

**Etablierung der Interaktion des viralen Onkoproteins  
LMP1 mit den zellulären Signalproteinen der TRAF-  
Proteinfamilie als Zielstruktur für Inhibitoren**



**Dissertation**

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

vorgelegt von Fabian Giehler

am 29.11.2012



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Etablierung der Interaktion des viralen Onkoproteins LMP1 mit den zellulären Signalproteinen der TRAF-Proteinfamilie als Zielstruktur für Inhibitoren“**

von mir selbständig und nur mit den erlaubten Hilfsmitteln angefertigt wurde. Alle Quellenangaben und Hilfsmittel wurden deutlich gekennzeichnet. Weiterhin ist diese Dissertation weder als Teilstück noch in der vorliegenden vollständigen Form einer weiteren Prüfungskommission vorgelegt worden.

Fabian Gehler



# HelmholtzZentrum münchen

Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

Diese Arbeit wurde in der Forschungsgruppe Signaltransduktion unter der Betreuung von PD. Dr. Kieser und Prof. Dr. Kempkes am Helmholtz Zentrum München angefertigt.

Dissertation eingereicht am: 29.11.2012

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2013

Erstgutachter: Prof. Dr. B. Kempkes

Zweitgutachter: Prof. Dr. E. Weiss



Teile dieser Arbeit sind in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

## Veröffentlichungen

Shkoda A, Town JA, Griese J, Romio M, Sarioglu H, Knofel T, Giehler F, Kieser A (2012) The Germinal Center Kinase TNIK Is Required for Canonical NF-kappaB and JNK Signaling in B-Cells by the EBV Oncoprotein LMP1 and the CD40 Receptor. *PLoS Biol* **10**: e1001376

de Jong S, Albrecht J, Giehler F, Kieser A, Sticht F, Biesinger B (2013) Noncanonical NF-kappaB Activation by the Oncoprotein Tio Occurs Through a Nonconserved TRAF3-Binding Motif.. *Sci Signal* **6**: ra27

## Vorträge und Poster

Giehler F, Kieser, A (2010) Development of a screening assay for compounds blocking the interaction of the EBV oncoprotein LMP1 with its critical signaling mediator TRAF2. Vortrag auf dem 14<sup>th</sup> Joint Meeting of the Signal Transduction society: Signal Transduction Receptors, Mediators and Genes, 18.-20.10. 2010, Weimar

Giehler F, Friberg A, Sterz K, Sattler M, Kieser A (2012) Development of small molecule inhibitors of LMP1-TRAF2 interaction that specifically block B-cell transformation by EBV. Poster Präsentation, International Congress on Oncogenic Herpesviruses and Associated Diseases, 01.-04.08. 2012, Philadelphia, Pennsylvania

Giehler F, Sterz K, Feller SM, Kieser A (2012) Molecular characterisation of TRAF6 as direct interaction partner of the EBV oncoprotein LMP1 as an potential drug target. Poster Präsentation, 16<sup>th</sup> Joint Meetig of the Signal Transduction society: Signal Transduction Receptors, Mediators and Genes, 05.-07.11. 2012, Weimar

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Epstein-Barr-Virus</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Behandlung von EBV-assoziierten Karzinomen und Lymphomen</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Das Latente Membranprotein 1</b>	<b>3</b>
1.3.1 Struktur und Funktion von LMP1	3
1.3.2 Aktivierung zellulärer Signalwege durch LMP1	5
1.3.3 Signalwege, die durch die CTAR1-Domäne induziert werden	7
1.3.4 Aktivierung von Signalwegen durch die CTAR2-Domäne	10
1.3.5 Regulierung von Signalwegen durch beide CTAR-Domänen	16
<b>1.4 Die TRAF-Protein-Familie</b>	<b>17</b>
1.4.1 Überblick über die TRAF-Protein-Familie	17
1.4.2 Strukturelle Aspekte der Interaktion von TRAFs mit Rezeptoren	19
<b>1.5 Aufbau eines Screeningsystems zur Identifizierung von Inhibitoren</b>	<b>23</b>
1.5.1 Allgemeine Voraussetzungen	23
1.5.2 Protein-Protein-Interaktionen als Ziel kleiner inhibitorischer Moleküle	25
1.5.3 Systeme zur Identifizierung von Inhibitoren	26
1.5.4 Prinzipien für die Aufstellung von hochdurchsatzfähigen Screeningsystemen	27
<b>1.6 Die LMP1-induzierten Signalwege als therapeutisches Ziel</b>	<b>30</b>
<b>1.7 Ziel dieser Arbeit</b>	<b>33</b>
<b>2. Material</b>	<b>34</b>
<b>2.1 Plasmide</b>	<b>34</b>
<b>2.2 Humane Zelllinien</b>	<b>37</b>
<b>2.3 Murine Zelllinien</b>	<b>37</b>
<b>2.4 Bakterienstämme</b>	<b>37</b>
<b>2.5 Standard Laborequipment</b>	<b>38</b>
<b>2.6 Verbrauchsmaterialien</b>	<b>38</b>
<b>2.7 Antikörper</b>	<b>39</b>
2.7.1 Primärantikörper	39
2.7.2 Sekundärantikörper	39
<b>2.8 Enzyme und Reagenzien</b>	<b>39</b>
<b>2.9 Kommerzielle Kits</b>	<b>40</b>
<b>2.10 Software</b>	<b>40</b>
<b>3. Methoden</b>	<b>41</b>
<b>3.1 DNA-Arbeitstechniken</b>	<b>41</b>
3.1.1 Polymerasekettenreaktion	41



3.1.2 Zielgerichtete Mutagenese von Plasmiden mittels PCR-Reaktionen	41
3.1.3 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	41
3.1.4 Restriktionsverdau von PCR-Fragmenten und Plasmid-DNA	42
3.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten	42
3.1.6 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab	42
3.1.7 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab	42
3.1.8 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	43
<b>3.2 Klonierungen</b>	<b>43</b>
3.2.1 GST-Fusionsproteine	43
3.2.2 6xHis-Epitop fusionierte TRAF-Proteine	44
3.2.3 Flag-Epitop fusionierte TRAF6-Proteine	46
<b>3.3 Protein Arbeitstechniken</b>	<b>47</b>
3.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	47
3.3.2 Coomassie-Brilliant-Blau Färbung von SDS-Gelen	47
3.3.3 Immunblot-Analysen	48
3.3.4 Quantifizierung von Signalen aus Immunblot-Analysen	48
3.3.5 Bestimmung der Konzentration von Proteinen nach der Bradford-Methode	49
3.3.6 Reinigung von Proteinen mittels Ni <sup>2+</sup> -NTA-Affinitätschromatographie	49
3.3.7 Reinigung von GST-fusionierten Proteinen	50
3.3.8 Protein-Protein-Interaktionsstudien zwischen GST-fusionierten Proteinen und His-TRAF-Proteinen	50
3.3.9 Protein-Protein-Interaktionsstudien mittels Oberflächenplasmonresonanz	51
3.3.10 Peptid-Protein-Interaktionsstudien mittels Peptidblot-Analysen	52
3.3.11 Protein-Protein-Interaktionsstudien mittels ELISA-basierter Experimente	53
3.3.12 Screening der AnalytiCon Discovery (AD)-Bibliothek	55
3.3.13 Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC <sub>50</sub> ) der Substanzen	56
3.3.14 Ko-Immunpräzipitationen	57
3.3.15 Kovalente Immobilisierung von Antikörpern an Protein G Sepharose-Kügelchen	58
<b>3.4 Zellkultur</b>	<b>58</b>
3.4.1 Zellkulturbedingungen	58
3.4.2 Langzeitlagerung von Zellkulturen	59
3.4.3 Zellzahlmessungen mittels Coulter Counter	59
3.4.4 Bestimmung von Zellzahlen mit der Zählkammer	59
3.4.5 Transfektion von HEK293-D-Zellen mit DNA-Plasmiden	60
3.4.6 Bestimmung der Vitalität von Zellkulturen	60
3.4.7 Luciferase-Reporter-Experimente	60
<b>3.5 Mikrobielle Arbeitsmethoden</b>	<b>61</b>
3.5.1 Suspensionskulturen	61
3.5.2 Bakterienausstriche	62
3.5.3 Dauerkulturen von Bakterien	62
3.5.4 Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	62
3.5.5 Herstellung von chemisch-kompetenten <i>E. coli</i> -Bakterien	62
3.5.6 Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i> -Bakterien	63
<b>3.6 Computergestützte Analysen von Proteinen</b>	<b>63</b>
3.6.1 Analysen und graphische Aufarbeitung von Protein-3D-Strukturen	63

3.6.2 Berechnung des Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizienten nach Moriguchi	63
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>64</b>
<b>4.1 Grundlegende <i>in vitro</i> Studien der Interaktion zwischen LMP1- und TRAF-Proteinen</b>	<b>64</b>
4.1.1 Proteinexpression und Reinigung von LMP1-Fusionsproteinen	64
4.1.2 Design, Expression und Reinigung der TRAF-Proteine	67
4.1.3 Die TRAF-Proteine 1-3, 5 und 6 binden an die Signaldomäne von LMP1	69
<b>4.2 Analyse der Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wt</b>	<b>74</b>
<b>4.3 Aufbau eines ELISA-basierten Sceningsystems</b>	<b>77</b>
<b>4.4 Screening der AnalytiCon Discovery Bibliothek</b>	<b>82</b>
4.4.1 Testdurchlauf des ELISA-basierten Systems	84
4.4.2 Identifizierung spezifischer LMP1-TRAF2-Inhibitoren	86
4.4.3 Die Substanzen AD01-E11 und AD05-F07 haben eine spezifische Wirkung auf EBV-transformierte B-Zellen	94
<b>4.5 TRAF6 als direkter Interaktionspartner der CTAR2-Domäne von LMP1</b>	<b>99</b>
4.5.1 Die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 wird durch die CTAR2-Domäne vermittelt	99
4.5.2 TRAF6 interagiert mit der Sequenz P <sub>379</sub> VQLSY innerhalb der CTAR2-Domäne	100
4.5.3 Vergleich der Interaktion von TRAF6 mit LMP1 und CD40	104
4.5.4 Die TRAF6 Aminosäuren Arg <sub>392</sub> , Phe <sub>471</sub> und Tyr <sub>473</sub> sind essentiell für die Interaktion von TRAF6 mit LMP1	108
4.5.5 Die Punktmutationen R392A, F471A und Y473A in TRAF6 inhibieren die Bindung von TRAF6 an LMP1 <i>in vivo</i>	114
4.5.6 Die Mutationen R392A, F471A und Y473A verhindern die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch die CTAR2-Domäne	115
<b>4.6 TRADD und TRAF6 sind direkte Interaktionspartner</b>	<b>118</b>
<b>5. Diskussion</b>	<b>124</b>
<b>5.1 Identifizierung von Inhibitoren, die gegen den Signalkomplex LMP1-TRAF2 gerichtet sind</b>	<b>124</b>
5.1.1 Aufbau des ELISA-basierten Screeningsystems	125
5.1.2 Identifizierung und Charakterisierung von Inhibitoren	126
5.1.3 Zukünftige weiterführende Charakterisierung der Inhibitoren	130
5.1.4 Der Nutzen rekombinanter TRAF-Proteine für Interaktionsstudien	133
<b>5.2 TRAF6 ist ein direkter Interaktionspartner von LMP1</b>	<b>134</b>
5.2.1 Identifizierung des TRAF6 Interaktionsmotivs in LMP1	134
5.2.2 Die LMP1-Bindetasche auf der Oberfläche von TRAF6	138
5.2.3 Einfluss der direkten Bindung von TRAF6 an LMP1 auf die Signalwege, die durch die CTAR2-Domäne aktiviert werden	139
<b>5.3 Die Rolle von TRADD im CTAR2 Signalkomplex</b>	<b>141</b>
<b>5.4 Weiterführende Schritte in der Entwicklung von Inhibitoren, die gegen den LMP1-Signalkomplex gerichtet sind</b>	<b>144</b>

<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>145</b>
<b>7. Abkürzungen</b>	<b>147</b>
<b>8. Literatur</b>	<b>150</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>165</b>
Anhang 1	165
Anhang 2	166
Anhang 3	167
Anhang 4	168
Anhang 5	169

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Epstein-Barr-Virus

Seit der Entdeckung des Epstein-Barr-Virus (EBV oder auch Humanes Herpesvirus 4 - HH4) in Burkitt-Lymphom (BL)-Zellen wird EBV mit einer ganzen Reihe von malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Epstein *et al.*, 1964; Roizmann *et al.*, 1992; IARC *et al.*, 1997; Okano, 1998; Niedobitek *et al.*, 2001). Überwiegend findet die Primärinfektion mit EBV vor dem dritten Lebensjahr statt und verläuft dann oftmals asymptomatisch (Rickinson *et al.*, 2007). Die Durchseuchungsrate mit EBV liegt in der Erwachsenenpopulation weltweit bei ca. 90 % und nach der akuten Infektion von B-Zellen persistiert das 172 Kilobasenpaare umfassende virale Genom latent als Episom in den Zellen (Baer *et al.*, 1984; Niedobitek *et al.*, 2001; Kieff *et al.*, 2007). Kommt es zur Primärinfektion jedoch erst in vorangeschrittenem Alter, kann durch die Infektion mit EBV die infektiöse Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber) ausgelöst werden (Evans *et al.*, 1968; Henle *et al.*, 1968; IARC *et al.*, 1997). Neben dieser nicht letalen Krankheitsform wurde EBV durch seine Assoziation mit verschiedenen Lymphomen und Karzinomen von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) 1997 als Karzinogen der Kategorie 1 eingestuft (IARC *et al.*, 1997; Niedobitek, 1999). Zusätzlich zu dem Burkitt-Lymphom ist EBV mit weiteren Lymphomen assoziiert, unter anderem dem Hodgkin-Lymphom, dem T-Zell non-Hodgkin-Lymphom sowie PTLD (*post transplant lymphoproliferative disorder*), also der Bildung von B-Zell-Lymphomen nach Organtransplantationen. EBV gilt zudem als Auslöser von Nasopharynxkarzinomen (NPC – *Nasopharyngeal carcinoma*) und wird mit der Entstehung von Magenkarzinomen in Verbindung gebracht (Niedobitek, 1999; Niedobitek *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2004).

EBV infiziert primär humane B-Zellen. Durch die Infektion von primären B-Zellen mit EBV werden diese in lymphoblastoide Zelllinien (LCLs - *lymphoblastoid cell lines*) transformiert (Young *et al.*, 2004). Werden diese LCLs durch Xenotransplantation in SCID Mäuse (C.B.-17 *scid/scid* Mausstamm) eingebracht, bilden sich Tumore in diesen Mäusen (Rowe *et al.*, 1991). Dies demonstriert das karzinogene Potenzial des Virus. In den transformierten B-Zellen werden neun EBV-Proteine exprimiert, die EBNA (*EBV nuclear antigens*)-Proteine EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C und EBNA3L (*leader protein*), sowie die LMPs (*latent membrane protein*) LMP1, LMP2A und LMP2B und die nicht-kodierenden EBV-RNAs EBER1 (*Epstein Barr encoded RNA*) und 2 (Farrell *et al.*, 1997; Young *et al.*, 2004).

Die Expression der EBV-Proteine variiert jedoch in den mit EBV assoziierten malignen Erkrankungen (Farrell *et al.*, 1997). In PTLD-Zellen werden ähnlich zu LCL-Zelllinien alle EBNA- und LMP-Proteine exprimiert (Farrell *et al.*, 1997; Cohen, 2000). In EBV-positiven Burkitt-Lymphom-Linien, werden nur EBNA1 sowie die EBERs exprimiert (Rowe *et al.*, 1987;

Cohen, 2000). Periphere T-Zell-Lymphome, NPC-Tumore und Hodgkin-Lymphome sind positiv für EBNA1 sowie für die LMP-Proteine (Cohen, 2000).

## 1.2 Behandlung von EBV-assoziierten Karzinomen und Lymphomen

Da NPC-Tumore sensitiv auf Bestrahlung reagieren, ist die Strahlentherapie derzeit die Standardbehandlung für NPC-Patienten (Spano *et al.*, 2003). Neben den hohen Rückfallraten zwischen 15 % und 55 %, je nach fortgeschrittenem Grad der Krankheit, stellen die Nebenwirkungen der Bestrahlungstherapie ein Problem dar (Spano *et al.*, 2003). Zu den akuten Nebenwirkungen der Strahlentherapie gehören z.B. Mucositis, Xerostomie und Dermatitis (Spano *et al.*, 2003). Als Spätfolgen können u.a. Beeinträchtigungen in der Funktion der Speicheldrüse, Trismus und Schädigungen der Hirnnerven eintreten. Die Kombination von Bestrahlungen mit Chemotherapie in der Behandlung von NPC zeigt zwar Verbesserungen in einzelnen Fällen, die allgemeine Überlebensrate wird dadurch jedoch nicht erhöht (Spano *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zur Behandlung von Nasopharynxkarzinomen ist der derzeitige Standard zur Therapie von PTLD Chemotherapie mit Anthrazyklinen und in Fällen von CD20-positiven PTLD der Einsatz von Rituximab (Kamdar *et al.*, 2011). Die Verwendung von bisher etablierten antiviralen Wirkstoffen hat keine Wirkung auf bereits transformierte Zellen in der Therapie von PTLD (Kamdar *et al.*, 2011). Die Anwendung von Chemotherapeutika ist zwar sehr effektiv gegen PTLD, deren Nebenwirkungen sind jedoch mitunter gravierend. Durch die hohe Toxizität liegt die Mortalitätsrate der Patienten bei 25 bis 50 % (Swinen *et al.*, 1995; Elstrom *et al.*, 2006). Auch Patienten mit Burkitt-Lymphomen werden durch Chemotherapie behandelt. Die Überlebensrate, gemessen über einen Zeitraum von 2 Jahren, beträgt hier in verschiedenen Studien zwischen 39 % und 89 % (Perkins *et al.*, 2008). Für die Heilung von Patienten mit Hodgkin-Lymphomen werden sowohl Chemo- als auch Strahlentherapie angewendet (Advani, 2011). Gerade durch die intensive Strahlentherapie bei der Behandlung von Hodgkin-Lymphomen kommt es jedoch mitunter zu der Bildung von weiteren Tumoren und erhöhter Anfälligkeit der Patienten gegenüber Herzkrankheiten (Hodgson, 2011). Somit ist auch dieser Therapieprozess ein Balanceakt zwischen der Bekämpfung der Tumoren und einer Vermeidung von Nebenwirkungen der beiden Behandlungen (Advani, 2011).

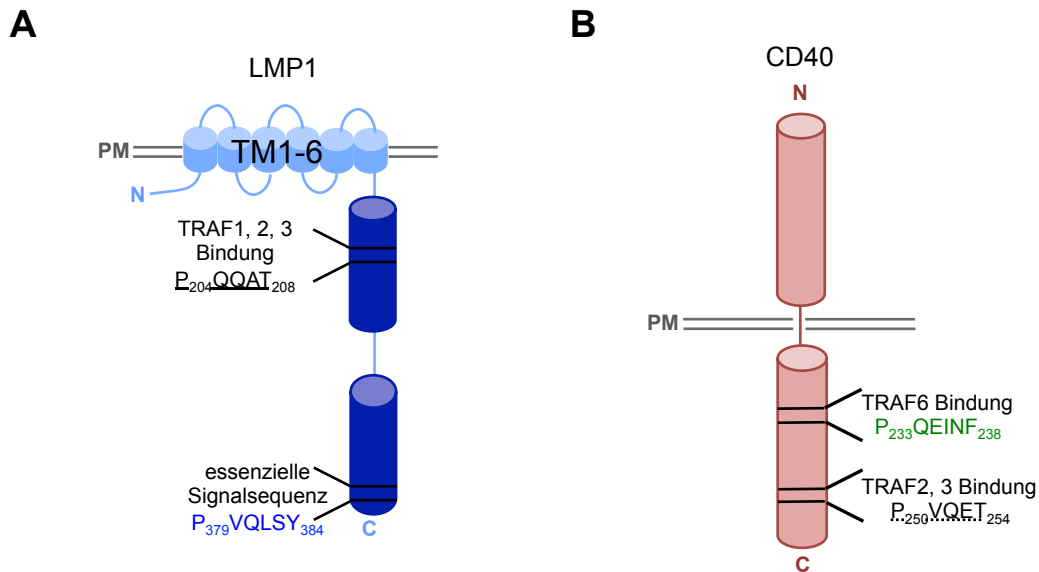
Folglich ist die Entwicklung eines neuen Therapieansatzes, der spezifisch gegen das karzinogene Potential von EBV gerichtet ist, dabei jedoch möglichst geringe Nebenwirkungen aufweist, sowohl logisch als auch notwendig. In dieser Arbeit stelle ich daher die durch das EBV-Protein LMP1 gebildeten Signalkomplexe als Ziel von spezifischen Inhibitoren vor.

## 1.3 Das Latente Membranprotein 1 (LMP1)

### 1.3.1 Struktur und Funktion von LMP1

Im Jahr 1985 konnte erstmals von Wang *et al.* das Transformationspotential von LMP1 in Rat-1-Zellen gezeigt werden (Wang *et al.*, 1985). LMP1 exprimierende Rat-1-Zellen verlieren ihre Kontaktinhibition und wachsen dichter als LMP1-negative Rat-1-Zellen. In Mäusen, denen die Zellen, die durch LMP1 transformiert wurden, injiziert wurden, bildeten sich innerhalb von zwei Wochen Tumoren (Wang *et al.*, 1985). Diese essenzielle Rolle von LMP1 bei der Zelltransformation konnte ebenfalls in humanen B-Zellen durch die Verwendung von rekombinanten Viruspartikeln für die Transformation von B-Zellen in LCL bestätigt werden (Kaye *et al.*, 1993; Kilger *et al.*, 1998; Dirmeier *et al.*, 2003). Das Transformationspotential von LMP1 wurde jedoch nicht nur *in vitro* gezeigt, sondern konnte auch *in vivo* bestätigt werden. So entwickeln sich in Mäusen, die LMP1 unter der Kontrolle des Maus IgH-Enhancers und V<sub>H</sub>-Promoters in B-Zellen exprimieren, signifikant mehr Lymphome als in Wildtyp-Mäusen (Kulwichit *et al.*, 1998). Diese Lymphome zeigen LMP1-Expressionsniveaus, die der Expression von LMP1 in LCLs entspricht (Kulwichit *et al.*, 1998). In transgenen Mäusen, in denen LMP1 in B-Zellen ab dem pro/prä-B-Zellstadium exprimiert wird, werden LMP1-positive B-Zellen durch das adaptive Immunsystem eliminiert (Zhang *et al.*, 2012). Eine Schwächung des Immunsystems in diesen Mäusen führt jedoch zu einer raschen Ausbildung von Lymphomen (Zhang *et al.*, 2012). Diese Lymphome zeigen die gleichen Charakteristika wie EBV-assoziierte Lymphome aus immunsupprimierten Patienten mit PTLN (Zhang *et al.*, 2012).

Das Protein LMP1 ähnelt in seiner Funktion dem zellulären Rezeptor CD40 (*Cluster of Differentiation 40*) auf B-Zellen (Abb1.1) (Zimber-Strobl *et al.*, 1996; Kilger *et al.*, 1998; Uchida *et al.*, 1999). Die Signaldomäne von LMP1 kann, wenn sie N-terminal zusammen mit der extrazellulären Domäne von CD40 (CD40-LMP1) unter der Kontrolle des MHC II E $\alpha$ -Promoters exprimiert wird, CD40-Signale in B-Zellen, Retikulumzellen und Makrophagen in CD40<sup>-/-</sup> Mäusen ersetzen. Dennoch zeigen die transgenen Mäuse eine erhöhte Autoimmunität und eine abnormale Entwicklung der Lymphknoten und der Milz (Stunz *et al.*, 2004). Ist die Expression von CD40-LMP1 in CD40<sup>-/-</sup> Mäusen jedoch auf B-Zellen beschränkt, zeigt sich weder eine von Wildtyp-Mäusen abweichende Entwicklung der lymphatischen Organe noch Anzeichen von Autoimmunität oder sonstige abnormale Entwicklungen des Immunsystems (Rastelli *et al.*, 2008). Somit ist die Signaldomäne von LMP1 in der Lage, die Signaldomäne von CD40 funktionell zu ersetzen, wenn sie zum richtigen Zeitpunkt am richtigen Ort exprimiert wird (Rastelli *et al.*, 2008).



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung von LMP1 und CD40.** **A** Das Latente Membranprotein 1 (LMP1). LMP1 wird über seine sechs Transmembrandomänen (TM 1-6) in der Plasmamembran (PM) verankert. Die TM vermitteln weiterhin die Bildung von LMP1-Klustern in der Membran, welche für die Rekrutierung von Signalproteinen durch die Signaldomänen wichtig sind. Die intrazelluläre C-terminale Domäne besitzt zwei C-terminale Aktivierungsregionen, CTAR1 und CTAR2, welche zelluläre Adapterproteine binden und so verschiedene Signalwege aktivieren. Die Signaldomäne von LMP1 ist in der Lage, die Signaldomäne von CD40 (B) funktionell zu ersetzen. **B** Struktur von CD40. Im Gegensatz zu LMP1 wird CD40 durch die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne aktiviert. Die intrazelluläre Signaldomäne von CD40 besitzt ein TRAF-1,2,3 Interaktionsmotiv ( $P_{250}VQET_{254}$ ) und ein TRAF6-Interaktionsmotiv ( $P_{233}QEINF_{238}$ ). [PM - Plasmamembran, CTAR - C-terminale Aktivierungsregion, LMP1 - Latentes Membranprotein 1, TRAF - TNF-Rezeptor assoziierter Faktor, für Referenzen siehe Text]

Die Aktivierung von CD40 erfolgt über die Bindung des CD40-Liganden an die extrazelluläre Domäne. Die Trimerisierung von CD40 durch die Bindung dieses Liganden ist wichtig für die Funktion von CD40 (McWhirter *et al.*, 1999; Pullen *et al.*, 1999; Werneburg *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu seinem zellulären Gegenstück benötigt das virale Protein LMP1 jedoch keinen externen Stimulus für die Aktivierung von Signalkaskaden. Die sechs N-terminalen Transmembrandomänen (Aminosäuren 24-180) bilden LMP1-Oligomere in der Plasmamembran und ermöglichen so eine konstante Signalinduktion (Gires *et al.*, 1997). Der C-terminale Teil von LMP1 (Aminosäuren 181-386) bildet die Interaktionsplattform des viralen Proteins mit zellulären Signalmolekülen und somit die Basis für die Induktion der Signalkaskaden ausgehend von LMP1 (siehe Abb. 1.2). Innerhalb des C-terminalen Bereichs wurden zwei für die B-Zelltransformation wichtige Signaldomänen definiert, die C-terminalen Aktivierungsregionen CTAR1 (*C-terminal activating region1*; Aminosäuren 194-232) und CTAR2 (Aminosäuren 351-386) (Huen *et al.*, 1995). Diese beiden CTAR-Domänen sind jede für sich essenziell, um die effiziente Transformation von B-Zellen durch LMP1 zu bewirken (Dirmeier *et al.*, 2003) (siehe Abb. 1.2). Daher ist das Transformationspotential von

rekombinanten EBV-Partikeln, in denen eine der CTAR-Domänen mutiert wurde, jeweils um mehr als 85 % gegenüber rekombinanten EBV-Partikeln mit einem Wildtyp LMP1-Protein reduziert. So ist das Transformationspotenzial von EBV mit einer LMP1-CTAR1-Mutante, bei der die Aminosäuren Pro<sub>204</sub> bis Thr<sub>208</sub> deletiert wurden, um 86,1 % reduziert (Dirmeier *et al.*, 2003). Ein einfacher Aminosäureaustausch der Aminosäure Tyr<sub>384</sub> in die Aminosäure Glycin innerhalb der CTAR2-Domäne reduziert das Transformations-Potenzial von rekombinantem EBV sogar um mehr als 90 % (Dirmeier *et al.*, 2003). Daher sollten diese beiden CTAR-Domänen, bzw. die von ihnen gebildeten Signalkomplexe, ausgezeichnete Ziele für Moleküle darstellen, die die Rekrutierung der Signalproteine durch Interferenz mit den gegenseitigen Interaktionsmotiven der Proteine unterbinden sollen. Durch die Inhibition der Ausbildung der LMP1-Signalkomplexe sollte sich ein mit den beschriebenen LMP1-Mutanten (s.o.) vergleichbarer Effekt zeigen und somit ebenfalls das karzinogene Potential von LMP1 stark eingeschränkt werden.

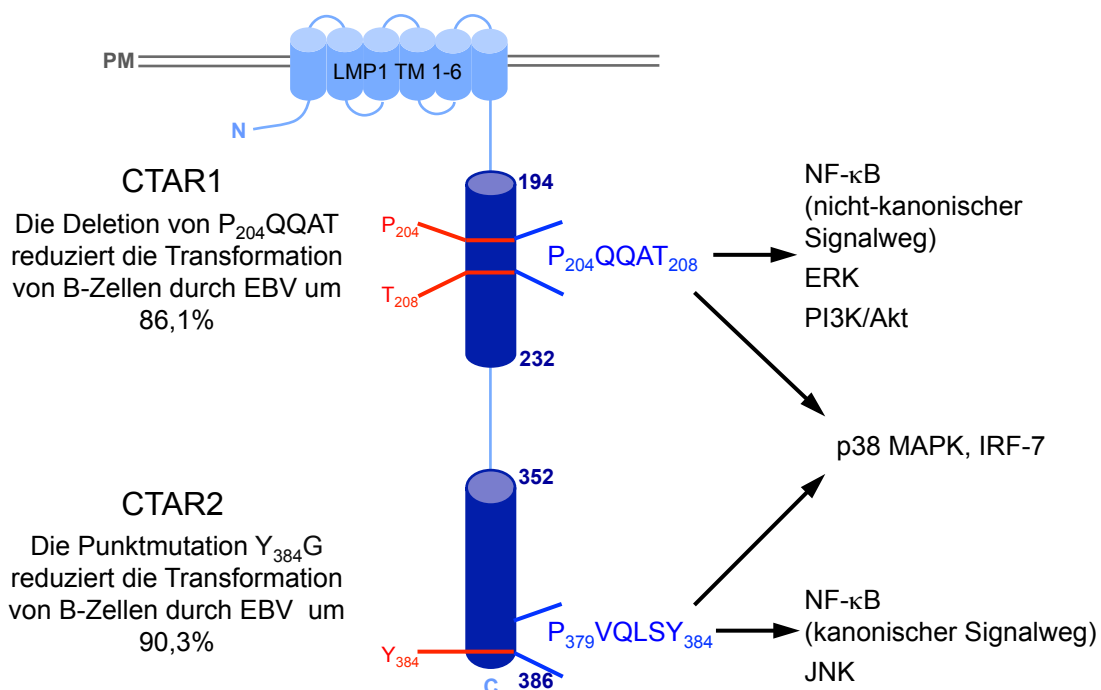
### 1.3.2 Aktivierung zellulärer Signalwege durch LMP1

Durch die Rekrutierung zellulärer Signalmoleküle an die Signaldomänen CTAR1 und CTAR2 aktiviert LMP1 eine Reihe intrazellulärer Signalwege (siehe Abb. 1.2). Dazu zählen sowohl der kanonische als auch der nicht-kanonische NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B-cells*)-Signalweg, die MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Signalwege JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) und p38, sowie der IRF7 (*interferon regulatory factor 7*)- und der PI3K/Akt (*phosphatidylinositol 3-kinase/Akt*)- Signalweg (Kieser *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Eliopoulos, Gallagher, *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000; Schultheiss *et al.*, 2001; Zhang & Pagano, 2001; Atkinson *et al.*, 2003; Dawson *et al.*, 2003; Luftig *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 2003; Luftig *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006; Dawson *et al.*, 2008; Gewurz *et al.*, 2011). Weiterhin induziert LMP1 auch den JAK (Janus Kinase 3)-STAT (*signal transducer and activator of transcription*)-Signalweg. Es wird jedoch kontrovers diskutiert, ob die Aktivierung dieses Signalweges über die beiden CTARs erfolgt oder durch ein JAK-Interaktionsmotiv zwischen den beiden CTAR-Domänen vermittelt wird (Gires *et al.*, 1999; Higuchi *et al.*, 2002).

Für einige dieser Signalkaskaden konnte deren spezifischer Beitrag für die Transformation von Zellen durch EBV bereits gezeigt werden. Die NF- $\kappa$ B-Signalkaskade aktiviert unter anderem die Expression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), welche die durch EBV-transformierten B-Zellen vor Apoptose schützen (Henderson *et al.*, 1991; Rowe *et al.*, 1994). Dementsprechend können NF- $\kappa$ B-Inhibitoren Apoptose in LCLs auslösen (siehe hierzu auch Abschnitt 1.6) (Cahir-McFarland *et al.*, 2000; Cahir-McFarland *et al.*, 2004).



Weiterhin ist die Regulation fast aller Zielgene, die durch die CTAR2-Domäne reguliert werden, über die Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges gesteuert. Dabei wird die Expression von 1916 mRNAs (messenger *ribonucleic acids*) reguliert (Gewurz *et al.*, 2011). Von diesen mRNAs werden 1479 durch LMP1 hochreguliert und 437 mRNAs werden durch LMP1 herunterreguliert (Gewurz *et al.*, 2011). Auch die Aktivierung der JNK-Signalkaskade durch LMP1 ist essenziell für EBV-induzierte Zelltransformation, da durch diesen Signalweg der G2/M-Übergang im Zellzyklus von LCLs reguliert wird (Kutz *et al.*, 2008). Das Wachstum von Tumoren in SCID Mäusen, die durch die Xenotransplantation dieser Mäuse mit LCLs induziert wurden, kann durch die Inhibition des JNK-Signalweges mit einem kleinen Molekül inhibiert werden (Kutz *et al.*, 2008). Ebenso wird der IRF-7-Signalweg mit dem Transformationspotential von EBV assoziiert (Zhang *et al.*, 2004). Auch die spezifische Beteiligung des PI3K/Akt-Signalweges zum Transformationspotential von LMP1 konnte in Rat-1-Zellen gezeigt werden. Für das adhäsionsunabhängige Zellwachstum von LMP1-transformierten Rat-1-Zellen wird die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges benötigt (Mainou *et al.*, 2005).



**Abb. 1.2: Aktivierung von Signalwegen durch LMP1.** Durch die Signalkomplexe, die an CTAR1 und CTAR2 gebildet werden, aktiviert LMP1 verschiedene Signalkaskaden. Innerhalb der beiden Domänen CTAR1 und 2 konnten jeweils kurze Aminosäuresequenzen (blau) bestimmt werden, die für die Induktion dieser Signalwege essenziell sind. Durch die Mutationen von Aminosäuren in jeweils einer dieser Sequenzen (rot) wird das Transformationspotential rekombinanter EBV-Partikel um jeweils mehr als 85 % reduziert (Dirmeier *et al.*, 2003). [PM - Plasmamembran, CTAR - C-terminale Aktivierungsregion, LMP1 - Latentes Membranprotein 1, für Referenzen siehe Text].

### 1.3.3 Signalwege, die durch die CTAR1-Domäne induziert werden

In den beiden CTAR-Domänen konnten die Aminosäuren, welche für die Aktivierung der Signalkaskaden relevant sind, genau bestimmt werden (siehe Abb. 1.2). Innerhalb der CTAR1-Domäne handelt es sich um die Aminosäuresequenz P<sub>204</sub>QQAT. Über diese Aminosäuresequenz rekrutiert LMP1 die Signalkomplexe, die die Aktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges, des PI3K/Akt-Signalweges sowie des ERK-MAPK-Signalweges induzieren (Atkinson *et al.*, 2003; Dawson *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 2003; Luftig *et al.*, 2004; Dawson *et al.*, 2008). Weiterhin gibt es Berichte über einen Beitrag der CTAR1-Domäne zur Aktivierung des JNK-Signalweges in einigen Zelllinien (Eliopoulos, Waites, *et al.*, 2003; Kutz *et al.*, 2008).

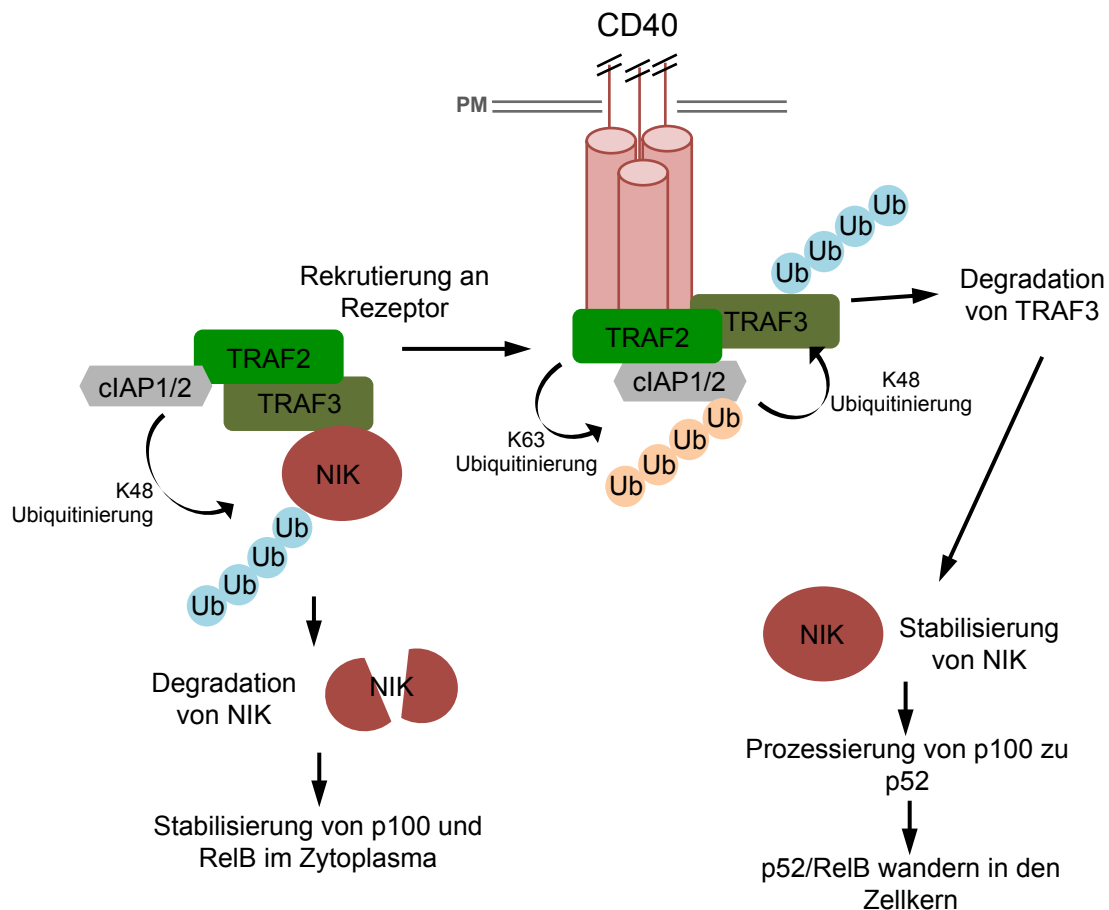
Die Sequenz P<sub>204</sub>QQAT enthält ein PxQxT-Konsensusmotiv, an das Adapterproteine der TRAF (*TNF-receptor associated factors*)-Protein-Familie binden können (Abb. 1.2; siehe hierzu auch Kapitel 1.4). Dieses TRAF-Interaktionsmotiv ist kritisch für die LMP1-induzierte B-Zelltransformation und vermittelt die Interaktion von TRAF1, TRAF2, TRAF3 und TRAF5 mit LMP1 (Devergne *et al.*, 1996; Brodeur *et al.*, 1997; Izumi, Kaye, *et al.*, 1997; Devergne *et al.*, 1998; Dirmeier *et al.*, 2003). Jedoch wurde bisher nur für die Proteine TRAF1, TRAF2 und TRAF3 die direkte Bindung an LMP1 in Protein-Protein-Interaktionsstudien mit rekombinanten, *in vitro* translatierten Proteinen gezeigt (Devergne *et al.*, 1996). Auch überexprimiertes TRAF5 aus humanen Zelllysaten interagiert mit der CTAR1-Domäne von immobilisierten GST-LMP1-Proteinen (Brodeur *et al.*, 1997). Da TRAF5 jedoch heterogene Komplexe mit TRAF3 bildet und in Abhängigkeit von TRAF3 an CD40 rekrutiert wird (Pullen *et al.*, 1998; Leo *et al.*, 1999), wäre es auch möglich, dass die Rekrutierung von TRAF5 an LMP1 aus Zelllysaten ebenfalls über TRAF3 vermittelt wird.

Durch die Rekrutierung von TRAF-Proteinen an die LMP1-Sequenz P<sub>204</sub>QQAT wird der nicht-kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg durch die CTAR1-Domäne von LMP1 aktiviert (Kieser, 2007; Soni *et al.*, 2007). Der nicht-kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg beruht auf der Prozessierung von p100 zu p52 nach der Phosphorylierung von p100 durch IKK $\alpha$  (*I $\kappa$ B kinase  $\alpha$* ) (Senftleben *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2004). IKK $\alpha$  wird seinerseits über die Phosphorylierung durch NIK (*NF- $\kappa$ B inducing kinase*) aktiviert (Senftleben *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2004). Die Folge der NIK-induzierten Phosphorylierung sowie Ubiquitinierung ist die Phosphorylierung und anschließende Degradation von p100 zu p52 im Proteasom (Xiao *et al.*, 2001). Nach der Degradation dimerisiert p52 mit RelB, einem weiteren Mitglied der NF- $\kappa$ B-Familie, und das p52:RelB Dimer wandert als aktiver NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktor in den Nukleus (Solan *et al.*, 2002; Atkinson *et al.*, 2003). Ohne externe Stimulation, also Aktivierung der Signalkaskade durch einen zellulären Rezeptor, wird NIK in

Zellen konstant abgebaut und so die Phosphorylierung von p100 verhindert (Liao *et al.*, 2004).

**Aktivierung des nicht-kanonischen NF-κB-Signalweges durch zelluläre Rezeptoren**

Zwei der TRAF-Proteine, TRAF2 und TRAF3, spielen bei der Regulierung des zellulären nicht-kanonischen NF-κB-Signalweges eine wichtige Rolle (Abb. 1.3). Sowohl TRAF2 als auch TRAF3 können beide direkt mit NIK interagieren und sind beide essenziell für die Regulierung dieses Signalweges (Song *et al.*, 1997; Liao *et al.*, 2004; Zarnegar *et al.*, 2008). TRAF2 und TRAF3 bilden zusammen einen NIK-Inhibitor-Komplex, der die Proteine cIAP1 (*cellular inhibitor of apoptosis1*) und cIAP2 mit NIK zusammenbringt (Vallabhapurapu *et al.*, 2008; Zarnegar *et al.*, 2008).



**Abb. 1.3: Aktivierung des nicht-kanonischen NF-κB-Signalweges durch CD40** (Abb. nach Razani *et al.* (2011)). Ohne Stimulation des Rezeptors wird NIK im Zytoplasma durch den NIK-Inhibitor-Komplex aus TRAF2, TRAF3 und cIAP1/2 konstant abgebaut und somit die Prozessierung von p100 zu p52 inhibiert. Durch die Bindung des CD40-Liganden und die Rekrutierung von TRAF2, TRAF3 und cIAP1/2 an einen Rezeptor wird TRAF3 ubiquitiniert und abgebaut. Dadurch wird NIK im Zytoplasma stabilisiert und induziert die Prozessierung von p100 zu p52. Der Komplex aus p52 und RelB wird so aktiviert und wandert in den Zellkern und reguliert die Aktivierung verschiedener Zielgene. [PM - Plasmamembran, für Referenzen siehe Text]

Trotz der strukturellen Ähnlichkeit der beiden TRAF-Proteine untereinander, sind die Funktionen von TRAF2 und TRAF3 in dem gebildeten Komplex nicht redundant (Vallabhapurapu *et al.*, 2008; Zarnegar *et al.*, 2008). So ist die Bindungsstärke von TRAF3 zu NIK stärker als die Affinität von TRAF2 zu NIK (Liao *et al.*, 2004; Zarnegar *et al.*, 2008). Weiterhin wird die Interaktion von TRAF2 mit NIK durch TRAF3 koordiniert, während die Interaktion von TRAF3 mit NIK unabhängig von TRAF2 ist (Vallabhapurapu *et al.*, 2008). Dagegen rekrutiert TRAF2, jedoch nicht TRAF3, die Proteine cIAP1 und cIAP2 zu dem gebildeten NIK-Inhibitor-Komplex, dem sogenannten Ubiquitin:NIK-E3-Ligase-Komplex (Rothe, Pan, *et al.*, 1995; Zarnegar *et al.*, 2008; Sanjo *et al.*, 2010). Die Proteine cIAP1/2 vermitteln in diesem Komplex die K48-verknüpfte Ubiquitinierung und somit den anschließenden Abbau von NIK durch das Proteasom (Razani *et al.*, 2011). Durch den Abbau von NIK wird die NIK-induzierte Prozessierung von p100 zu p52 inhibiert. Durch die Rekrutierung des Komplexes aus TRAF2, TRAF3 und cIAP1/2 an einen zellulären Rezeptor ändert sich die Substratspezifität des TRAF2:cIAP1/2 Ubiquitin-Ligase-Komplexes und TRAF3 wird ubiquitiniert und abgebaut (Vallabhapurapu *et al.*, 2008; Vallabhapurapu *et al.*, 2009). Somit wird NIK im Zytoplasma stabilisiert und induziert die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren p52/RelB (s.o.) (Liao *et al.*, 2004; Vallabhapurapu *et al.*, 2008; Vallabhapurapu *et al.*, 2009).

### **Aktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges durch LMP1**

Äquivalent zu der Aktivierung durch zelluläre Rezeptoren ist TRAF2 ebenfalls ein essentieller Faktor in dem durch die CTAR1-Domäne induzierten nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg (Kaye *et al.*, 1996; Izumi, Kaye, *et al.*, 1997; Soni *et al.*, 2007; Guasparri *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2010). In LMP1-basierten Studien in TRAF2<sup>-/-</sup> embryonalen Mausfibroblasten ist ebenfalls gezeigt, dass TRAF2 im LMP1-Signalkomplex eine wichtige Rolle spielt und in Abwesenheit von TRAF2 nur die CTAR2 in der Lage ist, den NF- $\kappa$ B Signalweg zu aktivieren (Soni *et al.*, 2007). In TRAF2<sup>-/-</sup> embryonalen Mausfibroblasten wird p100 konstant zu p52 prozessiert und LMP1 ist in diesen TRAF2<sup>-/-</sup>-Zellen, im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen, nicht in der Lage, die p100 Prozessierung weiter zu stimulieren (Song *et al.*, 2010). In lymphoblastoiden B-Zelllinien zeigt ebenfalls die negative Regulation von TRAF2 durch siRNA eine Inhibition des NF- $\kappa$ B-Signalweges und als Folge dessen wird in diesen Zellen Apoptose ausgelöst (Guasparri *et al.*, 2008). Weiterhin können dominant-negative TRAF2-Mutanten, denen die N-terminale RING (*really interesting new gene*)-Finger-Domäne fehlt (TRAF2 $\Delta$ 6-86), die Aktivierung von NF- $\kappa$ B-Signalen durch die CTAR1-Domäne weitestgehend blockieren (75-80 %) (Kaye *et al.*, 1996). Anzumerken bleibt, dass diese Mutanten nur einen geringen Effekt (Inhibition von 20-40 % der Signale) auf die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch die CTAR2-Domäne zeigen (Kaye *et al.*, 1996).

Vergleichbar mit dem Effekt auf die Induktion des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch den CD40-Rezeptor inhibiert die Überexpression von TRAF3 die Induktion des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch LMP1 in HEK293-Zellen (Devergne *et al.*, 1996). Es ist also wahrscheinlich, dass die Funktion von TRAF3 in dem Signalkomplex, der durch LMP1 in B-Zellen gebildet wird, äquivalent ist zu der Funktion von TRAF3 in dem Signalkomplex, der durch CD40 gebildet wird. Es gibt jedoch Studien, die eine abweichende Rolle von TRAF3 in der Aktivierung von Signalkaskaden durch LMP1 gegenüber der Aktivierung durch CD40 beschreiben. In TRAF3-defizienten Maus-B-Zellen ist die Induktion des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges sowie des JNK-Signalweges bei der Stimulation von CD40 nicht beeinflusst (Xie, Hostager, *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu ist der Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  sowie die Phosphorylierung der Proteine JNK1 und JNK2 nach Stimulation eines CD40-LMP1-Konstruktes in diesen Zellen inhibiert (Xie, Hostager, *et al.*, 2004). Obwohl TRAF3 nur direkt mit der CTAR1-Domäne interagiert, scheint TRAF3 in Maus-B-Zellen trotzdem in die Regulation von Signalwegen, die durch die CTAR2-Domäne induziert werden, involviert zu sein (Xie & Bishop, 2004; Xie, Hostager, *et al.*, 2004). Zusätzlich zu TRAF2 und TRAF3 ist für TRAF1 eine Rolle in der Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade durch LMP1 gezeigt. In LCLs wird durch die gemeinsame Expression von LMP1 und TRAF1 der NF- $\kappa$ B-Signalweg stimuliert (Devergne *et al.*, 1996).

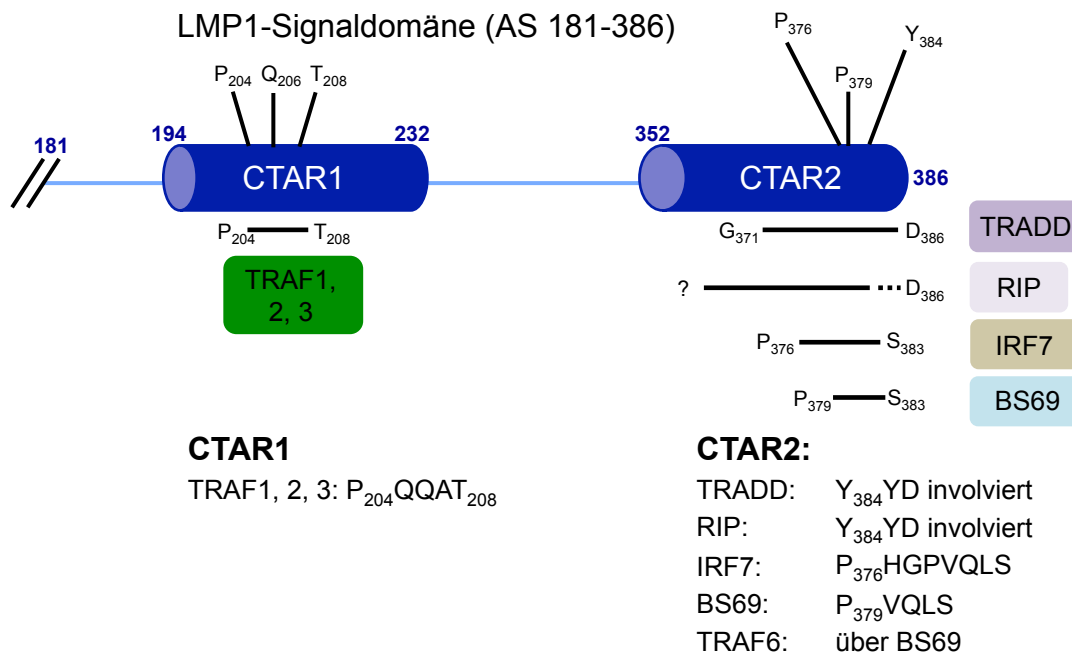
Im Gegensatz zu dem nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg ist für die Aktivierung des ERK-MAPK-Signalweges durch die CTAR1-Domäne die Beteiligung von TRAF-Proteinen noch nicht experimentell gezeigt. Es wird aber eine Rolle von TRAF2 als Signaladapter vermutet, da TRAF2 mit der Kinase Tpl-2 (*tumor progression locus 2*) interagiert, die sowohl in der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges als auch des ERK-MAPK-Signalweges durch LMP1 eine Rolle spielt (Dawson *et al.*, 2008).

#### 1.3.4 Aktivierung von Signalwegen durch die CTAR2-Domäne

Mittels Hefe-zwei-Hybrid-Experimenten wurden bisher vier zelluläre Proteine als direkte Interaktionspartner der CTAR2-Domäne beschrieben (Abb. 1.4): Die beiden Todesdomänenproteine TRADD (*tumor necrosis factor-receptor associated death domain*) und RIP1 (*receptor interacting protein 1*), sowie die Transkriptionsfaktoren BS69 und IRF7 (Izumi & Kieff, 1997; Izumi *et al.*, 1999; Wan *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2008). Die Aminosäuren 371-386 von LMP1 sind ausreichend, um die Interaktion mit dem TRADD Protein zu vermitteln (Schneider *et al.*, 2008). Innerhalb dieser Sequenz sind die Aminosäuren Y<sub>384</sub>YD kritisch für die Bindung von TRADD (Izumi & Kieff, 1997). Die Mutation von Y<sub>384</sub>YD in I<sub>384</sub>D führt zum Verlust der Interaktion von TRADD (Izumi & Kieff, 1997). Auf Seiten von TRADD ist das genaue Interaktionsmotiv, das die Bindung an LMP1 vermittelt,

bisher nicht bekannt. In den ursprünglichen Studien von Izumi und Kieff wurde der C-Terminus von TRADD, der die Todesdomäne umfasst (Aminosäuren 195-312), als Interaktionspartner von LMP1 in einem Hefe-zwei-Hybrid-Experiment identifiziert (Izumi & Kieff, 1997). In Protein-Protein-Interaktionsstudien mit einer GST-fusionierten Signaldomäne von LMP1 (Aminosäuren 181-386) und überexprimierten TRADD-Mutanten in HEK293 (*human embryonic kidney*)-Zellen bindet jedoch der N-terminale Teil von TRADD (Aminosäuren 1-194) an LMP1, nicht jedoch die Todesdomäne alleine (Kieser *et al.*, 1999).

Die LMP1-Sequenz Y<sub>384</sub>YD ist ebenfalls involviert in die Bindung von RIP1 an LMP1. Die Interaktion von RIP1 unterscheidet sich jedoch von der Bindung von TRADD an LMP1, da anders als bei der Rekrutierung von TRADD, die Aminosäuren 355-386 von LMP1 nicht ausreichen, um die Bindung zwischen RIP1 und LMP1 zu vermitteln (Izumi *et al.*, 1999).



**Abb. 1.4: Rekrutierung zellulärer Signalproteine durch LMP1.** Für die Rekrutierung von zellulären Adapterproteinen an LMP1 sind verschiedene Sequenzmotive innerhalb von CTAR1 und CTAR2 beschrieben. Die Aminosäuren Pro<sub>204</sub>, Gln<sub>206</sub> und Thr<sub>208</sub> bilden den Kern des TRAF-Interaktionsmotivs innerhalb der CTAR1. Über dieses Motiv interagiert LMP1 mit TRAF1, TRAF2 und TRAF3. TRAF5 wird ebenfalls an die CTAR1-Domäne rekrutiert, die direkte Bindung an LMP1 ist bisher jedoch nicht gezeigt. Die beiden Todesdomänenproteine TRADD und RIP interagieren unter anderem mit den LMP1 Aminosäuren Y<sub>384</sub>YD innerhalb der CTAR2-Domäne. IRF7 interagiert mit den letzten acht Aminosäuren von LMP1, im Gegensatz zu TRADD und RIP sind die Aminosäuren Y<sub>384</sub>YD jedoch nicht an der Interaktion beteiligt. BS69 wird auch von der P<sub>379</sub>VQLS Kernsequenz rekrutiert, die Aminosäuren Y<sub>384</sub>YD sind ebenfalls nicht essentiell für die Bindung. Für die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 wird bisher angenommen, dass sie über BS69 vermittelt wird. [AS - Aminosäuren, CTAR - C-terminale Aktivierungsregion; Referenzen siehe Text].

