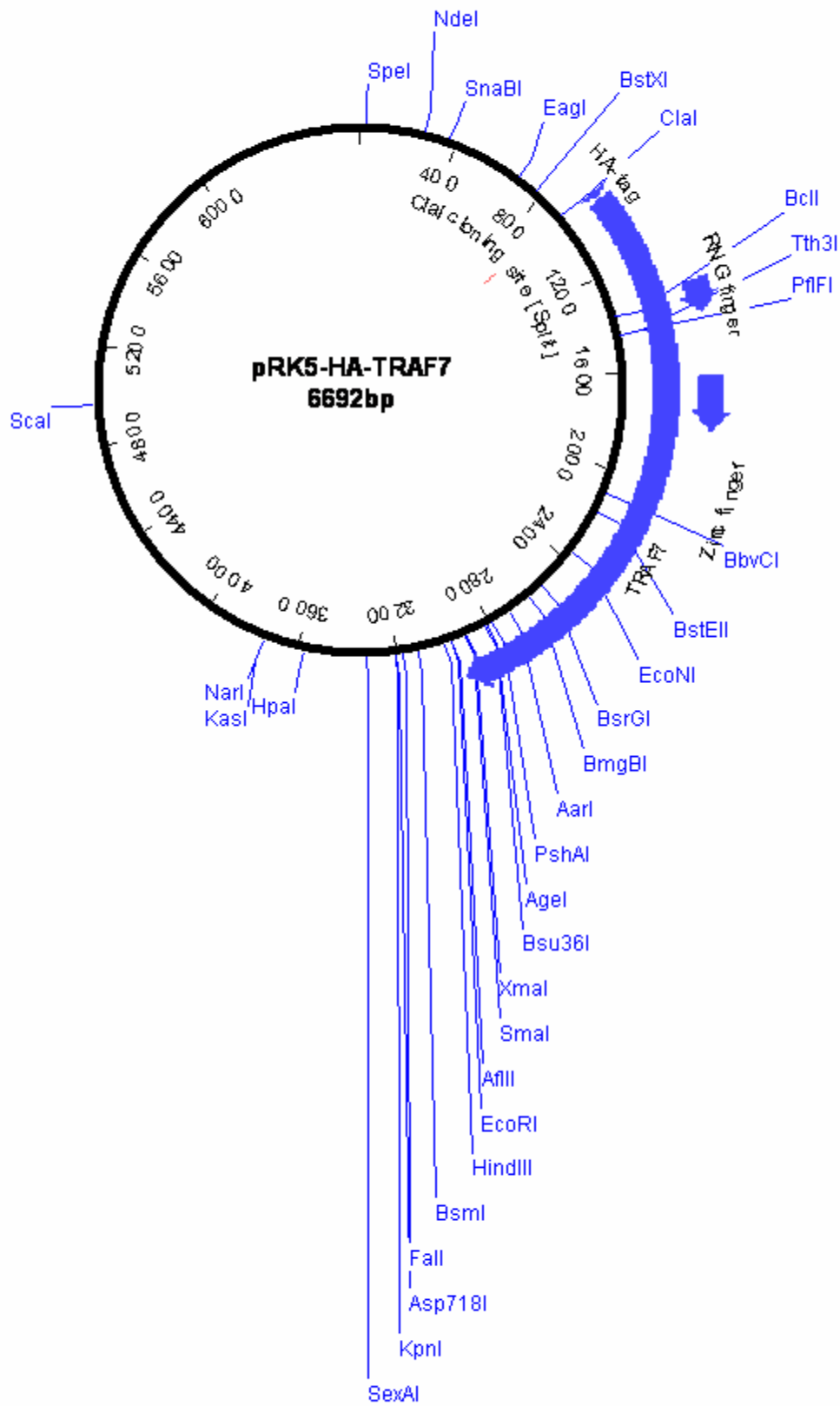


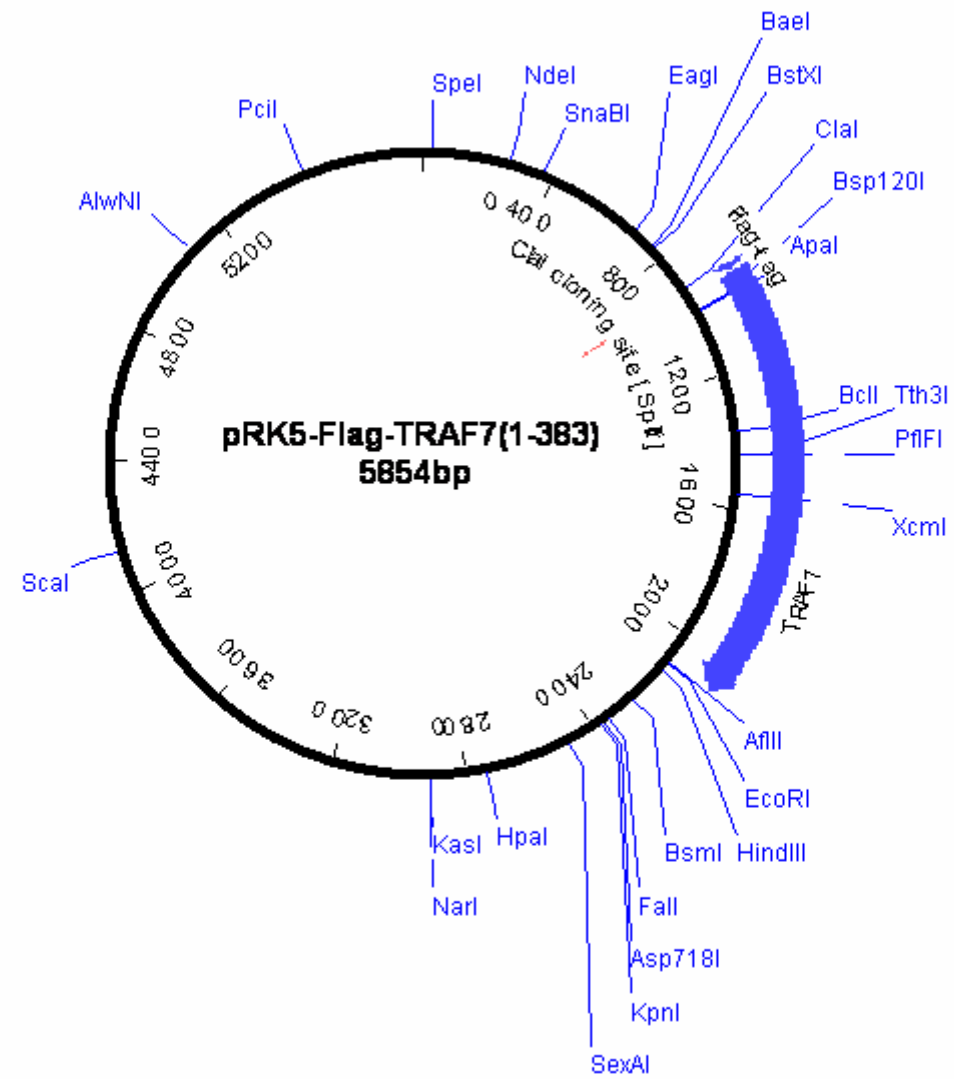


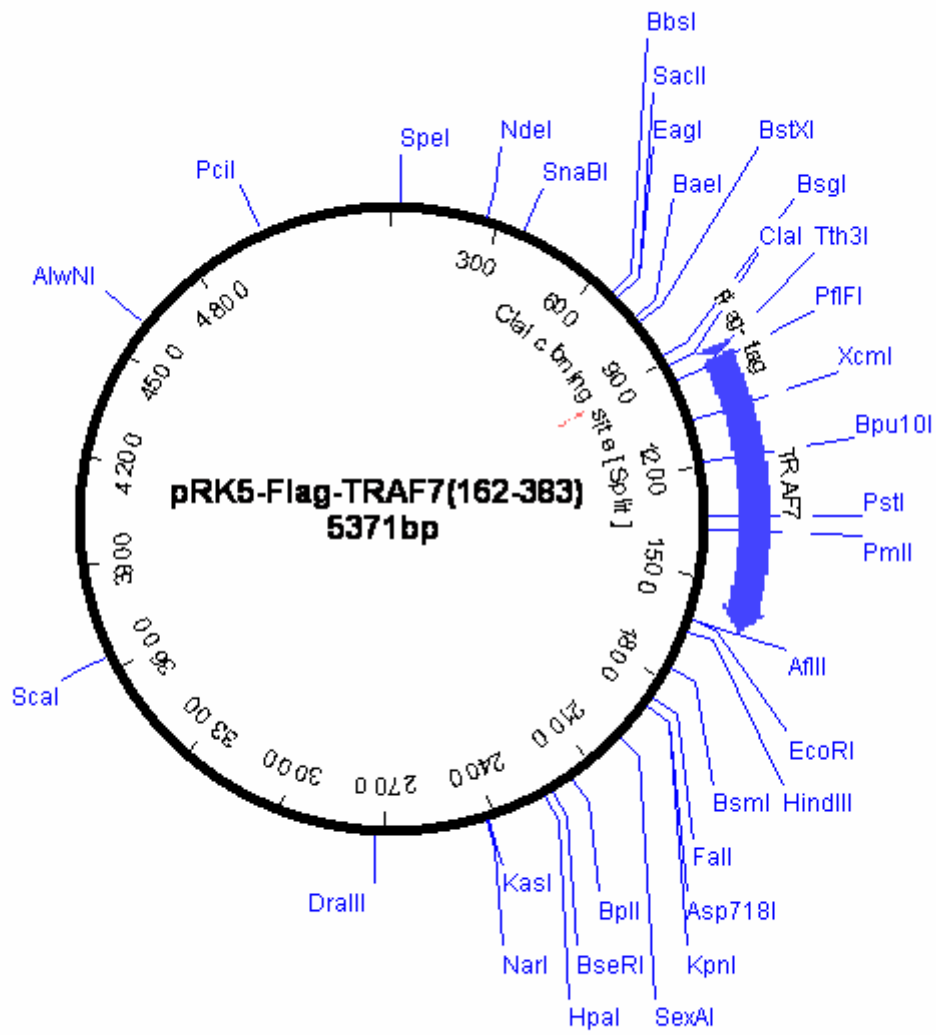


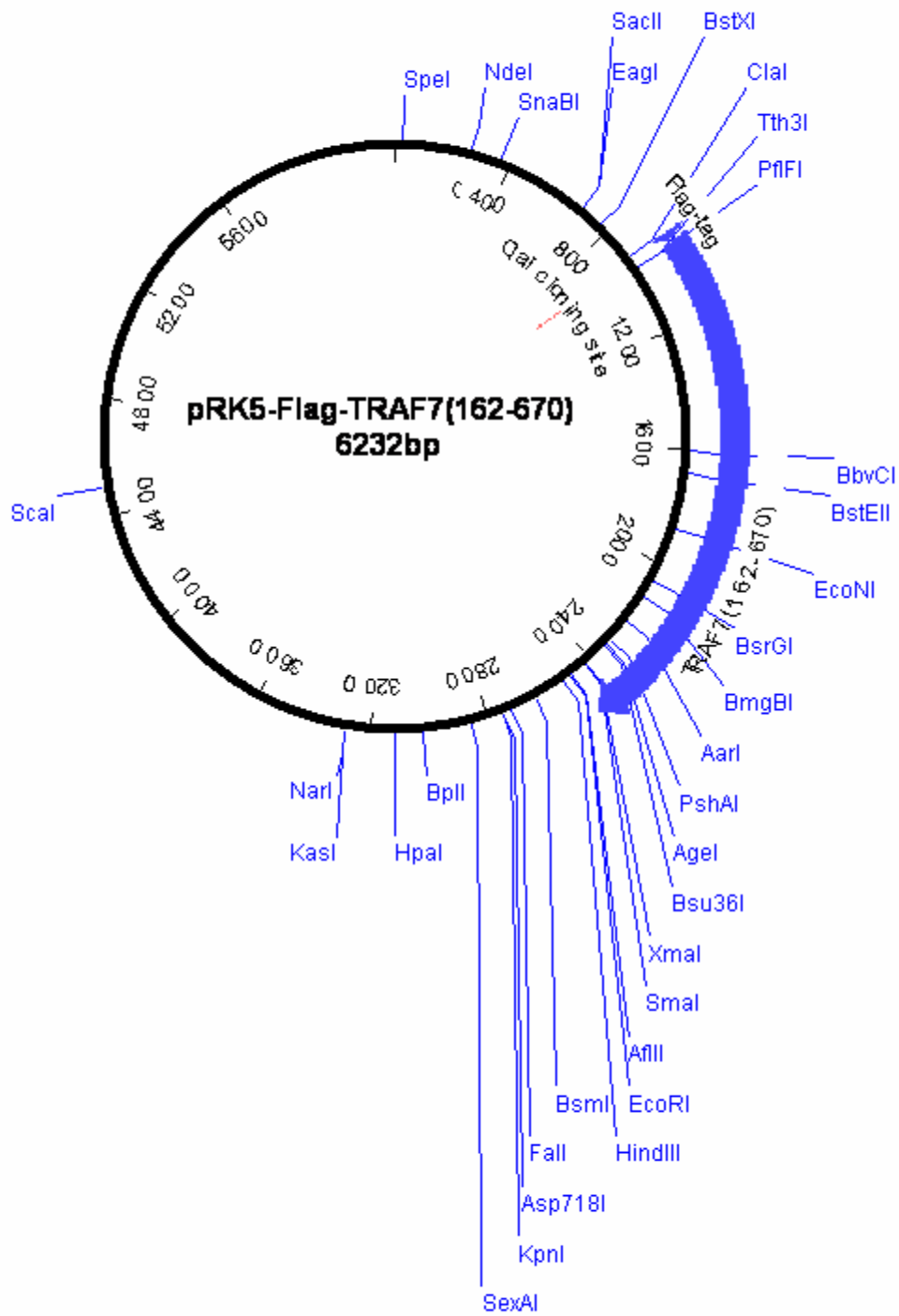












Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Dr. Arnd Kieser für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, für die gründliche Korrektur dieser Arbeit sowie für seine Unterstützung,

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung anzufertigen sowie für hilfreiche Diskussionen,

Herrn Prof. Dr. Dirk Eick dafür, dass er die Aufgaben und Pflichten des offiziellen Betreuers der Arbeit an der Fakultät für Biologie übernommen hat,

den Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Signaltransduktion“ (Cinthia, Frank, Helmi, Janine und Thomas) sowie allen Mitgliedern der Abteilung Genvektoren für ihre große Hilfsbereitschaft sowie für das gute Arbeitsklima, Nicola für die Vorarbeiten, die sie bereits für diese Doktorarbeit geleistet hatte, Cinthia für die Zusammenarbeit in Sachen *Lipid Rafts*, Christoph für seine Hilfe mit der Durchflusszytometrie, Markus, Patrizia, Magda, Romana und vielen weiteren ohne die das Arbeiten in der GSF nur halb soviel Spaß gemacht hätte, Babs und Cinthia für moralische Unterstützung sowie für das eine oder andere ausgedehnte Freshmaker Mittagessen,

Andreas für seine Unterstützung und dafür, dass er mich nach stressigen oder frustrierenden Labortagen wieder aufgebaut hat sowie meiner Schwester Laura für Hilfe bei allen Computerfragen. Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die während dieser Doktorarbeit immer für mich da waren und mich unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Julia Neugebauer
Geburtsdatum: 09.04.1978
Geburtsort: München
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1984-1988 Grundschohle in München
1988-1997 Michaeli-Gymnasium München
Juni 1997 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Studium

1997-2002 Studium der Biochemie an der Universität Regensburg
Oktober 1999 Abschluss des Vordiploms
August-Dezember 2000 Auslandssemester an der New York University
Oktober 2002 Abschluss des Studiums der Biochemie (Diplom)

März 2003-August 2006

Promotion in der Arbeitsgruppe Signaltransduktion, Abteilung Genvektoren
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München

21.11.2007 Mündliche Doktorprüfung in der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berufstätigkeit

seit September 2006 Wissenschaftler bei MorphoSys AG, Martinsried

Erklärung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

Hiermit erkläre ich, dass diese Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg nicht unterzogen habe.

München, Februar 2007

Julia Neugebauer