Im Gegensatz zu den Proteinen TRADD und RIP1 wird IRF7 zwar ebenfalls über die Aminosäuren 376-386 an die CTAR2-Domäne rekrutiert, die Sequenz Y<sub>384</sub>YD ist jedoch nicht essenziell für die Interaktion (Song *et al.*, 2008). Trotzdem hat die Mutation dieser Aminosäuren eine negative Auswirkung auf die Signalinduktion der IRF7-Signalkaskade durch LMP1 (Song *et al.*, 2008). Ursprünglich wurde BS69 ebenfalls als Interaktionspartner der CTAR2-Domäne identifiziert (Wan *et al.*, 2006). Es wurde postuliert, dass BS69 ein Negativregulator des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs ist und für die Aktivierung des JNK-Signalweges durch LMP1 benötigt wird (Wan *et al.*, 2006; Ikeda *et al.*, 2009). In Hefe-zwei-Hybrid-Experimenten interagiert BS69 ebenfalls mit den carboxyterminal gelegenen Aminosäuren P<sub>379</sub>VQLSYYD von LMP1 (Wan *et al.*, 2006). Das TRADD/RIP-Interaktionsmotiv Y<sub>384</sub>YD ist dabei jedoch, ähnlich wie bei IRF7, nicht essenziell für die Interaktion von LMP1 mit BS69 (Ikeda *et al.*, 2009). Die direkte Bindung von BS69 an die CTAR2-Domäne von LMP1 wird auf Seiten von BS69 durch die MYND-Domäne und Teile der E1A-Interaktionsdomäne vermittelt (Wan *et al.*, 2006).

In späteren Studien wurde zusätzlich zur Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges auch eine Rolle von BS69 im nicht kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg, ausgehend von der CTAR1-Domäne, postuliert. BS69 wirkt in diesem Modell zusammen mit TRAF3 als Negativregulator von NF- $\kappa$ B-Signalen ausgehend von der CTAR1-Domäne (Ikeda *et al.*, 2010). In diesen Studien wurde in Hefe-zwei-Hybrid-Experimenten eine Bindung von BS69 an eine CTAR2-Deletionsmutante gezeigt, die nur die Aminosäuren 1-231 von LMP1 umfasst (Ikeda *et al.*, 2010). BS69 scheint also noch ein zweites, bisher nicht näher beschriebenes, Interaktionsmotiv in LMP1 zu haben. Es erscheint jedoch prinzipiell eher fraglich, ob ein Transkriptionsfaktor derart viele spezifische Interaktionsmotive in LMP1 haben kann.

Obwohl die LMP1-Sequenz P<sub>379</sub>VQLSYYD ebenfalls ein mögliches TRAF-Interaktionsmotiv (PxQxT/S) enthält, konnte bisher keine direkte Bindung von TRAF-Proteinen an die CTAR2-Domäne gezeigt werden (Franken *et al.*, 1996; Kieser, 2007). Trotzdem spielt ein Mitglied der TRAF-Familie, TRAF6, eine wichtige Rolle in der Signalinduktion durch die CTAR2-Domäne. TRAF6 ist der essenzielle Faktor für die Induktion der NF- $\kappa$ B-, p38- JNK- und IRF7-Signalwege durch die CTAR2-Domäne (Schultheiss *et al.*, 2001; Luftig *et al.*, 2003; Wan *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2008). Es ist bisher nicht bekannt, wie TRAF6 mit LMP1 interagiert. Da jedoch die Mutation Y384G in der Sequenz P<sub>379</sub>VQLSYYD zum Verlust der Rekrutierung von TRAF6 an den Signalkomplex der CTAR2-Domäne führt, spielt diese Sequenz wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle in der Interaktion von TRAF6 mit LMP1 (Schultheiss *et al.*, 2001). Da TRAF6 direkt mit BS69 interagiert, wird bisher angenommen, dass TRAF6 über BS69 an den CTAR2-Signalkomplex

rekrutiert werden könnte (Wan *et al.*, 2006). Die Herunterregulation von BS69 mit shRNA (*short hairpin* RNA) verringert die Interaktion von TRAF6 mit LMP1. Daraus leiteten die Autoren der Studie ab, dass der Komplex aus TRAF6 und LMP1 von BS69 abhängig ist (Wan *et al.*, 2006).

Die LMP1-Sequenz P<sub>379</sub>VQLSYYD ist essenziell für die Aktivierung der Signalkaskaden durch die CTAR2-Domäne. Ursprünglich wurde nur ein Teilstück dieser Sequenz, die LMP1 Aminosäuren Y<sub>384</sub>YD, für die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch die CTAR2-Domäne beschrieben (Izumi & Kieff, 1997). In Punktmutationsstudien mit rekombinantem LMP1, in deren Verlauf die letzten 12 Aminosäuren des C-Terminus von LMP1 jeweils in die Aminosäure Glycin mutiert wurden, konnte jedoch gezeigt werden, dass die Sequenz P<sub>379</sub>VQLSY innerhalb von CTAR2 für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B essenziell ist (Floettmann *et al.*, 1997). Den größten (negativen) Effekt auf die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch die CTAR2-Domäne hatte dabei die Punktmutation Y384G. Der Austausch der Aminosäure Tyr<sub>384</sub> in die Aminosäure Glycin inhibiert die Aktivierung von NF- $\kappa$ B-Signalen in DG75- und ELI-BL-Zellen in gleichem Maße wie die komplette Deletion der zwölf C-terminalen Aminosäuren von LMP1 (Floettmann *et al.*, 1997).

### ***Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges durch zelluläre Rezeptoren***

Die Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges durch zelluläre Rezeptoren führt letztendlich zu der Translokation der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren Rel (c-Rel), RelA (p65) und p50 in den Zellkern (Vallabhapurapu *et al.*, 2009). Ohne externe Stimulation eines Rezeptors sind die NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren mit I $\kappa$ B-Proteinen im Zytoplasma komplexiert. Die I $\kappa$ B-Proteine maskieren die Kernlokalisationssequenz der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren und halten sie so in einem inaktiven Zustand im Zytoplasma zurück (Karin *et al.*, 2000; Ghosh *et al.*, 2002). Bei der Stimulation durch einen zellulären Rezeptor wird der IKK-Komplex, bestehend aus IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und IKK $\gamma$  (auch genannt NEMO - *NF- $\kappa$ B essential modulator*), aktiviert und induziert die Phosphorylierung der I $\kappa$ B-Proteine durch IKK $\beta$  (Vallabhapurapu *et al.*, 2009). Diese Phosphorylierung induziert die K48-Polyubiquitinierung und die daraus folgende Degradation der I $\kappa$ B-Proteine durch das Proteasom. Durch den Abbau der I $\kappa$ B-Proteine werden die NF- $\kappa$ B-Dimere freigesetzt, die Kernlokalisationssequenz demaskiert und die NF- $\kappa$ B-Faktoren translozieren in den Zellkern (Vallabhapurapu *et al.*, 2009). Im kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg reguliert TRAF6 zwei IKK-Aktivator Komplexe, die sogenannten TRIKAs (*TRAF6-regulated IKK activators*). Der TRIKA1-Komplex setzt sich aus den Proteinen UBC13 und UEV1A zusammen (Deng *et al.*, 2000). Der zweite Aktivator Komplex TRIKA2 setzt sich aus den Proteinen TAK1 (*TGF $\beta$ -activated kinase*), TAB1 (*TAK binding protein1*) und TAB2 zusammen (Wang *et al.*, 2001). TRAF6 ist



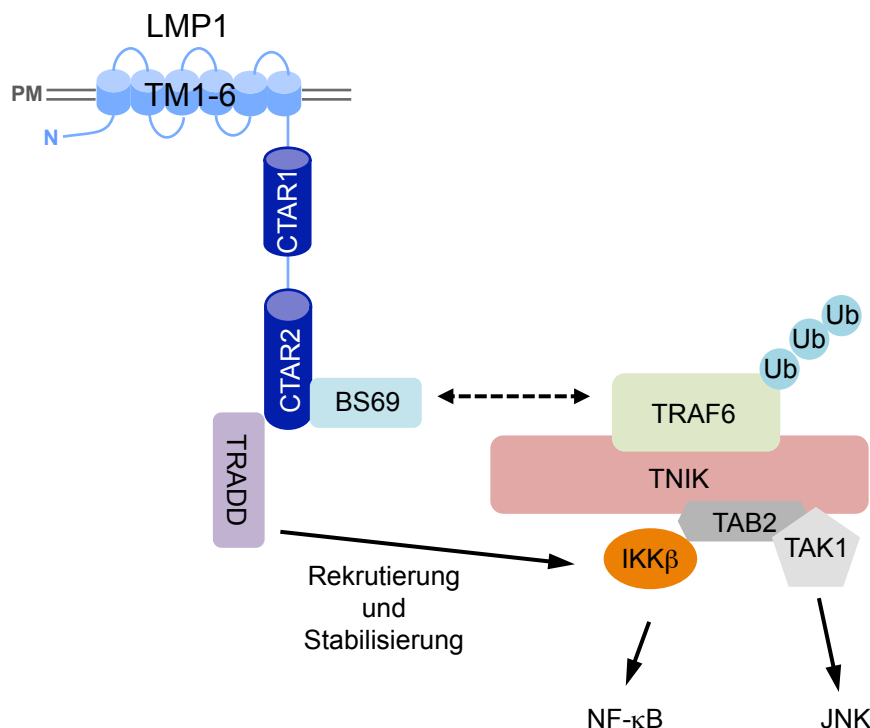
eine E3-Ubiquitinligase, die zusammen mit dem TRIKA1 die Verknüpfung von K63-Polyubiquitinketten sowohl an NEMO als auch an TRAF6 selbst katalysiert (Wang *et al.*, 2001; Chen, 2005). Durch die Ubiquitinierung von TRAF6 wird TRIKA2 rekrutiert (Sun *et al.*, 2004). Der TRAF6-TRIKA2-Komplex wiederum aktiviert die Kinase TAK1. Durch TAK1 wird letztendlich IKK $\beta$  phosphoryliert und somit der IKK-Komplex aktiviert (Wang *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2004; Chen, 2005).

### **Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges durch LMP1**

Vergleichbar mit der Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges durch zelluläre Rezeptoren, spielt TRAF6 eine essenzielle Rolle bei der Aktivierung dieses Signalweges durch LMP1 (Abb. 1.5) (Schultheiss *et al.*, 2001; Luftig *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2008). Die genaue Komposition des CTAR2-Signalkomplexes ist jedoch noch nicht aufgeklärt. Aus dem trimeren TRIKA2-Komplex wurde bisher nur eine essenzielle Rolle für die Proteine TAK1 und TRAF6 in der Aktivierung von IKK $\beta$  beschrieben (Wu *et al.*, 2006). Weiterhin ist es gezeigt, dass dominant-negative TAB2-Mutanten kanonische NF- $\kappa$ B-Signale ausgehend von LMP1 in HEK293-Zellen inhibieren (Luftig *et al.*, 2003). Diese TAB2-Mutanten sind noch in der Lage, mit TRAF6 und TAK1 zu interagieren, können jedoch keine Aktivierung von NF- $\kappa$ B vermitteln (Takaesu *et al.*, 2000). Trotzdem ist in embryonalen TAB2<sup>-/-</sup> Mausfibroblasten die Induktion des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges durch LMP1 nicht beeinträchtigt (Luftig *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2006). Eine essenzielle Rolle der verschiedenen IKKs konnte bisher nur für IKK $\beta$  im LMP1-induzierten kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweg gezeigt werden. In embryonalen IKK $\beta$ <sup>-/-</sup> Mausfibroblasten ist der kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg signifikant inhibiert (Luftig *et al.*, 2003). Die Aktivierung von IKK $\beta$  durch die CTAR2-Domäne ist dabei strikt abhängig von TRAF6 (Wu *et al.*, 2006). In embryonalen IKK $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mausfibroblasten und embryonalen NEMO<sup>-/-</sup> Mausfibroblasten ist jedoch die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren durch LMP1 nicht beeinflusst (Luftig *et al.*, 2003). Weiterhin ist die Frage offen, wie sich TRADD in diesen Komplex einfügt. Es wurde bisher kontrovers diskutiert, wie TRADD in die Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges involviert ist (Kieser, 2008). Der wichtigste Hinweis für die Rolle von TRADD in LMP1-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalkaskaden stammt aus humanen B-Zellen, dem natürlichen zellulären Kontext von LMP1. In DG75 TRADD<sup>-/-</sup> Zellen konnte gezeigt werden, dass TRADD für die Aktivierung und die Rekrutierung von IKK $\beta$  zur Signaldomäne von LMP1 notwendig ist (Schneider *et al.*, 2008). In TRADD<sup>-/-</sup> Zellen ist daher die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch die CTAR2-Domäne nicht mehr möglich (Schneider *et al.*, 2008). Somit spielt TRADD eine kritische Rolle in der Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges durch LMP1.

Trotz der getrennten Aktivierung der beiden NF- $\kappa$ B-Signalwege durch die beiden CTAR-Domänen kann ein kooperatives Verhalten zwischen dem kanonischen und dem nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg beobachtet werden. Die Aktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges wird zwar durch den an der CTAR1-Domäne gebildeten Signalkomplex aus TRAF2, TRAF3, NIK, IKK $\alpha$  induziert, für die Expression von p100 und RelB werden jedoch NF- $\kappa$ B-Signale ausgehend von der CTAR2-Domäne benötigt, wahrscheinlich durch die transkriptionelle Hochregulation von p100 und RelB (Atkinson *et al.*, 2003).

Die oben beschriebene CTAR2-Sequenz P<sub>379</sub>VQLSY ist jedoch nicht nur das essenzielle Motiv für die Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges, sondern initiiert auch die Aktivierung des JNK-Signalwegs (Kieser *et al.*, 1999). Obwohl die JNK-Aktivierungsregion innerhalb der CTAR2-Domäne mit dem TRADD/RIP-Interaktionsmotiv überlappt, haben RIP und wahrscheinlich auch TRADD keinen Einfluss auf die Aktivierung der JNK-Signalkaskade (Kieser *et al.*, 1999; Wan *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2008).



**Abb. 1.5: Modelvorstellung für die Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B- und des JNK-Signalweges durch die CTAR2-Domäne** (nach Shkoda *et al.* (2012)). In diesem Model organisiert TNIK den Signalkomplex, der zur Aufspaltung der beiden Signalwege kanonischer NF- $\kappa$ B und JNK unterhalb von TRAF6 führt. Die Interaktion von TNIK mit LMP1 wird durch die direkte Bindung von TNIK an TRAF6 vermittelt. Nach derzeitiger Vorstellung wird TRAF6 wiederum über BS69 an LMP1 rekrutiert. TRADD vermittelt in diesem Modell die Rekrutierung und Stabilisierung von IKK $\beta$ . [PM - Plasmamembran, TM1-6 - Transmembrandomänen 1-6. Für Referenzen siehe Text]

Es gibt jedoch eine Studie, die basierend auf der gemeinsamen Überexpression von TRADD und LMP1 die Beteiligung von TRADD an der Aktivierung von JNK-Signalweges postuliert (Eliopoulos, Blake, *et al.*, 1999). Der benötigte LMP1-Signalkomplex für die Aktivierung von AP-1 (*activator protein 1*) beruht auf der Rekrutierung der Proteine TRAF6, TAK1 (*TGF-beta-activated Kinase1*) und TAB1 (Wan *et al.*, 2004). Die AP1-Komplexe sind Dimere und bestehen aus Mitgliedern der Jun (c-Jun, JunB, JunC)-, Fos (c-Fos, FosB, Fra1, Fra2)-, ATF (*activation transcription factor*; ATF2, ATF3/LRF1, B-ATF, JDP1, JDP2)- und MAF (*musculoaponeurotic fibrosarcoma*; c-MAF, MafB, MAFa MafG/F/K, NRL)-Familien (Meng *et al.*, 2011). LMP1 aktiviert den AP1-Komplex durch die Phosphorylierung von c-Jun durch die MAP-Kinase JNK1 (Kieser *et al.*, 1997).

Neben TRAF6 ist TNIK (*TRAF2 an Nck-interacting kinase*) ein essentieller Faktor sowohl für die Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B- als auch des JNK-Signalweges durch die CTAR2-Domäne (Shkoda *et al.*, 2012). TNIK wird durch die Bindung an TRAF6 an LMP1 rekrutiert (Shkoda *et al.*, 2012). Zusammen mit TRAF6, TAK1, TAB2 und IKK $\beta$  bildet TNIK einen Signalkomplex, in dem unterschiedliche Domänen von TNIK die Aktivierung der beiden Signalwege vermitteln (Abb. 1.5) (Shkoda *et al.*, 2012).

### 1.3.5 Regulierung von Signalwegen durch beide CTAR-Domänen

Die Aktivierung des IRF7-Signalweges durch LMP1 wird, im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Signalwegen, zwar durch beide CTAR-Domänen vermittelt, ist aber abhängig von den CTAR2-assoziierten Proteinen RIP und TRAF6 (Zhang, Wu, *et al.*, 2001; Huye *et al.*, 2007; Ning *et al.*, 2008). Das Protein IRF7 ist ein Transkriptionsfaktor und liegt inaktiv im Zytoplasma vor (Ning *et al.*, 2011). Für die Induktion der IRF7-Signalkaskade, die zur Aktivierung von IRF7 durch LMP1 führt, wird TRAF6 als E3 Ubiquitin Ligase benötigt. TRAF6 ubiquitiniert die IRF7 Aminosäurereste Lys<sub>444</sub>, Lys<sub>446</sub> und Lys<sub>452</sub> (Ning *et al.*, 2008). Weiterhin wird IRF7 ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert (Zhang & Pagano, 2001). Innerhalb der CTAR1-Domäne vermittelt das TRAF-Interaktionsmotiv P<sub>204</sub>XQxT die Aktivierung von IRF7 (Zhang, Wu, *et al.*, 2001). Dominant-negative Mutanten sowohl von TRAF1, TRAF2, TRAF3 als auch TRAF5, die nur die TRAF-Domänen umfassen, inhibieren teilweise die Induktion der IRF-7-Signalkaskade durch LMP1 in B-Zellen (Zhang, Wu, *et al.*, 2001). Dagegen ist die Aktivierung des IRF-7-Signalwegs in embryonalen TRAF2<sup>-/-</sup> Mausfibroblasten und embryonalen TRAF3<sup>-/-</sup> Mausfibroblasten nicht beeinflusst (Song *et al.*, 2008). Innerhalb der CTAR2-Domäne wird die Aktivierung des IRF7-Signalweges ebenfalls über die LMP1-Sequenz Y<sub>384</sub>YD initiiert (Zhang, Wu, *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2008).

Der p38 MAPK-Signalweg wird ebenfalls sowohl über das Motiv P<sub>204</sub>XQxT innerhalb der CTAR1-Domäne als auch durch die CTAR2-Domäne induziert (Eliopoulos, Gallagher, *et al.*,

1999; Schultheiss *et al.*, 2001). Dennoch ist nur TRAF2 und nicht TRAF3 als Adapterprotein für die Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges gezeigt (Eliopoulos, Gallagher, *et al.*, 1999). Des Weiteren ist ebenfalls TRAF6 in die Regulation des p38 MAPK-Signalweges involviert. Die Induktion des p38 MAPK-Signalweges durch LMP1 ist in embryonalen TRAF6<sup>-/-</sup> Mäusfibroblasten sehr stark eingeschränkt (Schultheiss *et al.*, 2001).

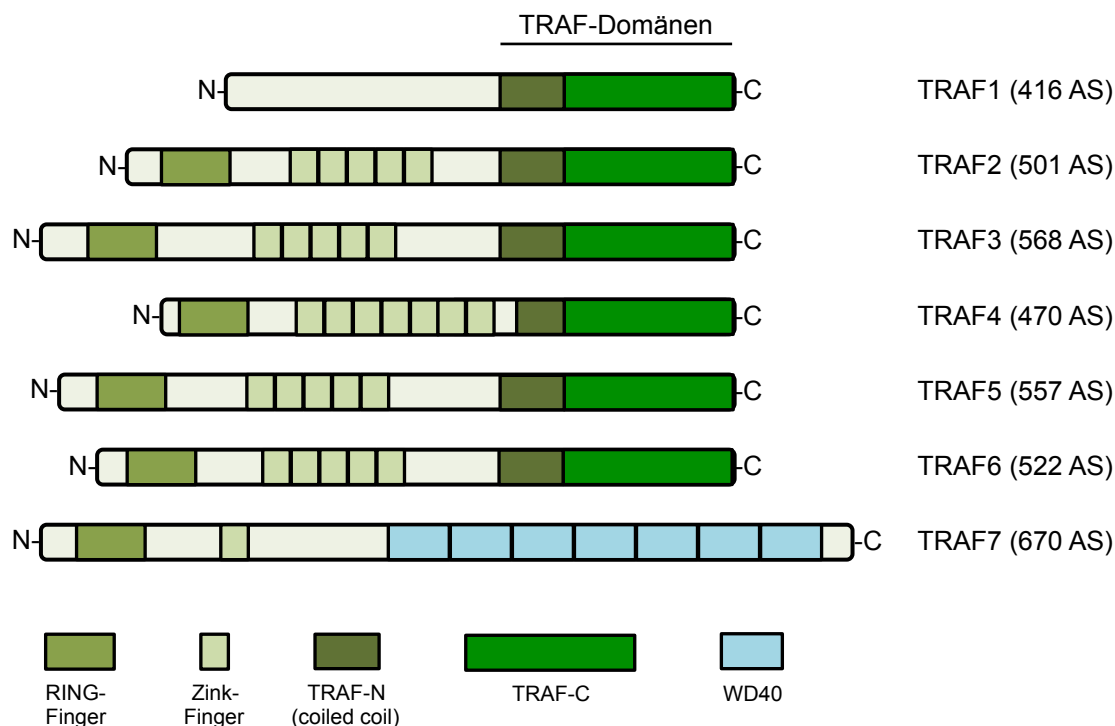
## 1.4 Die TRAF-Proteinfamilie

### 1.4.1 Überblick über die TRAF-Proteinfamilie

Namensgebend für die TRAF-Proteinfamilie war die Identifizierung von TRAF1 und TRAF2 als Signalproteine, die mit dem TNF-Rezeptor interagieren (Rothe *et al.*, 1994). Die TRAF-Familie umfasst sieben Proteine, TRAF1-7. Jedoch weisen nur die Proteine TRAF1-6 die konservierten C-terminalen TRAF-Domänen auf, die sich aus der TRAF-N bzw. *coiled coil*-Domäne und der TRAF-C-Domäne zusammensetzen (Abb. 1.6) (Chung *et al.*, 2002; Zotti *et al.*, 2012). Das Protein TRAF7 besitzt keine C-terminale TRAF-Domäne und die Einordnung in die TRAF-Protein-Familie erfolgte über die Homologie von TRAF7 zu den ebenfalls für die TRAF-Familie typische Anordnung von N-terminalen RING-Finger- und Zink-Finger-Domänen (Xu *et al.*, 2004; Zotti *et al.*, 2012). Die TRAF-Domänen sind ein einzigartiges Sequenzmotiv, das nur innerhalb der TRAF-Proteine vorhanden ist (Rothe *et al.*, 1994). Diese Domänen vermitteln sowohl die Homo- als auch Heterotrimerisierung der TRAFs als auch deren Interaktion mit verschiedenen Rezeptoren (Pullen *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2002). Neben TRAF7 stellt ebenfalls TRAF1 innerhalb der TRAF-Familie eine Ausnahme dar, da es keine Zink-Finger- und RING-Finger-Domäne aufweist (Rothe *et al.*, 1994). Von den sieben TRAF-Familienmitgliedern sind, wie bereits in den Abschnitten 1.3.2 und 1.3.3 erwähnt, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5 und TRAF6 als Signalmoleküle in verschiedenen LMP1-induzierten Signalwegen beschrieben (Devergne *et al.*, 1996; Brodeur *et al.*, 1997; Devergne *et al.*, 1998; Ye *et al.*, 1999; Schultheiss *et al.*, 2001; Luftig *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2006). Während die Expression von TRAF1, TRAF4 und TRAF6 auf einzelne Gewebe beschränkt ist, werden TRAF2, TRAF3 und TRAF5 ubiquitär exprimiert (Arch, Gedrich, *et al.*, 1998).

Obwohl die Aminosäuresequenz innerhalb der TRAF-Domänen weitestgehend konserviert ist (Park *et al.*, 1999), interagieren die TRAFs zum Teil auf unterschiedliche Art und Weise mit verschiedenen Rezeptor-Interaktionsmotiven. Im Gegensatz zu TRAF4 und TRAF6 interagieren z.B. TRAF1, TRAF2 und TRAF3 mit der Sequenz P<sub>250</sub>VQET innerhalb der zytoplasmatischen Signaldomäne des CD40-Rezeptors (Pullen *et al.*, 1998). TRAF1, TRAF2 und TRAF3 binden ebenfalls direkt an das P<sub>204</sub>XQxT Motiv innerhalb der Signaldomäne von LMP1 (Devergne *et al.*, 1996). Trotz des gemeinsamen Interaktionsmotivs interagieren TRAF2 und TRAF3 jedoch auf unterschiedliche Art und Weise mit dem PxQxT-Motiv (siehe

hierzu Abschnitt 1.4.2). Obwohl auch TRAF5 als direkter Interaktionspartner des CD40-Rezeptors in einem Hefe-zwei-Hybrid-Experiment entdeckt wurde, wird aber, wie schon in Abschnitt 1.3.3 erwähnt, die direkte Bindung von TRAF5 an CD40 kontrovers diskutiert (Ishida, Tojo, *et al.*, 1996; Pullen *et al.*, 1998).



**Abb. 1.6: Schematische Darstellung der TRAF-Proteinfamilie** (Abb. nach Chung *et al.* (2002) und Zotti *et al.* (2012)). Die C-terminale Region der TRAFs 1-6 umfasst die charakteristischen TRAF-Domänen (TRAF-N- bzw. *coiled coil*- und TRAF-C-Domäne). TRAF7 bildet innerhalb der TRAF-Familie die einzige Ausnahme und trägt statt der TRAF-Domänen sieben WD40-Domänen. N-terminal besitzen die TRAF-Proteine, mit Ausnahme von TRAF1, RING-Finger- und Zink-Finger-Domänen. [AS - Aminosäuren]

TRAF6 bindet dagegen direkt an ein, von den Interaktionsmotiven der anderen TRAFs abweichendes, PxE<sub>x</sub>F/Y/D/E-Motiv, das in verschiedenen Rezeptoren vorkommt, u.a. ii CD40 und im TRANCE-Rezeptor (Ye *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu den anderen TRAFs ist für TRAF4 bisher keine direkte Bindung an Rezeptoren beschrieben (Arch, Gedrich, *et al.*, 1998). Eine genauere Beschreibung der Interaktion verschiedener TRAFs mit Rezeptoren befindet sich in Abschnitt 1.4.2 dieser Arbeit.

Zusätzlich zu der Interaktion mit Rezeptoren binden die TRAF-Proteine weitere intrazelluläre Signalmoleküle. So rekrutieren sie nicht nur weitere Proteine an Rezeptoren, sondern können über Adapterproteine ebenfalls indirekt an Rezeptoren rekrutiert werden. Ein prominentes Beispiel ist die Assoziation von TRAF2 über TRADD an den TNFR1. Die

TRADD Todesdomäne bindet in diesem Modell direkt an die Todesdomäne des TNFR1 und der N-terminale Teil von TRADD rekrutiert TRAF2 zu dem Signalkomplex (Hsu *et al.*, 1996).

### 1.4.2 Strukturelle Aspekte der Interaktion von TRAFs mit Rezeptoren

Von den Proteinen TRAF2, TRAF3 und TRAF6 ist die Kristallstruktur im Komplex mit verschiedenen Rezeptorpeptiden bekannt (McWhirter *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 1999; Ni *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2005). In Abbildung 1.7 ist exemplarisch die trimere Struktur von TRAF2 im Komplex mit einem LMP1-Peptid gezeigt (Ye *et al.*, 1999).

TRAF2 bindet an verschiedene Aminosäuresequenzen in verschiedenen Rezeptoren. Als gemeinsame Interaktionsmotive wurden unter anderem das Motiv PxQxT in LMP1 und CD40 (Devergne *et al.*, 1996; Boucher *et al.*, 1997), sowie das Motiv SxEE in CD30 und TNF-R2 (Gedrich *et al.*, 1996; Boucher *et al.*, 1997) und das Motiv QEE in OX40 und 4-1BB (Arch & Thompson, 1998) identifiziert (siehe Tabelle 1.1). Aus der Kombination der beschriebenen Motive kann ein übergeordnetes P/S/A/TxQ/EE Konsensusmotiv für die Bindung von TRAF2 abgeleitet werden (Ye *et al.*, 1999). Um die einzelnen Positionen innerhalb der TRAF-Bindesequenzen zu beschreiben, wird in dieser Arbeit die Nomenklatur von Ye *et al.* (1999) verwendet (siehe Tabelle 1.1).

**Tabelle 1.1: TRAF2-Interaktionsmotive in verschiedenen zellulären Rezeptoren sowie LMP1.** Die TRAF2-Konsensusmotive PxQxT und PxQxxD sowie P/S/T/AxQ/E E stammen aus den Studien von Devergne *et al.* (1996) und Ye *et al.* (1999). [P<sub>x</sub> - Position x im Interaktionsmotiv]

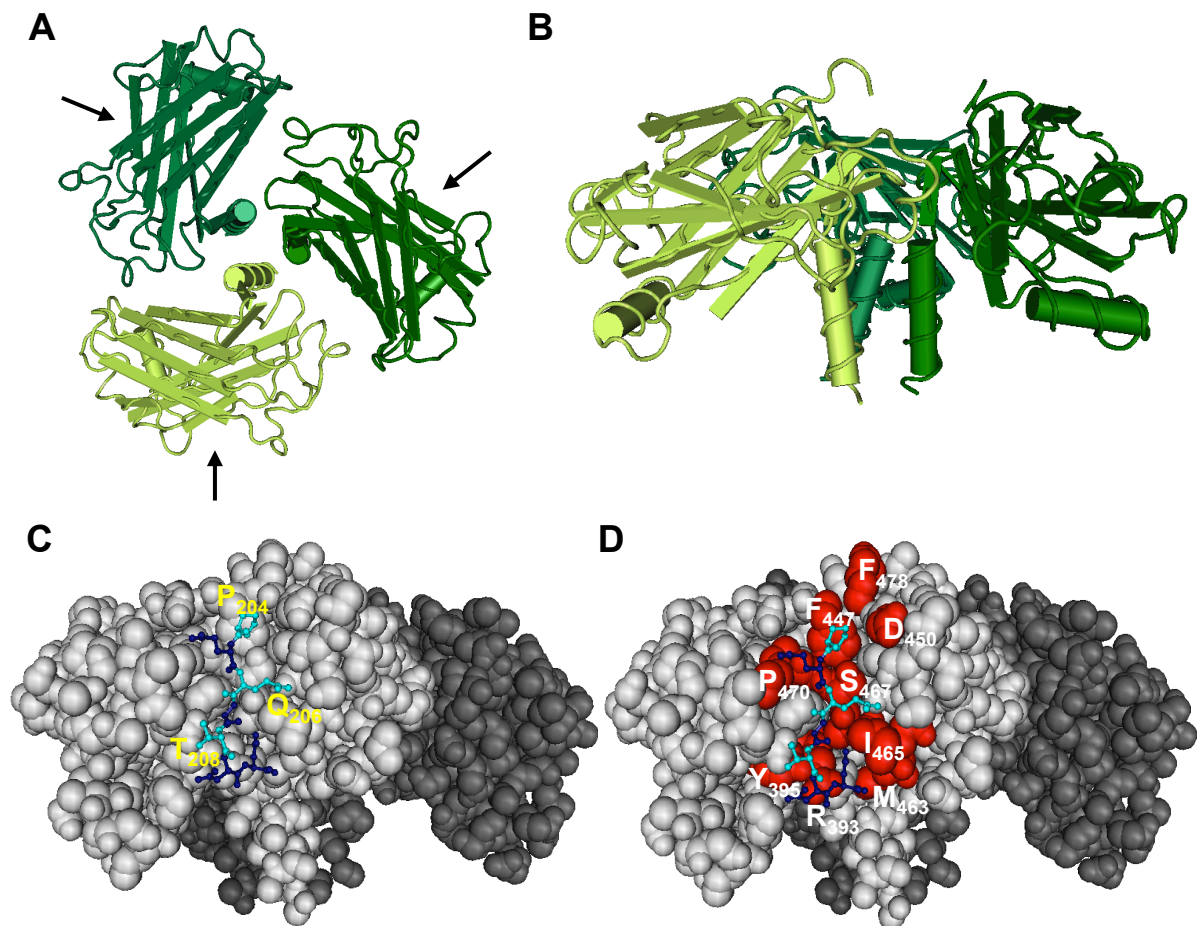
#### TRAF2-Interaktionsmotive

Rezeptor	P <sub>-2</sub>	P <sub>-1</sub>	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	
hLMP1	P	Q	Q	A	T	D	Devergne <i>et al.</i> , 1996; Brodeur <i>et al.</i> , 1997
hCD40	P	V	Q	E	T	L	Boucher <i>et al.</i> , 1997
hCD30	P	E	Q	E	T	E	Aizawa <i>et al.</i> , 1997
<b>CD40/LMP1 Konsensus</b>	<b>P</b>	<b>x</b>	<b>Q</b>	<b>x</b>	<b>T</b>		Devergne <i>et al.</i> , 1996;
<b>untergeordnetes LMP1 Motiv</b>	<b>P</b>	<b>x</b>	<b>Q</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>D</b>	Ye <i>et al.</i> , 1999
hTNF-R2	S	K	E	E	C	A	Boucher <i>et al.</i> , 1997
hCD30	S	V	E	E	E	G	Gedrich <i>et al.</i> , 1996
hCD27	P	I	Q	E	D	Y	Akiba <i>et al.</i> , 1998
hOx40	P	I	Q	E	E	Q	Arch & Thomson 1998
h4-1BB	T	T	Q	E	E	D	Arch & Thomson 1998
h4-1BB	P	E	E	E	E	G	Arch & Thomson 1998
hATAR	A	V	E	E	T	I	Hsu <i>et al.</i> , 1997
<b>Konsensus</b>	<b>P/S/T/A</b>	<b>x</b>	<b>Q/E</b>	<b>E</b>			Ye <i>et al.</i> , 1999

Für die Interaktion von TRAF3 mit LMP1 wurde ursprünglich ein PxQxT/S-Motiv beschrieben (Franken *et al.*, 1996). Dieses Motiv wurde seitdem ebenfalls verwendet, um die Interaktion von TRAF2 mit Rezeptoren zu beschreiben (Devergne *et al.*, 1996; Ye *et al.*, 1999).

Die Kristallstruktur der konservierten TRAF-Domäne von TRAF2 (AS 311-501) weist eine pilzartige Faltung auf (Abb 1.7) (McWhirter *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999). Jeweils drei TRAF2-Moleküle bilden einen trimeren Komplex. Der N-terminale Teil der TRAF-Domäne, der die Aminosäuren 311-347 umfasst (TRAF-N- bzw. Coiled-Coil-Domäne), bildet eine einzelne  $\alpha$ -Helix, die im Komplex den „Stiel“ des Pilzes darstellt (McWhirter *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999). Die Struktur der TRAF-C-Domäne eines jeden TRAF2-Moleküls setzt sich zusammen aus acht antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern und einem kurzen  $\alpha$ -helikalen Abschnitt und bildet den „Pilzkopf“ des Trimers (McWhirter *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999). Die Stabilisierung des trimeren TRAF-Komplexes erfolgt sowohl durch die TRAF-N- als auch die TRAF-C-Domäne. Die Aminosäuren, welche die Trimerisierung von TRAF-Molekülen vermitteln, sind in allen TRAFs konserviert (Park *et al.*, 1999). Die Interaktion von TRAF2 mit Rezeptoren wird innerhalb von TRAF2 über die  $\beta$ -Faltblätter  $\beta$ 3,  $\beta$ 4,  $\beta$ 6 und  $\beta$ 7 der TRAF-C-Domäne koordiniert (Park *et al.*, 1999). Die beiden Rezeptorinteraktionsmotive PxQxT und SxxE interagieren mit der Bindetasche auf der Oberfläche von TRAF2, die durch diese  $\beta$ -Faltblätter gebildet wird (McWhirter *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999). Dabei interagiert jeweils ein Rezeptor-Peptid nur mit einem TRAF-Molekül des Trimers (Park *et al.*, 1999).

Die Interaktion von TRAF2 mit dem P<sub>250</sub>xQxT-Motiv des CD40-Rezeptors wird über die  $\beta$ -Faltblätter  $\beta$ 3,  $\beta$ 4 und  $\beta$ 7 vermittelt (McWhirter *et al.*, 1999). Die Aminosäure Ile<sub>465</sub> des Faltblatts  $\beta$ 7 interagiert mit dem CD40-Aminosäurerest Gln<sub>252</sub> (McWhirter *et al.*, 1999). Die Seitenketten der CD40-Aminosäure Pro<sub>250</sub> fügen sich komplett in die Bindetasche, die durch die Aminosäurereste Phe<sub>447</sub>, Pro<sub>449</sub>, Phe<sub>456</sub> und Ser<sub>467</sub> von TRAF2 gebildet wird (McWhirter *et al.*, 1999). Der Aminosäurerest Thr<sub>254</sub> des CD40-Rezeptorpeptides kann eine Wasserstoffbrücke mit dem TRAF2-Rest Cys<sub>399</sub> bilden (McWhirter *et al.*, 1999). Die TRAF2-Reste Arg<sub>393</sub> und Tyr<sub>395</sub> bilden außerdem Wasserstoffbrücken mit dem CD40-Rest Glu<sub>253</sub> innerhalb der CD40 Sequenz P<sub>250</sub>VQET (McWhirter *et al.*, 1999). Die Interaktion von TRAF2 mit dem Interaktionsmotiv SxxE wird ebenfalls durch die TRAF2-Aminosäuren Arg<sub>393</sub>, Tyr<sub>395</sub> und Ser<sub>467</sub> vermittelt (Park *et al.*, 1999). Diese Aminosäuren sind hoch konserviert in den TRAF-Proteinen TRAF1, TRAF2, TRAF3 und TRAF5 (Park *et al.*, 1999). Obwohl LMP1 ebenfalls ein P<sub>204</sub>xQxT-Motiv besitzt, wurde für die Interaktion von LMP1 mit TRAF2 jedoch aufgrund von Strukturdaten ein abweichendes P<sub>204</sub>xQxxD-Interaktionsmotiv vorgeschlagen: Die kritischen TRAF2-Reste Arg<sub>393</sub> und Tyr<sub>395</sub> interagieren in diesem Modell mit der LMP1-Aminosäure Asp<sub>209</sub> (Ye *et al.*, 1999).



**Abb. 1.7: Kristallstruktur von TRAF2 im Komplex mit einem LMP1-Peptid.** Die Kristallstruktur von TRAF2 im Komplex mit einem LMP1-Peptid wurde aus der NCBI Datenbank (MMDB ID: 73520; PDB ID: 1CZY) in das Programm Cn3D 4.3 importiert und zur Veranschaulichung der TRAF2-Bindetasche bearbeitet. (modifiziert nach: Ye *et al.* (1999)) **A** Aufsicht auf den trimeren TRAF2-Komplex. Jeweils drei TRAF2-Moleküle bilden einen Komplex. Die Interaktion der TRAF-Moleküle untereinander wird durch die TRAF-N- und TRAF-C-Domäne vermittelt. Die Pfeile markieren die drei möglichen Rezeptorbindeseiten. **B** Seitenansicht des TRAF2-Trimers. Der Komplex hat eine pilzkopfähnliche Struktur. **C** Das LMP1-Peptid (blau) P<sub>204</sub>QQATTD im Komplex mit einem TRAF2-Molekül (hellgrau). Die kritischen LMP1-Aminosäurereste des TRAF-Bindemotivs, Pro<sub>204</sub>, Gln<sub>206</sub> und Thr<sub>208</sub> (türkis) fügen sich in die durch TRAF2 gebildete Bindetasche. **D** Kritische TRAF2-Reste (rot) für die Interaktion von TRAF2 mit LMP1. [Referenzen siehe Text]

Im Gegensatz zu diesem Modell konnte in Protein-Protein-Interaktionsstudien mit GST-fusionierten LMP1-Peptiden (Aminosäuren 199-214) und *in vitro* translatiertem TRAF2 gezeigt werden, dass die Bindung von TRAF2 an LMP1 durch die Mutationen der LMP1-Reste Pro<sub>204</sub>, Gln<sub>206</sub> und Thr<sub>208</sub> in Alanin inhibiert wird. Jedoch hatte die Mutation von Asp<sub>209</sub> in ein Alanin kaum einen Effekt auf die Interaktion von TRAF2 mit LMP1 (Devergne *et al.*, 1996). Diese Diskrepanz ist bis heute nicht vollständig geklärt. Interessanterweise scheint sich die Interaktion von TRAF3 mit LMP1 von der Bindung von TRAF2 an LMP1 zu unterscheiden. Jede der Punktmutationen P204A, Q206A und T208A in dem LMP1-Peptid D<sub>199</sub>SLHPQQATDD inhibiert die Bindung sowohl von TRAF2 als auch von TRAF3 an das



kurze LMP1-Peptid. Fügt man jedoch die Mutationen P204A und Q206A in eine längere LMP1-Sequenz ein (Aminosäuren 181-231) und testet diese in demselben *in vitro* System, wird die Bindung von TRAF3, im Gegensatz zur Interaktion von TRAF2, nicht beeinflusst (Devergne *et al.*, 1996).

Während also sowohl TRAF2 als auch TRAF3 mit dem Interaktionsmotiv PxQxT interagieren, bildet TRAF3 außerhalb des Motivs PxQxT noch weitere Kontakte mit Rezeptorpeptiden. Die Kristallstruktur von TRAF3 im Komplex mit einem LMP1-Peptid zeigt, dass die beiden TRAF3-Reste Tyr<sub>395</sub> und Arg<sub>393</sub> Wasserstoffbrücken mit dem LMP1-Rest Asp<sub>210</sub> bilden und so die Bindung von TRAF3 außerhalb des Motivs P<sub>204</sub>xQxT stabilisieren (Wu *et al.*, 2005). Äquivalent dazu ist zusätzlich zu dem Interaktionsmotiv P<sub>250</sub>xQxT innerhalb von CD40 ein weiterer CD40-Rest, Glu<sub>263</sub>, in die Interaktion mit TRAF3 eingebunden (Leo *et al.*, 1999). Im Komplex mit TRAF3 bildet die Signaldomäne von CD40 eine Schleife, durch die der CD40-Rest Glu<sub>263</sub> Kontakte mit den Aminosäuren Tyr<sub>395</sub> und Asp<sub>399</sub> in TRAF3 ausbilden kann (Ni *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu diesem TRAF3-Bindemodell interagieren, wie oben beschrieben, die TRAF2-Reste Tyr<sub>395</sub> und Arg<sub>393</sub> nur mit dem CD40-Rest Glu<sub>253</sub> innerhalb der P<sub>250</sub>VQET Sequenz von CD40 (McWhirter *et al.*, 1999; Ni *et al.*, 2000).

Die Interaktion von TRAF6 mit Rezeptoren unterscheidet sich von der Bindung der anderen TRAFs nicht nur durch ein abweichendes PxQxxF/Y/D/E Interaktionsmotiv, sondern auch durch die Orientierung des Peptids in der TRAF6-Bindetasche (Ye *et al.*, 2002). Ein CD40-Peptid, P<sub>233</sub>GENIF<sub>238</sub>, in der Bindetasche von TRAF6 ist im Vergleich zu dem CD40-Peptid in der Bindetasche von TRAF2 um 40° gedreht (Ye *et al.*, 2002). Zwar ist der TRAF2-Rest Arg<sub>393</sub> auch in TRAF6 (Arg<sub>392</sub>) konserviert und interagiert mit dem Aminosäurerest an P<sub>3</sub> der Rezeptorpeptide, die TRAF2-Reste Ser<sub>467</sub> und Cys<sub>469</sub> sind in TRAF6 jedoch nicht konserviert (Ye *et al.*, 2002). Daher wird die Bindetasche von TRAF6, die mit der P<sub>-2</sub> des Bindemotivs interagiert, durch die TRAF6-Reste Phe<sub>471</sub> und Tyr<sub>473</sub> gebildet (Ye *et al.*, 2002). Der Aminosäurerest an P<sub>0</sub> in Rezeptorbindemotiven, also ein Glutaminsäurerest, interagiert mit TRAF6 durch Bildung einer Wasserstoffbrücke mit der Hauptkette der TRAF6-Aminosäurereste Leu<sub>457</sub> und Ala<sub>458</sub> (Ye *et al.*, 2002). Weiterhin findet eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem Aminosäurerest an P<sub>0</sub> von TRAF6-bindenden Rezeptorpeptiden und dem TRAF6-Aminosäurerest Lys<sub>469</sub> statt (Ye *et al.*, 2002). Zusätzlich zu der trimeren Struktur der TRAF-Domänen bilden Teile der RING (*really interesting new gene*)-Domäne von TRAF6 eine dimere Struktur mit Molekülen eines zweiten TRAF6-Trimers (Yin *et al.*, 2009). Die Dimerisierung des N-Terminus von TRAF6 ist, wie die Trimerisierung des C-Terminus, ebenfalls notwendig für die biologische Funktion des Proteins. Ein TRAF6-Protein mit Alanin-Substitutionen der Aminosäuren Phe<sub>118</sub> und Arg<sub>88</sub> ist nicht mehr in der Lage, sich selbst zu ubiquitinieren und den IKK-Komplex in embryonalen

TRAF6<sup>-/-</sup> Mausfibroblasten zu aktivieren (Yin *et al.*, 2009). Die Dimerisierung des N-Terminus zusammen mit der Trimerisierung des C-Terminus führt zu einer Komplexbildung höherer Ordnung bei einer Aktivierung durch einen Rezeptor. Jede N-terminale Domäne eines Moleküls in einem trimeren Komplex dimerisiert mit einem N-Terminus aus einem weiteren trimeren-TRAF6-Komplex. Der C-Terminus jedes TRAF6-Trimers ist dabei in Richtung der Zellmembran ausgerichtet (Yin *et al.*, 2009).

Für die effektive Bindung von TRAF-Proteinen an zelluläre Rezeptoren als auch an LMP1 ist sowohl die Trimerisierung von TRAF-Molekülen als auch die Multimerisierung der Rezeptoren bzw. LMP1 wichtig (Pullen *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2009). TRAF2 hat eine sehr geringe Affinität zu monomeren Rezeptoren. In isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC)-Experimenten beträgt die Affinität (Gleichgewichtskonstante -  $K_D$ ) des Komplexes aus TRAF2 und CD40-Peptiden 60  $\mu\text{M}$ , die des Komplexes aus TRAF2 mit LMP1-Peptiden 1,9 mM (Ye *et al.*, 2000). In Oberflächenplasmonresonanzstudien zeigt die Interaktion von einem CD40-Peptid zu einer TRAF2-Mutante, die nur die TRAF-Domänen am C-Terminus (Aminosäuren 272-501) umfasst, eine  $K_D$  von 210  $\mu\text{M}$  (McWhirter *et al.*, 1999). Durch die Addition einer N-terminalen Coiled-Coil-Trimerisierungsdomäne an die Signaldomäne von CD40 wird die Affinität von TRAF2 im Vergleich zu monomeren CD40-Molekülen in solchen Experimenten um mehr als das 10-fache verstärkt. Die  $K_D$  des Komplexes aus monomeren CD40 mit TRAF2 (Aminosäuren 311-501) beträgt 30  $\mu\text{M}$ , während die  $K_D$  des Komplexes aus trimeren CD40 mit TRAF2 (Aminosäuren 311-501) 2,5  $\mu\text{M}$  beträgt (Pullen *et al.*, 1999). TRAF6 zeigt eine vergleichbare Affinität zu CD40-Peptiden. In ITC-Experimenten wurde die  $K_D$  der Bindung von TRAF6 (Aminosäuren 333-522) an ein CD40-Peptid (Aminosäuren 230-239) auf 84  $\mu\text{M}$  bestimmt (Ye *et al.*, 2002). TRAFs zeigen also eine höhere Affinität zu oligomerisierten Rezeptoren als zu Rezeptorpeptiden bzw. monomeren Rezeptoren.

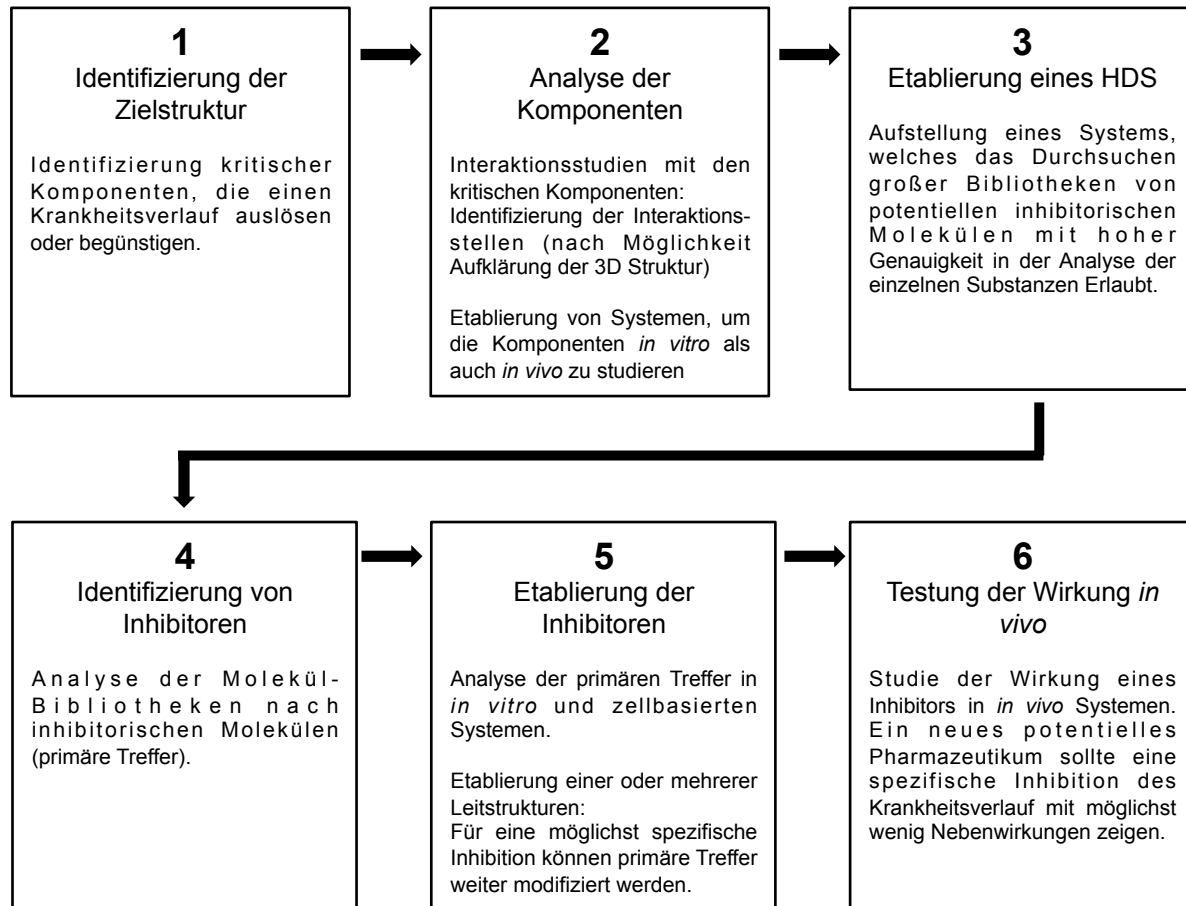
## 1.5 Aufbau eines Screeningsystems zur Identifizierung von Inhibitoren

### 1.5.1 Allgemeine Voraussetzungen

Von der Identifizierung einer potenziellen Zielstruktur für einen Inhibitor bis hin zu einem patentierten Wirkstoff ist es ein langer Weg (siehe Abb. 1.8). Dieser Prozess umfasst mehrere Entwicklungsschritte und mitunter einen Zeitraum von über einem Jahrzehnt (Hughes *et al.*, 2011). Der erste Schritt in diesem Prozess ist die Identifizierung einer Zielstruktur, anhand derer eine Krankheit bekämpft werden soll.

Da die Auswahl des Ziels später für das Gelingen oder das Scheitern des Projektes entscheidend ist, ist es notwendig, möglichst viele Informationen über die Zielstruktur zu sammeln (Hughes *et al.*, 2011). Dabei geht es um die Relevanz der Zielstruktur für die

assoziierten Krankheiten, um die Zugänglichkeit für inhibitorische Moleküle und um die Etablierung von verschiedenen Systemen, mit denen man die Zielstruktur sowohl *in vitro* als auch *in vivo* genau studieren kann (Hughes *et al.*, 2011).



**Abb. 1.8: Arbeitsschritte zur Etablierung einer Protein-Protein-Interaktion (PPI) als Zielstruktur für Inhibitoren** (Abb. modifiziert nach Hughes *et al.* (2011)). Die Entwicklung eines pharmazeutisch aktiven Moleküls gerichtet gegen Protein-Protein Interaktionen kann mitunter ein Jahrzehnt oder mehr Zeit in Anspruch nehmen. In einem ersten Schritt müssen die Ursachen der Krankheit auf molekularer Ebene untersucht werden. Nach Identifizierung kritischer Proteine, die den Krankheitsverlauf auslösen, müssen zwei Proteine, deren Interaktion für die Ausbildung der Krankheit essenziell ist, identifiziert werden. Deren Interaktion sollte möglichst genau analysiert werden. Die direkte Interaktion der beiden Proteine muss in *in vitro* Systemen mit rekombinanten Proteinen darstellbar sein. Wenn möglich, sollte dabei auch die 3D-Struktur des Proteinkomplexes aufgeklärt werden um die Interaktionsfläche der beiden Proteine analysieren zu können. Kleinere Interaktionsflächen begünstigen die Etablierung einer PPI als Zielstruktur. Als nächstes muss ein hochdurchsatzfähiges System (HDS) etabliert werden, welches die Suche nach inhibitorischen Molekülen in großen Bibliotheken erlaubt. Verschiedene Kriterien (siehe hierzu Abb. 1.9) sollten in diesem System erfüllt werden, um eine genaue Analyse der Wirkung der zu testenden Substanzen über den großen Probendurchsatz zu ermöglichen. Potenzielle Inhibitoren müssen zur Etablierung einer Leitstruktur auf ihre Wirkungsweise *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Im Idealfall sollte ein Inhibitor in Zellkulturen die PPI inhibieren, ohne dabei eine allgemeine Toxizität für Zellen zu zeigen. Sind diese grundlegenden Studien abgeschlossen, kann ein Inhibitor in einem *in vivo* Modell, z.B. der Maus, auf dessen Wirkung im Organismus untersucht werden.

Ein sehr wichtiger Schritt ist die Aufstellung des Systems, mit dem neue Inhibitoren identifiziert werden sollen (siehe auch 1.5.3 und 1.5.4). Um große Bibliotheken nach Substanzen mit inhibitorischer Wirkung zu durchsuchen, bedarf es einer robusten und zuverlässigen Methode. Nach der Identifizierung von neuen potenziellen Inhibitoren müssen diese sowohl *in vitro* als auch in Zellkulturexperimenten intensiv untersucht werden, um möglichst viele Informationen über die Wirkungsweise zu erhalten, bevor der neue Inhibitor *in vivo* getestet werden kann (Hughes *et al.*, 2011). Als Antagonisten für eine gegebene Zielstruktur stehen verschiedene Klassen von Molekülen zur Auswahl. Sowohl Antikörper als auch Peptid-Aptamere und kleine organische Moleküle können als Inhibitoren verwendet werden (Arkin *et al.*, 2004; Hughes *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Seigneuric *et al.*, 2011). Jede dieser Molekülklassen hat bestimmte Vor- und Nachteile. Diese jeweiligen Gegebenheiten sollten in die Überlegung mit einbezogen werden, wie der Inhibitor beschaffen sein soll. In der vorliegenden Arbeit sollen die gebildeten Signalkomplexe des EBV-Proteins LMP1 als Zielstruktur für Inhibitoren verwendet werden. Diese Signalkomplexe werden an der intrazellulären Signaldomäne von LMP1 gebildet (siehe Abschnitt 1.3). Große Moleküle, wie z.B. Antikörper, sind nicht in der Lage, Zellmembranen ohne weiteres zu penetrieren (Hughes *et al.*, 2011). Daher beschäftigt sich diese Arbeit mit der Suche nach kleinen organischen Molekülen, die spezifisch die Interaktion von LMP1 mit einem Signalmolekül *in vitro* inhibieren und gleichfalls in der Lage sind, Zellen zu penetrieren und daher eine biologische Funktion zu erreichen.

### 1.5.2 Protein-Protein-Interaktionen als Ziel kleiner inhibitorischer Moleküle

Protein-Protein Interaktionen (PPI) standen als Zielstruktur für kleine Moleküle lange nicht im Fokus bei der Entwicklung von Inhibitoren. Man hielt die Interaktionsfläche, die PPIs umfassen, für zu groß, als dass ein kleines Molekül die Interaktion zwischen den beteiligten Proteinen inhibieren könnte (Mullard, 2012). Erst die Entdeckung, dass die Interaktionsstärke der meisten PPIs auf einem kleinen Anteil von Wechselwirkungen beruht, brachte die Idee auf, PPIs als Ziel für kleine inhibitorische Moleküle zu verwenden (Mullard, 2012). Vor allem PPIs, die darauf beruhen, dass eine Peptid-Strang-Struktur oder eine  $\alpha$ -Helix eines Proteins in der Bindetasche eines zweiten Proteins bindet, konnten als Ziele für inhibitorische Moleküle identifiziert werden (Wells *et al.*, 2007; Arkin *et al.*, 2009). Ein Merkmal, das sich aus dieser Gegebenheit ableitet ist, dass die Interaktion der beiden Proteine, also die Zielstruktur, oftmals durch kurze Peptidsequenzen von einem der beiden Proteine kompetitiv inhibiert werden können (Arkin *et al.*, 2009).

Nun stellen die Signalkomplexe, die LMP1 durch die Rekrutierung von TRAF-Proteinen an die CTAR1-Domäne ausbildet (siehe Abschnitt 1.2 und 1.3), genau eine solche Protein-Protein-Interaktionsstruktur dar. Die TRAF-Proteine sind globulär gefaltet und besitzen eine

Rezeptorbindetasche auf ihrer Oberfläche. Die Signaldomäne von LMP1 ist weitestgehend unstrukturiert und die LMP1-Sequenz P<sub>250</sub>QQAT liegt als Peptidstrang in der Bindetasche der TRAF-Proteine (Ye *et al.*, 1999). Somit beruht der Signalkomplex, der von LMP1 an der CTAR1-Domäne gebildet wird, nicht auf einer großflächigen, raumumfassenden Struktur, sondern die Interaktion ist räumlich auf wenige Aminosäuren innerhalb von LMP1 begrenzt. Da durch Mutationen jeweils weniger Aminosäuren innerhalb der beiden Signaldomänen das Transformationspotential von EBV auf unter 15 % sinkt (Dirmeier *et al.*, 2003), stellen diese kurzen LMP1-Sequenzen und die von ihnen gebundenen Proteine ideale Zielstrukturen dar. Während jedoch die Interaktion der TRAF-Proteine mit der CTAR1-Domäne vor allem durch die Aufklärung der 3D-Strukturen gut darstellbar ist (siehe Abschnitt 1.4.2), ist die Interaktion der Adapterproteine, die an die CTAR2-Domäne binden, noch nicht so differenziert beschrieben (siehe Abschnitt 1.3.4). Daher ist es logisch, die Interaktion zwischen den TRAF-Proteinen und der CTAR1-Domäne als Zielstruktur für Inhibitoren zu wählen.

### 1.5.3 Systeme zur Identifizierung von Inhibitoren

Für die Suche nach kleinen organischen Molekülen als Inhibitoren benötigt man robuste Systeme, die es ermöglichen, große Bibliotheken organischer Moleküle zu durchsuchen. Die Anzahl an Substanzen kann je nach Molekül-Bibliothek bis über 10<sup>6</sup> Substanzen betragen (Hajduk *et al.*, 2011). Dabei wird zwischen fragmentbasierten Bibliotheken und diversitätsbasiertem Moleküldesign der Substanzen unterschieden (Hajduk *et al.*, 2011). Eine fragmentbasierte Bibliothek enthält meist wenige Moleküle (10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup>), die in ihrem Design so ausgelegt sind, dass sie eine große Anzahl von Substanzklassen rudimentär widerspiegeln (Hajduk, 2006; Hajduk *et al.*, 2011). In einem ersten Schritt werden daher bei einem Screen einer solchen Bibliothek niedermolekulare Fragmente (< 250 Da) identifiziert, die meist eine sehr geringe Affinität im Bereich von 100 µM-1000 µM zu ihrer Zielstruktur aufweisen (Hajduk, 2006). Diese Fragmente werden z.B. durch die Konjugation mit einem weiteren Fragment, welches die Zielstruktur in räumlicher Nähe zum ersten Fragment bindet, modifiziert. So kann schrittweise die Affinität des Inhibitors für die gesuchte Zielstruktur und somit dessen pharmazeutisches Potential erhöht werden (Hajduk, 2006).

Eine diversitätsbasierte Bibliothek umfasst meist größere Moleküle, die in ihrer Struktur pharmazeutisch aktiven Substanzen ähneln (Hajduk *et al.*, 2011). Die Größe dieser Bibliotheken kann 10<sup>6</sup> Moleküle umfassen und die Systeme, die verwendet werden, um diese großen Bibliotheken zuverlässig zu durchsuchen, müssen dementsprechend gerüstet sein (Hajduk *et al.*, 2011). Bei einem derartig hohen Aufkommen empfiehlt es sich, ein kostengünstiges System zu entwickeln, das einen hohen Probendurchsatz bei gleichmäßiger Qualität der einzelnen Reaktionsansätze erlaubt. Typische Screening-Systeme, die Protein-Protein Interaktionsstrukturen in *in vitro* Screens zum Ziel haben, sind ELISA-basierte

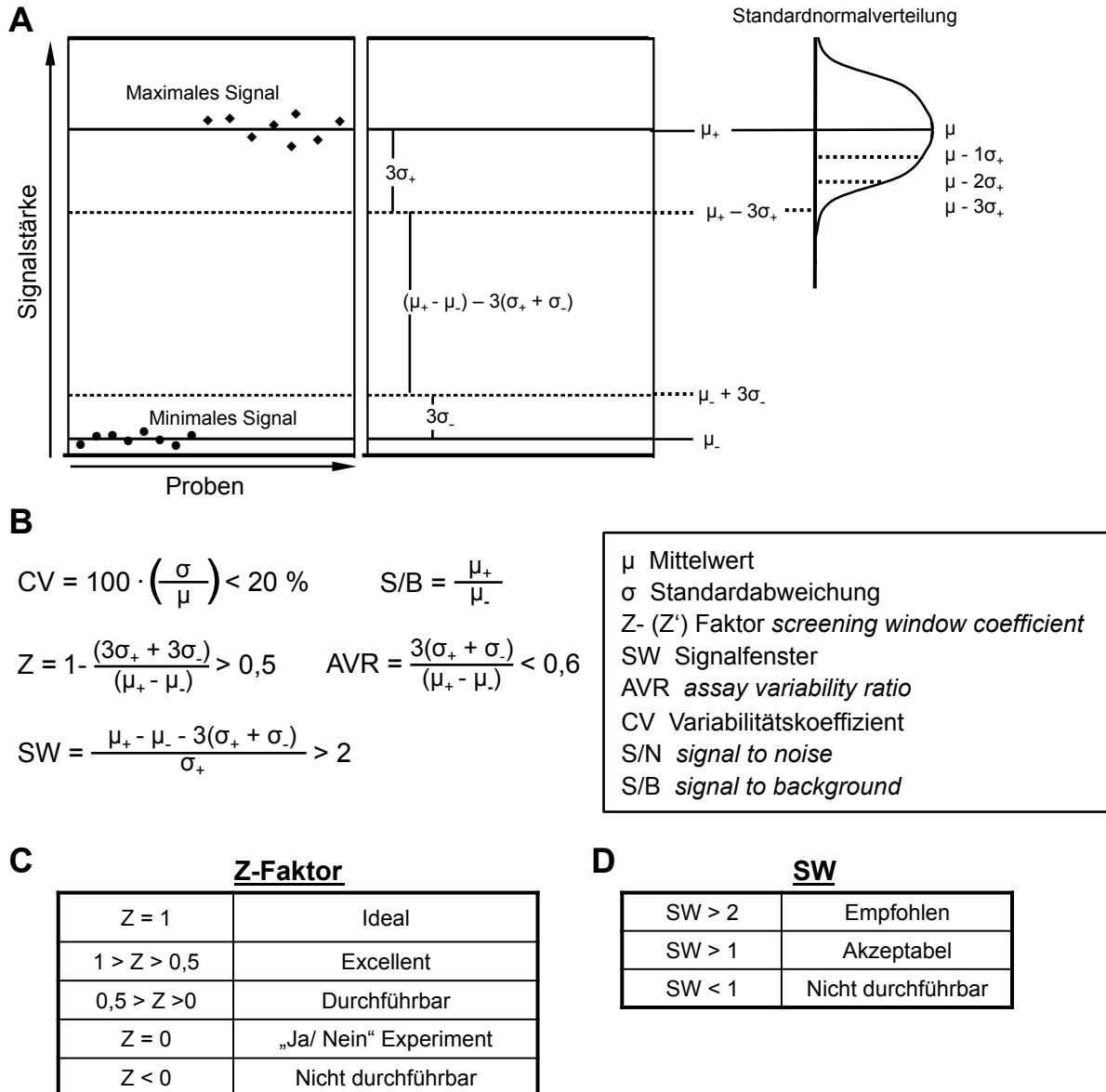
Systeme (*enzyme linked immunoabsorbent assays*), Fluoreszenz-Polarisations-basierte Detektionssysteme, FRET-basierte Systeme (*förster resonance energy transfer*), Oberflächenplasmonresonanz-basierte Detektionssysteme und NMR-basierte Screeningsysteme (*nuclear magnetic resonance*) (Fejzo *et al.*, 1999; Roehrl *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2005; Heeres *et al.*, 2011).

#### 1.5.4 Prinzipien für die Aufstellung von hochdurchsatzfähigen Screeningsystemen

Um den hohen Probendurchsatz (siehe Abschnitt 1.5.3) bewältigen zu können, müssen Screening-Systeme robust sein und dementsprechend bestimmte Kriterien erfüllen (Abb. 1.9). Da typischerweise bei der Durchführung eines Screens jede Substanz nur einmal getestet wird, sind die Schlüsselmerkmale eines robusten Hochdurchsatz (HD)-Systems ein kleines Probenvolumen, Sensitivität, hohe Reproduzierbarkeit und präzise Identifizierung von Treffern (Zhang *et al.*, 1999). Die Variabilität der Signale aus den einzelnen Reaktionen in einem solchen System sollte also möglichst gering sein. Die Messgrößen, um solche Varianzen zu quantifizieren, sind die Standardabweichung ( $\sigma$ ) der Signale von dem Mittelwert ( $\mu$ ) der Datenpopulation aller Einzelmessungen und der zugehörige Variationskoeffizient (CV) der aus dem Verhältnis der Standardabweichung zu dem Mittelwert gebildet wird (Iversen *et al.*, 2012). Der CV der Signalpopulationen in einem Hochdurchsatzsystem sollte unter 20 % liegen (Iversen *et al.*, 2012). In einem Inhibitionssystem, in dem das gesuchte Molekül die Bindung zweier Proteine inhibiert, handelt es sich bei diesen Signalpopulationen um das maximale Signal, das bei der Bindung der beiden Proteine detektiert werden kann (Positivkontrolle) und das minimale Signal, also der Hintergrund, der durch unspezifische Bindung im verwendeten System entsteht (Negativkontrolle). Eine weitere Größe zur Bestimmung der Qualität eines HD-Systems ist das Signalfenster (*SW-signal window*), welches den Raum zwischen dem Rauschen zweier zueinander im Verhältnis stehenden Signalpopulationen darstellt (siehe Abb. 1.9) (Sittampalam *et al.*, 1997; Iversen *et al.*, 2006). In einem qualitativ hochwertigen HD-System sollte das Signalfenster  $>2$  sein (Iversen *et al.*, 2006). Die Bandbreite des Rauschens beider Signalpopulationen wird durch den Mittelwert plus bzw. minus der dreifachen Standardabweichung jeder Signalpopulation beschrieben (Sittampalam *et al.*, 1997).

Weiterhin wird zur Bestimmung der Qualität eines HD-Systems die AVR (*assay variability ratio*) verwendet (Abb. 1.9) (Taylor *et al.*, 2000; Iversen *et al.*, 2006). Für die Durchführung eines Screens sollte die AVR des HD-Systems unter 0,6 liegen (Taylor *et al.*, 2000). Die am weitesten anerkannten Größen zur Bestimmung der Qualität eines HD-Systems sind jedoch der Z-Faktor sowie der zugehörige Z'-Faktor (Zhang *et al.*, 1999). Der Z-Faktor ist der Koeffizient des Signalfensters und definiert das Verhältnis des Signalfensters zu dem dynamischen Bereich des Screens (Abb. 1.9) (Zhang *et al.*, 1999). Der dynamische Bereich

eines Systems ist definiert aus dem Verhältnis des Mittelwertes der maximalen Signale ( $\mu_+$ ) und dem Mittelwert des Hintergrunds ( $\mu_-$ ).



**Abb. 1.9: Qualitätskriterien von hochdurchsatzfähigen (HD)-Systemen zur Identifizierung von inhibitorischen Molekülen.** **A** Die Analyse Kriterien für hochdurchsatzfähigen Systeme graphisch dargestellt nach Iversen *et al.* (2006) und Zhang *et al.* (1999). Dargestellt ist ein Inhibitionssystem. In solchen Systemen wird ein Treffer (Inhibitor) definiert durch Reduktion des Signals im Verhältnis zum maximalen Signal. Für die Etablierung eines solchen Systems müssen die beiden Signalpopulationen maximales Signal ( $\mu_+$ ) und minimales Signal ( $\mu_-$ ) klar voneinander getrennt sein. Das Rauschen ( $\mu \pm 3\sigma$ ) beider Populationen sollte nicht überlappen. **B** Formeln zur Berechnung der Qualitätskriterien aus den Analyse Kriterien aus (**A**) nach Iversen *et al.* (2006), (Iversen *et al.*, 2012) und Zhang *et al.* (1999). Die jeweiligen Minimalkriterien für ein stabiles HD-System sind angegeben. **C** Der Z-Faktor ist die etablierteste Größe zur Bestimmung der Qualität eines HD-Systems. In der Tabelle sind die Kriterien für den Z-Faktor nach Zhang *et al.* (1999) aufgelistet. **D** Kriterien für das Signalfenster (SW) für den Aufbau eines HD-fähigen Systems nach Iversen *et al.* (2006).

Der Z-Faktor und der Z'-Faktor sind dimensionslos und können Werte zwischen 0 und 1 annehmen (Zhang *et al.*, 1999). Dabei beschreibt der Z-Faktor den des Screens selbst, der Z'-Faktor wird aus den zugehörigen Positiv- und Negativkontrollen berechnet (Zhang *et al.*, 1999). Der Z'-Faktor beschreibt also die Qualität des Systems, da hier keine Messwerte durch die Zugabe von inhibitorischen Substanzen beeinflusst werden. In einem qualitativ hochwertigen HD-System mit korrekt gewählten Kontrollen gilt also immer  $Z' \geq Z$ -Faktor (Zhang *et al.*, 1999). Ausgezeichnet für die Durchführung eines Screens sind Z-Faktoren bzw. Z'-Faktoren über 0,5 (Zhang *et al.*, 1999; Iversen *et al.*, 2006). Liegt der Z-Faktor zwischen 0 und 0,5 ( $0,5 > Z > 0$ ), sollte der Screen mit doppelter Kontrolle durchgeführt werden (Zhang *et al.*, 1999; Iversen *et al.*, 2006). Ist der Z-Faktor gleich null, also berühren sich die Bereiche des Hintergrundrauschens beider Signalpopulationen, kann das System als Ja/Nein-Screen verwendet werden, in dem jedoch keine Rückschlüsse auf die Affinität einer identifizierten Substanz auf die Zielstruktur zugelassen werden. Ist der Z-Faktor kleiner null, ist die Durchführung eines Screens nicht möglich (Zhang *et al.*, 1999; Iversen *et al.*, 2006).

Zusammenfassend ist der Z-Faktor die einzige beschriebene Größe, die den Verlauf des Screens selbst definiert. Die anderen Größen, das SW, der Z'-Faktor und die AVR, definieren das System selbst, also die Signalpopulationen der Kontrollen (Zhang *et al.*, 1999; Iversen *et al.*, 2006). Anzumerken ist weiterhin, dass die AVR und der Z'-Faktor dieselbe Größe beschreiben, die AVR ist der Betrag des Z'-Faktors subtrahiert von eins (Taylor *et al.*, 2000). Die Stabilität eines HD-Systems ist vor allem wichtig für die zuverlässige Identifizierung von Treffern, also Inhibitoren der Zielstrukturen. In einer Normalverteilung von Signalen um einen Mittelwert sind 99,73 % aller Messwerte in der Menge  $\mu \pm 3\sigma$  zu finden (Zhang *et al.*, 1999). In einem Inhibitionsscreen kann eine Treffersubstanz also identifiziert werden, wenn das Signal, ausgehend von dem Reaktionsansatz, der diese Substanz enthält, unter diese Grenze fällt (Sittampalam *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1999). Es können aber auch stringenteren Auswahlkriterien gelegt werden, z.B. dass ein Inhibitor das Signal um 50 % in einem Screen reduzieren muss (Sittampalam *et al.*, 1997). Zu beachten ist dabei, dass bei der Festlegung der Treffergrenze zwei Fehler auftreten können. Typ-I-Fehler sind falsch-positiv identifizierte Substanzen, also Moleküle, die sich in einem zweiten Test als nicht aktiv erweisen (Sui *et al.*, 2007). Tritt dieser Fehler zu häufig auf, sind die Kriterien für die Identifizierung von Treffern nicht stringent genug. Typ-II-Fehler sind aktive Substanzen, welche die Kriterien für Treffer durch Verwendung von zu strengen Kriterien jedoch nicht erfüllt haben (Sui *et al.*, 2007). Bei der Etablierung eines HD-Systems ist es also sinnvoll, eine Treffergrenze zu finden die möglichst viele Typ-I-Fehler ausschließt und dabei möglichst alle aktiven Substanzen identifiziert.



## 1.6 Die LMP1-induzierten Signalwege als therapeutisches Ziel

Obwohl LMP1 bei der Transformation von Zellen durch EBV eine kritische Rolle spielt, gibt es nur eine begrenzte Anzahl von Studien, die LMP1 als direktes Ziel von pharmakologisch aktiven Molekülen behandeln. Ein Modellansatz nutzt Expressionsvektoren für einen Einzelketten-Antikörper, der gegen die intrazelluläre Domäne von LMP1 gerichtet ist (Piche *et al.*, 1998). Dieser Antikörper reduziert den Anteil von LMP1-Proteinen in Zellen und erhöht deren Sensitivität gegenüber Apoptose-induzierenden Chemotherapeutika (Piche *et al.*, 1998). Das Modell ist jedoch wenig anwendungsbezogen, da es sich dabei um ein Makromolekül handelt, das in die Zellen eingebracht werden muss.

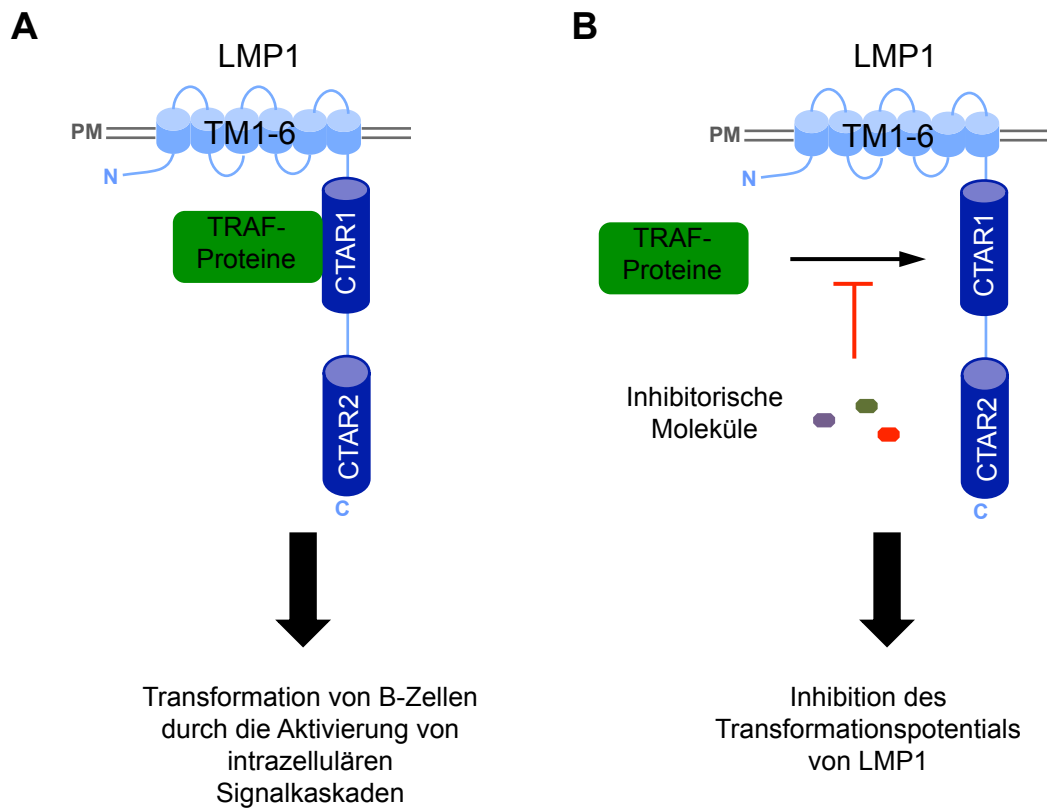
Weitere Modelle nutzen Nukleinsäuren, siRNA und DNAsymes, die spezifisch gegen LMP1 gerichtet sind und die Expression von LMP1 auf post-transkriptioneller Ebene inhibieren sollen (Mei *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2008). In NPC-Zellen verursacht die negative Regulation von LMP1 durch siRNA einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Mei *et al.*, 2007). Weiterhin erhöht sich durch die Behandlung der Zellen mit der LMP1-spezifischen siRNA ebenfalls die Chemosensitivität der Zellen gegenüber etablierten chemotherapeutischen Wirkstoffen (Mei *et al.*, 2007). Darüber hinaus zeigt die Verwendung des DNAsym Dz1 eine Inhibition von Tumoren, die durch die Xenotransplantation von NPC-Zellen in Athymic-Balb/c -Mäusen induziert wurden (Lu *et al.*, 2008). Es steckt also ein großes Potential in der Etablierung von LMP1 als Zielstruktur für EBV-spezifische Wirkstoffe.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten durch die Verwendung von etablierten Inhibitoren, die verschiedene LMP1-induzierte Signalwege inhibieren, das Wachstum von Tumoren aus xenotransplantierten LCL-Zelllinien in Mäusen inhibieren. So zeigt der JNK-spezifische Inhibitor SP600125 (Anthrapyrazolon) nicht nur große Wirkung auf die Proliferationsrate von EBV-transformierten B-Zellen in Zellkulturen, sondern inhibiert auch das Wachstum von Tumoren, die durch die Xenotransplantation von LCL721-Zellen in SCID-Mäusen induziert wurden (Kutz *et al.*, 2008). Weiterhin zeigen auch verschiedene NF- $\kappa$ B-Inhibitoren große Wirkungen sowohl auf Zelllinien, die durch EBV transformiert wurden, als auch auf das Tumorstadium in Mäusen. Der NF- $\kappa$ B-Inhibitor BAY11-7082 (E-3-(4-Methylphenylsulfonyl-2-propenenitril)) inhibiert schnell und irreversibel NF- $\kappa$ B-Signalwege in lymphoblastoiden Zelllinien und verursacht sowohl eine Destabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials als auch die Induktion von Apoptose in diesen Zellen (Cahir-McFarland *et al.*, 2004). Der NF- $\kappa$ B-Inhibitor DHMEQ (Dehydroxymethylpoxyquinomicin) induziert ebenfalls Apoptose in LCLs als auch in NPC-Zelllinien (Miyake *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2010). Vergleichbar zu dem JNK-Inhibitor SP600125 ist es ebenfalls möglich, mit dem NF- $\kappa$ B-Translokations-Inhibitor DHMEQ das Wachstum von Tumoren, die durch xenotransplantierte LCL-Zelllinien in NOG-Mäusen induziert wurden, zu inhibieren (Miyake *et*

*al.*, 2008). Auch die Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges durch den spezifischen Inhibitor LY294002 (2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on) verhindert das für die Zelltransformation wichtige, adhäsionsunabhängige Wachstum von Rat1-Zellen (Mainou *et al.*, 2005).

Diese Studien zeigen, dass bereits die Inhibition einzelner Signalwege durch niedermolekulare Substanzen eine große Wirkung auf Zellen hat, die durch EBV transformiert wurden. Weiterhin zeigen diese Studien das Potenzial von kleinen Molekülen, die gegen LMP1-induzierte Signalwege gerichtet sind, um EBV-assoziiertes Tumorstadium in Säugetieren zu inhibieren. Der Nachteil dieser Inhibitoren ist, dass sie nicht spezifisch gegen eine virale Zielstruktur, sondern allgemein gegen zelluläre Signalkaskaden gerichtet sind. So verhindert z.B. der JNK-Inhibitor SP600125 die Bindung von ATP an das aktive Zentrum der Proteine JNK1, JNK2 und JNK3 und ist dementsprechend nicht spezifisch auf LMP1 ausgerichtet (Bennett *et al.*, 2001). Der NF- $\kappa$ B-Inhibitor BAY11-7082 inhibiert die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  und verhindert so die Translokation der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren in den Zellkern (Pierce *et al.*, 1997). Der zweite NF- $\kappa$ B-Inhibitor DHMEQ verhindert ebenfalls durch Interaktion mit p65 die Translokation von NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren (Watanabe *et al.*, 2008). Dies ist natürlich von Nachteil, wenn man an den Einsatz von NF- $\kappa$ B-Inhibitoren als Pharmazeutika denkt, da die Inhibition der NF- $\kappa$ B-Signalwege nicht nur in den Krankheitsverlauf eingreift, sondern Auswirkungen auf den gesamten Organismus haben kann. Gerade der NF- $\kappa$ B-Signalweg ist essenziell für die Funktion des Immunsystems und die Inhibition dieses Signalweges über längere Zeit könnte negative Auswirkungen auf das Immunsystem zeigen (Karin, 2006). Auch der PI3K-Inhibitor LY294002 zeigt bei der Anwendung größere Nebenwirkungen. So inhibiert er nicht nur die PI3-Kinase, sondern auch weitere Kinasen, z.B. die Casein Kinase 2 und das bei vergleichbaren Konzentrationen (Kong *et al.*, 2008). Weiterhin zeigt der Einsatz von LY294002 in Mäusen zwar großen Einfluss auf das Tumorstadium von Ovarialkarzinomen, hat aber toxische Nebeneffekte auf Hautzellen (Hu *et al.*, 2000).

Die Signaltransduktion von LMP1 ist also durchaus ein lohnenswertes pharmazeutisches Ziel. Doch statt die induzierten Signalwege durch Inhibition von zellulären Interaktionen zu blockieren, sollte eine spezifischere Wirkungsweise bei der Entwicklung eines Inhibitors angestrebt werden. Um dies zu erreichen, sollte die Signalinduktion direkt bei der Rekrutierung von Adapterproteinen an die CTAR-Domänen unterbunden werden. Die Interaktion zwischen LMP1 und verschiedenen TRAF-Proteinen sollte, aufgrund der räumlich begrenzten Interaktionsfläche zwischen den TRAFs und LMP1 (siehe Kapitel 1.4), eine geeignete Zielstruktur für kleine inhibitorische Moleküle darstellen (Abb.1.10).



**Abb. 1.10: Modelvorstellung für die Etablierung der Interaktion von LMP1 und TRAF-Proteinen als Zielstruktur für Inhibitoren.** **A** Durch die Rekrutierung von TRAF-Proteinen an die CTAR1-Domäne aktiviert LMP1 Signalwege, die wichtig für die Transformation von Zellen sowie das Überleben EBV-transformierter Zelllinien sind. **B** Die Inhibition der Bindung von TRAF-Proteinen an die CTAR1-Domäne durch niedermolekulare Substanzen sollte das Transformationspotential von LMP1 stark eingeschränkt. [PM - Plasmamembran, CTAR - C-terminale Aktivierungsregion, LMP1 - Latentes Membranprotein 1, TM - Transmembrandomäne; für Referenzen siehe Text].

### 1.7 Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte der Komplex aus LMP1 und einem Mitglied der TRAF-Protein-Familie als Zielstruktur für Inhibitoren etabliert und hierfür ein hochdurchsatzfähiges Screeningssystem entwickelt werden.

Im ersten Schritt sollte eines der TRAF-Proteine identifiziert werden, dessen Bindung an LMP1 inhibiert werden soll. Dieses TRAF-Protein sollte natürlich eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Signalwegen durch LMP1 spielen. Weiterhin musste die Interaktion dieses TRAF-Proteins mit LMP1 *in vitro* darstellbar sein, um ein System etablieren zu können, mit dem Inhibitoren identifiziert werden können. Daher wurden rekombinante TRAF-Proteine gereinigt und auf ihre Bindung an ein rekombinantes LMP1-Protein untersucht. Aufgrund dieser Analysen wurde die Interaktion zwischen TRAF2 und LMP1 ausgewählt, um im weiteren Verlauf als Zielstruktur für Inhibitoren verwendet zu werden.

Als nächstes sollte ein System etabliert werden, das die Suche nach Inhibitoren in Molekülbibliotheken erlaubte. Dieses Screeningssystem sollte die Ansprüche, die an hochdurchsatzfähige Systeme gestellt werden, erfüllen, um in Zukunft möglichst große Bibliotheken nach potenten Inhibitoren durchsuchen zu können. Mit diesem System sollte ein Pilotscreen durchgeführt und Substanzen identifizieren werden, die die Bindung von TRAF2 an LMP1 inhibieren. Das Potential dieser Substanzen sollte dann sowohl in *in vitro* Konkurrenzexperimenten, als auch in Zellkultursystemen untersucht werden.

Da in den hier durchgeführten Protein-Protein-Interaktionsstudien zwischen den TRAF-Proteinen und LMP1 erstmals eine direkte Bindung von TRAF6 an LMP1 beobachtet werden konnte, wurde die ursprüngliche Zielsetzung dieser Arbeit erweitert. TRAF6 ist das essenzielle Adapterprotein für die Aktivierung von Signalwegen durch die CTAR2-Domäne. Bisher wurde jedoch angenommen, dass TRAF6 indirekt über weitere Adapterproteine an LMP1 rekrutiert wird. Daher sollte die Bindung von TRAF6 an LMP1 im weiteren Verlauf der Arbeit genauer charakterisiert werden. Durch diese Analysen sollten neue Informationen über den Aufbau des CTAR2-Signalkomplexes gewonnen werden, um diesen in der Zukunft ebenfalls als Zielstruktur für Inhibitoren verwenden zu können.

## 2. Material

### 2.1 Plasmide

#### pGEX2T-LMP1

Die Signaldomäne von LMP1 (Aminosäuren 181-386) wurde N-terminal mit GST (Gluthathion-S-Transferase) fusioniert (Sandberg *et al.*, 1997).

#### pGEX2T-LMP1(PQT-->AAA)

Dieser Expressionsvektor basiert auf dem pGEX2T-LMP1-Konstrukt. Die Aminosäuren Pro<sub>204</sub>, Gln<sub>206</sub> und Thr<sub>208</sub> wurden jeweils in die Aminosäure Alanin mutiert (A. Kieser, nicht publiziert).

#### pGEX2T-LMP1 (Y384G)

Dieser Expressionsvektor basiert auf dem pGEX2T-LMP1-Konstrukt. Die Aminosäure Tyr<sub>384</sub> wurde in die Aminosäure Glycin mutiert (A. Kieser, nicht publiziert).

#### pGEX2T-LMP1(A<sub>379</sub>xAxxA)

Dieser Expressionsvektor basiert auf dem pGEX2T-LMP1-Konstrukt. Die Aminosäuren Pro<sub>379</sub>, Gln<sub>381</sub> und Tyr<sub>384</sub> wurden jeweils in die Aminosäure Alanin mutiert (siehe 3.2.1).

#### pGEX2T-CD40

Die Signaldomäne von CD40 (Aminosäuren 216-277) wurde N-terminal mit GST fusioniert. (siehe 3.2.1)

#### pGEX2T-CD40(PxE<sub>xx</sub>F-->Ax<sub>Axx</sub>A)

Dieser Expressionsvektor basiert auf dem pGEX2T-CD40-Konstrukt. Die Aminosäuren Pro<sub>233</sub>, Glu<sub>235</sub> und Phe<sub>238</sub> wurden jeweils in die Aminosäure Alanin mutiert (siehe 3.2.1)

#### pGEX2T-Tio

Die Signaldomäne von Tio (Aminosäuren 1-280) wurde N-terminal mit GST und einem Flag-Epitop fusioniert (de Jong *et al.*, 2013).

#### pGEX2T-mT3b.2

Dieser Expressionsvektor basiert auf dem pGEX2T-Tio-Konstrukt. Die Aminosäuren Pro<sub>210</sub>, Gln<sub>211</sub>, Leu<sub>214</sub>, und Arg<sub>215</sub> wurden jeweils in die Aminosäure Alanin mutiert. Die Aminosäure Glu<sub>216</sub> wurde in Glutamin mutiert (de Jong *et al.*, 2013).

#### pGEX2T-mT6b

Dieser Expressionsvektor basiert auf dem pGEX2T-Tio-Konstrukt. Die Aminosäuren Glu<sub>7</sub>, Glu<sub>9</sub> und Glu<sub>10</sub> wurden jeweils in Glutamin mutiert (de Jong *et al.*, 2013).

#### pGST-(rTEV)-TRADDwt

Das TRADD-Protein wurde N-terminal mit GST fusioniert. Das GST-Protein kann über die TEV (*tobacco etch virus*)-Schnittstelle von TRADD abgetrennt werden. (B. Simm/A. Kieser, nicht publiziert).

#### pGEX2Tstop

Expressionsvektor für GST (V. Nikolova, J. Griese, A. Kieser)

pSV-LMP1:CD40

Fusionsprotein aus den Transmembrandomänen von LMP1 (Aminosäuren 1-190) und der Signaldomäne von CD40 (Aminosäuren 223-280) (Gires *et al.*, 1997)

pGEX2T

Bakterieller Expressionsvektor (Amersham Biosciences). Die Genexpression wird in diesem System durch den *tac*-Promoter reguliert (de Boer *et al.*, 1983). Das Plasmid trägt zudem ein Ampicilin-Resistenzgen.

pSG5-TRAF1

Expressionsvektor für Wildtyp TRAF1 (EBI6) (Mosialos *et al.*, 1995)

pET17b-His-TRAF1<sub>226-416</sub>

Die Aminosäuren 226-416 von TRAF1 wurden N-terminal mit einem 6xHis-Epitop fusioniert (siehe 3.2.2).

pRK5-TRAF2

Expressionsvektor für Wildtyp TRAF2 (Denis Templeton)

pET17b-His-TRAF2<sub>311-501</sub>

Die Aminosäuren 311-501 von TRAF2 wurden N-terminal mit einem 6xHis-Epitop fusioniert (siehe 3.2.2).

pSG5-TRAF3

Expressionsvektor für Wildtyp TRAF3 (LAP1) (Mosialos *et al.*, 1995).

pET17b-His-TRAF3<sub>375-568</sub>

Die Aminosäuren 375-568 von TRAF3 wurden N-terminal mit einem 6xHis-Epitop fusioniert (siehe 3.2.2).

pEGFP-N1-hTRAF4

Expressionsvektor für Wildtyp TRAF4 (H. Wajant, Molekulare Innere Medizin, Medizinische Klinik und Poliklinik II, Universität Würzburg)

pET17b-His-TRAF4<sub>282-470</sub>

Die Aminosäuren 282-470 von TRAF4 wurden N-terminal mit einem 6xHis-Epitop fusioniert (siehe 3.2.2).

pEGFP-N1-hTRAF5

Expressionsvektor für Wildtyp TRAF5 (H. Wajant, Molekulare Innere Medizin, Medizinische Klinik und Poliklinik II, Universität Würzburg)

pET17b-His-TRAF5<sub>363-557</sub>

Die Aminosäuren 363-557 von TRAF5 wurden N-terminal mit einem 6xHis-Epitop fusioniert (siehe 3.2.2).

pET17b-His-TRAF6<sub>310-522</sub>

Die Aminosäuren 310-522 von TRAF6 wurden N-Terminal mit einem 6xHis Epitop fusioniert (siehe 3.2.2).

pET17b-His-TRAF6<sub>310-522</sub>(R392A)

Basiert auf dem pET17b-His-TRAF6<sub>310-522</sub>-Konstrukt. Die Aminosäure Arg<sub>392</sub> wurde in ein Alanin mutiert (siehe 3.2.2).

pET17b-His-TRAF6<sub>310-522</sub>(K469A)

Basiert auf dem pET17b-His-TRAF6<sub>310-522</sub>-Konstrukt. Die Aminosäure Lys<sub>469</sub> wurde in ein Alanin mutiert (siehe 3.2.2).

pET17b-His-TRAF6<sub>310-522</sub>(Y473A)

Basiert auf dem pET17b-His-TRAF6<sub>310-522</sub>-Konstrukt. Die Aminosäure Tyr<sub>473</sub> wurde in ein Alanin mutiert (siehe 3.2.2).

pET17b-His-TRAF6<sub>310-522</sub>(F471A)

Basiert auf dem pET17b-His-TRAF6<sub>310-522</sub>-Konstrukt. Die Aminosäure Phe<sub>471</sub> wurde in ein Alanin mutiert (siehe 3.2.2).

pET-17b

Bakterieller Expressionsvektor (Novagen). Die Genexpression wird in diesem System von dem T7-Promotor reguliert (Studier *et al.*, 1986; Rosenberg *et al.*, 1987). Das Plasmid trägt ebenfalls ein Ampicillin-Resistenzgen.

pCMV-HA-LMP1

Expressionsvektor für ein Wildtyp LMP1 (Aminosäuren 6-386) mit einem N-terminalen Hämagglutinin (HA)-Epitop (Schneider *et al.*, 2008).

pCMV-HA-LMP1(AAA)

Expressionsplasmid basierend auf dem pCMV-HA-LMP1-Konstrukt. Die Aminosäuren Pro<sub>204</sub>, Gln<sub>206</sub> und Thr<sub>208</sub> wurden jeweils in Alanin mutiert (Schneider *et al.*, 2008).

pCMV-HA-LMP1(AAA/Δ371-386)

Expressionsplasmid basierend auf dem pCMV-HA-LMP1-Konstrukt. Die Aminosäuren Pro<sub>204</sub>, Gln<sub>206</sub> und Thr<sub>208</sub> wurden jeweils in die Aminosäure Alanin mutiert. Zusätzlich wurden die C-terminalen Aminosäuren 371-386 deletiert (Schneider *et al.*, 2008).

pCMV-HA-LMPΔ371-386

Expressionsplasmid basierend auf dem pCMV-HA-LMP1-Konstrukt. Die Aminosäuren 1-370 wurden mit einem N-terminalen HA-Epitop fusioniert (Schneider *et al.*, 2008).

pRK5-Flag-TRAF6 wt

Wildtyp TRAF6 mit N-terminalem Flag-Epitop (Shkoda *et al.*, 2012).

pRK5-Flag-TRAF6(R392A)

Basiert auf dem pRK5-Flag-TRAF6 wt-Konstrukt. Die Aminosäure Arg<sub>392</sub> wurde in ein Alanin mutiert (siehe 3.2.3).

pRK5-Flag-TRAF6(K469A)

Basiert auf dem pRK5-Flag-TRAF6 wt-Konstrukt. Die Aminosäure Lys<sub>469</sub> wurde in ein Alanin mutiert (siehe 3.2.3).

pRK5-Flag-TRAF6(F471A)

Basiert auf dem pRK5-Flag-TRAF6 wt-Konstrukt. Die Aminosäure Phe<sub>471</sub> wurde in ein Alanin mutiert (siehe 3.2.3).

pRK5-Flag-TRAF6(Y473A)

Basiert auf dem pRK5-Flag-TRAF6 wt-Konstrukt. Die Aminosäure Tyr<sub>473</sub> wurde in ein Alanin mutiert (siehe 3.2.3).

p1768 (3xκB-Luc)

Luciferase-Reporterplasmid mit drei NF-κB-Bindestellen und dem minimalen *fos* Promoter (Mitchell *et al.*, 1995).

pPGK-Renilla

Renilla-Luciferase-Reporterplasmid mit PGK-Promoter (Shkoda *et al.*, 2012).

**2.2 Humane Zelllinien**

- BL41 Burkitt Lymphom Zelllinie, EBV negativ (Lenoir *et al.*, 1985).
- Bjab Burkitt Lymphom Zelllinie, EBV negativ (Clements *et al.*, 1975).
- LCL 721 Lymphoblastoide B-Zelllinie, transformiert durch EBV (Kavathas *et al.*, 1980).
- HA-LCL 3 Lymphoblastoide B-Zelllinie, transformiert durch rekombinante maxi-EBV-Partikel, die HA-LMP1 an Stelle von Wildtyp-LMP1 tragen (Schneider *et al.*, 2008).
- EREB 2-5 Lymphoblastoide B-Zelllinie, transformiert durch einen EBNA2-defizienten EBV-Stamm (P3HR1). Die Zellen wurden zusätzlich mit rekombinanten EBV-Partikeln mit einem mini-EBV-Vektor infiziert, der für ein Östrogen-Rezeptor-EBNA2-Fusionsprotein kodiert (Kempkes *et al.*, 1995).
- p493-6 Subklon der EREB 2-5 Zelllinie, die stabil mit einem Tetracyclin-regulierbaren myc-Expressionsvektor transfiziert wurde (Schuhmacher *et al.*, 1999; Pajic *et al.*, 2000).
- HEK293-D Humane Nierenepithel Zelllinie (*human embryonic kidney*) (Graham *et al.*, 1977). Subklon D (AGV)

**2.3 Murine Zellen**

- MEF TRAF6<sup>-/-</sup> Embryonale Mausfibroblasten mit homozygotem TRAF6 Knockout, erhalten von Dr. Tak W. Mak (Lomaga *et al.*, 1999).

**2.4 Bakterienstämme**BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (Agilent Technologies)

B F- ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal λ(DE3) endA Hte [argU proL Cam<sup>r</sup>] [argU ileY leuW Strep/Spec<sup>r</sup>] (Stratagene, Instruction Manual)



DH5 $\alpha$  (Invitrogen, Life Technologies Corp.)

K-12 F-  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) gal- phoA supE44  $\lambda$ - thi-1 gyrA96 relA1

## 2.5 Standard Laborequipment

Brutschränke Heraeus Thermo

CP100 Agfa Film Prozessor

*Digital Sonifier* Model 250-D

Einfrierkontainer: 5100 *Cryo 1 °C Freezing Container*

Gel-Elektrophoresekammern: Mighty Small II SE250

Gelsysteme: PerfectBlue *horizontal midi gel*-System

Horizontal-und Kreisschüttler, KS 250 basic

Luminometer: *Orion Microplate Luminometer*

Mikrozentrifuge 5415R

Mikrozentrifuge: Galaxy Mini

Multifuge: Heraeus, Multifuge 3LR

Mikroskop: Axiovert 40C

PCR Maschine: *Robocycler Gradient 96*

Photometer: Biophotometer

Photometer: EL800 *Universal Microplate Reader*

Rollenmischer RM5

Scanner: Scanjet G4050

Stand-Kühlzentrifuge; Avanti J-26 XP

Schüttel-Inkubatoren: Innova44

Tank-Blot-System: TE 22 *tank-transfer-units*

Thermomixer 5436

Transferpette (8-Kanal) (20-200  $\mu$ L)

Überkopfmischer

Zell- und Partikelzähler: Coulter Counter Z1 TM

Zählkammer: Neubauer, Hecht-Assistent

Thermo Scientific, München

Agfa HealthCare GmbH, Bonn

Branson Ultrasonics, USA

Thermo Scientific, München

Hoefer Inc., USA

PEQLAB Biotechnologie, Erlangen

IKA/VWR International, Darmstadt

Berthold Detection Systems,  
Pforzheim

Eppendorf, Hamburg

VWR International, Darmstadt

Thermo Scientific, München

Carl Zeiss Microimaging, Jena

Stratagene/Agilent Technologies,  
München

Eppendorf, Hamburg

Bio-Tek Instruments, USA

Hecht Assistent Sondheim/Rhön

Hewlett-Packard GmbH, München

Beckman Coulter, München

New Brunswick, USA

Hoefer Inc., USA

Eppendorf, Hamburg

Brand GmbH, Wertheim

Labinco/Micro-Biotech-Brand,  
Giessen

Beckman Coulter, München

Karl Hecht GmbH, Sondheim

## 2.6 Verbrauchsmaterialien

Standard Labor-Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Nunc/ThermoScientific (München), Eppendorf (Hamburg) und BD Biosciences (Heidelberg) bezogen.

*Bio-Spin Disposable Chromatography Columns*

Chromatographiesäule: DextraSEC Pro10

Gluthathion-Sepharose 4B

Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Kügelchen

Poly Prep Chromatographiesäule

Protein G-Sepharose, *4 Fast Flow*

Protan Nitrozellulose-Transfer-Membranen

Röntgenfilme: *Medical X-ray Film, CEA Blue sensitive*

ELISA Platten EIA/RIA 96 Well, transparent (3369)

Bio-Rad Laboratories, München

AppliChem GmbH, Darmstadt

GE Healthcare, München

Quiagen, Hilden

Bio-Rad Laboratories, München

GE Healthcare, München

GE Healthcare, München

CEA GmbH, Hamburg

Costar/Sigma Aldrich, Taufkirchen

## 2.7 Antikörper

### 2.7.1 Primärantikörper

$\alpha$ -N-6xHis 2F12 (Maus)	E. Kremmer (HMGU, IMI)
$\alpha$ -N-6xHis 4A4 (Maus)	E. Kremmer (HMGU, IMI)
$\alpha$ -TRAF6 C-20 (Ziege)	SantaCruz Biotechnology, USA
$\alpha$ -TRAF6 C-16 (Ziege)	SantaCruz Biotechnology, USA
$\alpha$ -TRAF6 H-274 (Kaninchen)	SantaCruz Biotechnology, USA
$\alpha$ -HA 12CA5 (Maus)	RocheDiagnostics, Freiburg
$\alpha$ -Flag 6F7 (Ratte)	Sigma-Aldrich Co, Taufkirchen

### 2.7.2 Sekundärantikörper

$\alpha$ -Kaninchen IgG (HRP-konjugiert)	Cell Signaling Technology, USA
$\alpha$ -Maus IgG (HRP-konjugiert)	Cell Signaling Technology, USA
$\alpha$ -Ratte IgG (HRP-konjugiert)	Cell Signaling Technology, USA
$\alpha$ -Ziege IgG (HRP-konjugiert)	Dianova, Hamburg

## 2.8 Enzyme und Reagenzien

Die Enzyme und Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck und Sigma-Aldrich bezogen.

Ampicilin (Ampicilin Natriumsalz)	Karl Roth, Karlsruhe
Bacto Agar	Difco Laboratories, Augsburg
Chloramphenicol	Fluka BioChemika, Taufkirchen
Desoxyribukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roche Diagnostics, Freiburg
Dimethylpimelimidatedihydrochlorid	Fluka Analytica/Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNaseI	Roche Diagnostics, Freiburg
DMEM Medium ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )	Life Technologies, Darmstadt
<i>GeneRuler DNA ladder mix</i>	Thermo Scientific, München
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Augsburg
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	Thermo Scientific, München
Kälberserum (fötal)	Biochrome AG, Berlin
L-Glutamin	Life Technologies, Darmstadt
Lysozym	AppliChem, Darmstadt
MTT	Sigma-Aldrich Chemie
<i>PolyFect Transfection Reagent</i>	Quiagen, Hilden
Phusion High Fidelity F-530 DNA Polymerase	Finzymes/Thermo Scientific, München
<i>PageRuler Plus Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Scientific, München
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, USA
RPMI Medium: Gibco RPMI Medium 1640	Life Technologies, Darmstadt
SOD	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptomycin: Gibco Pen Strep	Life Technologies, Darmstadt
T4 DNA Ligase	Affimetrix Inc/USB Products, USA
TMB Substrat Reagent Set BD OptEIA	BD Biosciences, Heidelberg

Tween-20

Amersham Pharmacia Biotech,  
Freiburg

Vent DNA Polymerase

New England Biolabs, USA

Trypsin EDTA, Gibco

Life Technologies, Darmstadt

Naturstoffe

AnalytiCon Discovery, Potsdam

## 2.9 Kommerzielle Kits

*Dual Luciferase reporter assay system*

Promega, Mannheim

Jetstar 2.0 Plasmid Maxi Prep Kit

Genomed, Löhne

*NucleoSpin Extract II kit*

Machery-Nagel, Düren

## 2.10 Software

Adobe Photoshop CS3 Extended 10

Adobe Systems Inc., USA

ALOGPS 2.1

Virtual Computational Chemistry  
Laboratory ([www.vcclab.org](http://www.vcclab.org))

Biacore Evaluationsprogramm

Biacore/GE Healthcare

Biacore: *Control and evaluation software*

Biacore/GE Healthcare

ImageJ 1.45s

Wayne Rasband NIH, USA

Mac OsX

Apple Inc., USA

Microsoft Office 2008, 2011

Microsoft Cooperation, USA

MacVector 11

Mac Vector Inc., USA

Marvin View 5

ChemAxon Ltd, USA

Prism 5

Graphpad Software Inc., USA

## 3. Methoden

### 3.1 DNA-Arbeitstechniken

#### 3.1.1 Polymerasekettenreaktion

Alle PCR (*polymerase chain reaction*)-Reaktionen wurden in 50  $\mu$ L Ansätzen mit 0,2 mM dNTP Mix, 10 ng Matrizen-DNA, 1 x Vent Thermo-Puffer, 100 pmol je Primer und 3 U Vent DNA-Polymerase angesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden bei folgendem Standardprogramm durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	10 min bei 95 °C
33 Zyklen:	
Denaturierung:	1 min bei 95 °C
Primerhybridisierung:	1 min bei 58 °C
Elongation:	1,5 min bei 72 °C
Finale Elongation:	10 min bei 72 °C

Im Anschluss wurden die PCR-Produkte mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese (siehe 3.1.8) getrennt, mit dem NucleoSpin Extract II Kit gereinigt und die amplifizierten PCR-Fragmente in Plasmide ligiert (siehe 3.1.5).

dNTP Mix                    20 mM dATP, 20 mM dCTP, 20 mM dTTP, 20 mM dGTP in H<sub>2</sub>O

#### 3.1.2 Zielgerichtete Mutagenese von Plasmiden mittels PCR-Reaktionen

Für die zielgerichtete Mutagenese von DNA-Sequenzen in Plasmid-DNA wurden 5'-phosphorylierte Primer zusammen mit der Matrizen-DNA in PCR-Reaktionen verwendet. Alle PCR-Reaktionen zur zielgerichteten Mutagenese von DNA-Sequenzen wurden in 50  $\mu$ L Ansätzen mit 0,2 mM dNTP Mix, 10 ng Matrizen-DNA, 1 x Phusionpuffer, 100 pmol je Primer und 3 U Phusion High Fidelity F-530 DNA-Polymerase durchgeführt. Die Reaktionen wurden nach folgendem Standardprogramm durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	3 min bei 99 °C
33 Zyklen:	
Denaturierung:	0,5 min bei 99 °C
Primerhybridisierung:	0,5 min bei 55 °C
Elongation:	4,5 min bei 72 °C
Finale Elongation:	10 min bei 72 °C

Im Anschluss wurden die PCR-Produkte mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese (siehe 3.1.8) getrennt, mit dem NucleoSpin Extract II Kit gereinigt und die amplifizierten Plasmide ligiert (siehe 3.1.5).

#### 3.1.3 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Für die Konzentrationsbestimmung von DNA-Proben wurden diese in 100  $\mu$ L Wasser verdünnt und in UV/Vis Küvetten bei der OD<sub>260</sub> im Photometer vermessen.

### 3.1.4 Restriktionsverdau von PCR-Fragmenten und Plasmid-DNA

Die enzymatische Hydrolyse von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen (siehe 3.1.2) und gereinigter Plasmid-DNA (siehe 3.1.6 und 3.1.7) mit Restriktionsenzymen wurde in 50-200 µL Ansätzen durchgeführt. Die DNA wurde mit den gewünschten Enzymen (siehe 3.2) für 1 h bei der empfohlenen Reaktionstemperatur in den zugehörigen Reaktionspuffern (laut Herstellerangaben) verdaut. Die verdauten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese (siehe 3.1.8) voneinander getrennt und mit dem NucleoSpin Extract II kit gereinigt.

### 3.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von verdauten DNA-Fragmenten (siehe 3.1.4) in Plasmid-DNA (siehe 3.1.6) wurde in 15 µL Ligationsansätzen mit 1x T4 DNA Ligationspuffer mit 1 U T4-DNA-Ligase durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt 50-100 ng verdaute Plasmid-DNA mit einem fünffachen molaren Überschuss der verdauten DNA-Fragmente. Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Für die Ligation der amplifizierten Plasmid-DNA aus PCR-Reaktionen zur zielgerichteten Mutagenese von DNA-Sequenzen (siehe 3.1.2) wurden 15 µL Ligationsansätze mit 50-100 ng DNA mit 1x T4-DNA-Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase hergestellt. Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 16 °C inkubiert.

### 3.1.6 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus *Echerichia coli* (*E. coli*)-Bakterien in großem Maßstab wurden 400 mL LB-Medium, inklusive der benötigten Antibiotika als Selektionsmarker (siehe 3.2), mit einer *E. coli*-Einzelkolonie von einer LB-Agaroseplatte (siehe 3.5.2) oder *E. coli*-Dauerkulturen (siehe 3.5.3) inokuliert und über Nacht bei 37 °C bei 200 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden mittels Zentrifugation bei 4000 x g für 12 min bei 4 °C geerntet und die Plasmid-Isolation wurde mit dem Jetstar 2.0 Plasmid Maxi Prep Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die isolierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

LB-Medium                    1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 0,5 % (w/v) Natriumchlorid

### 3.1.7 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab

Für die Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli*-Bakterien in kleinem Maßstab wurden 5 mL LB-Medium, inklusive der benötigten Antibiotika (siehe 3.2), mit einer *E. coli*-Einzelkolonie von einer LB-Agaroseplatte (siehe 3.5.2) oder *E. coli*-Dauerkulturen (siehe 3.5.3) inokuliert und über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37 °C bei 200 rpm inkubiert. Aus der über-Nacht-Kultur wurden die Bakterien aus 1 mL einer *E. coli*-Kultur, die mit einem *high copy*-

Plasmid transformiert wurde, bzw. 2 mL einer *E. coli*-Kultur, die mit einem *low copy*-Plasmid transformiert wurde, bei 15000 x g für 1 min bei Raumtemperatur pelletiert und in 200 µL Resuspensionspuffer aufgenommen. Für die Lyse der Bakterien wurden 200 µL Lysepuffer zugefügt und die Ansätze für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse wurde durch die Zugabe von 200 µL Neutralisationspuffer gestoppt. Im Anschluss wurden die Lysate bei 15000 x g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert um die gelöste DNA von unlöslichen Zellfragmenten zu trennen. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt, die DNA durch die Zugabe von 0,7 % (v/v) Isopropanol präzipitiert und bei 15000 x g für 1 h bei Raumtemperatur pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die präzipitierte DNA wurde in Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

Resuspensionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNase A
Lysepuffer	200 mM Natriumhydroxid, 1 % (w/v) SDS
Neutralisationspuffer	3,1 M Kaliumacetat pH 5,5

### 3.1.8 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Analyse von DNA-Plasmiden und Fragmenten wurde in PerfectBlue *horizontal midi gel*-Systemen durchgeführt. Die DNA wurde mit DNA-Auftragspuffer versetzt und auf 1 % (w/v) Agarosegele in TBE-Puffer aufgetragen. Der Gellauf wurde bei 20-150 V (1-100 mA) für 1-4 h durchgeführt. Die DNA wurde nach der Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht visualisiert.

DNA Auftragspuffer (1x)	10 % (v/v) Glycerin, 0,04 % (w/v) Bromphenolblau in TBE-Puffer
TBE-Puffer pH 8	89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM Ethylendiamin-Tetraessigsäure

## 3.2 Klonierungen

### 3.2.1 GST-Fusionsproteine

Alle GST-Fusionproteine wurden auf Basis des bakteriellen pGEX-2T-Expressionsvektors kloniert. Alle pGEX-2T-Konstrukte wurden mit den pGEXfor- und pGEXrev-Primern der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) sequenziert.

pGEX for: 5'-ATAGCATGGCCTTTGCAGG  
pGex rev: 5'-GAGCTGCATGTGTCAGAGG

#### pGEX2T-LMP1(A<sub>379</sub>X<sub>Axx</sub>A)

In einem DNA-Fragment, das die LMP1-Aminosäuren 181-386 umfasst, wurden die Aminosäurereste Pro<sub>379</sub>, Gln<sub>381</sub> und Tyr<sub>384</sub> durch PCR mit den Primern FG44 und FG45 auf Grundlage der Matrize pGEX2T-LMP1 in jeweils einen Alaninrest mutiert und über die

Restriktionsschnittstellen der Enzyme BamHI und EcoRI in den pGEX-2T-LMP1-Expressionsvektor kloniert.

FG44: 5'-GGGGGGCGCGTGGATCCTTAATCTGGATGTATTACCATGGACAACG

FG45: 5'-CGCGCGGGAATTCTTAGTCATATGCGCTTAGTGCAACTGCGCCGTGGGGGT  
CGTCATCATCTCC

#### pGEX2T-CD40

Ein DNA-Fragment, das für die Aminosäuren 216-277 des humanen CD40-Rezeptors kodiert, wurde durch PCR mit den Primern FG39 und FG40 auf Grundlage der Matrize pSV-LMP1-CD40 generiert und über die Restriktionsschnittstellen der Enzyme BamHI und EcoRI in den pGEX-2T-Expressionsvektor kloniert.

FG39: 5'-GGGGGGCGTGGATCCAAAAAGGTGGCCAAGAAGCCAACCAATAAG

FG40: 5'-CCCCCGAATTCTATTACTGTCTCTCCTGCACTGAGATGCG

#### pGEX2T-CD40(PxExxF-->AxAxxA)

In ein DNA Fragment, das für die Aminosäuren 216-277 des humanen CD40-Rezeptors kodiert, wurden die Punktmutationen P233A, E235A und F238A durch PCR mit den Primern FG40 und FG41 auf Grundlage der Matrize pSV-LMP1-CD40 eingefügt. Das entstandene PCR-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen der Enzyme BamHI und EcoRI in den pGEX-2T-Expressionsvektor kloniert.

FG40: 5'-CCCCCGAATTCTATTACTGTCTCTCCTGCACTGAGATGCG

FG41: 5'-GGGGGGCGTGGATCCAAAAAGGTGGCCAAGAAGCCAACCAATAAGGCCCCC  
CACCCCAAGCAGGAAGCACAGGCAATCAATGCACCCGACGATCTTCCTGGCTCC

### **3.2.2 6xHis-Epitop fusionierte TRAF-Proteine**

Die humanen TRAF-Proteine 1-6 wurden für die Expression in *E. coli* durch PCR-Reaktionen mit einem N-terminalen 6xHis-Epitop fusioniert und in den bakteriellen pET-17b-Expressionsvektor kloniert. Alle pET-17b-His-TRAF-Konstrukte wurden mit den T7- und T7term-Primern der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) sequenziert.

T7: 5'-AATACGACTCACTATAG

T7term: 5'-CTAGTTATTGCTCAGCGGT

#### pET17b-His-TRAF1<sub>226-416</sub>

Ein DNA-Fragment, das für die Aminosäuren 226-416 des humanen TRAF1 kodiert, wurde durch PCR mit den Primern FG27 und FG28 auf Grundlage der Matrize pSG5-TRAF1 generiert und über die Restriktionsschnittstellen der Enzyme NdeI und EcoRI in den pET-17b-Expressionsvektor kloniert.

FG27: 5'-GGGGGGGGCCATGGCGCGTGAGCGCATCCTGAGCTTGGAGCA

FG28: 5'-GGGGGGGGAATTCTTACTAAGTGCTGGTCTCCACAATGCACT

pET17b-His-TRAF2<sub>311-501</sub>

Ein DNA-Fragment, das für die Aminosäuren 311-501 des humanen TRAF2 kodiert, wurde durch PCR mit den Primern FG09 und FG11 auf Grundlage der Matrize pRK5-TRAF2 generiert und über die Restriktionsschnittstellen der Enzyme NdeI und NotI in den pET-17b-Expressionsvektor kloniert.

FG09: 5'-GGGGGGGCATATGCACCACCACCACCACGCCATGGCGCAAGACAAGATT  
GAAGCCCTGAGT

FG11: 5'-GGGGGGGCGCCGGCGGATAATCTCGGGACAGTCCAGGTGTTACCGGAACTA

pET17b-His-TRAF3<sub>375-568</sub>

Ein DNA-Fragment, das für die Aminosäuren 375-568 des humanen TRAF3 kodiert, wurde durch PCR mit den Primern FG29 und FG30 auf Grundlage der Matrize pSG5-TRAF3 generiert und über die Restriktionsschnittstellen der Enzyme NdeI und EcoRI in den pET-17b-Expressionsvektor kloniert.

FG29: 5'-GGGGGGGGCCATGGCGGCTCGGAACACAGGCCTGCTGGAGT

FG30: 5'-GGGGGGGGAATTCTTATCAGGGATCGGGCAGATCCGAAGTATCCA

pET17b-His-TRAF4<sub>282-470</sub>

Ein DNA-Fragment, das für die Aminosäuren 282-470 des humanen TRAF4 kodiert, wurde durch PCR mit den Primern FG31 und FG32 auf Grundlage der Matrize pEGFP-N1-hTRAF4 generiert und über die Restriktionsschnittstellen der Enzyme NdeI und EcoRI in den pET17b-Expressionsvektor kloniert.

FG31: 5'-GGGGGGGGCCATGGCGTGTGCCCTGGTGGAGCCGGCAACGGCA

FG32: 5'-GGGGGGGGAATTCTTATCAGCTGAGGATCTTCCGGGGCAGTTC

pET17b-His-TRAF5<sub>363-557</sub>

Ein DNA-Fragment, das für die Aminosäuren 363-557 des humanen TRAF5 kodiert, wurde durch PCR mit den Primern FG33 und FG34 auf Grundlage der Matrize pEGFP-N1-hTRAF5 generiert und über die Restriktionsschnittstellen der Enzyme NdeI und EcoRI in den pET17b-Expressionsvektor kloniert.

FG33: 5'-GGGGGGGGCCATGGCGGATCAAAGATTAGCCGTTTTAG

FG34: 5'-GGGGGGGGAATTCTTACTAGAGATCCTCCAGGTCAGTTAAGTC

pET17b-His-TRAF6<sub>310-522</sub>

Ein DNA-Fragment, das für die Aminosäuren 310-522 des humanen TRAF6 kodiert, wurde durch PCR mit den Primern FG35 und FG36 auf Grundlage der Matrize pRK5-Flag-TRAF6



generiert und über die Restriktionsschnittstellen der Enzyme NdeI und EcoRI in den pET17b-Expressionsvektor kloniert.

FG35: 5'-GGGGGGGGCCATGGCGGACCATCAAATCCGGGAGCTGACT

FG36: 5'-GGGGGGGGAATTCTTACTATAACCCTGCATCAGTACTTCGTG

#### pET17b-His-TRAF6<sub>310-522</sub>(R392A)

In ein DNA-Fragment, das für die Aminosäuren 310-522 des humanen TRAF6 kodiert, wurde die Punktmutation R392A durch PCR mit den Primern FG36 und AK382 auf Grundlage der Matrize pET17b-His-TRAF6<sub>310-522</sub> generiert und über die Restriktionsschnittstellen der Enzyme XmaI und EcoRI in den pET17b-Expressionsvektor kloniert.

FG36: 5'-GGGGGGGGAATTCTTACTATAACCCTGCATCAGTACTTCGTG

AK382: 5'-GGGGGGGAGGAGAAACCTGTTGTGATTCATAGCCCTGGATTCTACACTG  
GCAAACCCGGGTACAAACTGTGCATGGCATTGCACCTTCAGTTACCGACTGC

#### pET17b-His-TRAF6<sub>310-522</sub>(K469A), (F471A) und (Y473A)

Die Punktmutationen K469A, Y473A und F471A wurden jeweils in den pET17b-His-TRAF6<sub>310-522</sub>-Expressionsvektor durch zielgerichtete Mutagenese mit Hilfe von PCR-Amplifikationen mit phosphorylierten Primern und anschließender Ligation des amplifizierten Plasmids eingebracht. Die verwendeten Primer-Sequenzen sind wie folgt:

K469A: AK401, AK397

F471A: AK401, AK398

Y473A: AK401, AK399

AK401: 5'-P-TGGAAGCCCTAAGACAAAGAACTTTTCATTAAGG

AK397: 5'-P-GATGCATAAAAGTTACATAGCCAAAACCTGCTGGGTTCCGTGGGATTGTGG  
GTCGCTG

AK398: 5'-P-GATGCATAAAAGTTACATAGCCTGCACCTTTTGGGTTCCGTGGGATTGTGG  
GTCGCTG

AK399: 5'-P-GATGCATAAAAGTTACTGCGCCAAAACCTTTTGGGTTCCGTGGGATTGTGG  
GTCGCTG

### **3.2.3 Flag-Epitop fusionierte TRAF6-Proteine**

Für die Expression von humanen TRAF6-Proteinen wurde der pRK5-Plasmidvektor, bei dem die Proteinexpression durch den CMV-Promoter reguliert wird, verwendet (Schall *et al.*, 1990). Die Punktmutationen R392A, K469A, F471A und Y473A wurden durch zielgerichtete Mutagenese in PCR-Amplifikationen eingefügt. Alle pRK5-TRAF6-Konstrukte wurden mit dem Primer SP6 der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) und dem Primer AK133 sequenziert.

SP6: 5'-CACATACGATTTAGG

AK133: 5'-TTGTAACCATTATAAGCTGC

Die verwendeten Primer-Sequenzen sind wie folgt:

R392A: AK406, AK407

K469A: AK401, AK397

F471A: AK401, AK398

Y473A: AK401, AK399

AK397: 5'-P-GATGCATAAAAAGTTACATAGCCAAAACCTGCTGGGTTCCGTGGGATTGTGG  
GTCGCTG

AK398: 5'-P-GATGCATAAAAAGTTACATAGCCTGCACCTTTTGGGTTCCGTGGGATTGTGG  
GTCGCTG

AK399: 5'-P-GATGCATAAAAAGTTACTGCGCCAAAACCTTTTGGGTTCCGTGGGATTGTGG  
GTCGCTG

AK401: 5'-P-TGGAAGCCCTAAGACAAAGAACTTTCATTAAGG

AK406: 5'-P-CATGGCATTGCACCTTCAGTTACCGACTGCTCAGCGCTG

AK407: 5'-P-CACAGTTTGTACCCGGGTTTGCCAGTGTAGAATCCAG

### 3.3 Protein Arbeitstechniken

#### 3.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese von Proteinen wurden SDS (*sodiumdodecylsulfat*)-PAA (Polyacrylamid)-Gele nach Laemmli hergestellt (Laemmli, 1970). Für die Polymerisierung der Trenn- und Sammelgele wurden die Trenn- und Sammelgel-Lösungen mit 0,1 % (w/v) APS (Ammoniumpersulfat) und 0,1 % (w/v) TEMED (Tetramethylethyldiamin) versetzt. Die Proteinproben wurden mit Proteinauftragspuffer versetzt und zur vollständigen Denaturierung für 5 min bei 95 °C erhitzt, anschließend auf Eis inkubiert und in die Taschen der Gele aufgetragen. Die Gelläufe wurden in den Gelelektrophoresekammen *Mighty Small II SE250* bei 35 mA für 1-2 h in SDS-Laufpuffer durchgeführt.

Trenngel-Lösung	12,5 % oder 15 % (w/v) Polyacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS, 3,5 mM EDTA in 375 mM Tris-HCl pH 8,9
Sammelgel-Lösung	4 % (w/v) Polyacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS, 3,5 mM EDTA in 125 mM Tris-HCl pH 6,8
Proteinauftragspuffer (1x)	25 mM Tris-HCl pH 6,8, 1 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) Glycerin, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, 1 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol, 25 mM DTT (Dithiothreitol)
SDS-Laufpuffer	0,1 % (w/v) SDS, 192 mM Glycin, 25 mM Tris-HCl

#### 3.3.2 Coomassie-Brilliant-Blau Färbung von SDS-Gelen

Für die Visualisierung von Proteinen in SDS-PAA-Gelen (3.3.1) wurden die PAA-Gele in 20 mL einer Coomassie-Lösung für 60 min unter Schütteln bei 50 rpm bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundener Farbstoff wurde durch mehrmaliges Waschen mit jeweils 20 mL Entfärbelösung für 20 min unter Schütteln bei 50 rpm aus dem Gel entfernt.

Coomassie-Lösung	1 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau G-250 in 20 % (v/v) Essigsäure in Wasser
Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure in Wasser

### 3.3.3 Immunblot-Analysen

Für Immunblot (Western Blot)-Analysen wurden die Proteinproben aus Protein-Protein-Interaktionsstudien (siehe 3.3.9), Ko-Immunpräzipitationen (siehe 3.3.14) und Luciferase-Reporter-Experimenten (siehe 3.4.7) mittels SDS-PAA Gelelektrophorese (siehe 3.3.1) ihrer Größe nach getrennt und anschließend mit dem Tank-Blot-System auf Protan-Nitrozellulosemembranen transferiert. Für den Proteintransfer von den Gelen auf die Membranen wurde in den Tank-Blot-Kammern eine Spannung von konstant 100 V für 45 min angelegt. Nach dem Transfer wurden die Membranen mit den immobilisierten Proteinen für 1 h unter Schütteln bei 50 rpm bei Raumtemperatur in einer Milch-TBST-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindestellen der Antikörper auf der Membranen zu sättigen. Die Membranen wurden dann mit dem jeweiligen Primärantikörper (siehe Kapitel 3) in Verdünnungen von 1:10 - 1:1000 in Milch-TBST über Nacht bei 4 °C auf einem Rollenmischer inkubiert. Um ungebundene Antikörpermoleküle zu entfernen, wurden die Membranen dreimal für 20 min unter Schütteln bei 50 rpm mit TBST gewaschen. Dann wurden die Membranen mit einem Meerrettichperoxidase (HRP – *horseradish peroxidase*)-konjugierten Sekundärantikörper (siehe 2.7.2), spezifisch gerichtet gegen den Primärantikörper, inkubiert. Die Bindung der Sekundärantikörper erfolgte in Milch-TBST für 1 h bei RT. Die Sekundärantikörper wurden in Verdünnungen zwischen 1:3000 und 1:10000 eingesetzt. Nach der Inkubation der Sekundärantikörper mit der Membran wurden ungebundene Sekundärantikörpermoleküle durch dreifaches Waschen mit TBST für 20 min unter Schütteln bei 50 rpm entfernt. Für die Detektion der spezifisch gebundenen Antikörper wurden die Membranen für 1 min mit einer ECL-Lösung inkubiert. Das hierbei entstandene chemilumineszente Signal wurde auf Röntgenfilmen detektiert. Alle Röntgenfilme wurden in einem CP100 Agfa Film-Prozessor entwickelt.

TBS	10 mM Tris-HCl pH 7,4 , 150 mM Natriumchlorid
TBST	TBS 0,1 % (v/v) Tween-20
Blot Puffer	25 mM Tris-HCl, 120 mM Glycin
Milch-TBST	5 % (w/v) Milchpulver in TBST
ECL-Lösungen	(A) 100 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM p-Coumarsäure 1,25 mM Luminol (B) 3 % (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Mischverhältnis (A)/(B): 333/1

### 3.3.4 Quantifizierung von Signalen aus Immunblot-Analysen

Für die Quantifizierung von Immunblot-Signalen wurden die Röntgenfilme mit einem Scanner digitalisiert und mit dem Programm ImageJ quantifiziert (nach Anleitung des Herstellers).

### 3.3.5 Bestimmung der Konzentrationen von Proteinen nach der Bradford-Methode

Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurden Proteinlösungen nach dem Protokoll von Bradford vermessen (Bradford, 1976). Die Bradfordlösung (BioRad Protein Assay) wurde 1:5 in Wasser verdünnt und 1-5  $\mu\text{L}$  einer Proteinlösung wurden zu 1 mL Reaktionsansätzen zugefügt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Änderung der Absorption durch die Interaktion des Coomassie-Brilliant-Blau G-250-Farbstoffs der Bradfordlösung mit den Proteinen bei der Wellenlänge 595 nm im Vergleich zu einem BSA (*bovine serum albumin*)-Protein Standard bestimmt.

### 3.3.6 Reinigung von Proteinen mittels $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätschromatographie

Für die Proteinreinigung mittels  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätschromatographie wurde das Pellet von 400 mL bakterieller Expressionskulturen (siehe 3.5.6) in 10 mL His-Lysepuffer gelöst und für 20 min auf Eis inkubiert. Für eine vollständige Lyse der Zellen wurden die Lysate dreimal für 10 sec bei einer Amplitude von 55 % mit 30 sec Pause zwischen den einzelnen Schritten in einem Falcon-Reaktionsgefäß mit einem Stab-Sonifiziergerät auf Eis sonifiziert. Im Anschluss wurden die gelösten Proteine von unlöslichen Zellbestandteilen durch Zentrifugation bei 20000 x g für 30 min bei 4 °C getrennt. Für die Affinitätschromatographie wurden die Lysate mit  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose-Kügelchen für 30 min auf einem Rollenmischer inkubiert. Für 10 mL Lysat wurden 500  $\mu\text{L}$  einer 50 %igen Lösung von  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose Kügelchen eingesetzt. Im Anschluss wurde die Suspension in eine Poly-Prep-Chromatographiesäule überführt. Eine Chromatographiesäule wurde mit maximal 20 mL Lysat beladen. Der Durchlauf wurde verworfen und die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Matrix mit den gebundenen Proteinen in der Säule mit einem Stufengradienten von Imidazol-Puffern gewaschen. Als erstes wurde die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Matrix zweimal mit je 10 mL eines 20 mM Imidazol-Puffer gewaschen, gefolgt von 2 mL eines 50 mM Imidazolpuffers und 1 mL eines 100 mM Imidazolpuffers. Nach diesen Waschschritten wurden die gebundenen Proteine mit einem 500 mM Imidazol-Puffer eluiert. Im Anschluss wurden die Eluate auf eine DextraSEC Pro10-Chromatographiesäule (AppliChem) aufgebracht und mit PBS eluiert, um die Proteine von dem Imidazol zu trennen. Der Pufferaustausch mittels Dextra Sec Pro10-Säule wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Lagerung wurden die Proteine mit 10 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -20 °C eingefroren. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt.

His-Lysepuffer	50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8, 300 mM Natriumchlorid, 20 mM Imidazol, 1 mg/mL Lysozym, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNaseA, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNaseI
Imidazolpuffer	50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8, 300 mM Natriumchlorid, sowie entweder 20 mM, 50 mM, 100 mM oder 500 mM Imidazol (s.o.)

PBS pH 7,4                      137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 10 mM  
Dinatriumhydrogenphosphat, 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat

### 3.3.7 Reinigung von GST-fusionierten Proteinen

Für die Reinigung von GST-fusionierten Proteinen wurde das Bakterienpellet aus 400 mL Expressionskulturen (siehe 3.5.6) in 10 mL PBST-Lysepuffer gelöst und für 20 min auf Eis inkubiert. Für eine vollständige Lyse der Bakterien wurden die Ansätze für dreimal 10 sec bei einer Amplitude von 55 %, mit 30 sec Pause zwischen den einzelnen Schritten in einem Falcon-Reaktionsbehälter mit einem Stab-Sonifiziergerät auf Eis sonifiziert. Im Anschluss wurden die gelösten Proteine von unlöslichen Zellbestandteilen durch Zentrifugation bei 20000 x g für 30 min bei 4 °C getrennt. Für die Affinitätschromatographie wurden die Lysate mit 1 mL einer 50 %igen Gluthation-Sepharose-Kügelchen-Lösung für 4 h auf einem Rollenmischer bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Gluthation-Sepharose-Kügelchen (GSH-Kügelchen) mit den gebundenen GST-Fusionsproteinen bei 500 x g für 5 min bei 4 °C sedimentiert und in 50 mL PBST aufgenommen. Dieser Waschschrift wurde dreimal durchgeführt. Danach wurden die GSH-Kügelchen erneut sedimentiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurden die gebundenen GST-Proteine durch Inkubation der GSH-Kügelchen mit einem Glutathion-Elutionspuffer für 20 min auf einem Überkopfmischer bei 4 °C von den GSH-Kügelchen gelöst und über eine Poly-Prep-Chromatographiesäule von den GSH-Kügelchen getrennt. Die Eluate wurden auf eine DextraSEC Pro10-Chromatographiesäule geladen und mit PBS eluiert um die GST-Proteine von dem Glutathion des Elutionspuffers zu trennen. Der Pufferaustausch mittels DextraSEC Pro10-Chromatographiesäule wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Lagerung wurden die Proteine mit 10 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -20 °C eingefroren. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt.

PBST                                      0,1 % (v/v) Tween-20 in PBS  
PBST-Lysepuffer                      PBST supplementiert mit 1 mg/mL Lysozym, 25 µg/mL  
RNaseA, 25 µg/mL DNaseI  
Glutathion-Elutionspuffer            10 mM Glutathion (reduzierte Form) in PBS

### 3.3.8 Protein-Protein-Interaktionsstudien zwischen GST-fusionierten Proteinen und His-TRAF-Proteinen

Für die Durchführung von Protein-Protein-Interaktionsstudien wurden zunächst die GST-Fusionsproteine mit 10 µL einer 50 %igen Lösung von GSH-Kügelchen inkubiert. Die GSH-Kügelchen haben eine Bindekapazität von 8 mg/mL (Herstellerangaben). Um eine vollständige Belegung aller Bindeplätze auf den GSH-Kügelchen und damit eine möglichst hohe Dichte von GST-Fusionsproteinen zu erreichen, wurden die GSH-Kügelchen mit einem zweifachen Massenüberschuss an GST-Fusionsproteinen, also 80 µg GST-LMP1-Proteinen, inkubiert. Das Beladen der GSH-Kügelchen mit GST-Fusionsproteinen wurde für 4 h bei 4 °C

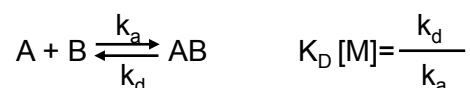
in 500  $\mu$ L PBS auf einem Überkopfmischer durchgeführt. Um ungebundene Proteine zu entfernen, wurden die GSH-Kügelchen durch Zentrifugation bei 500 x g für 5 min bei 4 °C sedimentiert und dreimal mit jeweils 1,5 mL PBST gewaschen. Für die Protein-Protein-Interaktion wurden die GSH-Kügelchen erneut mit 500 x g für 5 min bei 4 °C pelletiert und in 500  $\mu$ L PBST-Bindepuffer mit den zu untersuchenden Reaktionspartnern (siehe Kapitel 4) für 1 h bei 4 °C auf einem Überkopfmischer inkubiert. Ungebundene Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit 1,5 mL PBST entfernt. Im Anschluss wurden die GSH-Kügelchen mit den gebundenen Proteinen bei 500 x g für 5 min bei 4 °C pelletiert, mit 75  $\mu$ L Proteinauftragspuffer versetzt und die gebundenen Proteine wurden über SDS-PAA Gelelektrophorese (siehe 3.3.1) ihrer Größe nach getrennt und in Immunblot-Analysen (siehe 3.3.3) detektiert. Die gleichmäßige Bindung der GST-Fusionsproteine an die GSH-Kügelchen wurde durch Coomassiefärbung der SDS-Gele überprüft (siehe 3.3.2).

PBST-Bindepuffer 0,1% (w/v) BSA in PBST

### 3.3.9 Protein-Protein-Interaktionsstudien mittels Oberflächenplasmonresonanz

Die Bindestudien zwischen Proteinen mittels Oberflächenplasmonresonanz wurden an einem Biacore 3000 Gerät (GE Healthcare) durchgeführt. Dafür wurden die LMP1-Mutanten GST-LMP1 wt und GST-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) auf der Oberfläche eines Biacore CM5-Chips immobilisiert. Die Immobilisierung wurde durch chemische Vernetzung, also die Bildung von Peptidgruppen zwischen der carboxymethylierten Dextranoberfläche des CM5-Chips und den Aminogruppen der GST-Fusionsproteine, mit der Biacore Control Software durchgeführt („run application wizard“ → „surface preparation“ → „aim for immobilized level“). Hierbei wurden die Carboxylgruppen des Chips mit EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) und NHS (N-Hydroxysuccinimid) nach Herstellerangaben aktiviert. In einem zweiten Schritt wurden die GST-Fusionsproteine auf der Oberfläche immobilisiert. Dafür wurden 30  $\mu$ g/mL GST-Proteine in einem 10 mM Natriumacetatpuffer mit einer Flussrate von 10  $\mu$ L/min über die aktivierte Oberfläche des Chips geleitet. Als Immobilisierungsziel wurden 10000 RU (*response units*) gewählt. Eine RU entspricht 1 pg Protein/mm<sup>2</sup> auf der Oberfläche des CM5 Chips. Bei 10000 RU entspricht dies also 10000 pg Protein bzw. 210 pmol GST-LMP1 wt. Ein CM5 Chip hat 4 Kanäle zur Immobilisierung von Proteinen. Der erste Kanal wurde als Referenz für die unspezifische Resonanzänderung der Chipoberfläche während der Experimente verwendet. Dieser Kanal (1) wurde äquivalent zu den anderen Kanälen aktiviert, es wurde aber kein GST-Fusionsprotein immobilisiert. Auf der Oberfläche des Kanals 2 wurde GST-LMP1 wt und auf der Oberfläche des Kanals 3 GST-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) immobilisiert.

Für die Bindestudien zwischen den immobilisierten GST-LMP1-Proteinen und His-TRAF2<sub>311-501</sub> wurde zunächst His-TRAF2<sub>311-501</sub> in einer Konzentration von 5 µM bei einer Durchflussrate von 30 µL/min in den Kanälen 1, 2 und 3 untersucht. Die Regeneration der Oberfläche nach der Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> wurde durch 20 µL Glyzerin pH 2,5 gefolgt von 10 µL 4 M MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Um die Kinetik der Komplexbildung zwischen dem His-TRAF2<sub>311-501</sub> Protein und dem immobilisierten GST-LMP1 wt zu untersuchen, wurden Konzentrationsreihen von His-TRAF2<sub>311-501</sub> mit den Kanälen 1 und 2 inkubiert. Für die Auswertung der Signale wurde die unspezifische Resonanzänderung von Kanal 1 von den Resonanzänderungen in den Kanälen 2 und 3 abgezogen. Die Änderung der Resonanz jeder His-TRAF2<sub>311-501</sub> Konzentration wurde mit dem Biacore Evaluationsprogramm nach Herstellerangaben ausgewertet. Die erhaltenen Kurven wurden mit dem Langmuir 1:1 Bindemodell gefittet und die Bindungsratenkonstanten der Assoziation ( $K_a$ ) sowie der Dissoziation ( $K_d$ ) abgelesen. Die Gleichgewichtskonstante ( $K_D$ ) der Komplexbildung zwischen His-TRAF2<sub>311-501</sub> und GST-LMP1 wt wurde in dem Biacore Evaluationsprogramm aus dem Verhältnis von  $K_d/K_a$  berechnet:



Biacore Bindepuffer            0,5% (v/v) Triton-X-100 in TBS

### 3.3.10 Peptid-Protein-Interaktionsstudien mittels Peptidblot-Analysen

Die Membranen für die Peptidblot-Experimente mit immobilisierten LMP1-, CD40- und TRADD-Peptiden wurden von Stephan Feller (Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford) bereitgestellt und nach ihrer Anlieferung bei -20 °C gelagert. Die Peptidsequenzen sind in Abschnitt 4.5.2 beschrieben.

Für die Peptidblot-Experimente wurden die Membranen initial mit 10 mL 100% EtOH für 10 sec gewaschen. Im Anschluss wurden die Membranen dreimal mit jeweils 40 mL PBST unter Schütteln bei 50 rpm für 10 min gewaschen. Um die unspezifische Interaktion von His-TRAF6<sub>310-522</sub> mit der Membran zu blockieren, wurden die Membranen für 2 h mit 40 mL Milch-TBST bei Raumtemperatur behandelt. Um unspezifische Signale der Antikörper zu analysieren, wurden die Membranen als nächstes mit dem Primärantikörper α-TRAF6 C-20 inkubiert. Der Antikörper wurde dafür 1:1000 in Milch-TBST verdünnt und über Nacht bei 4 °C mit den Membranen unter Schütteln bei 50 rpm inkubiert. Ungebundene Antikörpermoleküle wurden durch dreimaliges Waschen mit jeweils 40 mL PBST entfernt. Um eventuell unspezifisch gebundene Primär-Antikörpermoleküle zu detektieren, wurden die Membranen im Anschluss mit einem HRP-konjugierten α-Ziege IgG Sekundärantikörper für 1 h bei 50 rpm bei Raumtemperatur in einer Verdünnung von 1:1000 in Milch-TBST inkubiert.

Vor der Visualisierung der Signale wurden die Membranen dreimal mit jeweils 40 mL TBST gewaschen, um ungebundene Antikörpermoleküle zu entfernen. Im Anschluss wurden die Membranen für 1 min bei Raumtemperatur mit ECL-Lösung inkubiert und das chemilumineszente Reaktionsprodukt der Reaktion der ECL-Lösung mit der HRP wurde auf Röntgenfilmen detektiert. Alle Röntgenfilme wurden in einem CP100 Agfa Film Prozessor entwickelt. Nach der Signaldetektion der Signale wurden die Membranen erneut gewaschen und unspezifische Bindestellen durch die Inkubation mit 40 mL Milch-TBST für 2 h bei Raumtemperatur gesättigt. Für die Bindung von His-TRAF6<sub>310-522</sub> an die Peptide auf den Membranen wurden die Membranen für 4 h bei Raumtemperatur bei 50 rpm mit 10 µg/mL His-TRAF6<sub>310-522</sub> in Milch-TBST inkubiert. Ungebundenes His-TRAF6<sub>310-522</sub> wurde durch dreimaliges Waschen mit jeweils 40 mL TBST entfernt. Für die Detektion von spezifisch gebundenem His-TRAF6<sub>310-522</sub> wurden die Membranen zunächst wieder mit dem Primärantikörper, gefolgt von dem Sekundärantikörper, inkubiert und die Signale aus der Reaktion der ECL-Lösung mit der HRP des Sekundärantikörpers auf Röntgenfilmen detektiert.

### 3.3.11 Protein-Protein-Interaktionsstudien mittels ELISA-basierter Experimente

Für die ELISA-basierten Interaktionsstudien zwischen His-TRAF2<sub>311-501</sub> und GST-LMP1-Proteinen wurden unbeschichtete ELISA-Platten mit 100 µL einer 200 nM Lösung von GST-LMP1 wt oder GST-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) in PBS bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Die Bindekapazität der Platten ist laut Hersteller mit 500 ng Protein (Maus IgG) pro cm<sup>2</sup> angegeben. Dies entspricht ca. 200 ng Protein pro Platte. 100 µL einer 200 nM GST-LMP1 Lösung enthalten 1 µg Protein, also einen 5-fachen Massenüberschuss. Ungebundene GST-LMP1-Proteine wurden durch Waschen entfernt. Zum Waschen wurden die ELISA-Platten jeweils pro Waschschrift über einem Waschbecken invertiert, mit 200 µL PBST pro Ansatz gefüllt und wieder über dem Waschbecken invertiert. Dann wurden die Platten mit 200 µL PBSB für 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. Um ungebundenes BSA zu entfernen, wurden die Platten im Anschluss einmal mit 200 µL PBST gewaschen. Die Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> wurde in PBST, supplementiert mit 0,1 % (w/v) BSA, in einem Volumen von 100 µL bei Raumtemperatur für 1 h durchgeführt. Ungebundene Proteine wurden durch viermaliges Waschen mit jeweils 200 µL PBST entfernt. Die gebundenen His-TRAF-Proteine wurden mit dem α-N-6xHis-Antikörper 4A4 detektiert. Hierfür wurden die Platten 1 h bei Raumtemperatur mit einer 1:10 Verdünnung des Antikörpers in PBSB inkubiert. Ungebundene Antikörpermoleküle wurden durch dreimaliges Waschen mit jeweils 200 µL PBST entfernt. Im Anschluss wurden die Platten mit einem α-Maus IgG-Sekundärantikörper (HRP-konjugiert) behandelt. Der Sekundärantikörper wurde hierfür in einer Verdünnung von 1:5000 in PBSB für 1 h bei Raumtemperatur mit den



Platten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 200  $\mu$ L PBST wurde die Menge an gebundenem Antikörper durch Zugabe von 50  $\mu$ L TMB (3,3',5,5'Tetramethylbenzidin)-Substrat (BD OptEIA, BD-Biosciences) quantifiziert. Die Reaktion zwischen der HRP des Sekundärantikörpers und dem TMB wurde nach 10 min mit einem äquivalenten Volumen einer 1 N Schwefelsäurelösung gestoppt und das Reaktionsprodukt bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem Photometer quantifiziert.

PBSB            10 mg/mL BSA in PBS

In den ELISA-basierten Protein-Protein-Interaktionsstudien, in denen die Bindung zwischen His-TRAF2<sub>311-501</sub> und GST-LMP1-Proteinen bei 4 °C untersucht wurde, wurden unbeschichtete ELISA-Platten mit 100  $\mu$ L einer 200 nM Lösung von GST-LMP1 wt oder GST-LMP1(A<sub>204</sub>xAxA) in TBS über Nacht bei 4 °C inkubiert. Ungebundene GST-Fusionsproteine wurden durch Waschen mit 200  $\mu$ L TBST entfernt. Dann wurden die Platten mit 200  $\mu$ L TBSB für 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. Um ungebundenes BSA zu entfernen, wurden die Platten im Anschluss einmal mit 200  $\mu$ L TBST gewaschen. Die Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> wurden in TBST, supplementiert mit 0,1 % (w/v) BSA, in einem Volumen von 100  $\mu$ L bei 4 °C für 30 min bei 350 rpm auf einem Thermomixer durchgeführt. Ungebundene Proteine wurden durch viermaliges Waschen mit jeweils 200  $\mu$ L TBST entfernt. Die gebundenen His-TRAF-Proteine wurden mit dem  $\alpha$ -N-6xHis-Antikörper 4A4 detektiert. Hierfür wurden die Platten 1 h bei Raumtemperatur mit einer 1:10 Verdünnung des Antikörpers in TBSB inkubiert. Ungebundene Antikörpermoleküle wurden durch dreimaliges Waschen mit jeweils 200  $\mu$ L TBST entfernt. Im Anschluss wurden die Platten mit einem  $\alpha$ -Maus IgG-Sekundärantikörper (HRP-konjugiert) behandelt. Der Sekundärantikörper wurde hierfür in einer Verdünnung von 1:5000 in TBSB für 1 h bei Raumtemperatur mit den Platten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 200  $\mu$ L TBST wurde die Menge an gebundenem Antikörper durch Zugabe von 50  $\mu$ L TMB-Substrat quantifiziert. Die Reaktion zwischen der HRP des Sekundärantikörpers und dem TMB wurde nach 10 min mit einem äquivalenten Volumen einer 1 N Schwefelsäurelösung gestoppt und das Reaktionsprodukt bei der Wellenlänge 450 nm in einem Photometer quantifiziert.

TBST                    0,5 % (v/v) Tween-20 in TBS

TBSB                    10 mg/mL BSA in TBS

Für die Berechnung der Halbmaximalen Sättigung ( $S_{50}$ ) des Komplexes aus His-TRAF2<sub>311-501</sub> und GST-LMP1 wt wurde die Signalstärke der Bindung über der Konzentration von His-TRAF2<sub>311-501</sub> aufgetragen. Die  $S_{50}$  wurde aus diesen Bindekurven unter Verwendung des Modells „one site specific binding with Hill slope“ des Programms Prism5 berechnet:

$$y = \frac{B_{\max} \cdot x^h}{S_{50}^h + x^h}$$

$B_{\max}$	maximale Signalstärke (Sättigung der Bindung)
$S_{50}$	halbmaximale Signalstärke (halbmaximale Sättigung der Bindung)
$h$	Hill Slope
$y$	y-Achse (Signalstärke)
$x$	x-Achse (Konzentration Ligand)

### 3.3.12 Screening der AnalytiCon Discovery (AD)-Bibliothek

Für das Screening der AD-Bibliothek nach Inhibitoren, die gegen den Signalkomplex aus TRAF2 und LMP1 gerichtet sind, wurden unbeschichtete ELISA-Platten mit 100 µL einer 200 nM Lösung von GST-LMP1 wt oder GST-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) in TBS über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die genaue Anordnung der immobilisierten Proteine auf den ELISA-Platten ist in Abb. 4.8 dargestellt. Alle Arbeitsschritte wurden per Hand mit einer Mehrkanalpipette durchgeführt. Mit der Mehrkanalpipette wurden jeweils 6 Ansätze gleichzeitig pipettiert und zwar in vertikalen Reihen (H 1-6, G 1-6..., H 7-12, G 7-12,...). Ungebundene GST-Fusionsproteine wurden durch Waschen mit 200 µL TBST entfernt (siehe 3.3.11). Dann wurden die Platten mit 200 µL TBSB für 4 h bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. Um ungebundenes BSA zu entfernen, wurden die Platten im Anschluss einmal mit 200 µL TBS gewaschen. Die Ursprungskonzentration der Substanzen der AD Bibliothek beträgt 5 mg/mL in DMSO. Am Vortag zu dem ELISA Screen wurden die Substanzen in 96-Loch Platten 1:50 in TBS verdünnt. Für die Inkubation der Substanzen mit den His-TRAF2<sub>311-501</sub> und den GST-LMP1-Proteinen wurde eine 158 nM His-TRAF2<sub>311-501</sub> Lösung in TBST, supplementiert mit 0,1 % (w/v) BSA, hergestellt. Von dieser His-TRAF2<sub>311-501</sub> Lösung wurden pro Testansatz 114 µL mit 6 µL der verdünnten Substanzen in einer 96-Loch Platte vermischt und 100 µL des fertigen Mixes wurden in die mit GST-LMP1 beschichtete 96-Loch ELISA-Platte überführt. Die Endkonzentration von His-TRAF2<sub>311-501</sub> betrug somit 150 nM, die (Massen)-Konzentration der Substanzen aus der AD-Bibliothek 5 µg/mL pro Ansatz. Da die Substanzen unterschiedlich aufgebaut sind, beträgt die molare Konzentration der Substanzen in den einzelnen Ansätzen je nach MW der Substanz zwischen 18 µM und 39,6 µM (siehe 4.4.2). Die Substanzen wurden zusammen mit His-TRAF2<sub>311-501</sub> und GST-LMP1 bei 4 °C für 30 min bei 350 rpm auf einem Thermomixer inkubiert. Im Anschluss wurde die Menge an gebundenem His-TRAF2<sub>311-501</sub> quantifiziert. Ungebundene Proteine wurden durch viermaliges Waschen mit jeweils 200 µL TBST entfernt. Die gebundenen His-TRAF-Proteine wurden mit dem α-N-6xHis-Antikörper 4A4 detektiert. Hierfür wurden die Platten 1 h bei Raumtemperatur mit einer 1:10 Verdünnung des Antikörpers in TBSB inkubiert. Ungebundene Antikörpermoleküle wurden durch dreimaliges Waschen mit jeweils 200 µL

TBST entfernt. Im Anschluss wurden die Platten mit einem  $\alpha$ -Maus IgG-Sekundärantikörper (HRP-konjugiert) behandelt. Der Sekundärantikörper wurde hierfür in einer Verdünnung von 1:5000 in TBSB für 1 h bei Raumtemperatur mit den Platten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 200  $\mu$ L TBST wurde die Menge an gebundenem Antikörper durch Zugabe von 50  $\mu$ L TMB-Substrat quantifiziert. Nach 10 min wurde der Umsatz von TMB durch die HRP des Sekundärantikörpers mit einem äquivalenten Volumen einer 1 N Schwefelsäurelösung gestoppt und bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem Photometer quantifiziert. Alle Arbeitsschritte wurden per Hand mit einer 8-Kanal-Multipette durchgeführt. Die gemessenen Werte wurden im Programm Excel (Microsoft Office) ausgewertet. Für die Berechnung des CV, des S/Bs, des Z-Faktors, des Z'-Faktors, des SW und die AVR (s.u.) wurden zuerst die Mittelwerte der Positivkontrolle ( $\mu_+$ ), der Negativkontrolle ( $\mu_-$ ) und der Daten des Screens einer Platte ( $\mu_s$ ) berechnet. Dann wurde für jeden Mittelwert die Standardabweichung ( $\sigma_+$ ,  $\sigma_-$ ,  $\sigma_s$ ) berechnet.

$$\text{CV (in \%)} = 100 \cdot (\sigma / \mu)$$

$$\text{S/B} = \mu_+ / \mu_-$$

$$\text{Z'-Faktor} = 1 - ((3\sigma_+ + 3\sigma_-) / (\mu_+ - \mu_-)) \quad \text{nach: (Zhang et al., 1999)}$$

$$\text{Z-Faktor} = 1 - ((3\sigma_s + 3\sigma_-) / (\mu_s - \mu_-)) \quad \text{nach: (Zhang et al., 1999)}$$

$$\text{SW} = (\mu_+ - \mu_- - 3(\sigma_+ + \sigma_-)) / \sigma_+ \quad \text{nach: (Iversen et al., 2006)}$$

$$\text{AVR} = (3(\sigma_+ + \sigma_-)) / (\mu_+ - \mu_-) \quad \text{nach: (Taylor et al., 2000)}$$

### 3.3.13 Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) der Substanzen

Für die Bestimmung der  $\text{IC}_{50}$  der LMP1-TRAF2-Inhibitoren wurden, wie in 3.3.12 beschrieben, ELISA-Platten mit GST-LMP1-Proteinen beschichtet. Die Substanzen (Lagerkonzentration 100 mM in DMSO) wurden in 50  $\mu$ L PBST-Bindpuffer so verdünnt, dass sich Endkonzentrationen zwischen 0,01  $\mu$ M und 300  $\mu$ M in 100  $\mu$ L Ansätzen ergaben. Die 50  $\mu$ L Substanzverdünnungen wurden in die ELISA-Platten überführt und mit jeweils 50  $\mu$ L einer His-TRAF2<sub>311-501</sub> Lösung gemischt. Die Endkonzentration von His-TRAF2<sub>311-501</sub> in den einzelnen Ansätzen wurde auf 0,1  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M oder 1  $\mu$ M eingestellt (siehe Abschnitt 4.4.2). Die Substanzen wurden zusammen mit His-TRAF2<sub>311-501</sub> und GST-LMP1 wt für 1 h bei 4 °C bzw. Raumtemperatur, wie angegeben (siehe 4.4.2), inkubiert. Die Detektion von His-TRAF2<sub>311-501</sub> wurde wie in Abschnitt 3.3.12 beschrieben durchgeführt. Für die Bestimmung der  $\text{IC}_{50}$  der LMP1-TRAF2 Inhibitoren wurden als Referenz von jeder His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentration Ansätze ohne Inhibitor angefertigt. Nach der Quantifizierung der Signale im Photometer wurde der prozentuale Anteil an gebundenem His-TRAF2<sub>311-501</sub> in jedem Ansatz berechnet. Für die Berechnung der  $\text{IC}_{50}$  wurden die prozentualen Anteile an gebundenem His-TRAF2<sub>311-501</sub> aus den verschiedenen His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentrationen über dem Logarithmus der Inhibitor-Konzentration aufgetragen. Die  $\text{IC}_{50}$  wurden aus diesen

Kurven unter Verwendung des Modells „*log(Inhibitor) vs. response – Variable slope (four parameters)*“ des Programms Prism5 berechnet:

$$y = \frac{\text{Min} + (\text{Max} - \text{Min})}{1 + 10^{((\text{Log}|\text{C}_{50}-x) \cdot h)}}$$

Min	Minimales Signal
Max	Maximales Signal
h	Hill Slope
IC <sub>50</sub>	halbmaximale Konzentration zwischen Max und Min
x	log C (M) Inhibitor

### 3.3.14 Ko-Immünpräzipitationen

Für die Ko-Immünpräzipitation von LMP1 mit TRAF6 wurden die beiden Proteine in HEK293-D-Zellen exprimiert (siehe 3.4.5). Vor der Lyse wurden die Zellen mit 10 mL PBS pro Ansatz gewaschen und die Zellen auf Eis transferiert. Durch Zugabe von 1 mL NP-40-Lysepuffer wurden die Zellen lysiert. Nach 1 min Inkubation wurde das Lysat mit einem Zellkultur-Schaber gesammelt und in jeweils ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Um unlösliche Zellfragmente von den gelösten Proteinen zu trennen, wurden die Ansätze für 10 min bei 15000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden jeweils in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Pellets verworfen. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration aller Lysate bestimmt (siehe 3.3.5). Als Expressionskontrolle wurden von jedem Lysat 200 ng Protein mit Proteinauftragspuffer versetzt, bei 95 °C für 5 min erhitzt und bis zur Immunblot-Analyse (siehe 3.3.3) bei -20 °C gelagert. Für die Immünpräzipitation wurden 3-4 mg Gesamtprotein aus den Lysaten mit 35 µL einer 50%-igen Suspension von Protein G Sepharose-Kügelchen mit kovalent gekoppelten α-Flag-Antikörper 6F7 (siehe 3.3.15) in 4 mL NP40-Lysepuffer für 1 h bei 4 °C auf einem Rollenmischer inkubiert. Die Protein G Sepharose-Kügelchen mit den gebundenen Proteinen wurden dreimal mit jeweils 1,5 mL NP40-Lysepuffer gewaschen. Dafür wurden die Protein G Sepharose-Kügelchen mittels Zentrifugation bei 15000 x g für 30 sec bei 4 °C sedimentiert, der Überstand abgenommen und die Protein G Sepharose-Kügelchen in 1,5 mL NP40-Lysepuffer gelöst. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Protein G Sepharose-Kügelchen in 45 µL Proteinauftragspuffer aufgenommen, für 5 min bei 95 °C erhitzt und bis zur Immunblot-Analyse (siehe 3.3.5) bei -20 °C gelagert.

NP40-Lysepuffer	150 mM Natriumchlorid, 5 mM EDTA, 0,1% (v/v) NP-40, 50 mM HEPES supplementiert mit 0,02% (v/v) Phosphatase Inhibitor Mix, 0,5 mM Natrium-Orthovanadat und 40 µL (pro 20 mL NP40-Puffer) einer gesättigten PMSF Lösung
-----------------	---

### 3.3.15 Kovalente Immobilisierung von Antikörpern an Protein G Sepharose-Kügelchen

Für die kovalente Bindung von Antikörpern an Protein G Sepharose-Kügelchen wurden 0,1 mg des  $\alpha$ -Flag Antikörper 6F7 mit 1 mL einer 50 %igen Suspension von Protein G Sepharose-Kügelchen in 10 mL PBS bei 4 °C über Nacht auf einem Rollenmischer inkubiert. Im Anschluss wurden die Protein G Sepharose-Kügelchen bei 1000 x g für 1 min bei Raumtemperatur sedimentiert und zweimal mit 10 mL 0,2 M Natriumboratpuffer (pH 9) gewaschen. Nach den Waschschritten wurden die sedimentierten Protein G Sepharose-Kügelchen in 10 mL 0,2 M Natriumboratpuffer (pH 9), supplementiert mit 20 mM Dimethylpimelimidatedihydrochlorid, aufgenommen und für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Protein G Sepharose-Kügelchen bei 1000 x g für 1 min bei Raumtemperatur sedimentiert, mit 10 mL 0,2 M Ethanolamin pH 8 gewaschen, gefolgt von 2 h Inkubation in 10 mL 0,2 M Ethanolamin bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer. Zum Abschluss wurden die Protein G-Sepharose-Kügelchen bei 1000 x g für 1 min bei Raumtemperatur sedimentiert und dreimal mit 10 mL PBS gewaschen. Nach diesem Waschschriff wurden die Protein G Sepharose-Kügelchen mit den immobilisierten Antikörpern als 50 %ige Suspension in PBS, supplementiert mit 0,1% (v/v) Natriumazid, bei 4 °C gelagert.

## 3.4 Zellkultur

### 3.4.1 Zellkulturbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen B-Zelllinien BL41, Bjab, LCL721, HA-LCL 3, EREB 2-5 und P493-6 (siehe 2.2) wurden als Suspensionskulturen in einem Brutschrank mit einer 5 %igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37 °C gehalten. Für die Zellpassage wurden die Zellen mit Verdünnungsfaktoren zwischen 1:1 und 1:5 in neue Zellkulturflaschen überführt.

Die Zelllinien BL41, Bjab, HA-LCL 3 und LCL 721 wurden in RPMI-Vollmedium kultiviert. Die Zelllinie EREB 2-5 wurde in DMEM-Vollmedium kultiviert. Je nach Proliferationsprogramm wurde die P493-6 Zelllinie unter zwei verschiedenen Bedingungen gehalten. Für c-myc induzierte Zellproliferation wurden die Zellen in RPMI-Vollmedium gehalten. Für Östrogen-Rezeptor-EBNA2 induzierte Zellproliferation wurden die Zellen in RPMI-Vollmedium supplementiert mit 1  $\mu$ M Östrogen und 0,1  $\mu$ g/mL Doxycyclin kultiviert (Pajic *et al.*, 2000).

Die adhärente humane Zelllinie HEK293-D (siehe 2.2) wurde in 10 cm Zellkulturschalen in einem Brutschrank mit einer 5 %igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37 °C in 10 mL RPMI-Vollmedium gehalten. Für die Zellpassage wurden die Zellen mit 10 mL PBS gewaschen und im Anschluss mit 2 mL 0,05 % Trypsin-EDTA behandelt. Nach 2 min Inkubationszeit wurden die Zellen mit 8 mL RPMI-Vollmedium von der Platte gespült und auf neue Zellkulturschalen überführt.

Embryonale TRAF6<sup>-/-</sup> Mausfibroblasten (siehe 2.3) wurden in Zellkulturschalen in einem Brutschrank mit einer 5 %igen CO<sub>2</sub> Atmosphäre bei 37 °C in DMEM-Vollmedium gehalten. Für die Zellpassage wurden die Zellen mit 10 mL PBS gewaschen und im Anschluss mit 2 mL 0,05 % Trypsin-EDTA behandelt. Nach 2 min Inkubationszeit wurden die Zellen mit 8 mL DMEM-Vollmedium von der Platte gespült und auf neue Zellkulturschalen verteilt.

RPMI-Vollmedium	RPMI supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum (FCS - <i>fötal calw serum</i> ), 1 mM L-Glutamin, 50 U/mL Penicillin, 50 µg/mL Streptomycin
DMEM-Vollmedium	DMEM supplementiert mit 10% FCS, 1 mM L-Glutamin, 50 U/mL Penicillin, 50 µg/mL Streptomycin

### 3.4.2 Langzeitlagerung von Zellkulturen

Für die Langzeitlagerung von Suspensionszellen wurden 1-2 x10<sup>7</sup> Zellen in einer Heraeus Multifuge bei 800 rpm für 4 min bei 25 °C sedimentiert und das Zellpellet in 1 mL Einfriermedium aufgenommen. Zum Einfrieren wurden die Zellen in einem Einfriercontainer in einem -80 °C Gefrierschrank überführt. Anschließend wurden die Zellen in einen Container mit flüssigen Stickstoff überführt.

Einfriermedium	10% (v/v) DMSO in 45% FCS und 45% Vollmedium
----------------	--

Adhärente Zellen wurden ähnlich den Suspensionszellen für die Langzeitlagerung verarbeitet. Die Zellen wurden erst mit 10 mL PBS gewaschen und im Anschluss mit 2 mL 0,05 % Trypsin-EDTA behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 2 min wurden die Zellen mit 8 mL RPMI-Vollmedium von der Platte gespült und in Falcon-Reaktionsgefäße überführt und bei 800 rpm für 4 min bei 25 °C pelletiert. Die Weiterverarbeitung und Lagerung erfolgte äquivalent zu Suspensionszellen.

### 3.4.3 Zellzahlmessungen mittels Coulter Counter Z1

Die Zellzahlen von Suspensionszellen und adhärenen Zelllinien wurden in einem Coulter Counter Z1 gezählt. Die Zellkulturen wurden 1:100 in einem Isotonpuffer verdünnt (Messvolumen: 10 mL) und im Coulter Counter vermessen. Suspensionszellen wurden mit einem Ausschlussdurchmesser von 5 nm und adhärenente Zellen mit einem Ausschlussdurchmesser von 8 nm vermessen.

### 3.4.4 Bestimmung von Zellzahlen mit der Zählkammer

Zur Bestimmung von Zellzahlen mittels Zählkammer wurden Zellsuspensionen auf die Neugebauer-Zählkammer aufgebracht und unter dem Mikroskop gezählt. Die verwendete Neugebauer-Zählkammer hat eine Volumengröße von 0,1 µL pro Zählfeld, der Umrechnungsfaktor ist also 1:10000 für die Zellzahl pro Milliliter.



Pro Ansatz wurden 2 µg der pCMV-HA-LMP1-Plasmide mit 0,5 µg der pRK5-Flag-TRAF6 Plasmide zusammen mit 0,2 µg des Renilla-Luciferase-Reporterplasmids pPGK-Renilla und 0,05 µg des NFκB-Luciferase-Reporterplasmids 3 x κB-Luc gemischt. Alle Ansätze wurden mit pRK5-Leervektor auf 3 µg Gesamt-DNA-Menge aufgefüllt und zusammen mit 6 µL PolyFect in 200 µL DMEM für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der fertige Transfektionsmix wurde mit 800 µL DMEM versetzt und auf die Zellen aufgebracht. Die Zellen wurden für 4 h mit den Transfektionsreagenzien im Brutschrank bei 37 °C in einer 5 %igen CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Im Anschluss wurde der Transfektionsmix abgenommen und die Zellen in DMEM-Vollmedium über Nacht im Brutschrank bei 37 °C in einer 5 %igen CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen einmal mit jeweils 2 mL PBS gewaschen und die 6-Loch-Zellkulturschalen auf Eis transferiert. Für die Bestimmung der Reporterengenaktivität wurde das Dual-Luciferase Reporter Assay System Kit von Promega verwendet. Für die Lyse der Zellen wurden alle Ansätze mit 150 µL Luc-Lysepuffer (Promega) behandelt. Nach 1 min Inkubation der Zellen mit dem Luc-Lysepuffer wurde das Lysat mit einem Zellkulturschaber gesammelt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die vollständige Lyse der Zellen erfolgte durch die anschließende Inkubation der Lysate bei -80 °C über Nacht. Zum Vermessen der Reporterengenaktivität wurden die Lysate auf Eis aufgetaut und Zellkompartimente vom Lysat durch Zentrifugation bei 15000 x g für 10 min bei 4 °C getrennt. Die Firefly- und Renilla-Luciferase Reporterengenaktivität wurde in einem Luminometer ausgelesen. Als Substrate für die Reaktionen wurden der Luciferase Puffer (50 µL) und die *Stop & Glow*-Lösung (50 µL) des Dual Luciferase Reporter Assays System Kits nach Herstellerangaben verwendet. Von jedem Lysat wurden je 2 mal 10 µL vermessen. Zur Quantifizierung der primären Daten wurden die gemessenen Firefly-Luciferase Werte der NF-κB-Reporteraktivität in einem ersten Schritt auf die Aktivität des Renilla-Reportergens normalisiert. Im zweiten Schritt der Quantifizierung wurden die Luciferase-Werte an das Expressionsniveau der LMP1 sowie TRAF6 Mutanten in den Ansätzen angeglichen. Die Expression der Proteine wurde mittels Western Blot (siehe 3.3.3) analysiert und quantifiziert (siehe 3.3.4).

### 3.5 Mikrobielle Arbeitsmethoden

#### 3.5.1 Suspensionskulturen

Für die Anzucht von Bakterien in Suspensionskulturen wurde LB-Medium mit den entsprechenden Selektionsmarkern mit Bakterien aus Dauerkulturen (siehe 3.5.3) oder einer Einzelkolonie aus einem Bakterienausstrich (siehe 3.5.2) inokuliert und bei 37 °C in Schüttel-Inkubatoren bei 200 rpm kultiviert. Als Selektionsreagenzien wurden Ampicillin (100 ng/µL) und Chloramphenicol (34 ng/µL) verwendet (siehe Kapitel 2.4 und 3.2).



### 3.5.2 Bakterienausstriche

Für die Kultur von Bakterien auf LB-Agaroseplatten wurden bakterielle Suspensionskulturen (siehe 3.5.1) auf LB-Platten mit den entsprechenden Selektionsreagenzien (siehe Kapitel 2.4 und 3.2) ausgestrichen. Nach dem Aufbringen der *E. coli*-Kulturen auf die Platten wurden die Platten in Brutschränken bei 37 °C bis zur gewünschten Wachstumsdichte inkubiert.

Für die Herstellung von LB-Agaroseplatten wurde 1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium gekocht. Die Lösung wurde auf 60 °C abgekühlt, bevor die benötigten Antibiotika Ampicillin (100 ng/μL) und Chloramphenicol (34 ng/μL) hinzugefügt wurden. Die fertige Lösung wurde in Zellkulturplatten (10 cm ø) gegossen und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

### 3.5.3 Dauerkulturen von Bakterien

Für die Herstellung bakterieller Dauerkulturen wurden Suspensionskulturen (siehe 3.5.1) in der spät-logarithmischen Wachstumsphase mit 30 % (v/v) Glycerin versetzt und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Dauerkulturen wurden bei -80 °C gelagert.

### 3.5.4 Hitzeschock-Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Für die Transformation wurden 200 μL chemisch-kompetente *E. coli* (3.5.5) mit 50-100 ng DNA und 3,5 % (v/v) DMSO in einem Eppendorf Reaktionsgefäß für 15 min auf Eis inkubiert. Für den Hitze-Schock wurden die Zellen auf 42 °C für 2 min überführt und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt. Zu dem Transformationsansatz wurden 800 μL auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium zugefügt und die Ansätze bei 37 °C für 1 h in einem Inkubator inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen bei 800 x g für 3 min bei 25 °C pelletiert, in 100 μL LB-Medium aufgenommen und auf LB-Agaroseplatten ausgestrichen (siehe 3.5.2). Die Platten wurden im Anschluss in einem Inkubator bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### 3.5.5 Herstellung von chemisch-kompetenten *E. coli*-Bakterien

Für die Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Bakterien (nach: Hanahan, 1983) wurden 50 mL LB-Medium mit 1 mL einer *E. coli*-über Nacht Kultur inokuliert. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3-0,55 bei 37 °C in einem Schüttel-Inkubator bei 200 rpm inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in jeweils 25 mL aufgeteilt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden bei 800 x g für 5 min bei 4 °C pelletiert, in 8,3 mL auf 4 °C vorgekühltem TFB-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut bei 800 x g für 5 min bei 4 °C pelletiert und in 2 mL TFB-Puffer pro 25 mL Bakteriensuspension resuspendiert und in Hitzeschock-Transformations-Reaktionen (siehe 3.5.4) eingesetzt.

TFB Puffer	10 mM	K-MES	pH 6,3,	10 mM	Kalziumchlorid,	3 mM
		Hexammincobalt(III)chlorid,		100 mM	Kaliumchlorid,	45 mM
		Magan(II)chlorid				

### 3.5.6 Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*-Bakterien

Für die Expression der rekombinanten His-TRAF- sowie der GST-CD40- und GST-Tio-Proteine wurde der *E. coli*-Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL verwendet. Für die Proteinexpression der GST-LMP1-Proteine wurde der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  verwendet.

Die Bakterienkulturen wurden in LB-Medium zusammen mit den zugehörigen Antibiotika (siehe 2.4, und 3.2) bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm bis zu einer Zelldichte von OD<sub>600</sub> von 0,8-1 inkubiert. Die Proteinexpression durch die Zugabe von 0,05 mM IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) induziert und die Bakterien wurden in einen Schüttelinkubator bei 200 rpm mit einer Temperatur von 20 °C transferiert. Nach 16 h Inkubationszeit wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 4000 x g für 15 min bei 4 °C sedimentiert und die Bakterienpellets bei -20 °C bis zur Reinigung der Proteine (3.3.6 und 3.3.7) gelagert. Die maximale Lagerzeit betrug 2 Tage.

## 3.6 Computergestützte Analysen von Proteinen

### 3.6.1 Analysen und graphische Aufarbeitung von Protein-3D-Strukturen

Die Kristallstrukturen der Proteine TRAF2 (im Komplex mit einem LMP1-Peptid) und TRAF6 (in Komplex mit einem CD40-Peptid) wurden aus der NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) Datenbank in das Programm Cn3D 4.3 geladen. Das Cn3D 4.3 Programm wurde genutzt, um die spezifischen Interaktionsmotive der Proteine hervorzuheben und Oberflächen der Bindetaschen zu analysieren.

### 3.6.2 Berechnung des Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizienten nach Moriguchi

Der Moriguchi-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (mLog P) beschreibt den Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (log P) berechnet nach dem Modell von Moriguchi (Moriguchi *et al.*, 1994). Die Berechnung der mLog P-Werte wurde mit dem Programm ALOGPS 2.1 (Tetko, 2005; Tetko *et al.*, 2005) auf Basis der SMILES der beiden Substanzen durchgeführt (<http://www.vcclab.org>).

SMILES AD01 E11: Cc1c(C(O)=O)c(O)cc2C(=O)c3cccc(O)c3C(=O)c12

SMILES AD05 F07: COC(=O)c1c(C)c2C(=O)c3c(O)cccc3C(=O)c2cc1O

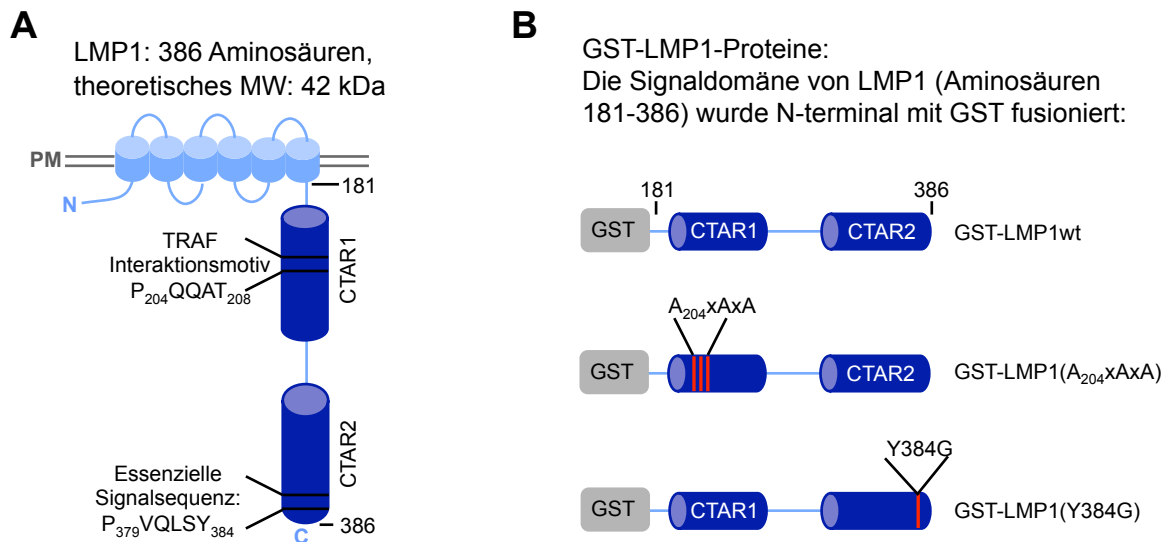
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Grundlegende *in vitro* Studien der Interaktion zwischen LMP1- und TRAF-Proteinen

Um einen Screen zu entwickeln, der die Inhibition der durch LMP1- und TRAF-Proteine gebildeten Signalkomplexe zum Ziel hat, musste zuerst eines der TRAF-Proteine ausgewählt werden, dessen Bindung an LMP1 durch einen Inhibitor unterbunden werden sollte. Daher wurde in dieser Arbeit zuerst die Interaktion der TRAF-Proteine 1-6 mit LMP1 in *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien untersucht. Wie in der Einleitung beschrieben, binden laut Literatur TRAF1, TRAF2 und TRAF3 direkt an LMP1 (siehe Kapitel 1.3 und 1.4). Auch wenn für TRAF5 die direkte Bindung an LMP1 noch nicht *in vitro* gezeigt wurde, besteht die Möglichkeit, dass TRAF5 ebenfalls direkt an das TRAF-Interaktionsmotiv P<sub>204</sub>XQxT in der CTAR1-Domäne bindet (siehe Abschnitt 1.3.3). Obwohl die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 bisher nur als indirekt beschrieben wird und keine Rolle für TRAF4 in der Aktivierung der Signalkaskaden durch LMP1 beschrieben ist, besitzen beide die charakteristischen TRAF-Domänen und wurden daher ebenfalls auf ihre Interaktion mit LMP1 getestet.

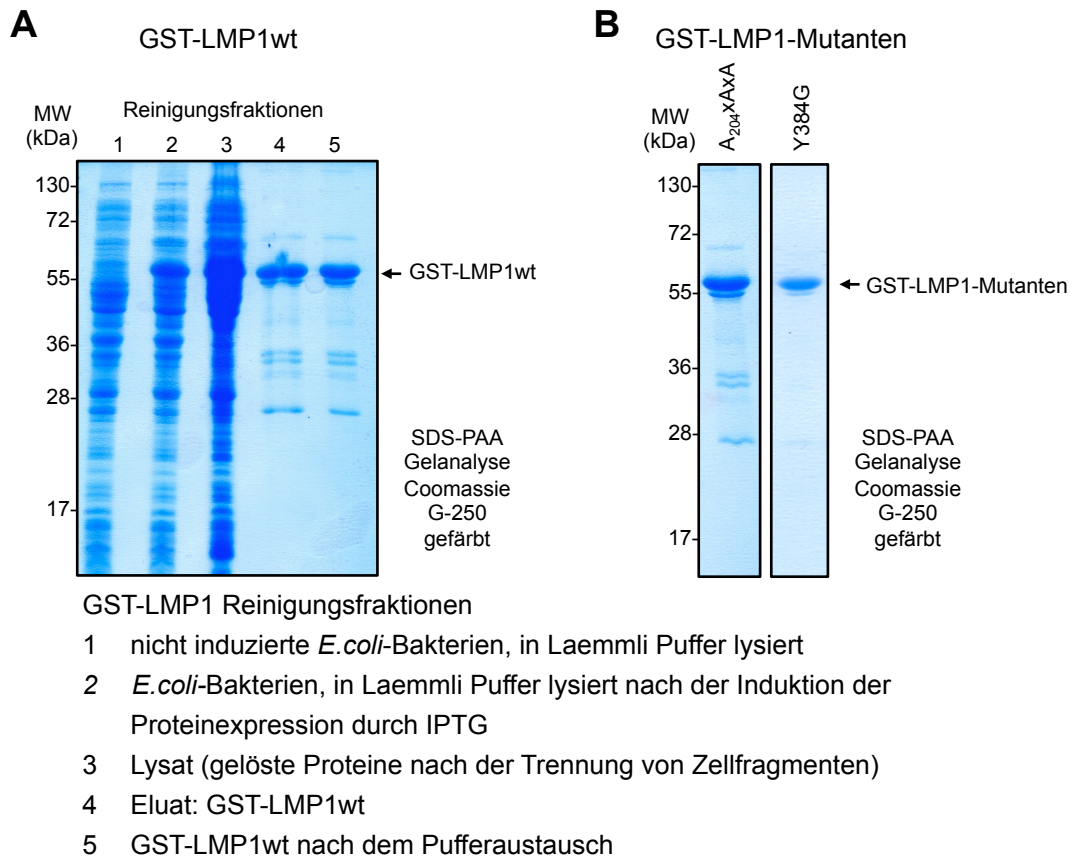
#### 4.1.1 Proteinexpression und Reinigung von LMP1-Fusionsproteinen

Um den hohen Durchsatz bei der Suche von Inhibitoren in großen Bibliotheken zu gewährleisten, müssen die verwendeten Komponenten in ausreichenden Mengen erhältlich sein. Also wurden vor der Etablierung eines Screeningsystems zuerst Reinigungssysteme etabliert, welche die Herstellung dieser Mengen, sowohl an LMP1- als auch den TRAF-Proteinen, gewährleisteten. Für die Expression rekombinanter LMP1-Proteine wurden bakterielle pGEX2T-LMP1 Expressionsvektoren verwendet, in denen die C-terminale, intrazelluläre Signaldomäne von LMP1 (AS 181-386) N-terminal mit einem GST (Glutathion-S-Transferase)-Protein fusioniert wurde (Sandberg *et al.*, 1997). Neben einem Wildtyp LMP1-Protein, GST-LMP1 wt, wurden für die Interaktionsstudien zwischen LMP1 und den TRAF-Proteinen zwei mutierte GST-LMP1-Proteine verwendet (Abb. 4.1). Diese beiden Proteine basieren auf dem GST-LMP1 wt, jedoch wurde in jeder Mutante jeweils eine der CTAR-Domänen mutiert. Die erste LMP1-Mutante, GST-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA), ist eine CTAR1-Mutante, in der die Aminosäuren Pro<sub>204</sub>, Gln<sub>206</sub> und Thr<sub>208</sub> des Motivs P<sub>204</sub>XQxT in jeweils ein Alanin mutiert wurden. TRAF-Proteine, die direkt an die CTAR1-Domäne rekrutiert werden, sollten daher nicht mehr in der Lage sein, mit dieser Mutante zu interagieren. Die zweite LMP1-Mutante, GST-LMP1(Y384G), trägt die Punktmutation Y384G, welche die Aktivierung der NF-κB- und JNK-Signalwege inhibiert (siehe Einleitung) (Floettmann *et al.*, 1997; Kieser *et al.*, 1999). Diese Mutation sollte daher die Interaktion von Proteinen inhibieren, die für diese Signalwege essenziell sind und direkt mit der CTAR2-Domäne interagieren.



**Abb. 4.1: Das Design der GST-LMP1-Proteine.** **A** Schematische Darstellung von LMP1. Innerhalb der intrazellulären C-terminalen Signaldomäne liegen die CTAR1- und CTAR2-Domänen, welche die Interaktionsmotive für die Rekrutierung von zellulären Adapterproteinen enthalten. **B** Design der GST-LMP1-Fusionsproteine GST-LMP1 wt, GST-LMP1(A<sub>204</sub>xAxA) und GST-LMP1(Y384G). Der C-terminale Teil von LMP1, also die Aminosäuren 181-386, wurde für die rekombinante Proteinexpression und Reinigung N-terminal mit dem GST-Protein fusioniert. Für die Interaktionsstudien zwischen den TRAF-Proteinen und LMP1 wurden zwei weitere LMP1-Mutanten verwendet, in denen jeweils eine der CTAR-Domänen mutiert wurde. [PM - Plasma Membran; CTAR - C-terminale Aktivierungsregion]

Die Expression der GST-LMP1-Fusionsproteine wurde in dem *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  durchgeführt (Sandberg *et al.*, 1997). Die Expressionsbedingungen und das Reinigungsprotokoll wurden jedoch modifiziert, um eine hohe Ausbeute an GST-LMP1-Proteinen zu erreichen (siehe Abschnitt 3.3.7 und 3.5.6). Die anschließende Reinigung der GST-LMP1-Proteine ist in Abbildung 4.2 A exemplarisch anhand von GST-LMP1 wt dargestellt. Die Expression der GST-Proteine wurde in den Bakterien durch die Zugabe von 0,05 mM IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) bei der OD<sub>600</sub> der Expressionskultur zwischen 0,8 und 1 induziert. Wie in Abbildung 4.2 A (Spur 2) gezeigt, wurden die GST-LMP1-Proteine nach der Induktion mit IPTG in den Bakterien exprimiert und waren nach der Lyse der Bakterien im Lysat gelöst (Abb. 4.2 A, Spur 3). Für die Reinigung wurden die GST-LMP1-Proteine über das GST-Protein an GSH (Glutathion-Sepharose)-Kügelchen gebunden, durch Waschen gereinigt und mit einem Glutathion-Elutionspuffer eluiert (Abb. 4.2 A, Spur 4). Da die Proteine anschließend in GST-Ko-Präzipitationsexperimenten verwendet werden sollten, wurden die Eluate auf eine Größenausschluss-Chromatographiesäule mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa geladen, um die GST-LMP1-Proteine von dem Glutathion des Elutionspuffers zu trennen. Von dieser Chromatographiesäule wurden die GST-LMP1-Proteine mit PBS eluiert (Abb. 4.2 A, Spur 5).



**Abb. 4.2: Reinigung der GST-LMP1-Proteine.** **A** Die einzelnen Schritte der Reinigung von GST-LMP1 wt wurden auf einem SDS-Polyacrylamid (PAA)-Gel analysiert: Die Proteinexpression von GST-LMP1 wt wurde durch Zugabe von IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) zu den Bakterienkulturen induziert (vgl. Spuren 1 und 2). Die im bakteriellen Lysat gelösten GST-LMP1-Proteine (Spur 3) wurden über eine GSH-Matrix gereinigt. Die eluierten GST-LMP1-Proteine (Spur 4) wurden im Anschluss an die Reinigung auf eine Größenausschluss-Chromatographiesäule geladen und in PBS eluiert, um die Proteine vom Glutathion des Elutionspuffers zu trennen (Spur 5). **B** Die gereinigten GST-Fusionsproteine GST-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) und GST-LMP1(Y384G). Die GST-LMP1-Mutanten wurden nach demselben Schema wie GST-LMP1 wt (**A**) gereinigt. [MW - Molekulargewicht]

GST-LMP1 wt hat ein theoretisches Molekulargewicht von 47,6 kDa. In SDS-PAA-Gelanalysen ist GST-LMP1 wt jedoch knapp über der 55 kDa Markerbande migriert. Die Ursache für dieses abweichende Laufverhalten ist unbekannt, wurde jedoch schon in der Vergangenheit beobachtet und beeinträchtigt nicht die Funktionalität der Proteine (Chi *et al.*, 2002). Die beiden GST-LMP1-Mutanten, GST-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) und GST-LMP1(Y384G), zeigten das gleiche Laufverhalten in SDS-PAA-Gelen (Abb. 4.2 B).

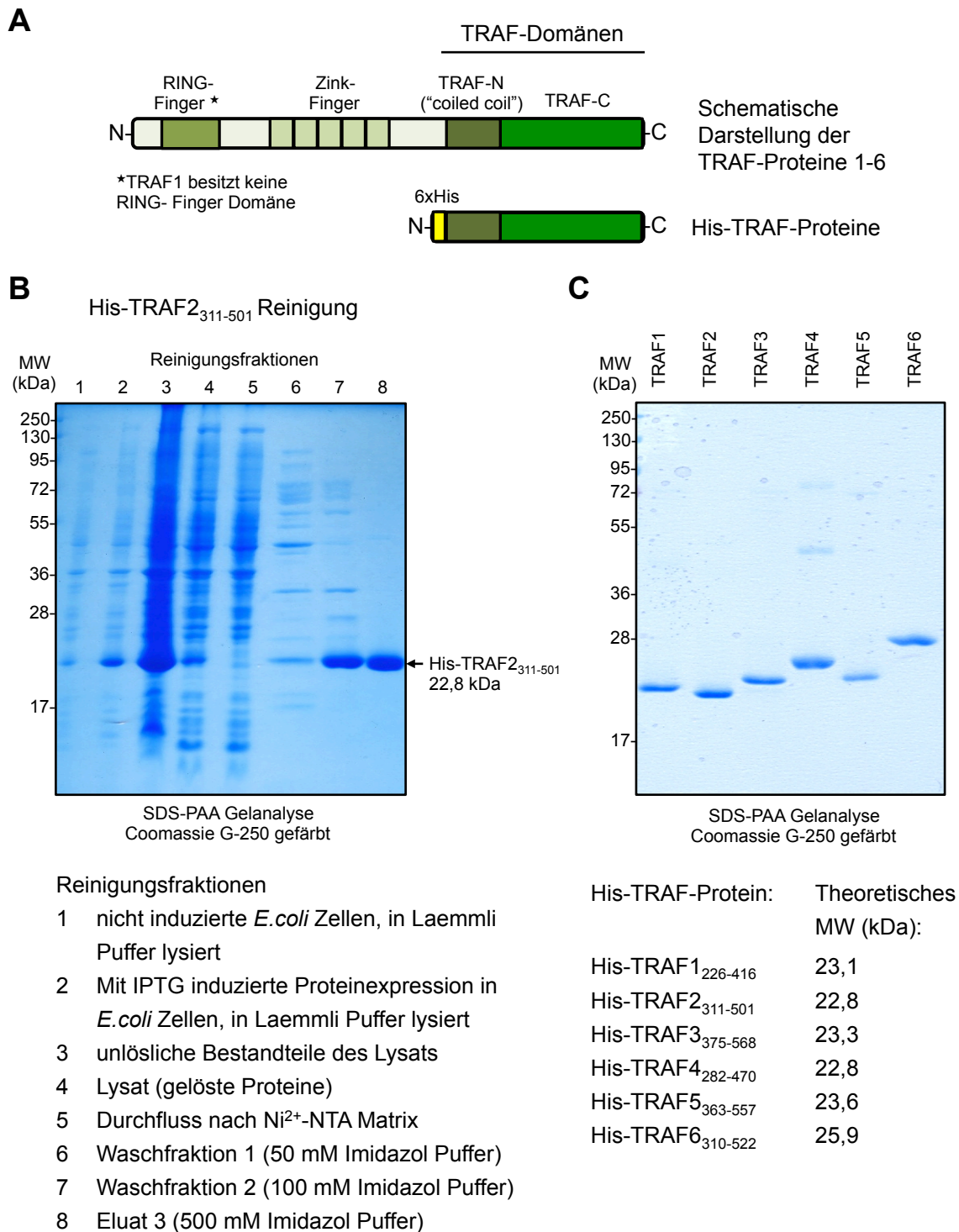
Aus 1 L bakterieller Expressionskultur konnten ca. 5 mg der GST-LMP1-Proteine isoliert werden. Neben der prominenten Bande der GST-LMP1-Proteine waren auf den SDS-PAA-Gelen weitere schwache Banden zu erkennen. Da jedoch weder stringenter Waschschritte während der Reinigung noch die Addition von Protease-Inhibitoren die Bildung dieser Proteinbanden verhinderte, handelt es sich sehr wahrscheinlich um Abbauprodukte, die

schon während der Proteinexpression in den *E. coli*-Bakterien entstanden sind. Der Anteil an GST-LMP1-Proteinen in den Elutionsfraktionen wurde durch Quantifizierung der jeweiligen Proteinbanden in den SDS-PAA-Gelen mit der Software ImageJ bestimmt und betrug zwischen 78 % und 94 %. Dieser Anteil war ausreichend, um die Bindung der TRAF-Proteine *in vitro* zu studieren (siehe Abschnitt 4.1.3) und letztendlich ein System zur Identifizierung von Substanzen zu etablieren, die die Bindung von TRAF2 an LMP1 inhibieren (siehe Kapitel 4.3)

#### 4.1.2 Design, Expression und Reinigung der TRAF-Proteine

Die Interaktion von Mitgliedern der TRAF-Protein-Familie wird sowohl mit zellulären Rezeptoren als auch mit dem EBV-Protein LMP1 über die TRAF-Domänen im C-terminalen Teil der TRAF-Proteine vermittelt (McWhirter *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999; Pullen *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2002). Für die *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien zwischen den Mitgliedern der TRAF-Protein-Familie und den GST-LMP1-Proteinen wurden daher die C-terminalen TRAF-Domänen von TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5 und TRAF6 in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert und als rekombinante Proteine aus *E. coli* Bakterien gereinigt. Die ausgewählten Aminosäuresequenzen der einzelnen TRAF-Proteine basieren auf den strukturbasierten Sequenzanalysen von Park *et al.* (1999). Die Aminosäuren 226-416 von TRAF1, 311-501 von TRAF2, 375-568 von TRAF3, 282-470 von TRAF4, 363-557 von TRAF5 und 310-522 von TRAF6 wurden jeweils durch PCR mit einem N-terminalen 6x His-Epitop fusioniert und in den pET17b-Expressionsvektor kloniert. Die exprimierten Proteine sind demnach also His-TRAF1<sub>226-416</sub>, His-TRAF2<sub>311-501</sub>, His-TRAF3<sub>375-568</sub>, His-TRAF4<sub>282-470</sub>, His-TRAF5<sub>363-557</sub> und His-TRAF6<sub>310-522</sub> (siehe Abb. 4.3).

Für die Proteinexpression wurde der *E. coli*-Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL mit den pET17b-His-TRAF-Expressionsplasmiden transformiert. Die Reinigung der TRAF-Proteine ist in Abbildung 4.3 B exemplarisch anhand der Reinigung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> dargestellt. Alle His-TRAF-Proteine wurden durch die Zugabe von IPTG zu den Expressionskulturen in den Bakterien exprimiert (Abb. 4.3 B, Spuren 1 und 2). Die Lysate der Expressionskulturen wurden nach dem Aufschluss der Bakterienzellen durch Zentrifugation von unlöslichen Bestandteilen gereinigt (Abb. 4.3, B, Spuren 3 und 4). Anschließend wurden die im Lysat gelösten His-TRAF-Proteine über das 6x His-Epitop an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose Kügelchen gebunden und schrittweise mit einem Stufengradienten von Imidazol-Puffern (20 mM Imidazol, 50 mM Imidazol, 100 mM Imidazol) gewaschen. Danach wurden die His-TRAF-Proteine in einem 500 mM Imidazol-Puffer eluiert (Abb. 4.3 B, Spur 8). Aus 1 L Expressionskultur konnten so ca. 10 mg des His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Proteins isoliert werden. Von den Proteinen His-TRAF1<sub>226-416</sub>, His-TRAF3<sub>375-568</sub>, His-TRAF4<sub>282-470</sub>, His-TRAF5<sub>363-557</sub> und His-TRAF6<sub>310-522</sub> konnten jeweils zwischen 2 und 6 mg Protein gereinigt werden.



**Abb. 4.3: Design und Reinigung der His-TRAF-Proteine.** **A** Schematische Darstellung der His-TRAF-Proteine am Beispiel von TRAF2. Die TRAF-Proteinfamilie wird durch eine Reihe von Proteindomänen charakterisiert. Namensgebend für die TRAF-Familie sind die charakteristischen, C-terminalen TRAF-N- und TRAF-C-Domänen. Diese TRAF-Domänen vermitteln sowohl die Bindung von TRAF-Proteinen an Rezeptoren als auch die Trimerisierung der TRAF-Proteine untereinander. Um Protein-Protein-Interaktionsstudien mit den TRAFs durchführen zu können, wurden die TRAF-Domänen der TRAF-Proteine 1 bis 6 in einen bakteriellen Expressionsvektor zusammen mit einem N-terminalen 6x His-Epitop kloniert. **B** Reinigungsfraktionen der His-TRAF-Proteine am Beispiel von His-TRAF<sub>2</sub><sub>311-501</sub>. Die His-TRAF-Proteine wurden in Bakterien exprimiert und über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix gereinigt. **C** Analyse der gereinigten His-TRAF-Proteine auf einem SDS-PAA-Gel. Die Proteine wurden mit dem Coomassiefarbstoff G-250 visualisiert. [MW - Molekulargewicht]

Um die His-TRAF-Proteine vom Imidazol des Elutionspuffers zu trennen, wurden die Eluate auf Größenausschluss-Chromatographiesäulen mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa geladen und in PBS eluiert. Mit diesem hier etablierten Protokoll konnten alle His-TRAF-Proteine mit sehr hoher Reinheit isoliert werden (Abb. 4.3 C). Während His-TRAF1<sub>226-416</sub>, His-TRAF2<sub>311-501</sub>, His-TRAF3<sub>375-568</sub>, His-TRAF5<sub>363-557</sub> und His-TRAF6<sub>310-522</sub> gemäß ihrer theoretischen Molekulargewichte in SDS-PAA-Gelen migrierten, zeigte His-TRAF4<sub>282-470</sub> ein leicht abweichendes Laufverhalten und war statt bei 22,8 kDa bei näherungsweise 24 kDa zu finden (Abb. 4.2 C).

#### 4.1.3 Die TRAF-Proteine 1-3, 5 und 6 binden an die Signaldomäne von LMP1

Nach der erfolgreichen Reinigung sowohl der GST-LMP1-, als auch der TRAF-Proteine musste für den Aufbau eines *in vitro* Screeningsystems als nächstes eines der TRAF-Proteine ausgewählt werden, dessen Interaktion mit LMP1 als Zielstruktur für einen Inhibitor verwendet werden sollte. Grundsätzlich sollte dieses TRAF-Protein natürlich eine wichtige Rolle in LMP1-induzierten Signalkaskaden spielen. Weiterhin sollte dieses TRAF-Protein direkt an LMP1 binden und dabei eine möglichst definierte, räumlich begrenzte Bindestelle haben. Ebenso musste die Interaktion dieses TRAF-Proteins mit LMP1 *in vitro* untersucht werden können. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, sind TRAF1, TRAF2, TRAF3 und TRAF5 als Signaladapter für die CTAR1-Domäne beschrieben. Während nun die direkte Bindung von TRAF1, TRAF2 und TRAF3 an LMP1 schon bekannt ist (Devergne *et al.*, 1996), ist die Interaktion von TRAF5 noch nicht genau definiert und könnte sowohl indirekt über TRAF5/TRAF3-Komplexe stattfinden, als auch direkt sein (siehe Abschnitt 1.3.3). Dagegen wird die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 als indirekt vermutet und eine Rolle von TRAF4 in der Aktivierung von Signalkaskaden durch LMP1 ist bisher nicht beschrieben (siehe Kapitel 1.3).

Um nun also herauszufinden, welche der His-TRAF-Proteine mit den GST-LMP1-Proteinen interagieren, wurden *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien durchgeführt. In GST-Ko-Präzipitationsexperimenten wurde die Bindung von His-TRAF1<sub>226-416</sub>, His-TRAF2<sub>311-501</sub>, His-TRAF3<sub>375-568</sub>, His-TRAF4<sub>282-470</sub>, His-TRAF5<sub>363-557</sub> und His-TRAF6<sub>310-522</sub> an GST-LMP1 untersucht. Hierfür wurden GST-LMP1 wt sowie die beiden LMP1-Mutanten GST-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) und GST-LMP1(Y384G) und ein GST-Protein ohne LMP1-Signaldomäne an GSH-Kügelchen immobilisiert. Die LMP1-Mutante GST-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) wurde verwendet, um die spezifische Interaktion von TRAF-Proteinen mit dem TRAF-Interaktionsmotiv P<sub>204</sub>XQxT innerhalb der CTAR1-Domäne zu zeigen. Durch die Verwendung von GST-LMP1(Y384G) wurde untersucht, ob die TRAF-Proteine ebenfalls innerhalb der CTAR2-Domäne binden. Weiterhin wurde ein GST-Protein ohne LMP1-Signaldomäne



verwendet, um unspezifische Interaktionen von TRAF-Proteinen mit GST ausschließen zu können.

Die Bindung der GST-Proteine wurde mit einem zweifachen Massenüberschuss von GST-Proteinen zu der Bindekapazität der GSH-Kügelchen durchgeführt, um eine maximale Belegung aller Bindeplätze und somit eine hohe räumliche Konzentration der LMP1-Moleküle zu erreichen. Bei einer kompletten Belegung aller Bindeplätze auf den GSH-Kügelchen sollten ~40 µg der GST-Proteine pro Ansatz immobilisiert sein (siehe 3.3.8). Die gleichmäßige Bindung aller GST-Proteine wurde in SDS-PAA-Gelanalysen überprüft (siehe Abb. 4.4 A). Von jedem der His-TRAF-Proteine wurden 1,5 µg mit den GST-LMP1-Proteinen in einem Volumen von 500 µL inkubiert. Bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 23,6 kDa der His-TRAF-Proteine entspricht dies einer durchschnittlichen molaren Konzentration von His-TRAF-Molekülen von näherungsweise 130 nM in den einzelnen Ansätzen. Die molare Konzentration der GST-LMP1-Proteine näherungsweise 1,7 µM. Dies entspricht also einem etwa 13-fachen Überschuss an GST-LMP1-Proteinen gegenüber den His-TRAF-Proteinen.

Die von GST-LMP1 gebundenen His-TRAF-Proteine wurden in Immunblot-Analysen mit Hilfe des  $\alpha$ -N-6xHis-Antikörpers 2F12 nachgewiesen. Von allen His-TRAF-Proteinen wurden 20 ng, also 1,3 % der Gesamtmenge an His-TRAF-Protein pro GST-Ko-Präzipitationsansatz, als Referenz für die Quantifizierung der Menge an gebundenen His-TRAF-Proteinen eingesetzt. Die Signalstärke der Banden der verschiedenen His-TRAF-Proteine war jedoch bei gleicher Expositionszeit der Immunblot-Membranen nicht identisch. His-TRAF<sub>4</sub><sup>282-470</sup> wurde selbst bei den längsten Expositionszeiten in den Immunblot-Analysen von dem  $\alpha$ -N-6xHis-Antikörper 2F12 nur schwach detektiert. Weiterhin zeigte sich in verschiedenen Experimenten unspezifische Bindung von His-TRAF<sub>4</sub><sup>282-470</sup> (Daten nicht gezeigt). Die Ursache für diese Diskrepanz wurde nicht weiter untersucht, da für TRAF4 bisher keine Relevanz in der Signaltransduktion von LMP1 bekannt ist und TRAF4 somit als Kandidat für den Aufbau eines Screens nicht weiter von Interesse war.

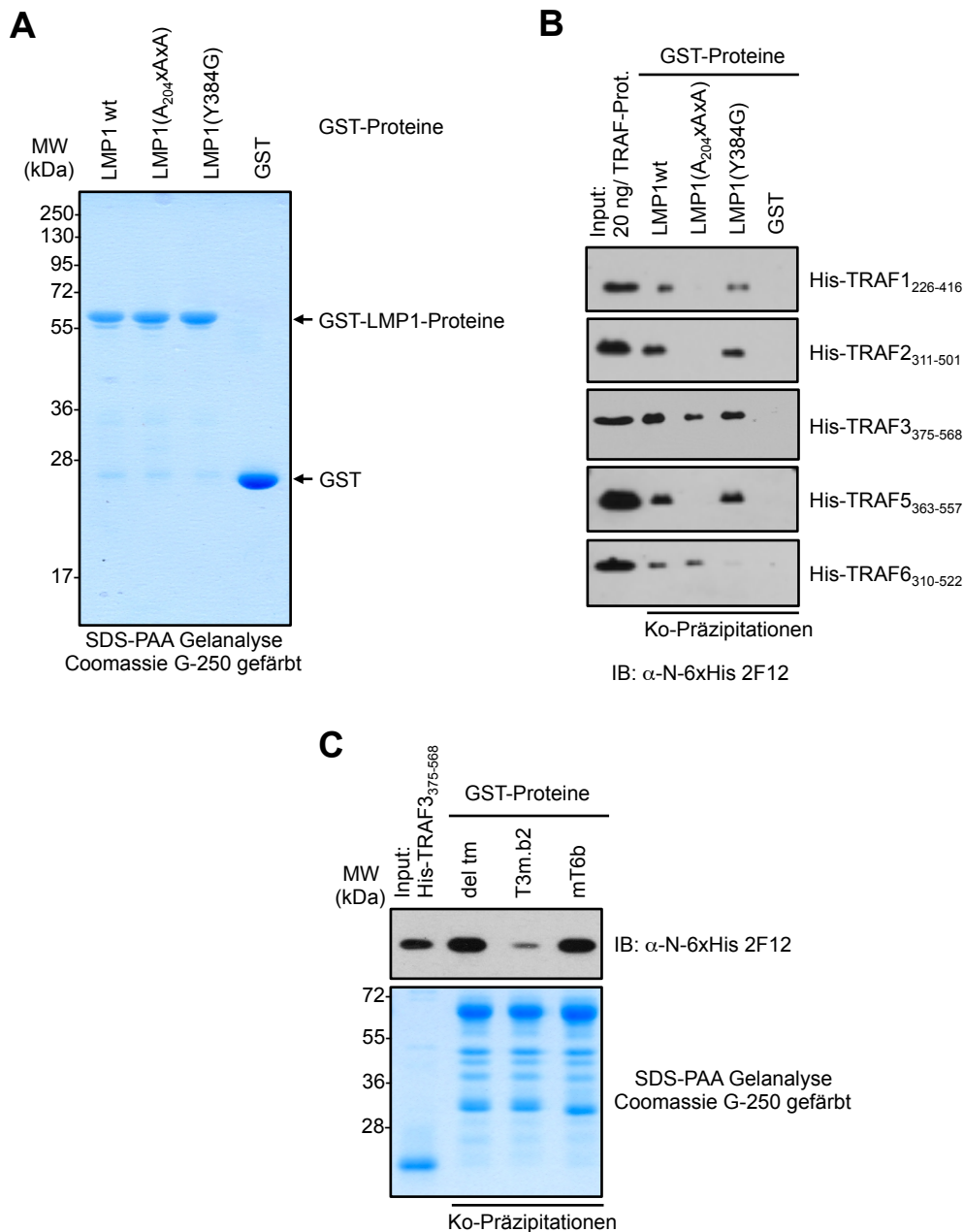
In den durchgeführten Protein-Protein-Interaktionsstudien haben die His-TRAF Proteine His-TRAF<sub>1</sub><sup>266-416</sup>, His-TRAF<sub>2</sub><sup>311-501</sup>, His-TRAF<sub>3</sub><sup>375-568</sup>, His-TRAF<sub>5</sub><sup>363-557</sup> und His-TRAF<sub>6</sub><sup>310-522</sup> spezifisch an GST-LMP1 wt gebunden (Abb. 4.4 B, Spur 2). Die Quantifizierung der Signale aus den in Abb. 4.4 gezeigten Protein-Protein-Interaktionsstudien wurde im Vergleich mit der jeweils zugehörigen Referenz durchgeführt. Von den eingesetzten 1,5 µg der His-TRAF-Proteine pro Ansatz wurden 10 % His-TRAF<sub>1</sub><sup>266-416</sup>, 14 % His-TRAF<sub>2</sub><sup>311-501</sup>, 24 % His-TRAF<sub>3</sub><sup>375-568</sup>, 8,5 % His-TRAF<sub>5</sub><sup>363-557</sup> und 5,7 % TRAF<sub>6</sub><sup>310-522</sup> von GST-LMP1 wt gebunden.

Die Interaktion von His-TRAF1<sub>266-416</sub>, His-TRAF2<sub>311-501</sub>, His-TRAF3<sub>375-568</sub> und His-TRAF5<sub>344-557</sub> mit GST-LMP1 wurde in diesen Bindestudien spezifisch von dem P<sub>204</sub>XQxT-Motiv innerhalb der CTAR1-Domäne vermittelt. In den Ansätzen, in denen dieses TRAF-Interaktionsmotiv mutiert wurde, war die Interaktion von LMP1 mit His-TRAF1<sub>266-416</sub>, His-TRAF2<sub>311-501</sub> und His-TRAF5<sub>363-557</sub> komplett inhibiert. Im Gegensatz dazu wurden immer noch 11,53 % des eingesetzten His-TRAF3<sub>375-568</sub> an GST-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) gebunden (Abb. 4.4 B, Spur 3).

Diese Resultate stehen im Einklang mit den bisher publizierten Daten. Die Affinität von TRAF3 an LMP1 wurde schon in den Studien von Devergne *et al.* (1996) und Sandberg *et al.* (1997) als stärker beschrieben als die Affinität von TRAF1 und TRAF2 zu LMP1. Auch in den hier durchgeführten Experimenten wurde mehr His-TRAF3<sub>375-568</sub> (24%) als His-TRAF1<sub>266-416</sub> (10%) und His-TRAF2<sub>311-501</sub> (14%) gebunden. Weiterhin wird die Interaktion von TRAF1, TRAF2 und TRAF3 mit dem P<sub>204</sub>XQxT-Motiv in LMP1 durch Aminosäuren außerhalb der CTAR1-Sequenz P<sub>204</sub>QQAT unterschiedlich stabilisiert. Die Bindung von TRAF2 an LMP1 wird nur über das TRAF-Interaktionsmotiv koordiniert, wohingegen die Bindung von TRAF3 an LMP1 durch Interaktion der TRAF-Proteine mit LMP1-Resten außerhalb des Motivs P<sub>204</sub>XQxT stabilisiert wird (Devergne *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2005).

Um jedoch auszuschließen, dass His-TRAF3<sub>375-568</sub> unspezifisch an das GST-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) oder den GSH-Kügelchen präzipitierte, wurden weitere Kontrollexperimente mit GST-fusionierten Tio-Signaldomänen durchgeführt. Tio (*two in one*) ist ein virales Protein des Herpesvirus Ateles (Albrecht *et al.*, 1999). Ähnlich wie LMP1 imitiert Tio zelluläre Rezeptoren und aktiviert zelluläre Signalwege (Heinemann *et al.*, 2006; de Jong *et al.*, 2010). So besitzt Tio ebenfalls ein TRAF3-Interaktionsmotiv. Durch die Bindung von TRAF3 an dieses Motiv aktiviert Tio den nicht kanonischen NF-κB-Signalweg (de Jong *et al.*, 2013).

In den Interaktionsstudien zwischen GST-Tio und His-TRAF3<sub>375-568</sub> zeigte sich, dass das rekombinante His-TRAF3<sub>375-468</sub> durchaus spezifisch mit TRAF3-Interaktionsmotiven interagiert (Abb. 4.4 C). Zwar war auch die Bindung von His-TRAF3<sub>375-568</sub> an Tio durch die Mutation der Tio-Aminosäuren Pro<sub>210</sub>, Gln<sub>211</sub>, Leu<sub>214</sub>, Arg<sub>215</sub> sowie Glu<sub>216</sub> ebenfalls nicht komplett inhibiert, die Restbindung von His-TRAF3<sub>375-568</sub> ist jedoch wahrscheinlich auch auf die Stabilisation der Interaktion durch weitere Tio-Aminosäuren zurückzuführen (de Jong *et al.*, 2013). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Bindung von His-TRAF3<sub>375-568</sub> mit GST-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) in den Protein-Protein-Interaktionsstudien in dieser Arbeit durch die Aminosäuren außerhalb des P<sub>204</sub>XQxT-Motivs stabilisiert wird (siehe Kapitel 1.4) und nicht auf unspezifischer Bindung beruht.



**Abb. 4.4: Die Proteine His-TRAF1, 2, 3, 5 und 6 binden an GST-LMP1.** **A** Kontrolle der eingesetzten GST-LMP1-Proteine in den Protein-Protein-Interaktionsstudien (repräsentative Abbildung). Um die Menge der GST-LMP1-Proteine, die in den einzelnen Ansätzen an die GSH-Kügelchen gebunden wurden, zu überprüfen, wurden die GST-LMP1-Proteine in SDS-PAA-Gelen analysiert. Die Proteine wurden durch Färbung der Gele mit dem Coomassiefarbstoff G-250 visualisiert. Für die Gelanalysen wurden jeweils 4 % des Volumens des GST-Kopräzipitationsansatzes eingesetzt. **B** Die rekombinanten Proteine His-TRAF1<sub>266-416</sub>, His-TRAF2<sub>311-501</sub>, His-TRAF3<sub>375-568</sub>, His-TRAF5<sub>363-557</sub> und His-TRAF6<sub>310-522</sub> binden an GST-LMP1. Für die Immunblot-Analysen wurden in der linken Spur 20 ng (1 % der Gesamt-TRAF-Proteinmenge pro Ansatz) jedes TRAF-Proteins als Referenz und jeweils 4 % der Ko-Präzipitationsansätze eingesetzt. Die Bindung von His-TRAF1<sub>266-416</sub>, His-TRAF2<sub>311-501</sub>, His-TRAF3<sub>375-568</sub> und His-TRAF5<sub>363-557</sub> wurde durch das P<sub>204</sub>XQxT-Motiv innerhalb der CTAR1-Domäne vermittelt. His-TRAF6<sub>310-522</sub> dagegen interagierte mit der CTAR2-Domäne. **C** His-TRAF3<sub>375-568</sub> bindet spezifisch an GST-Tio. Für die Immunblot-Analysen wurden in der linken Spur 25 ng (1,25 % der Gesamt-TRAF3-Proteinmenge pro Ansatz) His-TRAF3<sub>375-568</sub> als Referenz und jeweils 4 % der Ko-Präzipitationsansätze eingesetzt. [IB - Immunblot, MW - Molekulargewicht]

Diese Experimente bestätigten damit, dass die rekombinanten TRAF-Proteine His-TRAF1<sub>266-416</sub>, His-TRAF2<sub>311-501</sub> und His-TRAF3<sub>375-568</sub> an das P<sub>204</sub>XQxT-Motiv in der CTAR1-Domäne binden. Weiterhin zeigten die Ergebnisse, dass auch His-TRAF5<sub>344-557</sub> direkt mit LMP1 interagiert. Dies schließt natürlich nicht aus, dass TRAF5 in Zellen in einem Komplex mit TRAF3 an LMP1 bindet, zeigt jedoch eindeutig, dass TRAF5 wie auch TRAF1, TRAF2 und TRAF3 direkt an das TRAF-Interaktionsmotiv P<sub>204</sub>XQxT in der CTAR1-Domäne binden kann.

Interessanterweise konnte in den hier gezeigten Experimenten erstmals eine direkte Interaktion von TRAF6 mit LMP1 gezeigt werden. His-TRAF6<sub>310-522</sub> hat in den durchgeführten Experimenten vergleichbar an GST-LMP1 wt sowie an GST-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) gebunden (Abb. 4.4 B). Diese direkte Interaktion von TRAF6 mit LMP1 wurde durch die Mutation der LMP1-Aminosäure Tyr<sub>384</sub> inhibiert. Also interagierte TRAF6 direkt und spezifisch mit der CTAR2-Domäne, wohingegen die CTAR1-Domäne keine Rolle bei der Bindung von TRAF6 spielte. Eine unspezifische Interaktion von His-TRAF6<sub>310-522</sub> mit dem eingesetzten GST-Protein ohne LMP1-Signaldomänen wurde in dem vorliegenden Experiment nicht beobachtet. Die Affinität von His-TRAF6<sub>310-522</sub> an das GST-LMP1 wt scheint jedoch schwächer zu sein als die Affinität der anderen TRAF-Proteine zu den LMP1-Signaldomänen. Dies zeigte sich dadurch, dass nur 5,7 % der eingesetzten Menge an His-TRAF6<sub>310-522</sub> Protein an GST-LMP1 wt und 6,2 % an die CTAR1-Mutante GST-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) gebunden wurde (Abb 4.4 B).

Im Hinblick auf die Entwicklung eines hochdurchsatzfähigen Screeningsystems bleibt also festzuhalten, dass von allen His-TRAF-Proteinen von His-TRAF2<sub>311-501</sub> die größte Menge an Protein aus vergleichbaren bakteriellen Expressionkulturen isoliert werden konnte. Weiterhin war die Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wt nicht nur *in vitro* gut darstellbar, sondern wurde durch die Mutation des P<sub>204</sub>XQxT-Motivs innerhalb der CTAR1-Domäne vollständig inhibiert. Die Interaktionen zwischen His-TRAF2<sub>311-501</sub> und LMP1 ist also räumlich sehr begrenzt. Daher ist es wahrscheinlich möglich, ein kleines Molekül zu identifizieren, das die Bindung von TRAF2 an LMP1 inhibiert. Dahingegen bindet TRAF3 auch Aminosäuren außerhalb des P<sub>204</sub>XQxT-Motivs. Infolge dessen sollte diese Interaktion eine schlechtere Zielstruktur für kleine Moleküle darstellen als die Interaktion von TRAF2 mit LMP1 (siehe Kapitel 1.5). Sowohl auf Grund dieser Ergebnisse, als auch durch die Tatsache, dass TRAF2 das essenzielle Adaptermolekül für die Aktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges durch die CTAR1-Domäne und das Überleben von LCLs ist (Kaye *et al.*, 1996; Soni *et al.*, 2007; Guasparri *et al.*, 2008) (siehe Kapitel 1.3), wurde die Interaktion von His-TRAF2<sub>311-501</sub> mit GST-LMP1 wt für den weiteren Aufbau eines Screens ausgewählt, der den CTAR1-Signalkomplex als Zielstruktur hat.

Da zusätzlich in diesen Experimenten zum ersten Mal eine direkte Bindung von TRAF6 an LMP1 gezeigt werden konnte, wurde auch dieser Protein-Protein-Interaktionskomplex im Laufe dieser Arbeit weiter untersucht (siehe Kapitel 4.5). Denn die Etablierung von TRAF6 als direkter Bindepartner der CTAR2-Domäne könnte es ermöglichen, auch diesen Signalkomplex als Zielstruktur für inhibitorische Moleküle zu verwenden. Damit wäre man in der Lage, Inhibitoren gerichtet gegen beide CTAR-Domänen zu entwickeln.

#### 4.2 Analyse der Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wt

Für TRAF2 konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die Affinität zu zellulären Rezeptoren vom Oligomerisierungsstatus beider Moleküle abhängig ist. Die Bindungsstärke von TRAF2 zu monomeren Rezeptoren (und Peptiden) ist um ein Vielfaches geringer als die Affinität zu multimerisierten Rezeptorkonstrukten (Pullen *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2000). Die  $K_D$  des Komplexes aus TRAF2 und LMP1 wurde in der Vergangenheit jedoch nur in Studien mit LMP1-Peptiden bestimmt und die Bindung von TRAF2 an LMP1 wurde daher als sehr schwache Wechselwirkung ( $K_D = 1,9 \text{ mM}$ ) charakterisiert (Ye *et al.*, 2000). Dieses monomere Interaktionsmodell spiegelt jedoch nicht den *in vivo* Status der Komplexbildung von LMP1 mit TRAF2 wider. Die sechs Transmembrandomänen von LMP1 bilden LMP1-Oligomere in der Plasmamembran und aktivieren so die LMP1-induzierten Signalkaskaden (Gires *et al.*, 1997). Analog zu den unterschiedlichen Interaktionsstärken bei der Bildung des Signalkomplexes aus CD40 und TRAF2 Molekülen (siehe Abschnitt 1.4.2) sollte die Bindung von TRAF2 an oligomere LMP1-Molekülen eine stärkere Affinität aufweisen als die Bindung von TRAF2 an monomere LMP1-Moleküle.

Dieser Sachverhalt ist für den Aufbau eines *in vitro* Systems zur Identifizierung von Inhibitoren aus verschiedenen Gründen von Belang. So sollte sich das System so nah wie möglich an den nativen Gegebenheiten orientieren, also an einem Komplex multimerisierter Proteine, anstelle von monomeren LMP1-Molekülen. Um also eine Multimerisierung von LMP1 zu imitieren, wurden die GST-LMP1-Fusionsproteine für die Aufstellung eines Systems zur Suche nach potenziellen Inhibitoren gewählt. GST-Proteine dimerisieren und das GST-LMP1-Fusionsprotein sollte so die LMP1-Signaldomänen in räumliche Nähe zueinander bringen (Parker *et al.*, 1990; Ji *et al.*, 1992). Weiterhin wurde im folgenden, äquivalent zu den grundlegenden Protein-Protein-Interaktionsstudien in Abschnitt 4.1.3, immer versucht, eine möglichst hohe Dichte von LMP1-Molekülen an der jeweiligen Matrix in den einzelnen Experimenten zu erreichen.

Dazu kommt, dass die Wirksamkeit eines Inhibitors (ausgedrückt in der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration -  $IC_{50}$ ) sowohl durch seine eigene Affinität an die Zielstruktur,

also die Bindetasche eines der Proteine im Komplex, als auch durch die Affinität der Proteine untereinander sowie durch die Konzentration der Proteine bestimmt wird (Cochran, 2000).

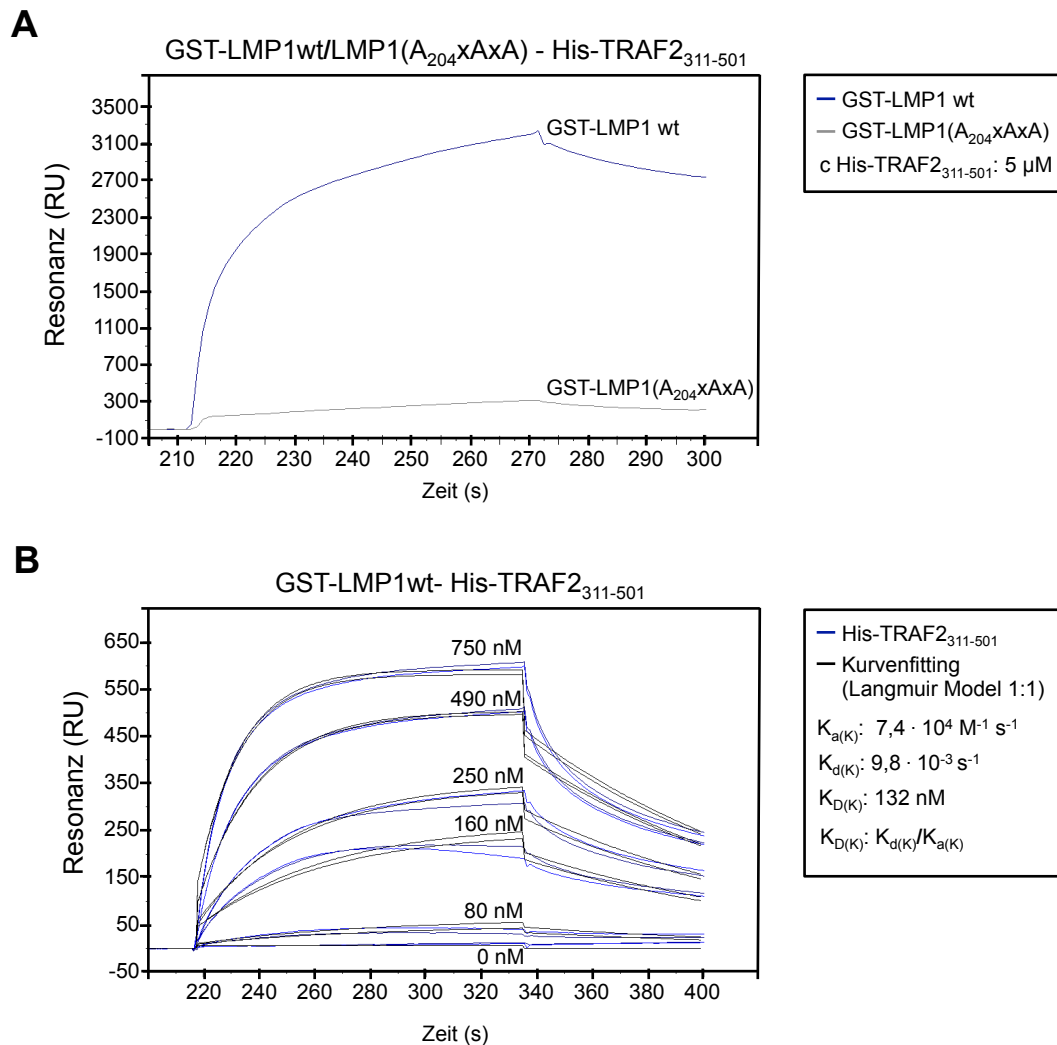
Für die Aufstellung eines Systems zur Identifizierung von Inhibitoren sollten also die Konzentrationen beider Proteine so gewählt werden, dass die Bindung der Proteine aneinander nicht in der Sättigung liegt, da eine zu hohe Konzentration von Proteinen die Identifizierung von Inhibitoren mit niedrigeren Affinitäten ausschließen würde. Dies sollte vermieden werden, da auch niederaffine Substanzen als Leitstrukturen etabliert werden können, und deren Affinität nachträglich durch Modifikation des Grundgerüsts gezielt verbessert werden kann, so dass auch diese als Leitstrukturen für die Entwicklung pharmakologischer Wirkstoffe eingesetzt werden können (Hajduk, 2006).

Daher wurde die Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wt in einem Oberflächenplasmonresonanz-Experiment untersucht (Abb. 4.5). Hierfür wurde GST-LMP1 wt an der Oberfläche eines Biacore Chips immobilisiert und mit einer Konzentrationsreihe von His-TRAF2<sub>311-501</sub> (80 nM, 160 nM, 250 nM, 490 nM und 750 nM) inkubiert. Die gemessenen Daten wurden in dem BiaEvaluation-Programm analysiert und mit dem Langmuir-Bindemodell gefittet.

Die spezifische Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wt wurde durch die parallele Verwendung der LMP1-Mutante GST-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) kontrolliert (Abb. 4.5 A). Auch dieses Experiment bestätigte, dass His-TRAF2<sub>311-501</sub> spezifisch mit GST-LMP1 wt interagiert, jedoch nicht mit der CTAR1-Mutante GST-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA).

Die Gleichgewichtskonstante für den Komplex aus His-TRAF2<sub>311-501</sub> und GST-LMP1 wt ( $K_{D(K)}$ ) wird in dem verwendeten Modell (Langmuir Model 1:1) aus dem Verhältnis der über das Fitting erhaltenen Dissoziationsratenkonstanten ( $K_d$ ) und Assoziationsratenkonstanten ( $K_a$ ) der Komplexbildung der Proteine ermittelt. In diesem Experiment konnte die  $K_{D(K)}$  für die Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wt auf 132 nM bestimmt werden (Abb. 4.5 B).

Dies zeigt also eine vielfach stärkere Affinität von His-TRAF2<sub>311-501</sub> zu der kompletten, intrazellulären Signaldomäne von LMP1, wenn diese zudem noch durch das N-terminal fusionierte GST dimerisiert wurde, gegenüber monomeren LMP1-Peptiden, wie sie in den Studien von Ye *et al.* (2000) beschrieben wurden.

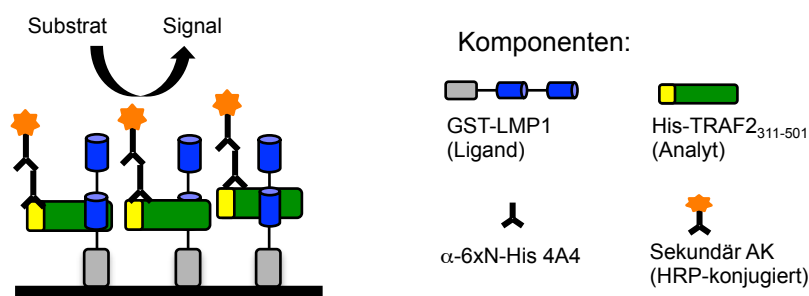


**Abb. 4.5: Protein-Protein-Interaktionsstudien zwischen LMP1 und TRAF2 mittels Oberflächenplasmonresonanz-Experimenten.** Für die Analyse der Interaktion zwischen GST-LMP1 und His-TRAF2<sub>311-501</sub> mittels Oberflächenplasmonresonanzänderung in einem Biacore-Messgerät wurde die Oberfläche des Biacore-Chips mit GST-LMP1 beschichtet und mit His-TRAF2<sub>311-501</sub> inkubiert. **A** Die Interaktion zwischen His-TRAF2<sub>311-501</sub> und GST-LMP1 wt ist spezifisch für das TRAF-Interaktionsmotiv P<sub>204</sub>XQxT in der CTAR1-Domäne. GST-LMP1 wt und GST-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) wurden an die Oberfläche zweier Kanäle desselben Chips gebunden und mit 5 μM His-TRAF2<sub>311-501</sub> inkubiert. In dem Kanal mit GST-LMP1 wt zeigt sich eine starke Resonanzänderung bei der Inkubation mit His-TRAF2<sub>311-501</sub>, die in dem Kanal mit GST-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) nicht beobachtet werden konnte. **B** Bestimmung der Interaktionsstärke des LMP1-TRAF2-Komplexes. Ein mit GST-LMP1 wt beschichteter Chip wurde mit einer Konzentrationsreihe (80 nM, 160 nM, 250 nM, 490 nM und 750 nM) von His-TRAF2<sub>311-501</sub> inkubiert. Jede Konzentration wurde in Duplikaten gemessen. Die erhaltenen Daten (blaue Kurven) wurden mit dem Biacore-Evaluationsprogramm über das Langmuir 1:1 Bindemodell gefittet (schwarze Kurven) und die Bindungsratenkonstanten  $K_{a(K)}$  und  $K_{d(K)}$  der Komplexbildung aus GST-LMP1 wt und His-TRAF2<sub>311-501</sub> abgelesen. Die Gleichgewichtskonstante der Komplexbildung  $K_{D(K)}$  wurde aus den beiden Ratenkonstanten berechnet. [ $K_{a(K)}$  – Assoziationsratenkonstante der Komplexbildung,  $K_{d(K)}$  – Dissoziationsratenkonstante der Komplexbildung,  $K_{D(K)}$  – Gleichgewichtskonstante des Komplexes, RU - Resonanz (*resonance units*)]

### 4.3 Aufbau eines ELISA-basierten Screeningsystems

Für den Aufbau eines hochdurchsatzfähigen Systems zur Identifizierung von Inhibitoren bedarf es einer robusten Methode, die gleichbleibende Signalqualität über einen großen Probendurchsatz zulässt. Ich habe mich aus verschiedenen Gründen für die Entwicklung eines ELISA-basierten Systems zur Identifikation von Inhibitoren, gerichtet gegen den Signalkomplex aus LMP1-TRAF2, entschieden. So konnte ich das ELISA-System basierend auf den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit entwickeln (Abb. 4.6). Um z.B. einen auf Fluoreszenzpolarisation-basierten Screen zu entwickeln, müsste eine der beiden Komponenten des Systems als Peptid eingesetzt werden (Heeres *et al.*, 2011). Damit wäre die Affinität der beiden Proteine zueinander sehr gering (siehe Kapitel 1.3.2) und das System würde sich von der *in vivo* Situation multimerer Proteinkomplexe unterscheiden. In einem ELISA-basierten System konnten jedoch die Komponenten verwendet werden, mit denen die Interaktion bisher schon untersucht wurde. Analog zu den bisherigen Protein-Protein-Interaktionsstudien wurde daher GST-LMP1 wt als Ligand an der Oberfläche der Reaktionsgefäße (Boden der 96-Loch-Platten) durch Proteinadsorption immobilisiert und mit gelöstem His-TRAF2<sub>311-501</sub> (Analyt) inkubiert (Abb. 4.6).

Ein weiterer Grund für die Verwendung eines ELISA-basierten Systems war, dass jeweils Waschschritte zwischen allen Inkubationsschritten in ELISA-Experimenten durchgeführt werden. Die Detektion von gebundenem His-TRAF2<sub>311-501</sub>, mittels spezifischen N-6xHis-Antikörpern, wird somit nicht durch die Substanzen aus den Bibliotheken beeinflusst. Dagegen gibt es zum Beispiel in AlphaLISA-basierten Screens keine Waschschritte, die Substanzen aus Bibliotheken werden zusammen mit allen Komponenten inkubiert (Eglen *et al.*, 2008).



**Abb. 4.6: Aufbau eines ELISA-basierten Systems zur Detektion der Interaktion zwischen TRAF2 und LMP1.** Analog zu den GST-Ko-Präzipitationsstudien und Oberflächenplasmonresonanzstudien wurde das ELISA-basierte System mit immobilisierten GST-LMP1-Proteinen und His-TRAF2<sub>311-502</sub> als gelöstem Bindepartner entworfen. Das gebundene His-TRAF2<sub>311-501</sub> wurde durch den α-N-6x His-Antikörper 4A4 in Kombination mit einem Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper detektiert. Zur Quantifizierung der Bindung wurde der Umsatz von TMB-Substrat durch die Meerrettichperoxidase des Sekundärantikörpers in einem Photometer vermessen. [TMB - 3,3',5,5'Tetramethylbenzidin]



Somit könnten die Substanzen ebenfalls zwischen verschiedenen anderen Bestandteilen des Systems intervenieren. Dieser Umstand kann die Anzahl an falsch-positiven Treffern erhöhen. Weiterhin ist der Aufbau eines ELISAs keinen großen Beschränkungen unterworfen. So kann z.B. zum Auslesen des Umsatzes an TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)-Substrat durch einen HRP-konjugierten Sekundärantikörper jedes Luminometer verwendet werden, während man zum Auslesen von AlphaLISA-Experimenten einen Hochleistungs-Energie-Laser benötigt (Eglen *et al.*, 2008).

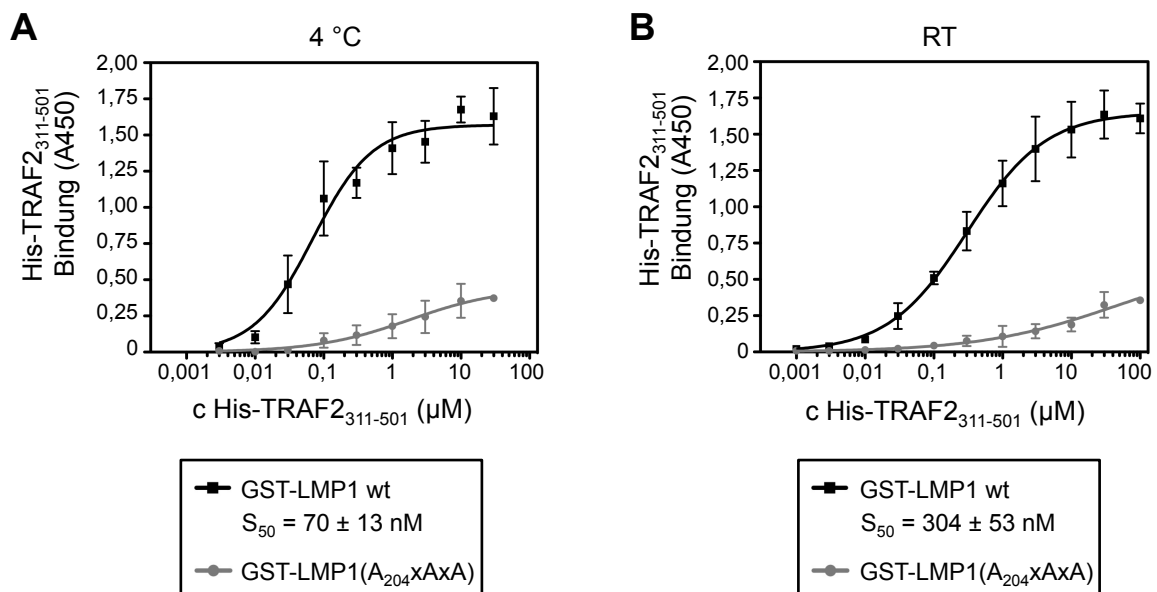
Für die Detektion von gebundenem His-TRAF2<sub>311-501</sub> wurde in diesem System der  $\alpha$ -N-6x His 4A4 Antikörper in Kombination mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper verwendet (Abb. 4.6). Die Quantifizierung der Bindung konnte so über den Umsatz von TMB-Substrat durch die Meerrettichperoxidase der gebundenen Sekundärantikörper photometrisch bestimmt werden. Um letztendlich ein ELISA-basiertes, screeningfähiges System zu etablieren, wurden verschiedene Parameter der Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an die GST-LMP1-Proteine getestet. Analog zu den Oberflächenplasmonresonanzstudien (Abb. 4.5) wurden konzentrationsabhängige Bindestudien zwischen den GST-LMP1-Proteinen und His-TRAF2<sub>311-501</sub> durchgeführt (Abb. 4.7). Hierfür wurden die beiden Proteine GST-LMP1 wt und GST-LMP1(A<sub>204</sub>xAxA) als Liganden auf ELISA-Platten immobilisiert und mit Konzentrationsreihen von His-TRAF2<sub>311-501</sub> inkubiert. Die His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentrationen wurden für diese Experimente so gewählt, dass sie den Bereich um die  $K_D$ -Konzentration des Komplexes aus His-TRAF2<sub>311-501</sub> und GST-LMP1 wt abdeckten, der aus den Oberflächenplasmonresonanz-Studien ermittelt wurde.

Die spezifische Interaktion von His-TRAF2<sub>311-501</sub> mit GST-LMP1 wt ließ sich in diesem ELISA-basierten System sehr gut darstellen und bestätigte die erhaltenen Daten aus den vorangegangenen Experimenten. Die Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wurde durch die dreifache Alanin-Mutation des TRAF-Interaktionsmotivs innerhalb der CTAR1-Domäne verhindert. GST-LMP1(A<sub>204</sub>xAxA) war nicht also mehr in der Lage, His-TRAF2<sub>311-501</sub> zu binden (Abb. 4.7). Ebenso zeigte sich keine unspezifische Interaktion von His-TRAF2<sub>311-501</sub> mit BSA-beschichteten Platten (siehe Anhang 1). Die Interaktion der CTAR2-Mutante GST-LMP1(Y384G) mit His-TRAF2<sub>311-501</sub> war in diesen Experimenten vergleichbar mit der Interaktion von GST-LMP1 wt mit His-TRAF2<sub>311-501</sub> (siehe Anhang 1 und Abb. 4.7 A).

Zusätzlich wurde die Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 in unterschiedlichen ELISA-basierten Experimenten sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4 °C analysiert. Bei beiden Inkubationstemperaturen war die Interaktion von His-TRAF2<sub>311-501</sub> spezifisch für GST-LMP1 wt und stabil über den eingesetzten Konzentrationsbereich (Abb. 4.7).

Sowohl für die Bildung des Komplexes aus His-TRAF2<sub>311-501</sub> und GST-LMP1 wt bei 4 °C als auch bei Raumtemperatur wurde die halbmaximale Sättigung ( $S_{50}$ ) der Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wt auf den ELISA Platten berechnet. Dafür wurde die Signalstärke über der molaren Konzentration von His-TRAF2<sub>311-501</sub> aufgetragen (Abb. 4.7). Die Berechnung der  $S_{50}$ -Werte erfolgte mit dem Programm Prism 5 unter Verwendung des Modells „one site specific binding with Hill slope“ (siehe 3.3.11).

Für die Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wt bei 4 °C konnte aus den Daten von drei unabhängigen Experimenten eine  $S_{50}$  von  $70 \pm 13$  nM bestimmt werden (Abb. 4.7 A). Bei Raumtemperatur verschob sich die  $S_{50}$  des Komplexes und betrug  $304 \pm 53$  nM (Abb. 4.7 B). Das Reaktionsgleichgewicht verschiebt sich also bei niedrigen Temperaturen in die Richtung des Komplexes aus den beiden Proteinen. Für den Aufbau eines Screens bedeutete dies, dass bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C geringere Konzentrationen von His-TRAF2<sub>311-501</sub> notwendig waren, um eine hohe Signalstärke zu erzeugen.



**Abb. 4.7: Bestimmung der halbmaximalen Sättigung der Interaktion von His-TRAF2<sub>311-501</sub> mit GST-LMP1 wt in ELISA-basierten Experimenten bei 4 °C und Raumtemperatur.** GST-LMP1 wt und GST-LMP1(A<sub>204</sub>xAxA) wurden auf der Oberfläche von ELISA-Platten immobilisiert und mit Konzentrationsreihen von His-TRAF2<sub>311-501</sub> inkubiert. Die  $S_{50}$  der gebildeten Komplexe wurden mit Hilfe des Programms Prism 5 berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten (bei 4 °C 30 μM und RT 100 μM jeweils nur 2 Datenpunkte). Zur Quantifizierung der Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> wurde der Umsatz von TMB durch den HRP-konjugierten Sekundärantikörper bestimmt (siehe Abb. 4.6). **A** Die Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wt und GST-LMP1(A<sub>204</sub>xAxA) bei 4 °C. **B** Die Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an die GST-LMP1-Protein bei Raumtemperatur. [RT - Raumtemperatur,  $S_{50}$  - halbmaximale Sättigung der Bindung, HRP - Meerrettichperoxidase, TMB - 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin]

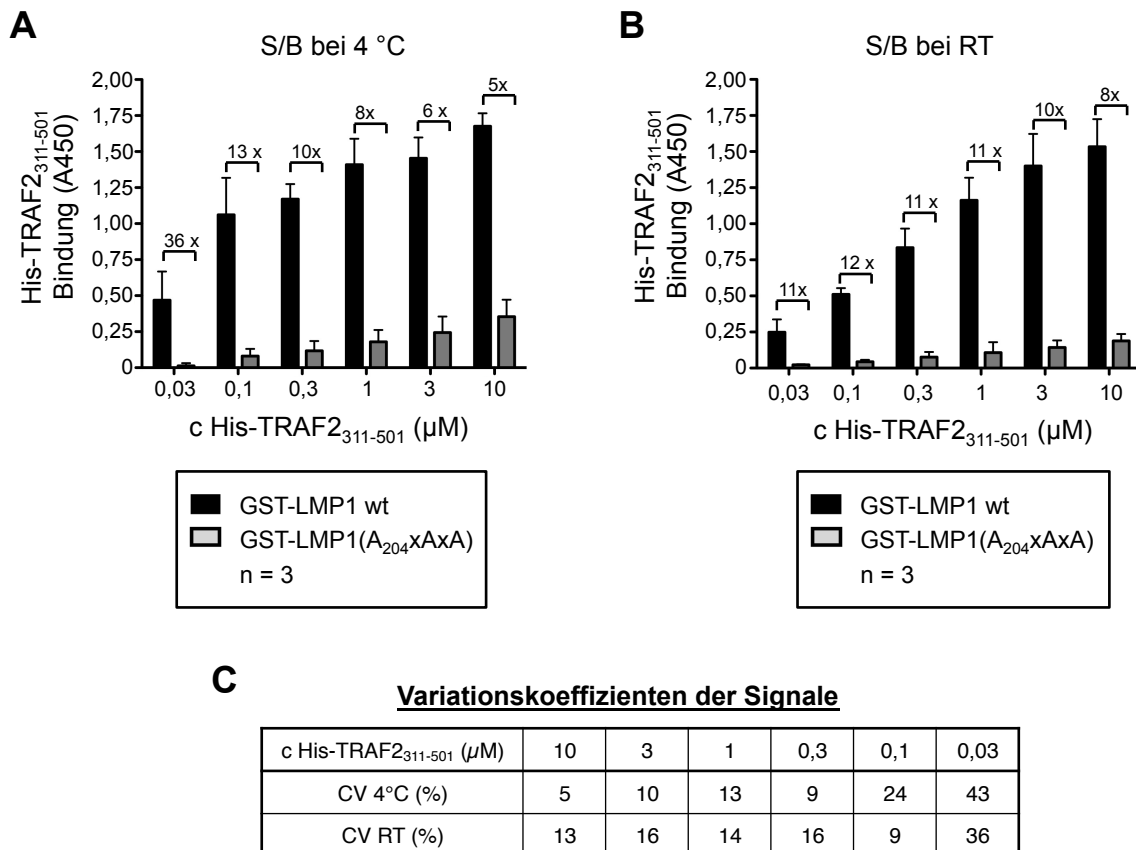
Für den Aufbau eines Screeningsystems ist jedoch nicht nur das absolute Signal der Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wt von Bedeutung. Ebenso ist die Differenz aus den Signalpopulationen von maximalem Signal, also der Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wt und dem Hintergrund, also Ansätze mit GST-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) und His-TRAF2<sub>311-501</sub>, sowie die Stabilität dieser Signalpopulationen zu einer gegebenen His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentration essenziell.

Für die Aufstellung des Screeningsystems wurden daher die Messwerte aus dem nicht gesättigten Bereich beider Reaktionen auf das Signal-zu-Hintergrund Verhältnis (S/B) hin analysiert (Abb. 4.8). Das S/B-Verhältnis bei Raumtemperatur war bei His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentrationen bis 3 µM konstant über 10, bei His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentrationen von 10 µM fiel das S/B-Verhältnis dann auf einen Faktor von 8. Bei Inkubationstemperaturen von 4 °C zeigte sich im Vergleich dazu eine höhere Varianz in den S/B-Verhältnissen. Während das S/B bei niedrigen TRAF2-Konzentrationen einen Faktor von 36 erreichte, fiel das S/B bei TRAF2-Konzentrationen über 0,3 µM unter den Faktor 8. Bei His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentrationen von 0,1 µM bis 0,3 µM zeigten sich bei beiden Inkubations-Temperaturen S/B-Werte von 10-fach bis 13-fach (Abb. 4.8 A und B). Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Aufstellung von screeningfähigen Systemen ist die Varianz der Signale. Das Durchsuchen großer Bibliotheken mit über 10<sup>4</sup> Molekülen nach potenziellen Inhibitoren für eine gegebene Interaktion erfordert selbstverständlich eine Anordnung der Substanzen auf mehreren (in diesem Fall ELISA-) Platten und daher oft mehrtägige Experimente aufgrund des großen Probendurchsatzes. Eine Vergleichbarkeit der Experimente verschiedener Tage ist dabei von großem Interesse. Für die Auswertung der konzentrationsabhängigen ELISA-basierten Experimente sind deshalb jeweils drei unabhängige, an verschiedenen Tagen durchgeführte Experimente verwendet worden (Abb. 4.7 und 4.8).

Um herauszufinden, bei welchen Bedingungen die Varianz der Signale aus den verschiedenen Ansätzen am geringsten war, wurde der Variationskoeffizient (CV) der Signalpopulationen bestimmt (Abb. 4.8 C). In den ELISA-basierten Experimenten mit His-TRAF<sub>311-501</sub>-Konzentrationen von 0,3 bis 10 µM lag der CV der Signalpopulationen jeweils unter 20 %. Die ELISA-Ansätze mit geringeren His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentrationen als 0,3 µM zeigten zwar sehr gute S/B-Verhältnisse, aber CVs von über 20 %, die einzige Ausnahme zeigte die Konzentration 0,1 µM bei der Inkubation bei Raumtemperatur (CV = 9 %). Bei beiden Inkubationstemperaturen ließ sich ein ähnlicher Trend beobachten. Bei höheren His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentrationen (>0,3 µM) lagen die Werte der CVs jeweils unter 20 %. Bei geringeren His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentrationen stieg der CV über 20 %. Die geringste Variation der Signale, 5 % bei der Inkubationstemperatur von 4 °C, zeigte sich bei der His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentration von 10 µM. Der zweitniedrigste CV der Signale bei 4 °C betrug

9 % und war bei einer His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  zu beobachten. Bei Raumtemperatur wiesen dagegen His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{M}$  ebenfalls eine sehr geringe Varianz von 9 % auf.

Bei His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentrationen von 0,03  $\mu\text{M}$  bis zu 0,3  $\mu\text{M}$  waren also bei beiden Inkubationstemperaturen die S/B-Verhältnisse größer oder gleich 10. Dabei befand sich in diesen Konzentrationsbereich die Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wt noch nicht in der Sättigung (siehe Abb. 4.7 und 4.8). Die Varianz der Signale bei TRAF2-Konzentrationen ab 0,3  $\mu\text{M}$  war gering (CVs < 20 %) und sollte so die Aufstellung eines stabilen Systems gewährleisten.



**Abb. 4.8: Analyse des S/B-Verhältnisses bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen.** Das S/B-Verhältnis der Daten wurde aus den ELISA-basierten Experimenten zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten (Abb. 4.7) der Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wt und GST-LMP1(A<sub>204</sub>xAxA) bei 4 °C (**A**) und RT (**B**) berechnet. Das höchste S/B-Verhältnis der Interaktion von His-TRAF2<sub>311-501</sub> mit GST-LMP1 wt zum Hintergrund, also dem Restsignal aus den Ansätzen mit GST-LMP1(A<sub>204</sub>xAxA) mit His-TRAF2<sub>311-501</sub>, konnte bei den Inkubationstemperaturen von 4 °C mit einer TRAF2-Konzentrationen von 0,03  $\mu\text{M}$  erreicht werden. **C** Variationskoeffizienten der Signale aus (**A**) und (**B**). Der Variationskoeffizient der Interaktion von His-TRAF2<sub>311-501</sub> mit GST-LMP1 liegt bei beiden Inkubationstemperaturen für His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentrationen  $\geq 0,3 \mu\text{M}$  unter 20 %. Die Daten wurden aus jeweils drei unabhängigen Experimenten ermittelt. [S/B - Signal zu Hintergrund, RT – Raumtemperatur]

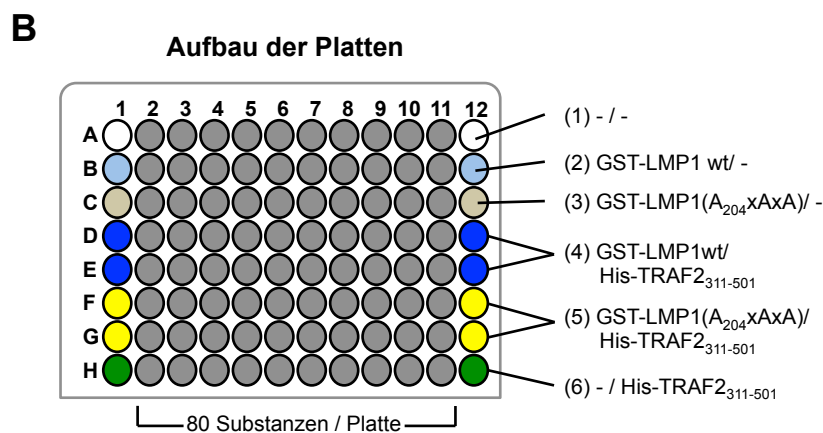
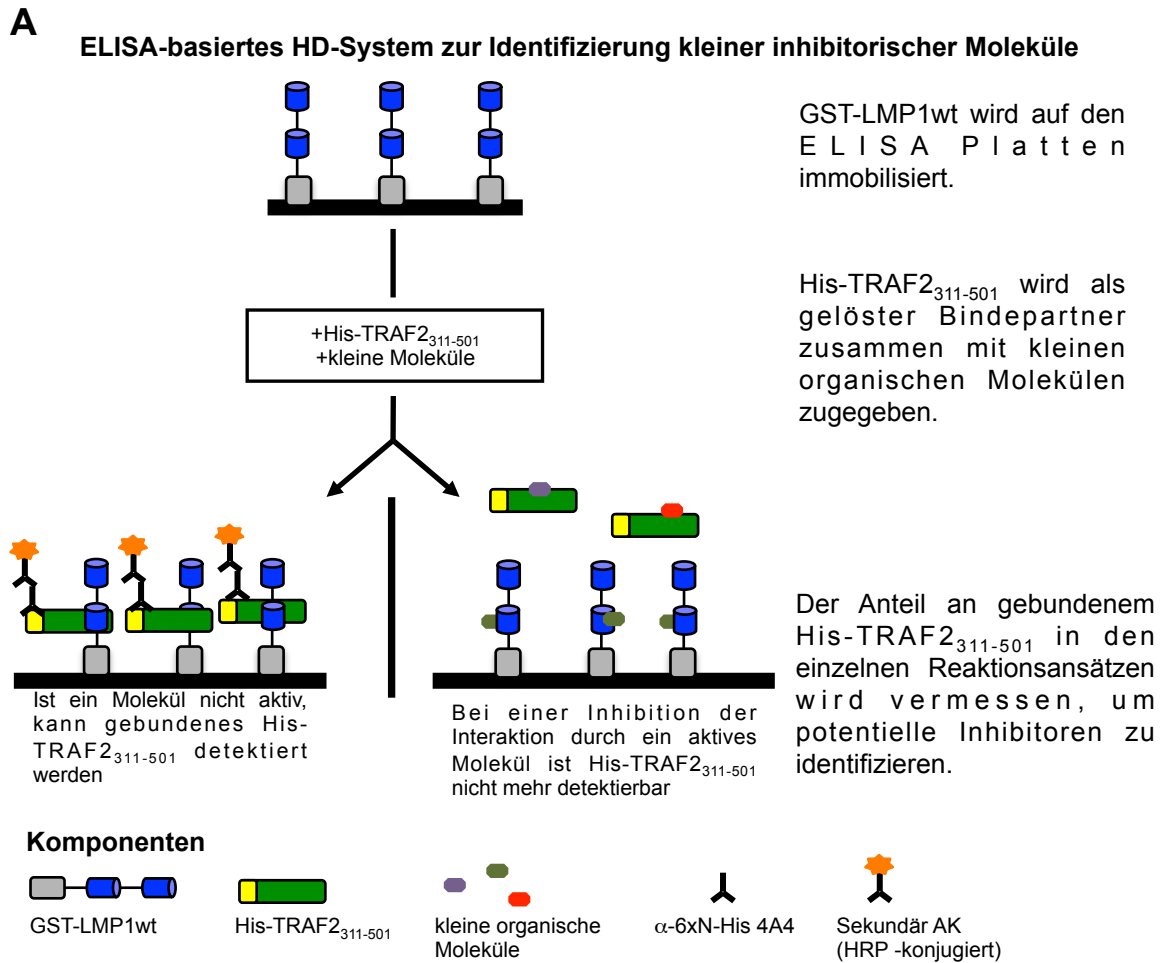
Für den Aufbau eines Screening-Systems basierend auf diesen Experimenten, wäre die Durchführung der Inkubation von His-TRAF2<sub>311-501</sub> mit GST-LMP1-Proteinen und den Substanzen aus Molekülbibliotheken sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4 °C bei His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentrationen zwischen 0,1 und 1 µM möglich. Da jedoch das Labor, in dem diese Experimente durchgeführt wurden, nur begrenzt klimatisiert war (durchschnittliche Raumtemperatur ca. 26 °C), konnten Temperaturschwankungen um  $\pm 2$  °C zwischen verschiedenen Tagen auftreten. Eine gleichmäßige Inkubation bei Raumtemperatur über mehrere Tage ist somit zwar wahrscheinlich, konnte aber nicht absolut garantiert werden. Dies sprach somit für eine Durchführung des Screens bei 4°C.

#### 4.4 Screening der AnalytiCon Discovery-Bibliothek

Basierend auf den bisher gewonnenen Erkenntnissen wurde also ein ELISA-basiertes System zur Suche nach potentiellen Inhibitoren der Interaktion von LMP1 mit TRAF2 in Bibliotheken mit kleinen organischen Molekülen mit folgenden Parametern etabliert: GST-LMP1 wt wurde als Ligand an den ELISA-Platten immobilisiert und mit His-TRAF2<sub>311-501</sub> zusammen mit den Substanzen aus der Bibliothek inkubiert. Das System ist in der Abbildung 4.9 A dargestellt. Gebundenes His-TRAF2<sub>311-501</sub> wurde durch die Verwendung des  $\alpha$ -N-6x His-Antikörpers 4A4 detektiert, der gegen das 6xHis-Epitop von His-TRAF2<sub>311-501</sub> gerichtet war.

Zur Quantifizierung der Menge an gebundenem His-TRAF2<sub>311-501</sub> in den einzelnen Ansätzen wurde der Substratumsatz von TMB durch die Meerrettichperoxidase des Sekundärintikörpers vermessen. Einen Treffer, also einen potenziellen Inhibitor, zeigte in diesem System also eine geringere Signalintensität in einem Ansatz im Vergleich zu einem Referenzsignal aus Kontrollansätzen ohne Kompetitoren.

Die ELISA-Platten wurden für die Durchführung der Experimente so arrangiert, dass auf jeder Platte 80 Substanzen auf ihre potentielle inhibitorische Wirkung getestet werden konnten (Abb. 4.9 B). Jede Platte wurde weiterhin mit 6 Kontrollen ohne Inhibitoren in verschiedenen Replikaten ausgestattet. Als Referenz für die maximale Signalausbeute und Positivkontrolle für die Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wt waren auf jeder Platte 4 Ansätze ohne Inhibitor vorgesehen. Als Hintergrundkontrolle und Referenz für die minimale Signalausbeute wurden 4 Ansätze mit GST-LMP1(A<sub>204</sub>xAxA) und His-TRAF2<sub>311-501</sub> verwendet. Weiterhin wurden 3 mal 2 Antikörperkontrollen, also 2 Ansätze ohne GST-LMP1 wt und ohne His-TRAF2<sub>311-501</sub>, und 2 Ansätze mit GST-LMP1 wt ohne His-TRAF2<sub>311-501</sub> und 2 Ansätze mit GST-LMP1(A<sub>204</sub>xAxA) verwendet.



**Abb. 4.9: Aufbau des ELISA-basierten Systems zur Identifizierung kleiner inhibitorischer Moleküle.** **A** Ablauf des ELISA-basierten-Systems. Als erstes wurde GST-LMP1 wt auf den ELISA-Platten immobilisiert und dann mit His-TRAF2<sub>311-501</sub> zusammen mit Bibliotheken kleiner organischer Moleküle inkubiert. Die Interaktion von GST-LMP1 wt mit His-TRAF2<sub>311-501</sub> wurde detektiert durch Zugabe des  $\alpha$ -N-6xHis-Antikörpers 4A4. Durch die Quantifizierung des Substratumsatzes eines HRP-konjugierten Sekundärantikörpers, gerichtet gegen den  $\alpha$ -N-6xHis-Antikörper, wurde die Menge an gebundenem His-TRAF2<sub>311-501</sub> bestimmt. **B** Arrangement der einzelnen Ansätze auf den ELISA-Platten. Jede Platte wurde so organisiert, dass darauf 80 Substanzen getestet werden konnten (grau). Weiterhin enthielt jede Platte 6 verschiedene interne Kontrollen ohne Inhibitoren in mehrfacher Ausführung in der angezeigten Anordnung: (1, weiß) Ansätze ohne GST-LMP1 wt und His-TRAF2<sub>311-501</sub> (Hintergrund des Systems), (2, hellblau) GST-LMP1 wt ohne His-TRAF2<sub>311-501</sub> (Kontrolle zum Ausschluss unspezifischer Interaktion der Antikörper mit GST-LMP1 Proteinen), (3, braun) GST-

LMP1(A<sub>204</sub>XAxA)/ ohne His-TRAF2<sub>311-501</sub>, (4, **dunkelblau**) Positivkontrolle (maximale Signalausbeute): Interaktion von GST-LMP1 wt mit His-TRAF<sub>311-501</sub> (ohne inhibitorische Moleküle). (5, **gelb**) Negativkontrolle: Hintergrund der Assoziation von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) (6, **grün**) His-TRAF2<sub>311-501</sub> ohne GST-LMP1 wt (Ausschluss der unspezifischen Interaktion von His-TRAF2<sub>311-501</sub> mit der ELISA-Platte). [AK - Antikörper]

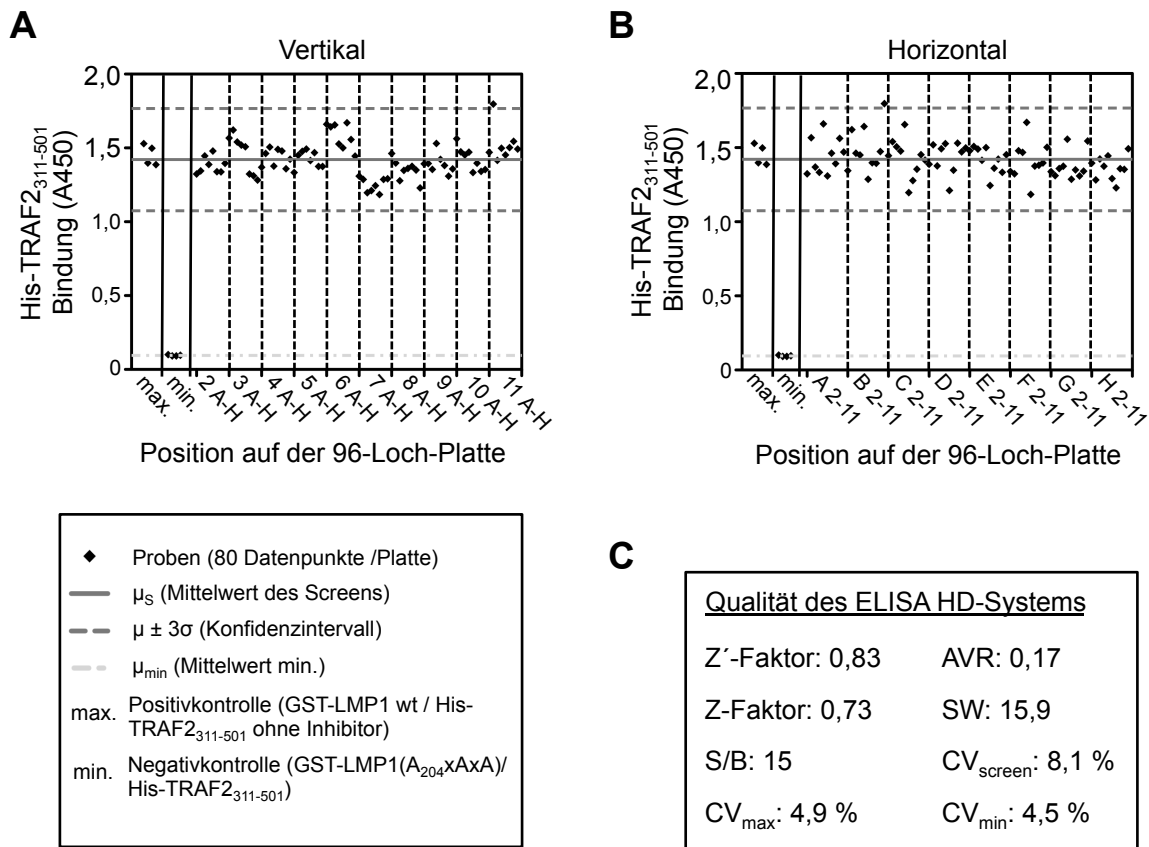
Als letztes wurde noch eine Kontrolle mit 2 Ansätzen ohne GST-LMP1 wt mit His-TRAF2<sub>311-501</sub> angesetzt, um unspezifische Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an die ELISA-Platten auszuschließen.

#### 4.4.1 Testdurchlauf des ELISA-basierten Systems

Um zu überprüfen, ob das ELISA-basierte System den Parametern für die Durchführung eines Screeningsystems gerecht wird, wurde ein Testdurchlauf bei 4°C ohne Testsubstanzen über eine komplette 96-Loch ELISA-Platte durchgeführt (Abb. 4.10). His-TRAF2<sub>311-501</sub> wurde in diesem Experiment in einer Konzentration von 150 µM eingesetzt. Diese Konzentration wurde als Mittel aus der His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentration mit dem zweitbesten S/B-Verhältnis (S/B von 13 bei 0,1 µM His-TRAF2<sub>311-501</sub>) für eine gute Signalausbeute und der Konzentration von His-TRAF2<sub>311-501</sub> mit der zweit geringsten Signalvarianz (0,3 µM, CV = 9 %, S/B = 10) aus dem dynamischen Bereich der Bindung bei 4°C in den Vorversuchen ausgewählt (Abb. 4.7 A und Abb. 4.8 A, C).

Dieser Testdurchlauf zeigte die hohe Qualität des in dieser Arbeit entwickelten ELISA-basierten Systems. Die erhaltenen Messwerte aus den einzelnen Ansätzen wurden graphisch in zwei Darstellungen aufgearbeitet und sind in den Abbildungen 4.10 A und 4.10 B dargestellt. Beide Grafiken zeigen die Signalausbeute der 80 Ansätze, in welchen im späteren Verlauf die Substanzen getestet werden sollen, im Vergleich zu den Referenz-Ansätzen für maximale Signalausbeute (max.) und Hintergrund (min.).

Die Signale des Testdurchlaufs wurden sowohl nach vertikalen Reihen auf der Platte (2 A-H, 3 A-H, ...) als auch horizontalen Reihen (A 2-11, B 2-11, ...) aufgetragen, um eventuelle, systembedingte Muster z.B. auf- oder absteigende Signalstärken durch die Reihenfolge, in welcher die Reaktionsansätze fertiggestellt wurden, zu detektieren (Pipettierschema mit der Mehrkanalpipette siehe 3.3.12). Die Signale aus dem Testdurchlauf zeigten jedoch eine randomisierte Verteilung um den Mittelwert ( $\mu$ ) der Signalpopulation, also keine systembedingten Muster, die durch die Reihenfolge entstanden sind, in der die einzelnen Ansätze pipettiert wurden (Abb. 4.10 A und B).



**Abb. 4.10: Qualitätsanalyse des ELISA-basierten Systems zur Identifizierung kleiner inhibitorischer Moleküle.** **A + B** Analyse der Werte aus einem Testdurchlauf des ELISA-basierten Systems zur Identifizierung von spezifischen LMP1-TRAF2-Inhibitoren. Die ELISA-Platte wurde, wie in Abb. 4.9 beschrieben, mit den GST-LMP1-Proteinen bestückt und ein Testdurchlauf mit His-TRAF2<sub>311-501</sub> ohne Substanzen durchgeführt. Die gemessenen Werte der Platten wurden graphisch nach Block (A) 2 A-H, 3 A-H... und nach Reihe (B) A 2-11, B 2-11,... aufgetragen. Die Datenpunkte zeigen in beiden Fällen eine randomisierte Verteilung um den Median und keinen systematischen Drift oder andere Quellen von Datenvariabilität bedingt durch systematische Fehler. Keiner der Datenpunkte überschreitet das 99,73 %-Konfidenzintervall der Signalpopulation. Gezeigt sind die 80 Positionen, auf denen im weiteren Verlauf die Substanzen analysiert werden sollen, sowie die Daten der Positivkontrolle (GST-LMP1 wt/His-TRAF2<sub>311-501</sub>) und Negativkontrolle (GST-LMP1(A<sub>204</sub>xAxA)/ His-TRAF2<sub>311-501</sub>), die zur Qualitätskontrolle jeder Platte verwendet werden (siehe Abb. 4.9). Alle Arbeitsschritte wurden per Hand durchgeführt (Pipettierschema siehe 3.3.12). **C** Das entwickelte ELISA-basierte System zur Identifizierung von Inhibitoren gegen die Interaktion von LMP1 und TRAF2 erfüllt alle Kriterien eines HD-fähigen Systems. Die Werte des Z'-Faktors und des Z-Faktors waren größer 0,5 und korrespondierend hierzu die AVR kleiner 0,6. Die Signalstärke der Positivkontrolle war um mehr als 15-fach höher als das Signal der Negativkontrolle. Ebenso lagen die Variationskoeffizienten aller Signalpopulationen auf der Testplatte (CV<sub>screen</sub>: 80 Positionen, die später verwendet werden, um die Substanzen zu testen, CV<sub>max</sub>- CV der Positivkontrolle und CV<sub>min</sub>- CV der Negativkontrolle), unter 10%. Das System bietet also ein stabiles Signalfenster für die Testung großer Bibliotheken. [S/B - Signal zu Hintergrund, AVR - assay variability ratio, SW - signal window]

In Übereinstimmung mit den Vorversuchen hatte der Testscreen ein sehr gutes S/B-Verhältnis von 15 und eine geringe Varianz der Signale (CV<sub>screen</sub> von 8,1 %). Dieser CV<sub>screen</sub> zeigt die Varianz der 80 Positionen untereinander, welche im weiteren Verlauf die



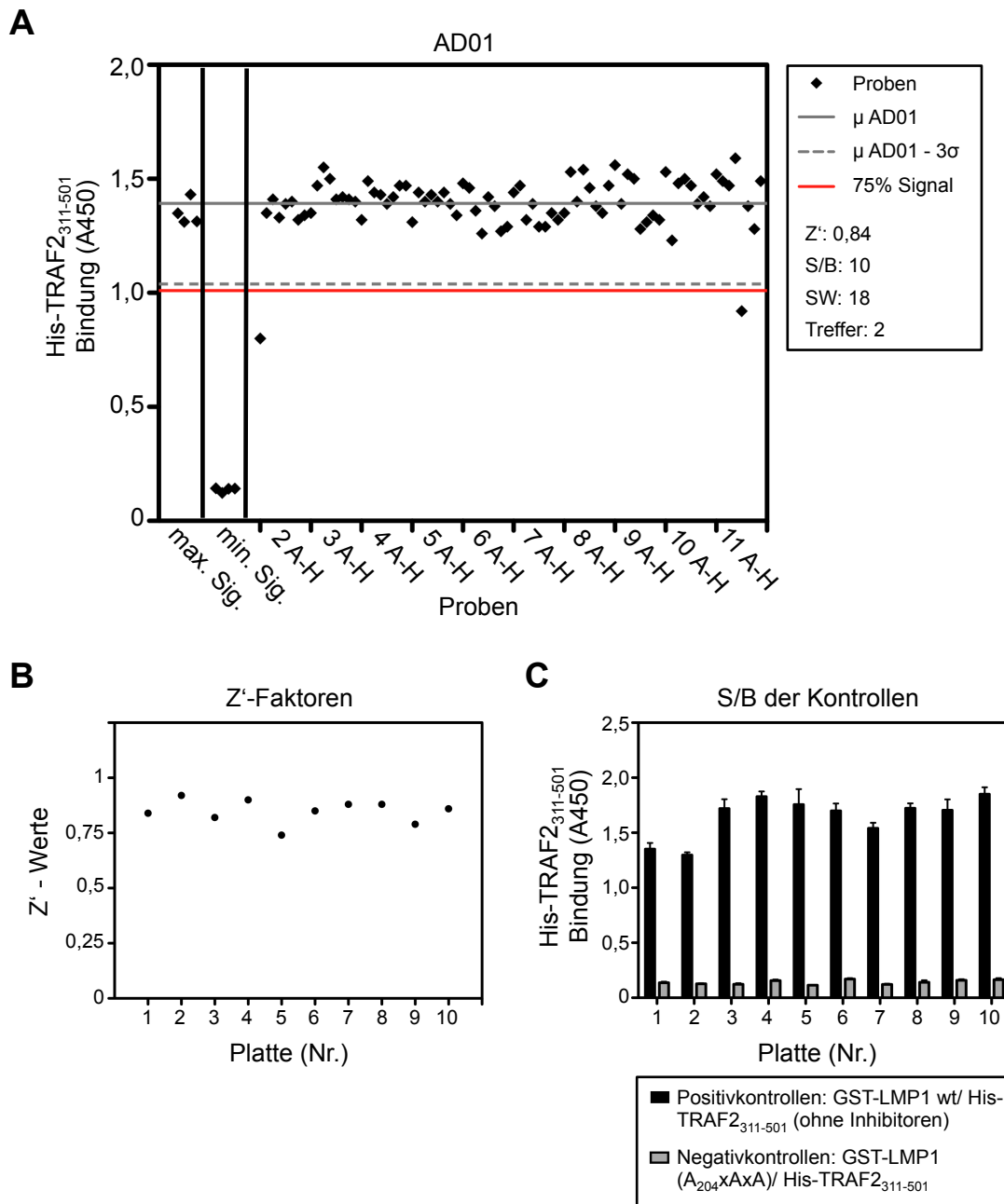
Testsubstanzen enthalten sollen. Entsprechend dazu zeigten der Z'- und Z-Faktor sowie die AVR die Stabilität des etablierten Systems. Der Z'-Faktor betrug 0,83 und korrespondierend hierzu die AVR: 0,17. Der Z-Faktor betrug 0,73. Ausgezeichnete Systeme zur Identifizierung von Inhibitoren haben per Definition Z-Faktoren über 0,5, bzw. AVR's unter 0,4 (Zhang *et al.*, 1999; Iversen *et al.*, 2006; Iversen *et al.*, 2012), und diese Kriterien wurden somit von dem vorliegenden ELISA-basierten System erfüllt (Abb. 4.10 C).

#### 4.4.2 Identifizierung spezifischer LMP1-TRAF2-Inhibitoren

Das etablierte ELISA-basierte System wurde nun zur Identifizierung kleiner Moleküle eingesetzt, die spezifisch die Interaktion zwischen LMP1 und TRAF2 inhibieren. Dafür wurde eine von AnalytiCon Discovery (AD) erworbene Bibliothek mit 800 kleinen organischen Molekülen nach potentiellen Inhibitoren durchsucht. Bei diesen 800 Substanzen handelt es sich um Naturstoffe, die sowohl aus Pflanzen als auch aus Mikroorganismen isoliert wurden. Das durchschnittliche Molekulargewicht dieser Substanzen beträgt 281,05 Da. Der Screen dieser Bibliothek wurde auf zehn Platten, also mit jeweils 80 Substanzen pro Platte, arrangiert (siehe Abb. 4.9 B). Die Substanzen der Bibliothek waren bei der Lieferung in DMSO mit einer Konzentration von 5 mg/mL gelöst. Für den Screen wurden die Substanzen um den Faktor 1:1000 in TBS verdünnt und somit mit einer Endkonzentration von 5 µg/mL eingesetzt. Dies entspricht einer durchschnittlichen molaren Konzentration von ~18 µM der Substanzen in den einzelnen Ansätzen. Die höchste Konzentration von 39,6 µM hatte eine Substanz mit einem Molekulargewicht von 126,11 Da, die geringste Konzentration von 11,2 µM hatte eine Substanz mit einem Molekulargewicht von 447,5 Da.

Der Screen wurde über 5 Tage durchgeführt, mit jeweils 2 Platten pro Tag. Als Qualitätskontrolle wurden für jede Platte der Z'-Faktor, der Z-Faktor, die AVR, das SW und das S/B-Verhältnis berechnet. In der Abbildung 4.11 A ist exemplarisch das Ergebnis der Platte AD01 gezeigt. Die Ergebnisse aller Platten befinden sich im Anhang 2.

Der Screen der AD-Bibliothek bestätigte das große Potential, das in dem etablierten ELISA-basierten System steckt. Die Z'-Faktoren aller Platten waren ausnahmslos größer 0,5 (siehe Abb. 4.11 B und Anhang 3). Der geringste Z'-Faktor betrug 0,74 (Platte AD05), der höchste Z'-Faktor 0,92 (Platte AD02). Korrespondierend hierzu war die AVR aller Platten unter 0,26. Weiterhin waren die Kontrollen auf den Platten korrekt gewählt, der Z'-Faktor jeder Platte war größer als der jeweilige Z-Faktor (vgl. Abschnitt 1.5.4 und Anhang 3). Der Z'-Faktor, der Z-Faktor, das S/B, das SW sowie die AVR und die Anzahl der Treffer jeder Platte sind in einer Tabelle im Anhang 3 zusammengefasst.



**Abb. 4.11: Ergebnisse des Screens der AnalytiCon Discovery (AD)-Bibliothek.** Die AD-Bibliothek umfasst 800 Substanzen, die auf zehn 96-Loch-Platten arrangiert wurden (AD01-AD10). **A** Ergebnis der Platte AD01. Auf der Platte AD01 konnten 2 Substanzen, AD01-A02 und AD01-E11, identifiziert werden, die die Bindung von TRAF2 um mehr als 25 % (75 % Restsignal) inhibierten. Die Ergebnisse der anderen 9 Platten befinden sich im Anhang 2. **B** Die Z'-Faktoren der einzelnen Platten des Screens der AD-Bibliothek. Die Z'-Faktoren aller Platten waren jeweils größer als 0,74. Das etablierte ELISA-basierte System ist dementsprechend sehr robust und geeignet für das Screening großer Bibliotheken. **C** Analyse des Signal-zu-Hintergrund (S/B)-Verhältnis der Kontrollen der 10 Platten. Gezeigt ist das maximale Signal jeder Platte aus der Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wt im Vergleich zu dem Hintergrund, also der Interaktion von His-TRAF2<sub>311-501</sub> mit GST-LMP1(A<sub>204</sub>xAxA). Das S/B-Verhältnis betrug durchschnittlich 1:12 (siehe hierzu auch Anhang 3). Der Variationskoeffizient der maximalen Signale über die verschiedenen Platten betrug  $CV_{max} = 11,8\%$  und zeigte somit nur eine geringfügige Tag-zu-Tag Varianz. [max Sig. - maximales Signal (Positivkontrolle), min. Sig. - minimales Signal (Hintergrund),  $\mu$  - Mittelwert,  $\sigma$  - Standardabweichung, SW - Signalfenster]

Das ELISA-System ist also sehr robust und für die Durchführung von Screens großer Bibliotheken geeignet. Für jede Platte wurde weiterhin der Mittelwert ( $\mu$ ) der Signale aus dem Screen sowie das Rauschen ( $\mu \pm 3 \sigma$ ) dieser Signalpopulation berechnet (Abb. 4.11 A). Das Rauschen kann theoretisch als Grenze für die Identifizierung von Treffern definiert werden, da es einem 99,73 % Konfidenzintervall entspricht (Zhang *et al.*, 1999). In der Praxis werden jedoch oft stringenter Kriterien, wie zum Beispiel die Reduktion der Signale um 50 % als feste Grenze gesetzt (Sittampalam *et al.*, 1997). Da die Breite von Normalverteilungen, in diesem Fall dem Rauschen, einer Signal-Populationen durch die Standardabweichung dieser Population definiert wird, unterliegt diese somit den Schwankungen der einzelnen Signale vom Mittelwert und ist variabel. Wenn sich auf einer Platte mehrere Treffer befinden, wird somit die Standardabweichung bzw. das Rauschen größer und die Treffergrenze verschoben. Somit wäre die Treffergrenze für jede Platte unterschiedlich. Dies sollte vermieden werden und daher wurde für die Identifizierung von Inhibitoren als feste Grenze die Inhibition von 25 % des Signals festgelegt, also einem Restsignal des jeweiligen Ansatzes von höchstens 75 % im Vergleich zu der Kontrolle des maximalen Signals. Aus der AD-Bibliothek konnten mit diesem Verfahren 11 Substanzen identifiziert werden, die in dem Screen diese oder eine größere Inhibition des Signals zeigten. Diese Substanzen werden zur Vereinfachung der Nomenklatur im weiteren Verlauf dieser Arbeit mit den Koordinaten der jeweiligen Plattenposition bezeichnet. Alle Treffer sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Zur Bestätigung des Screens wurde zusätzlich jede der 11 Substanzen ein zweites Mal in dem ELISA-System getestet und bestätigt. Den größten inhibitorischen Effekt im Screen hatte die Substanz AD05-C05 mit einer Inhibition von 58 % des Signals, gefolgt von den Substanzen AD05-A07 (42 % Inhibition) und AD01-A02 (41 % Inhibition). Von den 11 identifizierten Treffern sind 9 der Substanzen mikrobieller Herkunft, 2 weitere Substanzen wurden aus Pflanzen isoliert. Das Molekulargewicht der Substanzen beträgt zwischen 162,15 Da (AD09-G09) und 312,28 Da (AD05-F07).

Um jedoch noch genauere Aussagen über die Inhibition der Bindung von TRAF2 an LMP1 durch die einzelnen Substanzen treffen zu können, wurde versucht für jede der Substanzen die halbmaximale inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) zu bestimmen. Hierfür wurde zunächst anhand der Substanz AD01-E11 untersucht, ob die Inhibition der Interaktion von GST-LMP1 wt mit His-TRAF2<sub>311-501</sub> sowohl bei Inkubationstemperaturen von 4 °C (Inkubationstemperatur des Screens der AD-Bibliothek) als auch bei RT beobachtet werden kann (Abb. 4.12). Hierfür wurden Konzentrationsreihen in einem Konzentrationsbereich von 0,01-300  $\mu$ M von AD01-E11 als Kompetitor zu His-TRAF2<sub>311-501</sub> und GST-LMP1 wt auf zwei verschiedenen ELISA-Platten in einem parallelen Experiment bei 4 °C und Raumtemperatur inkubiert. Als Endkonzentration von His-TRAF2<sub>311-501</sub> wurden 0,3  $\mu$ M eingesetzt (Abb. 4.12).

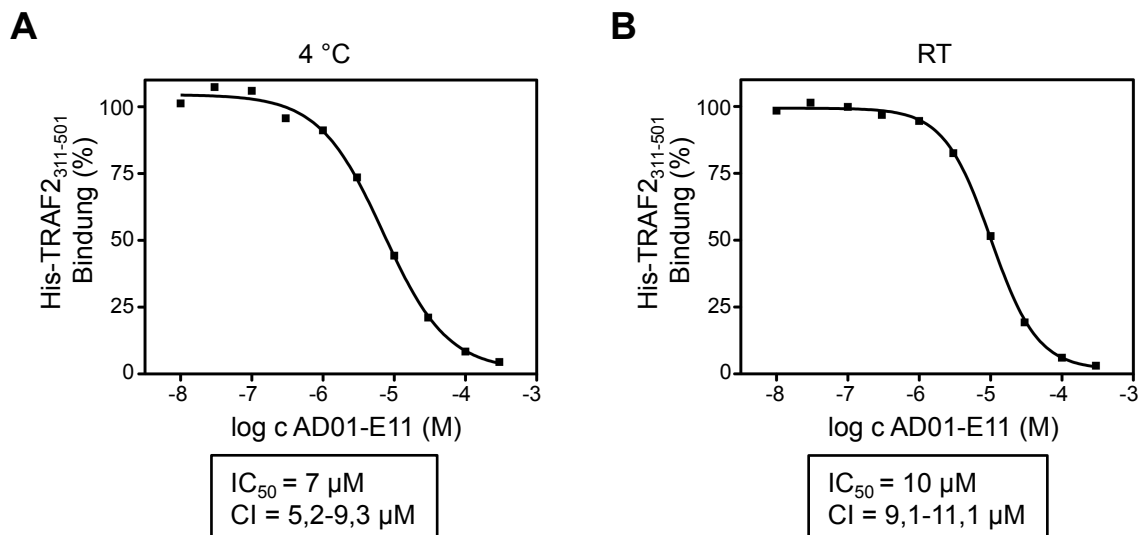
**Tabelle 4.1: Treffersubstanzen aus der AD-Bibliothek.** In dem ELISA-basierten Screen mit dem Ziel, inhibitorische Substanzen gegen die Interaktion von LMP1 mit TRAF2 zu finden, konnten 11 Substanzen aus der AD-Bibliothek als Treffer identifiziert werden. Diese Substanzen reduzierten mehr als 25 % der Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wt, gemessen im Verhältnis zu dem maximalen Signal (GST-LMP1 wt/ His-TRAF2<sub>311-501</sub> ohne Inhibitor) im Primärscreen. [M - mikrobielle Herkunft, P - pflanzliche Herkunft, MW - Molekulargewicht]

**Treffersubstanzen aus der AD Bibliothek**

Substanz (Platte-Position)	Summenformel	MW (Da)	Reduktion der Bindung von His- TRAF2 an GST- LMP1 (%)	Quelle	Reinheit (%) (Angaben laut Lieferant)
AD01-A02	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	218,25	41	M	100
AD01-E11	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	298,25	32	M	100
AD05-A07	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	212,25	42	M	88
AD05-C05	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	244,29	58	M	73
AD05-D10	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	375,47	30	M	100
AD05-F07	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312,28	28	P	98
AD09-F05	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	224,22	26	M	100
AD09-G09	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	162,15	27	P	100
AD09-H02	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	234,3	30	M	74
AD10-C06	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	284,27	28	M	72
AD10-H08	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	224,22	29	M	99

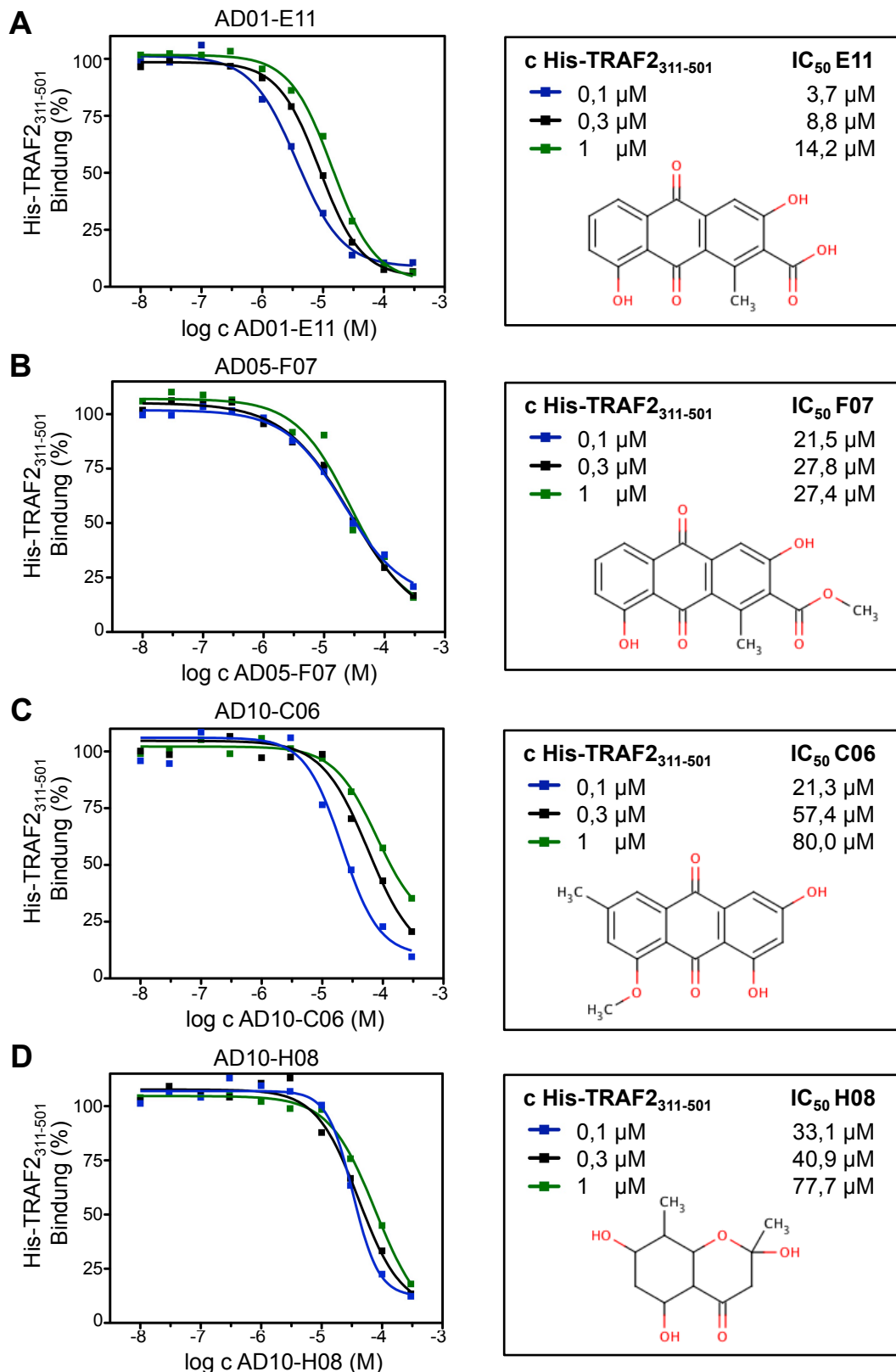
Diese Konzentration wurde ausgewählt, da der Unterschied in der Signalstärke aus ELISA-Experimenten bei 4 °C und Raumtemperatur hier nicht so groß war, wie bei der TRAF2-Konzentration von 0,15 µM, die in dem Screen (Inkubationstemperatur 4°C) verwendet wurde (siehe Abb. 4.7 und 4.8). Die Signale beider ELISA-Experimente wurden quantifiziert und für die Bestimmung der jeweiligen IC<sub>50</sub> in Prozent des Signals im Vergleich zu einer Referenz (maximale Signalausbeute) umgewandelt. Die prozentualen Anteile der Signale aus den einzelnen Ansätzen wurden über dem Logarithmus der Konzentration des Inhibitors aufgetragen und im Programm Prism 5 mit dem Modell „*log(Inhibitor) vs. response – Variable slope (four parameters)*“ analysiert (nach: Beck *et al.*, 2012).

Die Interaktion von GST-LMP1 wt mit His-TRAF2<sub>311-501</sub> wurde in diesem Experiment sowohl bei der Inkubationstemperaturen von 4 °C als auch bei der Durchführung des Experiments bei Raumtemperatur durch den Inhibitor AD01-E11 inhibiert. Die IC<sub>50</sub> von AD01-E11 für die Inhibition des Komplexes aus LMP1-TRAF2 betrug bei 4 °C 7 µM, bei Raumtemperatur 10 µM (Abb. 4.12).



**Abb. 4.12: Der Inhibitor AD01-E11 inhibiert die Bindung von TRAF2 an LMP1 sowohl bei 4 °C als auch bei Raumtemperatur.** Konzentrationsreihen (0,01-300 µM) von AD01-E11 wurden mit His-TRAF2<sub>311-501</sub> auf GST-LMP1 wt beschichteten ELISA-Platten bei 4 °C (**A**) und bei Raumtemperatur (**B**) inkubiert. Pro Ansatz wurden 0,3 µM His-TRAF2<sub>311-501</sub> eingesetzt. Die Inhibition der Bindung von TRAF2 an LMP1 durch die Substanz AD01-E11 konnte sowohl bei 4 °C als auch bei Raumtemperatur beobachtet werden, war also temperaturunabhängig. Die IC<sub>50</sub> wurden aus den Kurven mit dem Modell „log(Inhibitor) vs. response – Variable slope (four parameters)“ im Programm Prism 5 berechnet. Statt der Standardabweichung berechnet dieses Modell das 95 % Konfidenzintervall der IC<sub>50</sub>. [CI - Konfidenzintervall, RT - Raumtemperatur]

Da die IC<sub>50</sub> aus beiden Experimenten annähernd gleich war, wurde die Bestimmungen der IC<sub>50</sub> aller Treffersubstanzen aus dem Screen der AD-Bibliothek bei Raumtemperatur durchgeführt. Weil die IC<sub>50</sub> eines Inhibitors jedoch nicht nur von seiner Affinität zur Zielstruktur abhängt, sondern auch von der Konzentration der Zielstruktur in den einzelnen Ansätzen (Cochran, 2000), wurden die weiteren Experimente mit Konzentrationsreihen jeder Treffersubstanz (Konzentrationsbereich: 0,01-300 µM) bei jeweils 3 verschiedenen His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentrationen durchgeführt. Die His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentrationen wurden aus dem dynamischen Bereich der Interaktion zwischen His-TRAF2<sub>311-501</sub> und GST-LMP1 wt bei Raumtemperatur gewählt (siehe Abb. 4.7 B). Die niedrigste verwendete His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentration betrug 0,1 µM, die mittlere His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentration wurde so gewählt, dass sie der S<sub>50</sub> der Interaktion von GST-LMP1 wt und His-TRAF2<sub>311-501</sub> bei Raumtemperatur in den ELISA Experimenten entsprach (0,3 µM) und als höchste Konzentration wurden 1 µM His-TRAF2<sub>311-501</sub> in den Experimenten verwendet. Die erhaltenen Daten jeder Substanz aus den drei TRAF2-Konzentrationen einer Substanz wurden jeweils in Prozent des Signals im Vergleich zu einer Referenz umgewandelt und für jede Konzentration wurde mit dem Modell „log(Inhibitor) vs. response – Variable slope (four parameters)“ des Programms Prism5 die IC<sub>50</sub> berechnet (Abb. 4.13 sowie Anhang 4).



**Abb. 4.13: Verifizierung der Treffer aus dem Screen der AD-Bibliothek. A-D** Gezeigt sind die 4 Substanzen AD01-E11, AD05-F07, AD10-C06 und AD10-H08 deren IC<sub>50</sub> für die Inhibition der Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wt im niedrigen bis mittleren μM-Bereich lag. Alle Inhibitoren wurden in Konzentrationsreihen mit drei verschiedenen TRAF2-Konzentrationen, 1 μM, 0,3 μM und 0,1 μM, inkubiert. Für die Berechnung der IC<sub>50</sub> wurden die Werte in %-Bindung umgewandelt. Die IC<sub>50</sub> wurden mit dem Modell „log(Inhibitor) vs. response – Variable slope (four parameters)“ des Programms Prism 5 berechnet. **(A)** AD01-E11 **(B)** AD05-F07 **(C)** AD10-C06 **(D)** AD10-H08.

Unter den 11 Substanzen, die aus dem Screen der AD-Bibliothek als potentielle Inhibitoren hervorgingen, befand sich nur eine falsch-positiv identifizierte Substanz, AD05-C05. Alle anderen Treffersubstanzen zeigten eine Inhibition des Komplexes aus GST-LMP1 wt und His-TRAF2<sub>311-501</sub>.

Von diesen 10 bestätigten Treffern konnte für 6 Substanzen jeweils die IC<sub>50</sub> bestimmt werden. Aus diesen Treffern wiederum konnte einzig mit der Substanz AD01-E11 eine vollständige Inhibition der Interaktion bei den eingesetzten Substanz-Konzentrationen bei jeder His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentration in ELISA-basierten Experimenten gezeigt werden (siehe Abb. 4.12 und 4.13 A). Fünf weitere Substanzen, AD05-F07, AD10-H08, AD10-C06, AD5-A07 und AD09-G09, zeigten zwar eine konzentrationsabhängige Inhibition der Bindung von TRAF2 an LMP1, die verwendeten Substanz-Konzentrationen von maximal 300 µM reichten bei diesen Molekülen jedoch nicht aus, um bei allen TRAF2-Konzentrationen die Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wt komplett zu inhibieren (siehe Abb. 4.13 B, C und D sowie Anhang 4). In Übereinstimmung mit dem „Assay Guidance Manual“ (Beck *et al.*, 2012) wurden für diese Inhibitoren, bei denen die IC<sub>50</sub>-Konzentration (i) innerhalb der Testkonzentration (< 300 µM) lag, und (ii) für die mehr als ein Datenpunkt auf beiden Seiten der IC<sub>50</sub> gezeigt werden konnte, eine IC<sub>50</sub> berechnet. Für 4 der Treffer, AD01-A02, AD05-D10, AD09-F05 und AD09-H02, konnte daher keine IC<sub>50</sub> ermittelt werden, da die oben genannten Bedingungen nicht erfüllt wurden (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 4.2: Die IC<sub>50</sub> der Treffersubstanzen aus dem Screen der AD-Bibliothek.** Für jede Substanz wurde jeweils die IC<sub>50</sub> bei 3 verschiedenen TRAF2-Konzentrationen (0,1 µM, 0,3 µM und 1 µM) in ELISA-basierten Experimenten bei Raumtemperatur bestimmt (siehe hierzu auch Abb. 4.13 und Anhang 4). [n.b. - nicht berechenbar]

<b>IC<sub>50</sub>-Konzentrationen</b>			
c His-TRAF2311-501 (µM)	0,1	0,3	1
		<b>IC<sub>50</sub></b>	
AD01-E11	3,72	8,78	14,21
AD05-A07	42,87	65,28	305,3
AD05-F07	21,45	27,82	27,4
AD09-G09	81,25	102,7	286,6
AD10-C06	21,3	57,4	80
AD10-H08	33,1	40,9	77,7
AD01-A02	n.b.		
AD05-C05	n.b.		
AD05-D10	n.b.		
AD09-F05	n.b.		
AD09-H02	n.b.		

Wie erwartet zeigten die gemessenen Daten ebenfalls, dass die  $IC_{50}$  jeder Substanz für die Inhibition der Bindung von TRAF2 an LMP1 abhängig von der eingesetzten Menge an Proteinen war. Mit steigender His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentration in den Experimenten stieg die  $IC_{50}$ . Eine Ausnahme bildete die Substanz AD05-F07, bei der die  $IC_{50}$  bei den His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentrationen 0,3  $\mu$ M und 1  $\mu$ M identisch war (Abb. 4.13 B und Tabelle 4.2). Alle ermittelten  $IC_{50}$  sind in der Tabelle 4.2 zusammengefasst. Um im weiteren Verlauf einen besseren Überblick zu gewährleisten und um die erhaltenen Daten besser vergleichen zu können, beziehen sich die folgenden Vergleiche immer auf die  $IC_{50}$ , die bei der His-TRAF2<sub>311-501</sub>-Konzentration von 0,3  $\mu$ M berechnet wurde (Tabelle 4.2).

Der potenteste Inhibitor war die Substanz AD01-E11. Diese Substanz inhibierte die Interaktion zwischen His-TRAF2<sub>311-501</sub> und GST-LMP1 wt bereits mit einer  $IC_{50}$  von 8,78  $\mu$ M. Drei der identifizierten Substanzen inhibierten die Interaktion von TRAF2 mit LMP1 bei  $IC_{50}$ -Werten im zweistelligen  $\mu$ M-Bereich: AD05-F07 (27,82  $\mu$ M), AD10 C06 (57,4  $\mu$ M) und AD10-H08 (40,9  $\mu$ M). Die höchsten definierbaren  $IC_{50}$ -Werte zeigten die Substanzen AD05-A07 (65,28  $\mu$ M) und AD09-G09 (102,7  $\mu$ M). Die IUPAC-Bezeichnungen und Trivialnamen (soweit bekannt) der 6 Substanzen, für die eine  $IC_{50}$  bestimmt werden konnte, sind in Tabelle 4.3 aufgeführt.

Drei der identifizierten Substanzen, AD01-E11 (DMAC), AD05-F07 (Aloesaporanin I) und AD10-C06, haben ein Anthrachinon-Grundgerüst. AD01-E11 und AD05-F07 unterscheiden sich in der Anordnung ihrer funktionellen Gruppen nur durch einen Methylester in AD05-F07 statt einer Carboxylgruppe in AD01-E11.

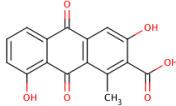
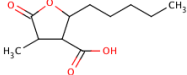
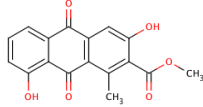
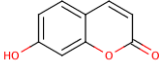
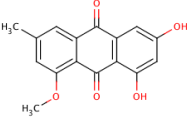
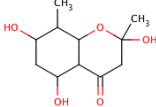
Die Substanz AD10-H08 besitzt ein Benzopyran-Grundgerüst, weist aber ebenfalls Ähnlichkeiten zu den funktionellen Gruppen der Substanzen AD01-E11 und AD05-F07 auf. Der Pyranring trägt ebenfalls wie die Substanzen AD01-E11 und AD05-F07 eine Carbonylgruppe in räumlicher Nähe zu der Hydroxylgruppe am Benzolring. Bei der Substanz AD09-G09 (Umbelliferon) handelt es sich ebenfalls um ein Benzopyran. AD09-G09 zeigt jedoch keine ähnliche Anordnung funktioneller Gruppen im Vergleich zu den anderen Substanzen.

Die Substanz AD05-A07 hat ein Tetrahydrofuran-Grundgerüst mit einer Pentylgruppe an der Position zwei des Tetrahydrofurgerüsts. Die Anordnung der Carbonyl-, Methyl- und Carboxyl-Gruppen ähnelt der Anordnung dieser Reste an dem Anthrachinon-Gerüst von AD01-E11 und AD05-F07.



**Tabelle 4.3: IUPAC und Trivialnamen der identifizierten Inhibitoren.**

[ID - Platte-Position, MW - Molekulargewicht]

<b>Identifizierte Inhibitoren</b>			
<b>ID</b>	<b>Struktur</b>	<b>IUPAC</b>	<b>Trivialname</b>
AD01-E11		3,8-Dihydroxy-1-methyl-9,10-dioxo-9,10-dihydro-2-anthracencarbonsäure	DMAC
AD05-A07		4-Methyl-5-oxo-2-pentyl-tetrahydrofuran-carbonsäure	
AD05-F07		1-Methyl-3,8-dihydroxy-9,10-dihydro-9,10-dioxoanthracene-2-carbonsäuremethylester	Aloesaponarin I
AD09-G09		7-Hydroxy-2H-chromen-2-on	Umbelliferon
AD10-C06		1,3-Dihydroxy-8-methoxy-6-methyl-9,10-anthrachinon	
AD10-H08		2,5,7-Trihydroxy-2,8-dimethyl-3H-1-benzopyran-4-on	

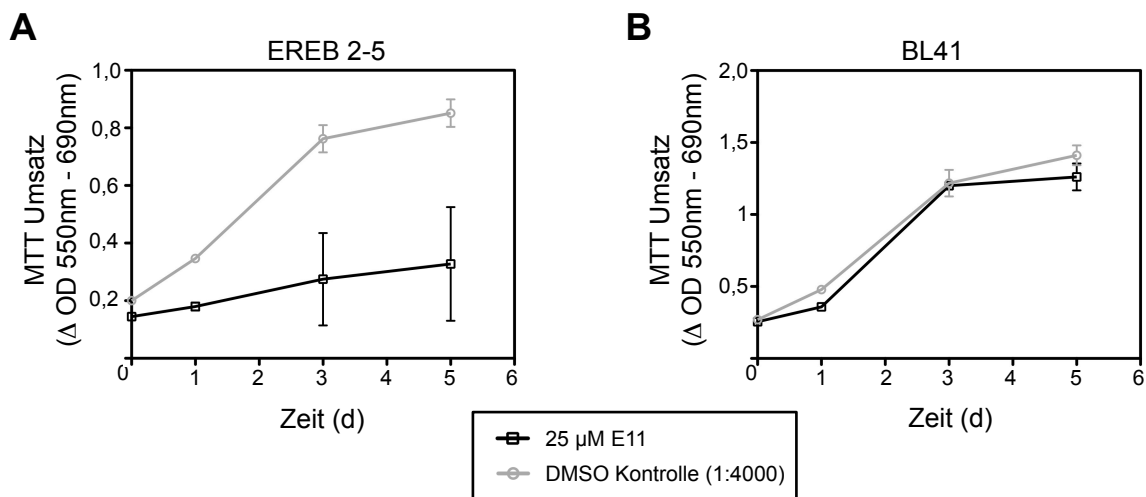
#### 4.4.3 Die Substanzen AD01-E11 und AD05-F07 haben eine spezifische Wirkung auf EBV-transformierte B-Zellen

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die identifizierten Substanzen eine Auswirkung auf die Vitalität von EBV-transformierten Zelllinien haben. Da LMP1-Proteine mit deletiertem TRAF-Interaktionsmotiv mehr als 85 % des Transformationspotentials verlieren (Dirmeier *et al.*, 2003) und die Negativregulation von TRAF2 durch die Inhibition von NF- $\kappa$ B in LCLs Apoptose auslöst (Guasparri *et al.*, 2008), sollten die Substanzen ähnliche Effekte in diesen Zellen erzeugen.

Daher wurden die beiden potentesten Inhibitoren, AD01-E11 und AD05-F07, ausgewählt, um deren Wirkung auf verschiedene B-Zellkulturen zu testen. Um die Vitalität der Zellen unter dem Einfluss der Inhibitoren zu bestimmen, wurde der Umsatz von MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch die Zellen gemessen. MTT ist ein Tetrazoliumsalz, das durch die Mitochondrien von Zellen reduziert wird. So kann die Vitalität einer Zellkultur bestimmt werden (Mosmann, 1983). Durch die Durchführung von MTT-

Experimenten über mehrere Tage können so auch Rückschlüsse auf die Proliferationsraten von Zellkulturen getroffen werden.

Die beiden Inhibitoren AD01-E11 und AD05-F07 wurden jeweils mit einer Endkonzentration von 25  $\mu\text{M}$  in den verschiedenen MTT-Experimenten eingesetzt. Bei dieser Konzentration wurde die Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wt durch AD01-E11 um ca. 75 % in den *in vitro* Experimenten inhibiert (siehe Abb. 4.12 und 4.13 A). Die Substanz AD05-F07 inhibierte bei dieser Konzentration ca. 50 % der Bindung von His-TRAF2<sub>311-501</sub> an GST-LMP1 wt (siehe Abb. 4.13 B). Zunächst wurde der Effekt der Substanz AD01-E11 auf die Vitalität von zwei verschiedenen humanen B-Zelllinien analysiert, der EBV-transformierten B-Zelllinie EREB 2-5 und der Burkitt-Lymphom-Zelllinie BL41, die nicht mit EBV infiziert ist. Da sich in Vorversuchen zeigte, dass die Proliferationsrate von EREB 2-5-Zellen gegenüber BL41-Zellen geringer war, wurden 7000 EREB 2-5-Zellen und 5000 BL41-Zellen pro experimentellem Ansatz ausgesät. Da die Substanzen in DMSO gelöst waren, wurden ebenfalls Kontrollexperimente mit einem äquivalenten Volumen an DMSO als Negativkontrolle durchgeführt (Abb. 4.14). Die Vitalität der Zelllinie EREB 2-5 wurde durch die Inkubation mit dem LMP1-TRAF2 Inhibitor AD01-E11 deutlich gehemmt. Der Umsatz von MTT durch die LCLs war in den Zellkulturansätzen merklich reduziert, die mit AD01-E11 behandelt wurden. Im Gegensatz dazu zeigten die EREB 2-5-Zellen, die nur mit DMSO behandelt wurden, einen stetigen Anstieg des Umsatzes von MTT (Abb. 4.14 A).



**Abb. 4.14: Die Substanz AD01-E11 hemmt die Vitalität von EBV-transformierten B-Zelllinien.** **A** Die Vitalität der EBV-transformierten B-Zelllinie EREB 2-5 wurde durch die Substanz AD01-E11 eingeschränkt. Durch die Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  der Substanz AD01-E11 wurde der Umsatz von MTT in den Zellkulturansätzen mit EREB 2-5-Zellen immens reduziert gegenüber EREB 2-5-Zellen, die nur mit einem äquivalenten Volumen DMSO (1 : 4000) inkubiert wurden. **B** Die Vitalität von BL41-Zellen wurde durch Addition von AD01-E11 zum Zellkulturmedium nicht inhibiert. Die Fehlerbalken zeigen jeweils die Standardabweichung aus Triplikaten eines Experiments.

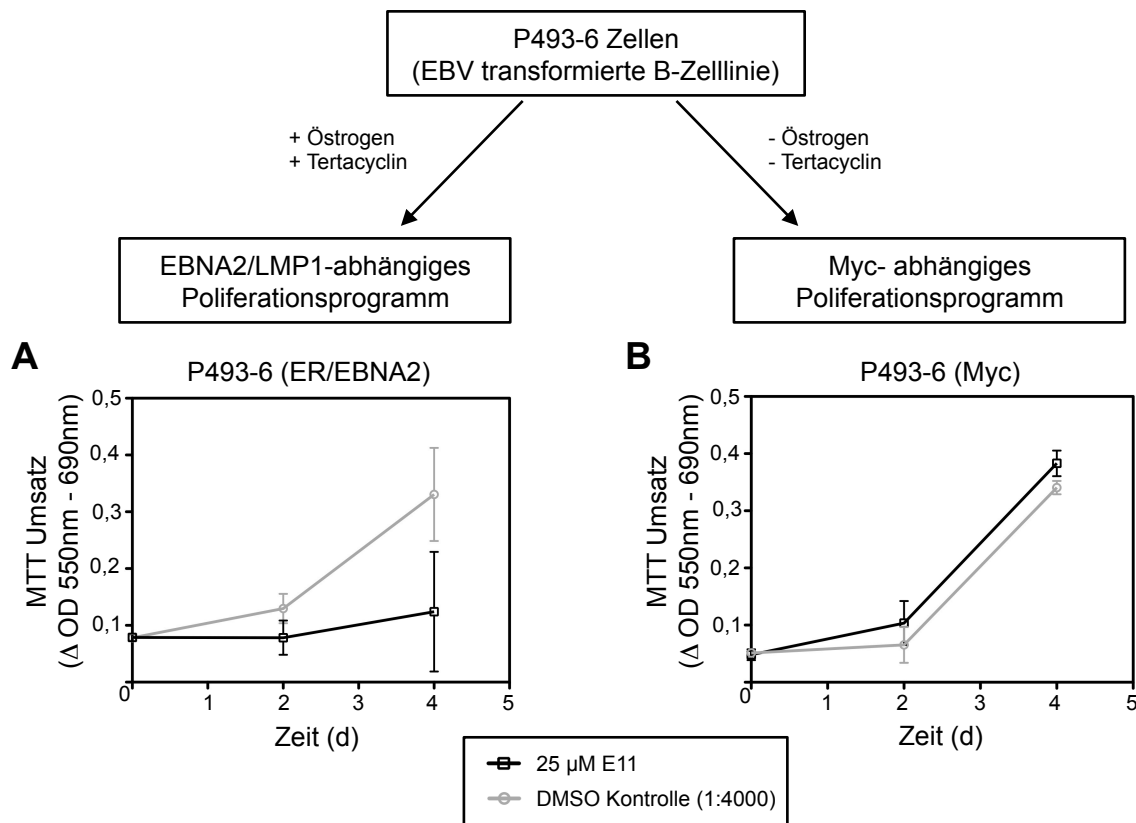
Dieser Anstieg entsteht durch die Zellproliferation in diesen Ansätzen. Es ist daher wahrscheinlich, dass der geringere Umsatz an MTT in den Ansätzen der EREB 2-5-Zellen, die mit AD01-E11 behandelt wurden, die Inhibition der Proliferation der Zellen bedeutete. Diese Reduktion des Umsatzes an MTT war in diesem Experiment spezifisch für die EREB 2-5-Zelllinie zu beobachten. Der Umsatz von MTT durch BL41-Zellen, die über denselben Zeitraum mit der gleichen Konzentration von AD01-E11 behandelt wurden, gleicht dem von BL41-Zellen, die nur mit DMSO inkubiert wurden. Der Inhibitor AD01-E11 zeigte somit keinen Effekt auf die BL41-Zellen.

Um diese Experimente zu bestätigen und die spezifische Inhibition von EBV-transformierten Zellen durch die Substanz AD01-E11 weiter zu untersuchen, wurde in einem weiteren Experiment die EBV-transformierte B-Zelllinie P493-6 verwendet. Die P493-6-Zelllinie ist ein Subklon der EREB 2-5-Zelllinie, der stabil mit einem Tetracyclin-regulierbaren myc-Expressionsvektor transfiziert wurde (Schuhmacher *et al.*, 1999; Pajic *et al.*, 2000).

Die P493-6-Zellen können durch die Expression des Transkriptionsfaktors Myc unabhängig von EBNA2/LMP1 proliferieren und zeigen dann einen Burkitt-Lymphom-ähnlichen Phänotyp (P493-6 myc-Proliferationsprogramm). Durch die Zugabe von Tetracyclin und Östrogen zum Zellkulturmedium wird die Expression von Myc in P493-6-Zellen reprimiert und zugleich LMP1, abhängig von dem durch Östrogen regulierbaren Östrogenrezeptor/EBNA2 (ER/EB2)-Fusionsprotein, exprimiert (Kempkes *et al.*, 1995; Pajic *et al.*, 2000). In diesem System kann also die Wirkung von AD01-E11 auf die gleichen Zellen beobachtet werden, einmal in einem LMP1-unabhängigen und einmal in einem LMP1-abhängigen Proliferationsprogramm. Daher wurden die P493-6-Zellen verwendet, um die spezifische Wirkung von AD01-E11 auf LMP1-abhängige Zellen zu demonstrieren und eine allgemeine Zytotoxizität als Wirkungsprinzip der Substanzen auszuschließen, denn die Inhibition der Interaktion von TRAF2 und LMP1 sollte nur eine Wirkung auf P493-6-Zellen im ER/EB2-Programm haben.

Vergleichbar mit dem Experiment zuvor wurde die Vitalität der EBNA2/LMP1-abhängigen P493-6-Zellen, entsprechend den EREB 2-5-Zellen, durch Inkubation mit der Substanz AD01-E11 spezifisch inhibiert (Abb. 4.15, A). P493-6-Zellen, deren Proliferation durch Expression von Myc getrieben wird, wurden nicht durch AD01-E11 inhibiert (Abb. 4.15, B). Dies zeigte also, dass die Substanz AD01-E11 spezifisch LMP1-induziertes Zellwachstum in EBV-transformierten B-Zellen inhibiert.

Insbesondere zeigte die Verwendung der P493-6-Zellen, dass dieselben Zellen in einem LMP1-abhängigen Proliferations-Programm gehemmt wurden, während der Umsatz von MTT in P493-6-Zellen, deren Proliferation unabhängig von LMP1 ist, von AD01-E11 nicht inhibiert wurde.



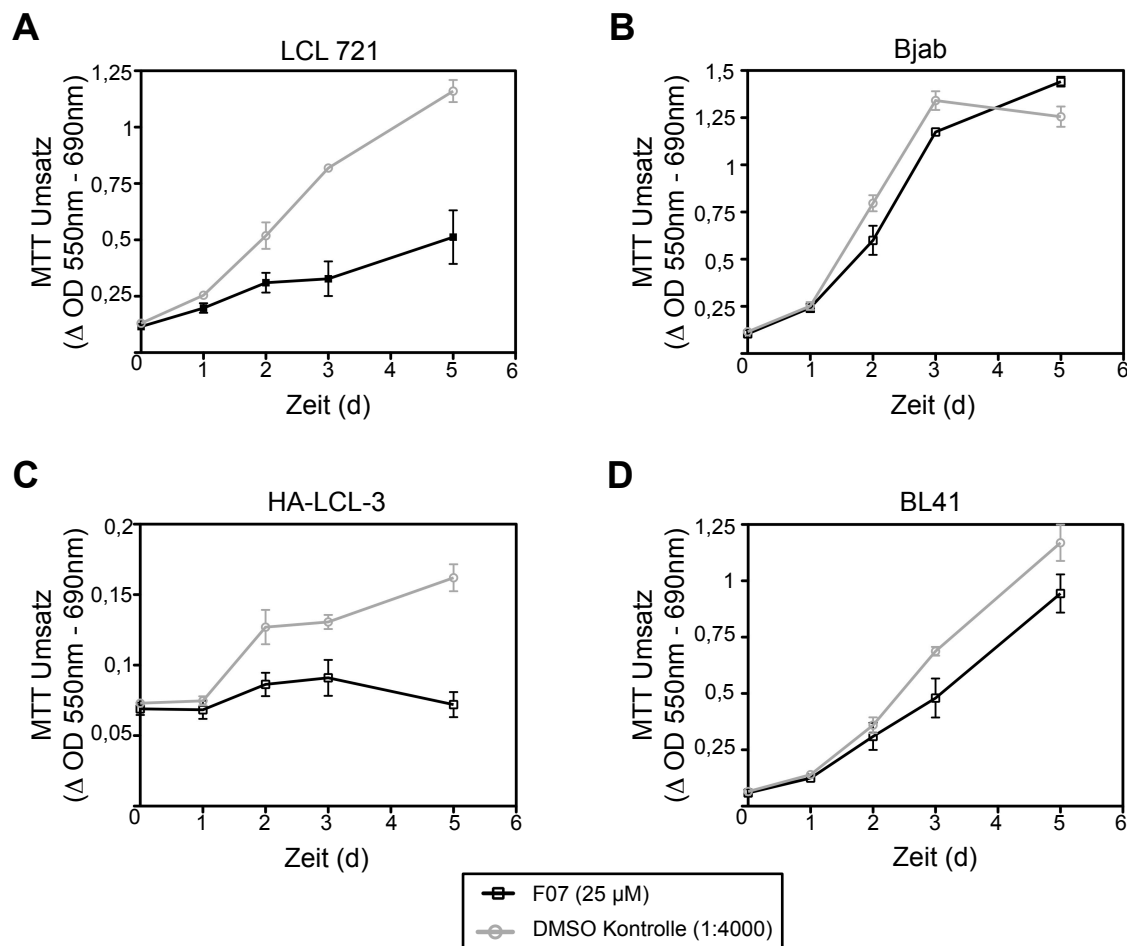
**Abb. 4.15: Die Substanz AD01-E11 hat eine spezifische Wirkung auf P493-6-Zellen im LMP1-abhängigen Proliferationsprogramm.** Die Zelllinie P493-6 ist ein Subklon der EBV-transformierten B-Zelllinie EREB 2-5. In EREB 2-5-Zellen wird die Expression von LMP1 durch ein Östrogen abhängiges Östrogenrezeptor/EBNA2 (*ER/EB2*) Fusionsprotein reguliert (Kempkes *et al.*, 1995). Die stabile Transfektion von EREB 2-5-Zellen mit einem Tetracyclin-regulierbaren Expressionsvektor, der für das Onkogen Myc kodiert, ermöglicht die Zellproliferation von P493-6-Zellen in zwei verschiedenen Programmen, einem EBNA2- bzw. LMP1-abhängigen Proliferationsprogramm und einem Myc-abhängigen Proliferationsprogramm (Pajic *et al.*, 2000). **A** Die Inkubation von P493-6-Zellen mit 25 μM AD01-E11 inhibierte spezifisch die Vitalität von P493-6-Zellen im EBNA2-abhängigen Programm. **B** Die Substanz AD01-E11 hatte keinen Einfluss auf den Umsatz von MTT in Experimenten mit P493-6-Zellen im Myc-Proliferationsprogramm. Die Fehlerbalken zeigen jeweils die Standardabweichung aus Triplikaten eines Experiments.

Der geringere Umsatz von MTT in den Zellkulturansätzen mit LMP1-abhängigen Zelllinien ist also nicht auf Zytotoxizität der Substanz AD01-E11 für die B-Zellen selbst zurückzuführen, sondern spezifisch für das Proliferationsprogramm EBV-transformierter Zellen, die von LMP1 und TRAF2 abhängig sind.

Auch die Substanz AD05-F07 zeigte eine spezifische Wirkung auf die Vitalität von EBV-transformierten B-Zellen. Die LCL-Zelllinien LCL721 und HA-LCL3 wurden durch die Inkubation mit AD05-F07 in ihrem Zellwachstum gehemmt, während die Proliferation der Burkitt Lymphom B-Zelllinien BL41 und Bjab durch AD05-F07 nicht inhibiert wurde (Abb. 4.16). Interessanterweise war die Substanz AD05-F07 trotz der höheren  $IC_{50}$ -Werte in den *in*

*in vitro* Experimenten (Tabelle 4.2) in den hier durchgeführten *in vivo* Experimenten ähnlich potent wie die Substanz AD01-E11. Die Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  reichte aus, um die Proliferation der beiden LCL-Zelllinien LCL 721 und HA-LCL-3 größtenteils zu inhibieren (Abb. 4.16 A und C).

Die Konzentration der beiden Substanzen in den hier durchgeführten Experimenten wurde, wie oben beschrieben, in Anlehnung an die  $\text{IC}_{50}$ -Werte für die Inhibition des Komplexes aus LMP1 und TRAF2 *in vitro* gewählt. Um noch genauere Aussagen über die Potenz der beiden Inhibitoren *in vivo* treffen zu können, sollten daher in Zukunft weitere MTT-Experimente mit Konzentrationsreihen der Substanzen durchgeführt werden.



**Abb. 4.16: Die Substanz AD05-F07 hemmt spezifisch die Vitalität von EBV-transformierten B-Zelllinien.** **A + C** Die Vitalität der EBV-transformierten B-Zelllinien LCL 721 und HA-LCL3 wurde durch die Substanz AD05-F07 gehemmt. Der Umsatz von MTT durch die LCLs ist deutlich reduziert bei Zellen, die mit 25  $\mu\text{M}$  AD05-F07 inkubiert wurden gegenüber Zellen, die mit einem äquivalenten Volumen von DMSO (1 : 4000) behandelt wurden. **B + D** Die Substanz AD05-F07 hatte bei Konzentrationen von 25  $\mu\text{M}$  jedoch keinen Einfluss auf die Burkitt Lymphom Zelllinien BL41 und Bjab. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus Triplikaten eines Experiments.

In diesen Experimenten sollte eine  $EC_{50}$  (*half maximal effective concentration* - halbmaximale effektive Konzentration) für die Wirkung von AD01-E11 und AD05-F07 in Zellkulturen bestimmt werden. Da es zu Lieferschwierigkeiten der beiden Substanzen kam, konnten diese Experimente im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Ebenso war es aus diesem Grund nicht möglich, weitere Experimente durchzuführen um zu untersuchen, ob die Substanzen tatsächlich Apoptose in den LCLs induzieren.

Zusammenfassend ist es mir in diesem Abschnitt meiner Arbeit gelungen, ein HD-System zu entwickeln, mit dem ich in einem Screen aus einer Bibliothek mit 800 Substanzen 4 Substanzen identifizieren konnte, die den Komplex aus LMP1 und TRAF2 mit einer  $IC_{50}$  im niedrigen bis mittleren  $\mu$ M-Bereich inhibierten. Weiterhin war es mir möglich zu zeigen, dass die beiden potentesten Inhibitoren, AD01-E11 und AD05-F07, spezifisch das Wachstum von EBV-transformierten Zellen inhibieren. Obwohl es noch eine Reihe von Experimenten gibt, die in Zukunft zur Aufklärung der Wirkung der Inhibitoren durchgeführt werden müssen (siehe hierzu Kapitel 5.1) konnte ich zeigen, dass der von LMP1 und TRAF2 gebildete Signalkomplex ein sehr gutes Ziel für Inhibitoren darstellt.

#### **4.5 TRAF6 als direkter Interaktionspartner der CTAR2-Domäne von LMP1**

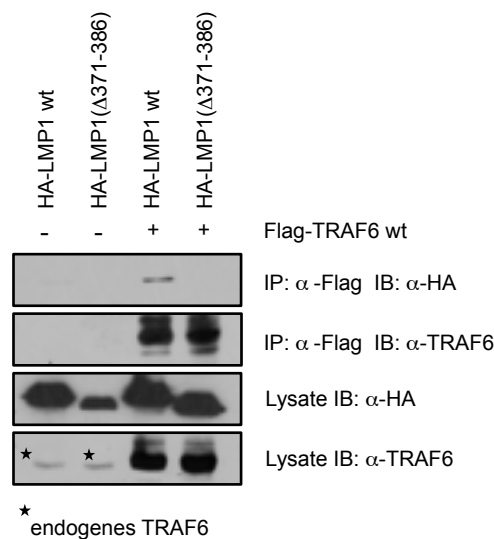
TRAF6 ist essenziell für die Induktion des kanonischen NF- $\kappa$ B-, des JNK- und IRF7-Signalweges durch LMP1 (Schultheiss *et al.*, 2001; Luftig *et al.*, 2003; Wan *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2008). Bisher wurde angenommen, dass TRAF6 indirekt an LMP1 rekrutiert wird (Wan *et al.*, 2006). Dennoch zeigten sich in den Protein-Protein-Interaktionsstudien im ersten Teil dieser Arbeit (siehe Abschnitt 4.1.3) erste Hinweise, dass die Interaktion nicht, wie bisher angenommen, indirekt über BS69 vermittelt wird (Wan *et al.*, 2006), sondern dass TRAF6 direkt an LMP1 bindet. Diese Erkenntnis ist sowohl wissenschaftlich von hohem Interesse als auch im Hinblick darauf, dass sich der Signalkomplex aus TRAF6 und LMP1 dazu eignen könnte, ebenfalls als Ziel für Inhibitoren verwendet zu werden. Daher wurde im folgenden Abschnitt dieser Arbeit die Interaktion zwischen TRAF6 und LMP1 weiter charakterisiert.

##### **4.5.1 Die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 wird durch die CTAR2-Domäne vermittelt**

Im ersten Schritt zur weiteren Charakterisierung der Interaktion zwischen LMP1 und TRAF6 wurden Ko-Immunpräzipitationsstudien mit LMP1- und TRAF6-Proteinen in HEK293-D Zellen durchgeführt (Abb. 4.17). TRAF6, markiert mit einem N-terminalem Flag-Epitop (Flag-TRAF6), wurde zusammen mit einem HA-Epitop-markierten LMP1-Wildtyp-Protein (HA-LMP1 wt) sowie einer LMP1-Mutante mit teilweise deletierter CTAR2-Domäne (HA-LMP1 $\Delta$ 371-386) in HEK293-D-Zellen exprimiert. Nach der Lyse der Zellen wurde Flag-

TRAF6 aus den Lysaten mit  $\alpha$ -Flag-Antikörpern immunpräzipitiert und die spezifisch gebundenen HA-LMP1-Proteine wurden in Immunblot-Analysen nachgewiesen (Abb. 4.17).

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass Flag-TRAF6 und HA-LMP1 wt spezifisch in den Zellen miteinander interagierten (Abb. 4.17). In den Ansätzen ohne Flag-TRAF6 konnte kein HA-LMP1 wt in den Immunblot-Analysen detektiert werden. Diese Interaktion wurde von der CTAR2-Domäne vermittelt. Die LMP1-Deletionsmutante HA-LMP1 $\Delta$ 371-386 war nicht mehr in der Lage, an Flag-TRAF6 zu binden (Abb. 4.17).



**Abb. 4.17: TRAF6 interagiert mit der CTAR2-Domäne von LMP1 in HEK293-D-Zellen.** Für die Ko-Immunitpräzipitation wurde Flag-TRAF6 zusammen mit HA-LMP1 wt oder HA-LMP1( $\Delta$ 371-386) durch Transfektion von HEK293-D-Zellen mit 0,5  $\mu$ g des pRK5-TRAF6-Plasmids und 1  $\mu$ g der genannten pCMV-HA-LMP1-Konstrukte exprimiert. Die Flag-TRAF6-Proteine wurden mittels  $\alpha$ -Flag-Antikörpern präzipitiert. Die gebundenen HA-LMP1-Proteine wurden in Immunblot-Analysen mit dem  $\alpha$ -HA-Antikörper 12CA5 nachgewiesen. In diesen Experimenten wurde HA-LMP1 wt spezifisch über die CTAR2-Domäne von Flag-TRAF6 gebunden. Die LMP1-CTAR2-Deletionsmutante HA-LMP1( $\Delta$ 371-386) war nicht mehr in der Lage, an Flag-TRAF6 zu binden. Für die Immunblot-Analysen wurden 7  $\mu$ g Gesamtprotein der Lysate und 25 % der Ko-Immunitpräzipitationsansätze eingesetzt. Die Flag-TRAF6-Proteine wurden mit dem  $\alpha$ -TRAF6-Antikörper H274 detektiert, die HA-LMP1-Proteine mit dem  $\alpha$ -HA-Antikörper 12CA5. [IP -Immunitpräzipitation, IB - Immunblot]

#### 4.5.2 TRAF6 interagiert mit der Sequenz P<sub>379</sub>VQLSY innerhalb der CTAR2-Domäne

In den vorangegangenen Experimenten ergaben sich also Hinweise, dass TRAF6 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* direkt mit LMP1 interagiert. Die Bindung von TRAF6 an LMP1 wurde sowohl durch die Deletion von Teilen der CTAR2-Domäne (Abb. 4.17), als auch durch die Mutation der LMP1-Aminosäure Y384G inhibiert (Abb. 4.4). Um nun das genaue Interaktionsmotiv von TRAF6 innerhalb von LMP1 zu identifizieren, wurden Experimente mit verschiedenen LMP1-Peptiden durchgeführt. Diese Peptide wurden auf einer Membran

arrangiert und mit His-TRAF6<sub>310-522</sub> inkubiert. Als Kontrolle für die spezifische Bindung von His-TRAF6<sub>310-522</sub> an Rezeptorpeptidsequenzen wurden zusätzlich zu den LMP1-Peptiden eine Reihe von CD40-Peptiden auf der Membran arrangiert.

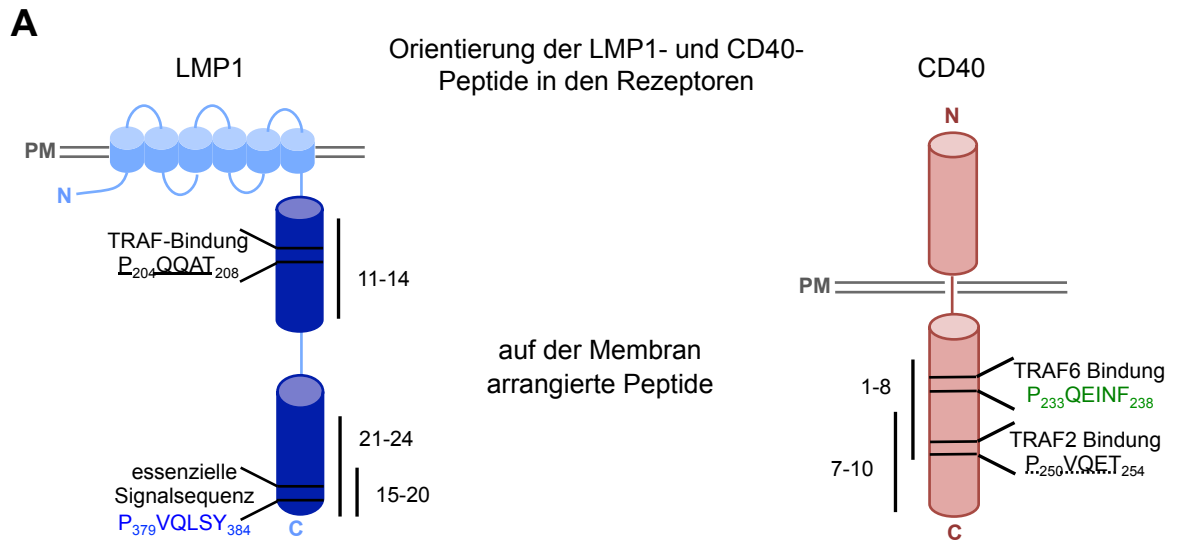
Die Peptide hatten jeweils eine Länge von 30 bzw. 16 Aminosäuren und wurden in Duplikaten auf der Membran aufgebracht (siehe Abb. 4.18). Die Peptidsequenzen basierten sowohl auf bekannten TRAF2- und TRAF6-Interaktionsmotiven in LMP1 und CD40 als auch auf Aminosäuresequenzen, welche essenziell für die Induktion von Signalwegen durch LMP1 sind (Abb. 4.18 A). Zwei der LMP1-Peptidsequenzen umfassten die CTAR1-Domäne mit dem TRAF2-Interaktionsmotiv P<sub>204</sub>XQxT. In einer dieser Peptidsequenzen wurde das TRAF-Interaktionsmotiv mutiert, die andere Peptidsequenz entspricht dem Wildtyp LMP1 (Abb. 4.18 B, Nr. 11-14).

Fünf der LMP1-Peptidsequenzen enthielten die CTAR2-Sequenz P<sub>379</sub>VQLSY (Abb. 4.18 B, Nr. 15-24), welche essenziell für die Induktion der NF-κB-, JNK- und IRF7-Signalwege durch die CTAR2-Domäne ist (Floettmann *et al.*, 1997; Kieser *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2008). Diese Sequenz umfasst ebenfalls ein putatives TRAF-Interaktionsmotiv, P<sub>370</sub>XQxT/S (Franken *et al.*, 1996; Xie & Bishop, 2004). In einem der 30 Aminosäuren umfassenden LMP1-Peptide wurden die LMP1-Aminosäuren Pro<sub>379</sub> und Gln<sub>381</sub> innerhalb dieses Motivs jeweils in ein Alanin mutiert (Abb. 4.18 B, Nr. 21-24).

Drei der LMP1-Peptide auf der Membran umfassten nur die letzten 16 Aminosäuren von LMP1, um die Hinlänglichkeit dieser carboxyterminalen Aminosäuren für die Bindung von TRAF6 zu untersuchen (Abb. 4.18 B, Nr. 15-20), denn in den Ko-Immünpräzipitationsstudien hatte sich gezeigt, dass eine Deletion dieser Aminosäuren zum Verlust der Interaktion zwischen LMP1 und TRAF6 *in vivo* führte (siehe Abb. 4.18). Somit sollte geklärt werden, ob diese 16 Aminosäuren von LMP1 ebenfalls ausreichend sind, um die Bindung von TRAF6 zu vermitteln. Neben einem Peptid mit einer Wildtypsequenz wurde in einem dieser 16 Aminosäuren-langen Peptide ebenfalls das putative TRAF-Interaktionsmotiv mutiert (P<sub>379</sub>XQxS in A<sub>379</sub>XAxA). In der dritten 16 Aminosäuren umfassenden LMP1-Peptidsequenz wurden, in Anlehnung an die *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien (Abb. 4.4) und der Aktivierung der NF-κB- und JNK-Signalwege (Floettmann *et al.*, 1997; Kieser *et al.*, 1999), die beiden LMP1-Reste Tyr<sub>384</sub> und Tyr<sub>385</sub> in Alanin mutiert (Abb. 4.18 B, Nr. 17,18).

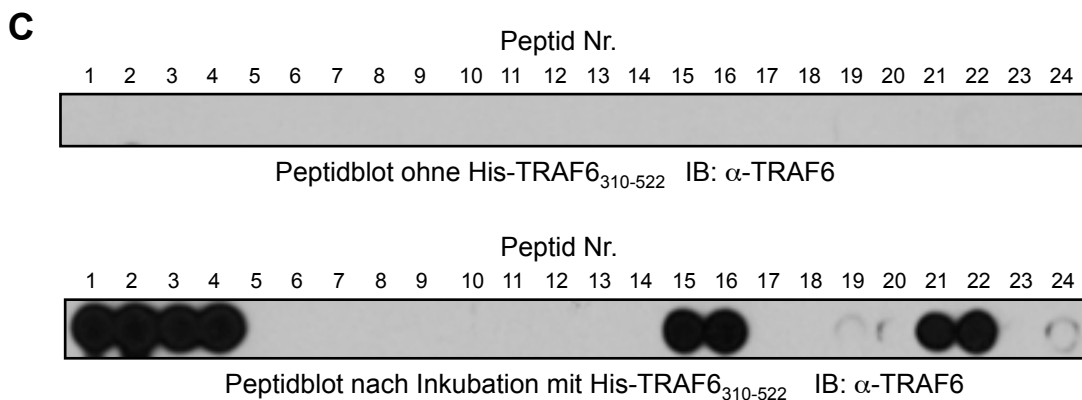
Als Positivkontrolle für die spezifische Bindung von His-TRAF6<sub>310-522</sub> an Peptidsequenzen, die auf einer Membran immobilisiert wurden, wurden 30 Aminosäuren umfassende CD40-Peptide verwendet (Abb. 4.18 B, Nr. 1-10).





**B**

Nr.	Peptid	Sequenz	TRAF6 Bindung
1, 2	CD40 wt (1)	K <sub>230</sub> QEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCG <sub>259</sub>	+
3, 4	CD40(A <sub>250</sub> xAxA)	K <sub>230</sub> QEPQEINFPDDLPGSNTAAVAEALHGCG <sub>259</sub>	+
5, 6	CD40(A <sub>233</sub> xA)	K <sub>230</sub> QEQAINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCG <sub>259</sub>	-
7, 8	CD40 wt (2)	G <sub>244</sub> SNTAAPVQETLHGCGPVTQEDGKESRISV <sub>273</sub>	-
9,10	CD40 (A <sub>250</sub> xAxA)	G <sub>244</sub> SNTAAVAEALHGCGPVTQEDGKESRISV <sub>273</sub>	-
11, 12	LMP1 CTAR1 wt	D <sub>198</sub> DSLPHPPQATDDSGHESDSNSNEGRHHLL <sub>228</sub>	-
13, 14	LMP1 CTAR1(A <sub>250</sub> xAxA)	D <sub>198</sub> DSLPHAAADDSGHESDSNSNEGRHHLL <sub>228</sub>	-
15, 16	LMP1 CTAR2 wt	G <sub>371</sub> DDDDPHGVPVQLSYD <sub>386</sub>	+
17, 18	LMP1 CTAR2(Y384A)	G <sub>371</sub> DDDDPHGVPVQLSAD <sub>386</sub>	-
19, 20	LMP1 CTAR2(A <sub>379</sub> xAxA)	G <sub>371</sub> DDDDPHGVALAYD <sub>386</sub>	-
21, 22	LMP1 CTAR2 wt	P <sub>356</sub> HLPTLLLGS SGGDDDDPHGVPVQLSYD <sub>386</sub>	+
23, 24	LMP1 CTAR2(A <sub>379</sub> xA)	P <sub>356</sub> HLPTLLLGS SGGDDDDPHGVALSYD <sub>386</sub>	-



**Abb. 4.18: Charakterisierung der TRAF6-Bindestelle in LMP1 mittels Peptidblot-Analysen.**  
**A** Für die Peptidblot-Analysen wurden Peptide, die die bekannten TRAF2- und TRAF6-Interaktionsmotive des CD40-Rezeptors und das TRAF2-Interaktionsmotiv von LMP1 umfassen, sowie LMP1-CTAR2-Peptide auf der Membran arrangiert. **B** LMP1- und CD40-Peptidsequenzen zur Analyse der LMP1-TRAF6 Interaktionsstelle. Alle Peptidsequenzen wurden in Duplikaten auf der Membran arrangiert. Die Nummerierung der Aminosäurereste innerhalb der Peptide wurden

entsprechend der Position der Aminosäuren in den Wildtyp Proteinen gehalten. Vier der LMP1-Peptide (11-14) waren CTAR1-Peptide, die das TRAF2-Interaktionsmotiv P<sub>204</sub>XQxT umfassten (durchgängig unterstrichen). Fünf der LMP1-Peptide (15-24) basierten auf der LMP1-CTAR2-Domäne und beinhalteten die LMP1-CTAR2-Kernsequenz P<sub>379</sub>VQLSY (**blau**). Zu Vergleichszwecken und als Positivkontrolle für die Spezifität der Interaktion von His-TRAF6<sub>310-522</sub> mit Peptiden wurden ebenfalls CD40-Peptide auf der Membran arrangiert (1-10). Drei der CD40-Peptidsequenzen beinhalteten das CD40-TRAF6 Interaktionsmotiv, P<sub>233</sub>XExxF (**grün**), sowie das CD40-TRAF2 Interaktionsmotiv P<sub>250</sub>XQxT (gestrichelt unterstrichen). Zwei der CD40-Peptide umfassen nur das CD40-TRAF2 Interaktionsmotiv (7-10). In Alanin mutierte Aminosäuren in den Peptiden sind **rot** markiert. **C** Peptidblot-Analyse der Interaktion von LMP1- und CD40-Peptiden mit His-TRAF6<sub>310-522</sub>. (386 µM) Gebundenes His-TRAF6<sub>310-522</sub> wurde mit dem α-TRAF6 Antikörper C-20 detektiert. Die Antikörper selbst zeigen keine unspezifische Interaktion mit der Membran (oberer Peptidblot). His-TRAF6<sub>310-522</sub> wurde spezifisch an die P<sub>379</sub>VQLSY Sequenz innerhalb der LMP1-CTAR2-Domäne gebunden. Sowohl die Mutation des putativen TRAF-Bindemotivs P<sub>379</sub>XQxS in A<sub>379</sub>XAxA als auch die Mutation Y384A/Y385A inhibieren die Interaktion von TRAF6 mit LMP1. Die Interaktion ist spezifisch für CTAR2-Peptide, denn His-TRAF6<sub>310-522</sub> interagiert nicht mit CTAR1-Peptidsequenzen. [IB - Immunblot]

Diese CD40-Peptide beinhalteten sowohl das TRAF6-Interaktionsmotiv P<sub>233</sub>XExxF von CD40 als auch dessen TRAF2-Interaktionsmotiv P<sub>250</sub>XQxT (Boucher *et al.*, 1997; McWhirter *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2002). In beiden Motiven wurden, vergleichbar mit den LMP1-Peptiden, die essenziellen Aminosäuren in einer der CD40-Sequenzen jeweils in ein Alanin mutiert.

Die Membranen wurden mit 10 ng/µL (386 µM) His-TRAF6<sub>310-522</sub> inkubiert. Im Anschluss wurde das spezifisch an die Peptide auf der Membran gebundene His-TRAF6<sub>310-522</sub> unter Verwendung des α-TRAF6-Antikörpers C-20 in Kombination mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen (Abb. 4.18 C). Diese Peptidblot-Analysen zeigten, dass die 16 carboxyterminalen Aminosäuren von LMP1 ausreichend sind, um die direkte Bindung der TRAF-Domänen von TRAF6 zu vermitteln.

Die Interaktion von His-TRAF6<sub>310-522</sub> mit LMP1-Peptiden war spezifisch für die CTAR2-Domäne, denn His-TRAF6<sub>310-522</sub> diskriminierte zwischen den CTAR1-Peptiden und den CTAR2-Peptiden, die auf der Membran aufgebracht waren. Die CTAR1-Peptidsequenzen waren nicht in der Lage, His-TRAF6<sub>310-522</sub> zu binden. An der Bindung von His-TRAF6<sub>310-522</sub> an CTAR2-Peptide ist das putative TRAF-Interaktionsmotiv P<sub>379</sub>XQxS beteiligt. Die Mutation der beiden Aminosäuren Pro<sub>379</sub> und Gln<sub>381</sub> (LMP1-Peptide 23 und 24) und dementsprechend auch die Mutation der LMP1-Aminosäuren Pro<sub>379</sub>, Gln<sub>381</sub> und Ser<sub>383</sub> jeweils in die Aminosäure Alanin (LMP1-Peptide 19 und 20) inhibierte die Bindung von His-TRAF6<sub>310-522</sub> an die CTAR2-Peptide. Auch die Mutationen Y384A und Y385A führten zum Verlust der Interaktion von His-TRAF6<sub>310-522</sub> mit den CTAR2-Peptiden.

Die Interaktion von His-TRAF6<sub>310-522</sub> mit den CD40-Kontrollpeptiden bestätigte die Diskriminierung von TRAF6 zwischen dem CD40-TRAF2-Interaktionsmotiv, P<sub>250</sub>xQxT, und dem CD40-TRAF6-Interaktionsmotiv, P<sub>233</sub>xExxF. Das Motiv P<sub>250</sub>xQxT in den CD40-Peptiden war nicht in der Lage, die Interaktion mit His-TRAF6<sub>310-522</sub> zu vermitteln und die Bindung von His-TRAF6<sub>310-522</sub> an CD40-Peptide war strikt abhängig von dem TRAF6 Interaktionsmotiv P<sub>233</sub>xExxY. Mutationen in diesem Motiv führten zum Verlust der Interaktion von TRAF6 mit den CD40-Peptidsequenzen. Die Bindung von His-TRAF6<sub>310-522</sub> an die Peptidsequenzen auf den Membranen war also spezifisch für TRAF6-Interaktionsmotive.

#### 4.5.3 Vergleich der Interaktion von TRAF6 mit LMP1 und CD40

Für TRAF6 wurde gezeigt, dass es ein gemeinsames PxExxF/Y/D/E-Interaktionsmotiv innerhalb verschiedener Rezeptoren und Proteinen gibt (Ye *et al.*, 2002). Die LMP1-Sequenz P<sub>379</sub>VQLSY innerhalb der CTAR2-Domäne ist diesem Motiv sehr ähnlich, lediglich der LMP1-Rest an P<sub>0</sub> unterscheidet sich von dem übergeordneten TRAF6-Interaktionsmotiv zellulärer Rezeptoren (siehe Abb. 4.19 A). Im Gegensatz zu zellulären Rezeptoren trägt LMP1 an dieser Position die Aminosäure Glutamin (Q<sub>381</sub>) statt eines Glutaminsäurerestes (E). Für die Interaktion von TRAF2 mit verschiedenen Rezeptoren ist gezeigt, dass TRAF2 zwischen den Aminosäuren Glutamin und Glutaminsäure an P<sub>0</sub> innerhalb von TRAF2-Interaktionsmotiven nicht diskriminiert (siehe Tab. 1.1). Das übergeordnete TRAF2-Rezeptorinteraktionsmotiv an P<sub>0</sub> lautet Q/E (Ye *et al.*, 1999). Nun sieht es so aus, dass TRAF6 bei der Bindung von LMP1 ebenfalls einen Aminosäureaustausch von Glutamin zu Glutaminsäure toleriert und die Bindung der TRAF-Domänen von TRAF6 an das P<sub>379</sub>xQxxY-Motiv in der CTAR2-Domäne vermittelt wird.

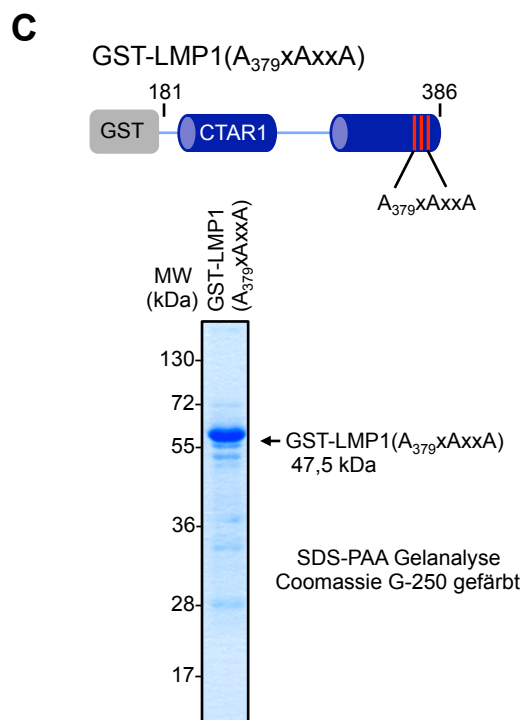
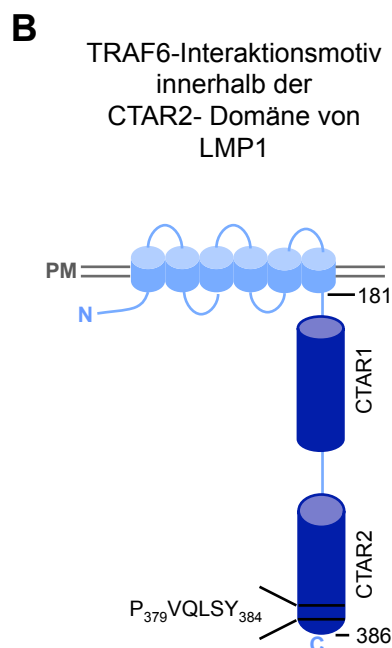
Um die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 im Kontext der gesamten Signaldomäne weiter zu untersuchen und mit der von einem zellulären Rezeptor zu vergleichen, wurde eine neue LMP1-Mutante basierend auf den bisher verwendeten GST-LMP1-Proteinen entworfen. In dieser Mutante wurde das TRAF6-Interaktionsmotiv P<sub>379</sub>xQxxY innerhalb der CTAR2-Domäne in A<sub>379</sub>xAxxA mutiert (Abb. 4.19). Die Proteinexpression und Reinigung der LMP1-Mutante GST-LMP1(A<sub>379</sub>xAxxA) wurde nach dem in Abschnitt 3.1.1 dieser Arbeit etablierten GST-LMP1-Reinigungsprotokoll durchgeführt (Abb. 4.2 und Abb. 4.19 C).

Zusätzlich wurden analog zu den GST-LMP1-Fusionsproteinen zwei GST-CD40-Fusionsproteine hergestellt (Abb. 4.20). Hierfür wurde die intrazelluläre Signaldomäne von CD40 (Aminosäuren 216-277) N-terminal mit dem GST-Protein fusioniert und in den gleichen bakteriellen pGEX2T-Expressionsvektor wie die GST-LMP1-Mutanten kloniert. Für die Experimente wurden sowohl ein GST-CD40-Fusionsprotein und ein CD40-Wildtyp-Protein (GST-CD40 wt) entworfen sowie eine CD40-Mutante mit einem mutiertem TRAF6-

Interaktionsmotiv (Abb. 4.20). Analog zu den eingeführten Mutationen in das TRAF6-Interaktionsmotiv  $P_{379}xQxxY$  in LMP1 wurden die Positionen  $P_{-2}$ ,  $P_0$  und  $P_3$  in dem TRAF6-Interaktionsmotiv in CD40 jeweils in die Aminosäure Alanin mutiert (GST-CD40( $A_{233}xAxxA$ )).

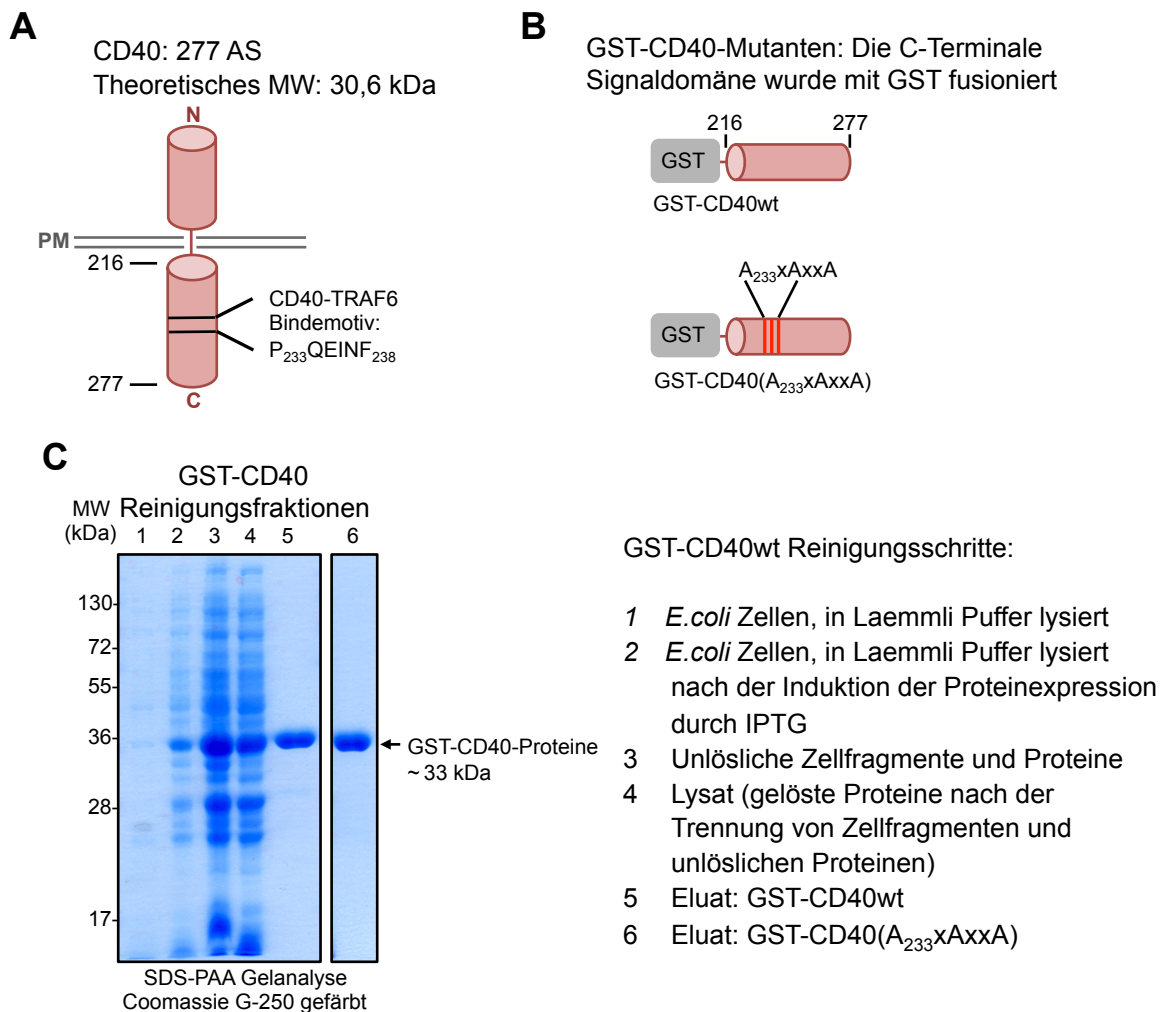
### A Mutation des TRAF6-Interaktionsmotivs in CD40 bzw. LMP1

TRAF6-Interaktionsmotive:	Aminosäuresequenz:	Eingeführte Mutationen:
(Position)	$P_{-2}$ x $P_0$ x x $P_3$	
CD40	$P_{233}$ Q E I N $F_{238}$	$A_{233}$ Q A I N $A_{238}$
LMP1	$P_{379}$ V Q L S $Y_{384}$	$A_{379}$ V A L S $A_{384}$
Konsensus Motiv♦	P x E x x Ar/Ac*	



**Abb. 4.19: Design und Reinigung der LMP1-Mutante GST-LMP1( $A_{379}xAxxA$ ) zur Analyse der Interaktion von TRAF6 mit der Signaldomäne von LMP1 *in vitro*.** **A** Vergleich der TRAF6-Interaktionsmotive in LMP1 und zellulären Rezeptoren. Das übergeordnete TRAF6-Interaktionsmotiv zellulärer Rezeptoren hat an  $P_0$  einen Glutaminsäurerest (E). LMP1 trägt an dieser Stelle statt dessen die Aminosäure Glutamin (Q). Für weiterführende *in vitro* Interaktionsstudien zwischen TRAF6 und LMP1 im Vergleich zu der Interaktion zwischen TRAF6 und CD40 wurde das TRAF6-Interaktionsmotiv sowohl in GST-LMP1- als auch GST-CD40-Proteinen mutiert (siehe Abb. 4.20). ♦Die Konsensus-Sequenz der TRAF6-Interaktionsmotive stammt aus Ye *et al.* (2002). Ar/Ac\*, diese Position kann von aromatischen und sauren Aminosäuren (F/Y/D/E) besetzt sein. **B** Schematische Darstellung von LMP1 zur Veranschaulichung der Orientierung des TRAF6-Interaktionsmotivs in LMP1. **C** Die Mutante GST-LMP1( $A_{379}xAxxA$ ) wurde analog zu den bisher verwendeten GST-LMP1-Fusionsproteinen entworfen. Für die Expression und Reinigung aus *E. coli* wurde das etablierte GST-LMP1-Reinigungsprotokoll (siehe Abb. 4.2) verwendet. [PM - Plasmamembran, CTAR - C-terminale Aktivierungsregion]

Für die Proteinexpression der GST-CD40-Proteine wurden zunächst ebenfalls, analog zu der Proteinexpression der GST-LMP1-Mutanten, der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  mit den pGEX2T-CD40 Expressionsvektoren transformiert. Die SDS-PAA-Gelanalyse der Elutionsfraktionen der Proteinreinigung von GST-CD40-Proteinen aus *E. coli* DH5 $\alpha$  zeigte jedoch neben dem GST-CD40 wt Protein (theoretisches MW: 33,2 kDa) eine weitere prominente Bande bei ~26 kDa (siehe Anhang 5).



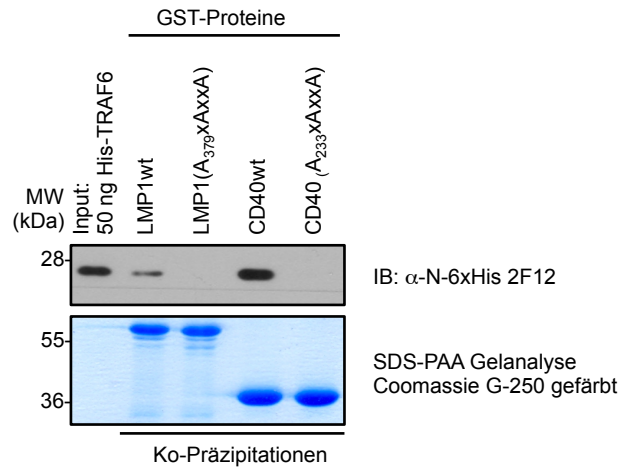
**Abb. 4.20: Design und Reinigung der GST-CD40 Fusionsproteine.** **A** Schematische Darstellung von CD40. CD40 ist ein integrales Membranprotein mit einer extrazellulären N-terminalen Domäne und einer intrazellulären Signaldomäne. CD40 bindet TRAF6 durch direkte Interaktion von TRAF6 mit dem Interaktionsmotiv P<sub>233</sub>xExxF (Ye *et al.*, 2002). **B** Design der GST-CD40-Mutanten. Um Protein-Protein-Interaktionsstudien zur Bindung von TRAF6 an LMP1 im Vergleich zur Bindung von TRAF6 an CD40 erstellen zu können, wurde die Signaldomäne von CD40 (Aminosäuren 216-277) als GST-Fusionsprotein in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert. Vergleichbar zu LMP1 wurden von CD40 ebenfalls ein Wildtyp-Protein mit intaktem TRAF6-Interaktionsmotiv (GST-CD40 wt) als auch eine CD40-Mutante mit mutiertem TRAF6-Interaktionsmotiv (GST-CD40(A<sub>233</sub>xAxxA)) kloniert. **C** Reinigung der GST-CD40-Proteine. Die Reinigung der GST-CD40-Proteine erfolgte nach dem etablierten GST-Reinigungsprotokoll (Abschnitt 4.1). Die Reinigungsschritte sind wie angegeben. [PM - Plasmamembran, AS - Aminosäuren]

Um die Qualität der GST-CD40-Proteinpräparationen zu erhöhen, wurde daher der *E. coli*-Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL mit den GST-CD40-Expressionsplasmiden transformiert. Durch die Verwendung dieses *E. coli* Stamms konnten die Proteine GST-CD40 wt und GST-CD40(A<sub>233</sub>XAxXA) mit einer hohen Reinheit isoliert werden (Abb. 4.20). Die SDS-PAA-Gelanalyse der Elutionsfraktionen der GST-CD40-Proteine aus *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL zeigte nur die Bande der GST-CD40-Proteine bei ca. 33 kDa (Abb. 4.20 C). Die Reinigung der GST-CD40-Proteine selbst wurde analog zu der Reinigung von GST-fusionierten LMP1-Proteinen durchgeführt (siehe Abschnitt 4.1.1). Aus einem Liter Expressionskultur konnten pro Reinigung durchschnittlich jeweils ca. 10 mg der GST-CD40-Proteine isoliert werden.

Um nun die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 und CD40 zu vergleichen, wurde in einem parallelen GST-Ko-Präzipitationsexperiment mit den LMP1-Proteinen GST-LMP1 wt sowie GST-LMP1(A<sub>379</sub>XAxXA) und den CD40-Proteinen GST-CD40 wt sowie GST-CD40(A<sub>233</sub>XAxXA) die Bindung von His-TRAF6<sub>310-522</sub> untersucht. Hierbei interagierte der TRAF6 C-Terminus mit den beiden Wildtyp-Proteinen GST-LMP1 wt und GST-CD40 wt, wohingegen die jeweiligen Mutanten GST-LMP1(A<sub>379</sub>XAxXA) und GST-CD40(A<sub>233</sub>XAxXA) nicht mehr in der Lage waren, His-TRAF6<sub>310-522</sub> zu binden (Abb. 4.21). Vergleichbar mit den GST-Ko-Präzipitations-Experimenten im ersten Abschnitt dieser Arbeit (Abb. 4.4 B), zeigte die Quantifizierung dieses Experiments, dass 12 % des eingesetzten His-TRAF6<sub>310-522</sub> an GST-LMP1 wt gebunden wurden. In dem Ansatz mit der LMP1-Mutante GST-LMP1(A<sub>379</sub>XAxXA) konnte kein His-TRAF6<sub>310-522</sub> in Immunblot-Analysen nachgewiesen werden (Abb. 4.21).

Die Affinität von His-TRAF6<sub>310-522</sub> zu GST-CD40 wt war jedoch deutlich stärker als die Affinität von His-TRAF6<sub>310-522</sub> zu GST-LMP1 wt. An GST-CD40 wt wurden ca. 50% des eingesetzten His-TRAF6<sub>310-522</sub> gebunden, also mehr als die 4-fache Menge an His-TRAF6<sub>310-522</sub>, die von dem GST-LMP1 wt-Protein gebunden wurde.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist also davon auszugehen, dass die Bindung von TRAF6 an LMP1 von einem P<sub>379</sub>XQxxY-Interaktionsmotiv vermittelt wird. Dieses Motiv ist ähnlich zu dem gemeinsamen TRAF6-Interaktionsmotiv in CD40 und anderen Rezeptoren PxExxF/Y/D/E (Ye *et al.*, 2002). Die Affinität von TRAF6 zu LMP1 ist jedoch geringer als zu CD40. Ein wahrscheinlicher Grund hierfür könnte die unterschiedliche Aminosäurekomposition innerhalb des Motivs an P<sub>0</sub> sein. Der Glutaminsäurerest von CD40 bildet an dieser Position Wasserstoffbrücken mit den TRAF6 Aminosäuren Leu<sub>457</sub> und Ala<sub>458</sub>. LMP1 trägt an dieser Stelle jedoch einen Glutaminrest und sollte daher keine vergleichbaren Interaktionen mit TRAF6 ausbilden können.



**Abb. 4.21: *In vitro* Interaktionsstudien zum Vergleich der Interaktion zwischen LMP1 und CD40 mit TRAF6.** His-TRAF6<sub>310-522</sub> bindet spezifisch GST-LMP1 wt und GST-CD40 wt. Die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 wird über die Aminosäuren P<sub>379</sub>xQxxY innerhalb der CTAR2-Domäne vermittelt. Für die GST-Ko-Präzipitationsstudien wurden die GST-Fusionsproteine GST-LMP1 wt, GST-LMP1(A<sub>379</sub>xAXxA), GST-CD40 wt und GST-CD40(A<sub>233</sub>xAXxA) an GSH-Kügelchen immobilisiert und mit His-TRAF6<sub>310-522</sub> inkubiert. Die SDS-PAA-Gelanalyse zeigte die vergleichbare Bindung der GST-Proteine an die GSH-Kügelchen. Das an LMP1 und CD40 gebundene His-TRAF6<sub>310-522</sub> wurde in Immunblot-Analysen mit dem α-N-6xHis-Antikörper 2F12 detektiert. Von jedem Ko-Präzipitationsansatz wurden 6,5 % des Gesamtansatzes in den Immunblot-Analysen eingesetzt. Als Referenz zur Bestimmung des Anteils an gebundenem Protein wurden in der linken Spur 50 ng His-TRAF6<sub>310-522</sub> geladen. Dies entspricht 2,5 % des eingesetzten His-TRAF6<sub>310-522</sub> in den einzelnen Experimenten. [IB - Immunblot, MW - Molekulargewicht]

#### 4.5.4 Die TRAF6 Aminosäuren Arg<sub>392</sub>, Phe<sub>471</sub> und Tyr<sub>473</sub> sind essentiell für die Interaktion von TRAF6 mit LMP1

Nachdem in den bisherigen Experimenten das TRAF6-Interaktionsmotiv innerhalb der LMP1-Signaldomäne untersucht wurde, konzentrieren sich die folgenden Experimente auf die Analyse der Bindetasche von LMP1 innerhalb der TRAF-Domänen von TRAF6. Für die genaue Charakterisierung der Aminosäuren von TRAF6, welche die Interaktion mit LMP1 vermitteln, wurde zunächst die Interaktion von TRAF6 mit CD40 und anderen zellulären Rezeptoren und Proteinen auf molekularer Ebene anhand der publizierten Kristallstruktur von TRAF6 im Komplex mit verschiedenen Rezeptorpeptiden genauer analysiert (Abb. 4.22; (Ye *et al.*, 2002)). In den bisher durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 durch Mutationen in der CTAR2-Sequenz P<sub>379</sub>VQLSY inhibiert wird. Diese LMP1-Sequenz enthält also ein neues, von den bisher publizierten TRAF6-Interaktionsmotiven abweichendes P<sub>379</sub>xQxxY-Interaktionsmotiv. Dieses neue Interaktionsmotiv unterscheidet sich von dem PxExxF/Y/D/E-Motiv zellulärer Rezeptoren jedoch nur durch eine Substitution von P<sub>0</sub>, also Glutaminsäure in Glutamin (Abb. 4.18 A). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 ebenfalls über die Bindetasche auf der Oberfläche von TRAF6 vermittelt wird, welche auch für die Bindung

an zelluläre Rezeptoren verantwortlich ist. Um dies zu untersuchen, wurden von den TRAF6-Aminosäuren, die mit den Aminosäuren an P<sub>-2</sub>, P<sub>0</sub> und P<sub>3</sub> des TRAF6-Interaktionsmotivs in CD40 interagieren, 4 Aminosäuren ausgewählt, und deren Einfluss in Mutationsstudien auf die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 im Vergleich zu der Bindung von TRAF6 an CD40 genauer untersucht (Abb. 4.22).

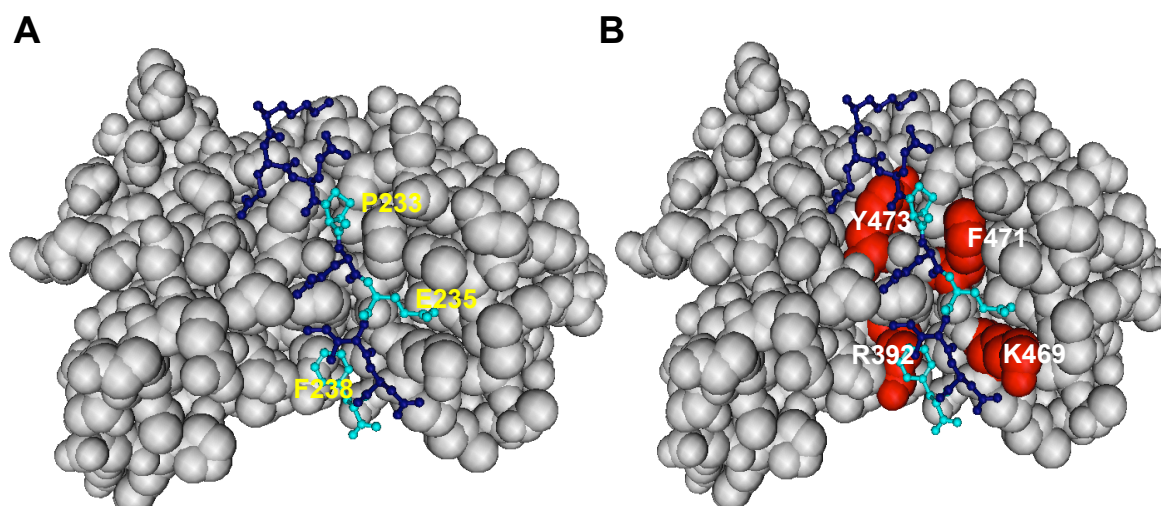
Zwei der ausgewählten TRAF6-Aminosäuren, Phe<sub>471</sub> und Tyr<sub>473</sub>, bilden die Bindetasche von TRAF6 für die Aminosäure an P<sub>-2</sub> der Rezeptorpeptide (Ye *et al.*, 2002). Diese Position wird in allen bisher beschriebenen TRAF6-Bindesequenzen und auch innerhalb der LMP1-Sequenz P<sub>379</sub>VQLSY von der Aminosäure Prolin besetzt (Ye *et al.*, 2002). Mutationen dieser TRAF6-Reste sollten daher einen großen Einfluss auf die Interaktion von TRAF6 sowohl mit CD40 als auch mit LMP1 haben.

Der Aminosäurerest an P<sub>0</sub> der Rezeptorpeptide, also in zellulären Rezeptoren die Aminosäure Glutaminsäure, bildet Wasserstoffbrücken mit den Aminogruppen der Peptidkette der TRAF6-Aminosäuren Leu<sub>457</sub> und Ala<sub>458</sub> (Ye *et al.*, 2002). Da die Interaktion an dieser Stelle jedoch von dem Peptidrückgrat dieser TRAF6-Aminosäuren vermittelt wird (Ye *et al.*, 2002), wurden diese beiden TRAF6-Reste aus den Mutationsstudien ausgenommen. Stattdessen wurde die TRAF6-Aminosäure Lys<sub>469</sub> in die Aminosäure Alanin mutiert. Dieser Lysinrest interagiert wahrscheinlich über elektrostatische Wechselwirkungen mit der Aminosäure an P<sub>0</sub> des TRAF6-Interaktionsmotivs zellulärer Rezeptoren (Ye *et al.*, 2002).

Als viertes wurde die TRAF6-Aminosäure Arg<sub>392</sub> ausgewählt. Diese Aminosäure ist innerhalb der TRAF-Familie in den Proteinen TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5 und TRAF6 hoch konserviert (Park *et al.*, 1999). In der TRAF6-Bindetasche bildet dieser TRAF6-Rest eine amino-aromatische Interaktion mit der Aminosäure an der P<sub>3</sub> der Rezeptorpeptide (Ye *et al.*, 2002).

Die 4 ausgewählten TRAF6-Aminosäuren wurden durch zielgerichtete Mutagenese in PCR-Reaktionen in dem His-TRAF6<sub>301-522</sub>-Expressionplasmid (pET17b-Expressionsvektor) jeweils in ein Alanin mutiert (Abb. 4.23 A). Die Reinigung der His-TRAF6-Mutanten erfolgte analog zu den anderen His-TRAF-Proteinen (siehe Abschnitt 4.1.2). Die His-TRAF6-Mutanten wurden als rekombinante Proteine in *E. coli* exprimiert und über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Alle 4 His-TRAF6-Mutanten, His-TRAF6<sub>310-522</sub>(R392A), His-TRAF6<sub>310-522</sub>(K469A), His-TRAF6<sub>310-522</sub>(F471A) und His-TRAF6<sub>310-522</sub>(Y473A) konnten mit hoher Reinheit aus den Bakterien isoliert werden (Abb. 4.23 B).





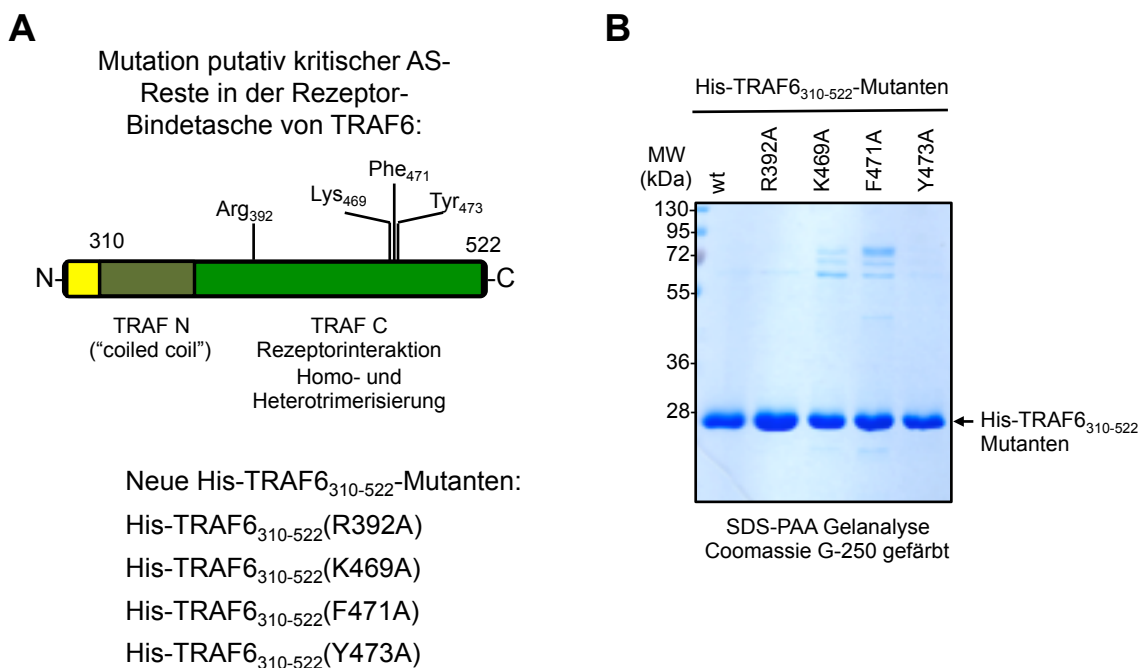
C

### Kritische AS-Reste für die Bindung von TRAF6 an CD40

Rezeptor Peptide		CD40-Kontakte in TRAF6	Art der Interaktion des TRAF6 AS Restes mit CD40 (nach Ye <i>et al.</i> , 2002)	
Position	CD40			LMP1
P <sub>-2</sub>	Pro <sub>233</sub>	Pro <sub>379</sub>	Phe <sub>471</sub>	formt die Bindetasche für den P <sub>-2</sub> -Rest des Rezeptorpeptids
			Tyr <sub>473</sub>	formt die Bindetasche für den P <sub>-2</sub> -Rest des Rezeptorpeptids
P <sub>0</sub>	Glu <sub>235</sub>	Gln <sub>381</sub>	Leu <sub>457</sub>	Wasserstoffbrückenbindung der TRAF6 Hauptkette mit der Carboxylgruppe der Seitenkette des CD40 AS-Restes Glu <sub>235</sub>
			Ala <sub>458</sub>	Wasserstoffbrückenbindung der TRAF6 Hauptkette mit der Carboxylgruppe der Seitenkette des CD40 AS-Restes Glu <sub>235</sub>
			Lys <sub>469</sub>	elektrostatische Wechselwirkung zwischen der Seitenkette von Lys <sub>469</sub> mit der Carboxylgruppe des CD40 AS-Restes Glu <sub>235</sub>
P <sub>3</sub>	Phe <sub>238</sub>	Tyr <sub>384</sub>	Arg <sub>392</sub>	Amino-Aromatische Wechselwirkung mit der Seitenkette des CD40 AS-Restes Phe <sub>238</sub>

**Abb. 4.22: Kristallstruktur von TRAF6 im Komplex mit einem CD40-Peptid.** **A** Die publizierte Kristallstruktur der TRAF6-Aminosäuren 333-508 im Komplex mit dem CD40-Peptid (Aminosäuren 230-238) wurde aus PubMed (MMDB ID: 20224; PDB ID: 1LB6) in das Programm CN3D 4.3 importiert, mit diesem analysiert und zur Veranschaulichung bearbeitet (Originalpublikation der Struktur: Ye *et al.*, 2002). Die Bindung von TRAF6 (grau) wird durch die CD40 Sequenz P<sub>233</sub>QEINF (blau) vermittelt. Die CD40-Aminosäuren Pro<sub>233</sub>, Glu<sub>235</sub> und Phe<sub>238</sub> (türkis) bilden die kritischen Interaktionen auf Seiten von CD40. **B** Die Interaktion von TRAF6 mit dem PxQxxF/Y/D/E Motiv zellulärer Rezeptoren wird durch eine definierte Anzahl von Aminosäuren gebildet. Abgebildet sind die 4 Aminosäuren von TRAF6, Arg<sub>392</sub>, Lys<sub>469</sub>, Phe<sub>471</sub> und Tyr<sub>473</sub> (rot), deren Seitenketten die Interaktion mit dem CD40-Peptid vermitteln. Diese Aminosäuren wurden ausgewählt und jeweils in ein Alanin mutiert, um die Auswirkung der Mutation auf die Bindung von TRAF6 an CD40 und LMP1 studieren zu können. **C** In der Tabelle sind die kritischen Interaktionen von TRAF6 mit dem CD40-Peptid aufgelistet (nach: Ye *et al.*, 2002). Zum Vergleich sind die äquivalenten Aminosäuren der Positionen P<sub>-2</sub>, P<sub>0</sub> und P<sub>3</sub> des LMP1-TRAF6 Interaktionsmotivs (grau) aufgeführt. [AS - Aminosäure]

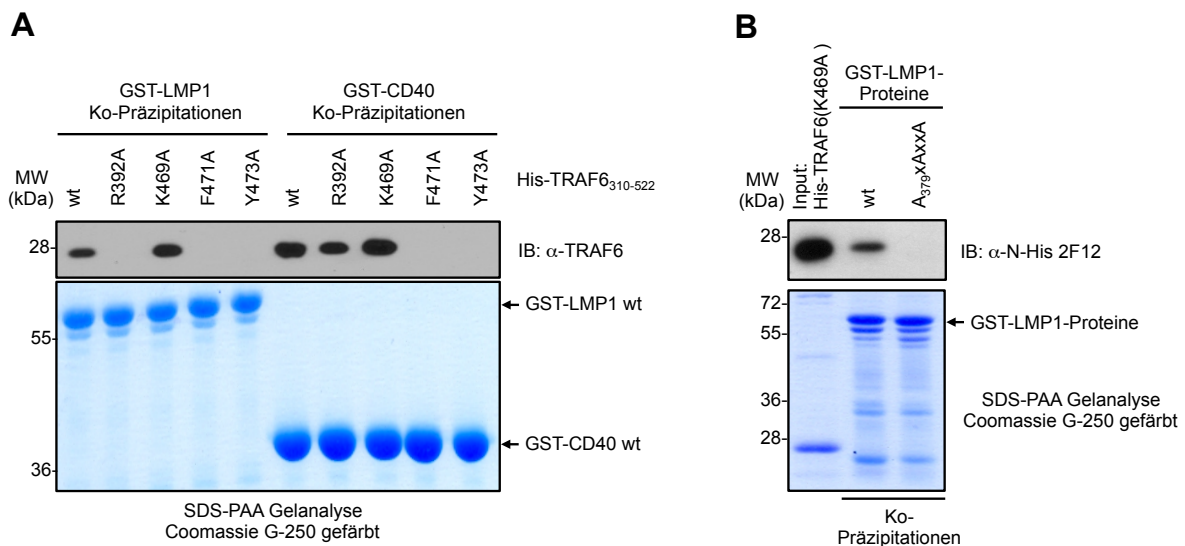
Um nun festzustellen, ob die Bindung der TRAF-Mutanten an LMP1 durch die Mutationen in der TRAF6-Bindetasche beeinflusst wird, wurden Protein-Protein-Interaktionsstudien der His-TRAF6-Mutanten zusammen mit GST-LMP1-Proteinen durchgeführt (Abb. 4.24 A). In GST-Ko-Präzipitationsexperimenten wurden GST-LMP1 wt und GST-CD40 wt an GSH-Kügelchen immobilisiert und mit His-TRAF6<sub>310-522</sub>, His-TRAF6<sub>310-522</sub>(R392A), His-TRAF6<sub>310-522</sub>(K469A), His-TRAF6<sub>310-522</sub>(F471A) und His-TRAF6<sub>310-522</sub>(Y473A) inkubiert. Von den His-TRAF6-Proteinen wurden je Ansatz 3 µg Protein eingesetzt, was einer molaren Endkonzentration von 230 nM entspricht. Ungebundene His-TRAF6<sub>310-522</sub>-Proteine wurden durch Waschen entfernt und die spezifisch gebundenen His-TRAF6<sub>310-522</sub>-Proteine in Immunblot-Analysen nachgewiesen (Abb. 4.24 A).



**Abb. 4.23: Design und Reinigung der His-TRAF6-Mutanten.** **A** Design der His-TRAF6-Mutanten. Die Punktmutationen R392A, K469A, F471A und Y473A wurden in den His-TRAF6<sub>310-522</sub> Expressionsvektor eingeführt. Alle Mutationen befinden sich in der TRAF-C Domäne von TRAF6. **B** Reinigung der His-TRAF6-Mutanten His-TRAF6<sub>310-522</sub>(R392A), -(K469A), -(F471A) und -(Y473A). Die Proteinexpression und Reinigung der His-TRAF6-Mutanten wurde nach dem in dieser Arbeit etablierten Ni<sup>2+</sup>-NTA-Reinigungsprotokoll durchgeführt (siehe Abschnitt 4.1.2). Vergleichbar zu His-TRAF6<sub>310-522</sub> konnten die Punktmutanten mit hoher Reinheit aus *E. coli* isoliert werden. [MW - Molekulargewicht, AS - Aminosäuren]

Die Mutation der TRAF6-Reste Arg<sub>392</sub>, Phe<sub>471</sub> und Tyr<sub>473</sub> innerhalb des TRAF6 C-Terminus führte zum Verlust der Bindung von TRAF6 an die LMP1-Signaldomäne, was die große Bedeutung dieser 3 Aminosäuren innerhalb der TRAF6-Bindetasche für die Interaktion mit LMP1 zeigt (Abb. 4.24, A). Einzig die Mutation der Aminosäure Lys<sub>469</sub> innerhalb von TRAF6

zeigte keinen Einfluss auf die Bindung von TRAF6 an LMP1. Nun könnte diese Bindung von His-TRAF6<sub>310-522</sub>(K469A) auf unspezifischer Bindung z.B. durch eine nicht native Faltung des rekombinanten Proteins beruhen. Um also auszuschließen, dass die Interaktion von His-TRAF6<sub>310-522</sub>(K469A) unspezifisch mit dem verwendeten GST-LMP1-Proteinen oder den GSH-Kügelchen aufgrund des Aminosäureaustausches stattfindet, wurde die TRAF6-Mutante auf ihre Spezifität für das TRAF6-Interaktionsmotiv P<sub>379</sub>XQxxY in der CTAR2-Domäne getestet (Abb. 4.24 B). In diesem Experiment hat His-TRAF6<sub>310-522</sub>(K469A) jedoch spezifisch an GST-LMP1 wt gebunden und interagiert nicht mit der LMP1-Mutante GST-LMP1(A<sub>379</sub>XAxXA). Daher ist davon auszugehen, dass diese TRAF6-Mutante trotz der Mutation der Aminosäure Lys<sub>469</sub> in die Aminosäure Alanin nicht in ihrer spezifischen Bindung an das TRAF6-Interaktionsmotiv beeinträchtigt war.



**Abb. 4.24: Die Rezeptorbindetasche in der TRAF-Domäne von TRAF6 vermittelt die Bindung an LMP1 und CD40. A** Ko-Präzipitationsansätze der His-TRAF6<sub>310-522</sub> Mutanten (His-TRAF6<sub>310-522</sub>, His-TRAF6<sub>310-522</sub>(R392A), His-TRAF6<sub>310-522</sub>(K469A), His-TRAF6<sub>310-522</sub>(F471A), His-TRAF6<sub>310-522</sub>(Y473A)) mit GST-LMP1 wt und CD40 wt. Die His-TRAF6<sub>310-522</sub> Mutanten F471A und Y473A waren nicht mehr in der Lage, mit LMP1 und CD40 zu interagieren. Die TRAF6-Mutante R392A diskriminierte zwischen der Bindung an CD40 und LMP1. His-TRAF6<sub>310-522</sub>(R392A) wurde nicht mehr an GST-LMP1 wt gebunden, interagiert jedoch noch mit GST-CD40 wt. Die Mutation des TRAF6-Restes Lys<sub>469</sub> hatte keinen Einfluss auf die Bindung von TRAF6 an LMP1 und CD40. Die His-TRAF6<sub>310-522</sub> Mutante K469A interagiert sowohl mit der Signaldomäne von LMP1 als auch CD40. Für die GST-Ko-Präzipitationsstudien wurden die Proteine GST-LMP1 wt und GST-CD40 wt an GSH-Kügelchen immobilisiert und mit den His-TRAF6<sub>310-522</sub>-Mutanten inkubiert. Die gebundenen TRAF6-Proteine wurden mittels Immunblot-Analysen mit dem α-TRAF6-Antikörper C-16 detektiert. Die vergleichbare Bindung der GST-Proteine an die GSH-Kügelchen wurde in SDS-PAA Kontrollgelen überprüft. Für die Immunblot-Analysen und die Kontrollgele wurden 6,5 % von jedem Ko-Präzipitationsansatz geladen. **B** Die His-TRAF6<sub>310-522</sub> Mutante K469A interagiert, wie der TRAF6-Wildtyp (siehe Abb. 4.21), spezifisch mit dem TRAF6-Interaktionsmotiv P<sub>379</sub>XQxxY innerhalb der CTAR2-Domäne. [IB - Immunblot, MW - Molekulargewicht]

Interessanterweise diskriminierte His-TRAF6<sub>310-522</sub>(K469A) ebenfalls nicht zwischen der Bindung an LMP1 bzw. CD40. In dem vergleichenden GST-Ko-Präzipitationsexperiment zeigte sich, dass neben His-TRAF6<sub>310-522</sub> auch His-TRAF6<sub>310-522</sub>(K469A) sowohl mit GST-LMP1 wt als auch mit GST-CD40 wt interagiert (Abb. 4.24 A). Die Mutation des TRAF6-Restes Lys<sub>469</sub> scheint also keine essenzielle Rolle bei der Erkennung TRAF6-spezifischer Interaktionsmotive durch die Bindetasche von TRAF6 zu haben (Abb. 4.24 A).

Es zeigte sich jedoch, dass die Punktmutation R392A innerhalb von TRAF6 einen unterschiedlichen Einfluss auf die Bindung von TRAF6 an die Signaldomänen von LMP1 und CD40 hat (Abb. 4.24 A, vgl. Spur 2 und 7, von links). Während die Bindung von His-TRAF6<sub>310-522</sub>(R392A) an GST-LMP1 wt nicht mehr detektiert werden konnte, interagiert His-TRAF6<sub>310-522</sub>(R392A) immer noch mit GST-CD40 wt. Jedoch ist die Menge des an GST-CD40 wt gebundenem His-TRAF6<sub>310-522</sub>(R392A) reduziert gegenüber der Menge von gebundenem His-TRAF6<sub>310-522</sub> (Abb. 4.24 A). Die TRAF6-Aminosäure Arg<sub>392</sub> interagiert mit der P<sub>3</sub> des TRAF6-Interaktionsmotivs zellulärer Rezeptoren. Diese Position kann von aromatischen als auch von sauren Aminosäureresten (Phe, Tyr, Asp und Glu) besetzt sein und somit wahrscheinlich auch verschiedene räumliche Positionen in der Bindetasche einnehmen (Ye *et al.*, 2002). Es ist möglich, dass das LMP1-Peptid P<sub>379</sub>VQLSY aufgrund seiner von CD40 abweichenden Aminosäurekomposition an dieser Position anders in die Bindetasche von TRAF6 eingebettet ist, und daher der TRAF6-Rest Arg<sub>392</sub> zwar kritisch für die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 ist, die TRAF6-Interaktion mit dem P<sub>3</sub>-Rest von CD40 jedoch durch weitere Interaktionen des CD40-Proteins mit den umliegenden Aminosäuren von TRAF6 stabilisiert wird. Die wahrscheinlichere Erklärung bietet jedoch die Tatsache, dass die Affinität von TRAF6 an LMP1 ohnehin geringer ist als die Affinität von TRAF6 zu CD40 (siehe Abschnitt 4.5.3). Daher ist es möglich, dass die Bindung von His-TRAF6<sub>310-522</sub>(R392A) an CD40 von den anderen TRAF6-Aminosäuren innerhalb der Bindetasche noch ausreichend stabilisiert werden kann und so His-TRAF6<sub>310-522</sub>(R392A) gebunden wird. Durch die abweichende Aminosäurekomposition an P<sub>0</sub> in LMP1 und CD40 ist die Bindung von TRAF6 an LMP1 wahrscheinlich schwächer im Vergleich zu der Bindung an CD40 und somit wäre es möglich, dass die Bindung von His-TRAF6<sub>310-522</sub>(R392A) an LMP1 daher nicht mehr ausreichend stabilisiert werden kann.

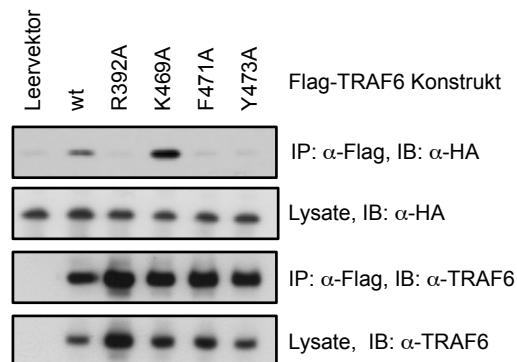
Zusammenfassend konnte in diesen *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien erstmals die direkte Bindung von TRAF6 an LMP1 gezeigt werden. TRAF6 interagiert dabei mit der LMP1-Sequenz P<sub>379</sub>VQLSY innerhalb der CTAR2-Domäne. Diese Sequenz enthält ein neuartiges TRAF6-Interaktionsmotiv, PxQxxY. Dieses Motiv unterscheidet sich von dem TRAF6-Interaktionsmotiv zellulärer Rezeptoren durch die Aminosäure Glutamin statt Glutaminsäure an der Position P<sub>0</sub>. Trotz dessen wird die Bindung von TRAF6 an LMP1 durch

dieselbe Bindetasche auf der Oberfläche von TRAF6 vermittelt, welche auch die Interaktion von TRAF6 mit zellulären Rezeptoren initiiert.

#### 4.5.5 Die Punktmutationen R392A, F471A und Y473A in TRAF6 inhibieren die Bindung von TRAF6 an LMP1 *in vivo*

Um die Relevanz der aus den *in vitro* durchgeführten Protein-Protein-Interaktionsstudien gewonnenen Informationen über die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 auch im zellulären Kontext zu verifizieren, wurden Ko-Immunpräzipitationsstudien in HEK293-D-Zellen zwischen LMP1 und den TRAF6-Punktmutanten durchgeführt (Abb. 4.25). Hierfür wurden die TRAF6 Aminosäuren Arg<sub>392</sub>, Lys<sub>469</sub>, Phe<sub>471</sub> und Tyr<sub>473</sub> durch zielgerichtete Mutagenese mittels PCR-Reaktionen in dem pRK5-Flag-TRAF6 wt Expressionsvektor jeweils in ein Alanin mutiert.

Für die Ko-Immunpräzipitationen wurden diese Flag-TRAF6-Mutanten zusammen mit HA-LMP1 wt in HEK293-D-Zellen exprimiert. Die Immunpräzipitation der Flag-TRAF6-Proteine wurde wie oben beschrieben (siehe Abschnitt 4.5.1) mit dem  $\alpha$ -Flag-Antikörper 2F12 durchgeführt. Das an die TRAF6-Proteine gebundene HA-LMP1 wt wurde in Immunblot-Analysen unter Verwendung des  $\alpha$ -HA-Antikörpers 12CA5 nachgewiesen (Abb. 4.25).



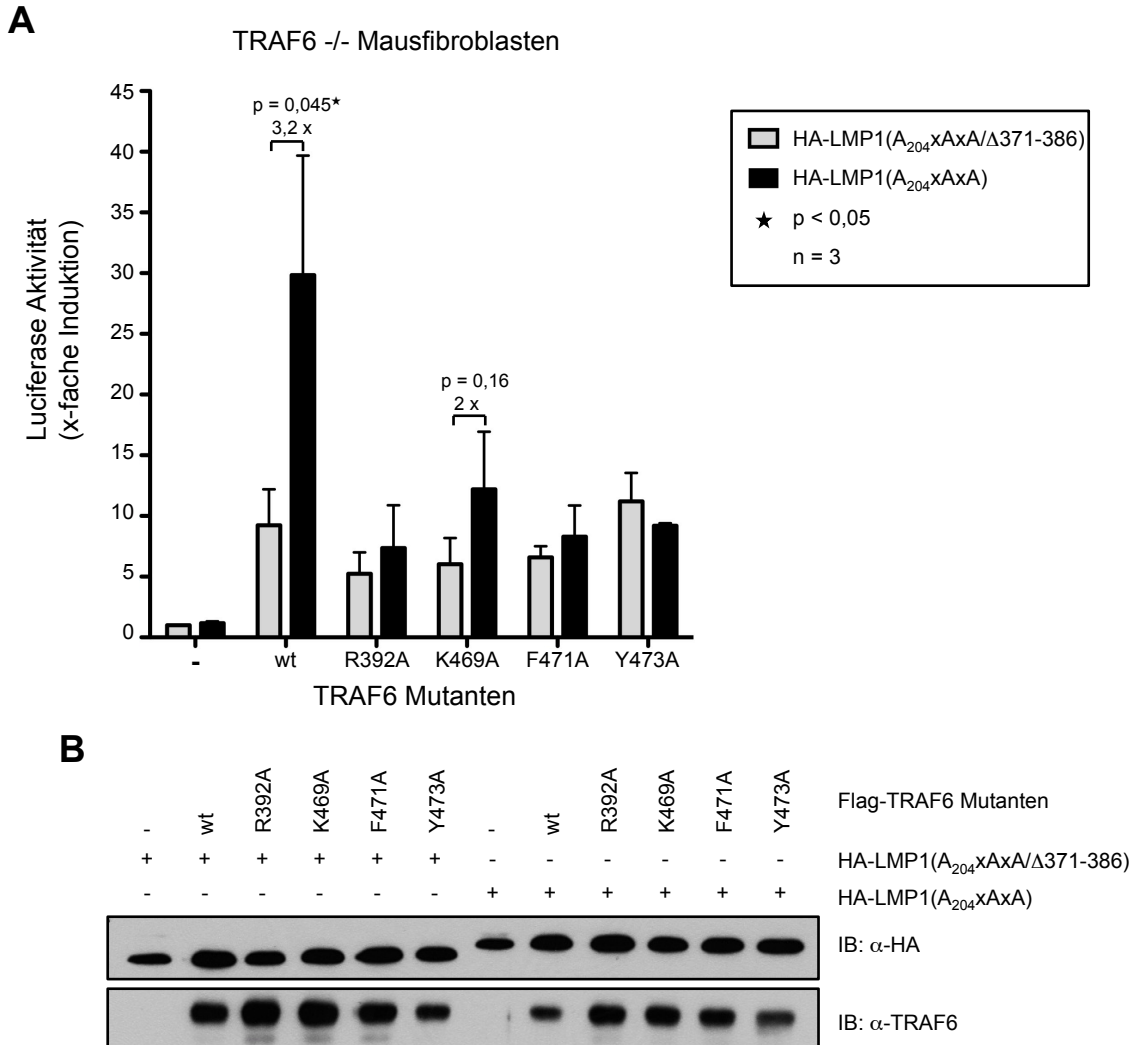
**Abb. 4.25: Die TRAF6-Aminosäuren Arg<sub>392</sub>, Phe<sub>471</sub>, und Tyr<sub>473</sub> sind essenziell für die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 *in vivo*.** HA-LMP1 wt bindet spezifisch Flag-TRAF6 und Flag-TRAF6(K369A) in Ko-Immunpräzipitationen aus HEK293-D-Zellen. Die Mutation der TRAF6-Reste Arg<sub>392</sub>, Phe<sub>471</sub> oder Tyr<sub>473</sub> inhibierte die Interaktion von TRAF6 mit LMP1. Für die Immunpräzipitation wurde Flag-TRAF6 wt bzw. die Flag-TRAF6-Mutanten R392A, K469A, F471A oder Y473A zusammen mit HA-LMP1 wt durch Transfektion von HEK293-D-Zellen mit 0,5  $\mu$ g der pRK5-TRAF6-Konstrukte und 1  $\mu$ g des pCMV-HA-LMP1-Plasmids exprimiert. Die Flag-TRAF6-Proteine wurde mittels  $\alpha$ -Flag-Antikörpern präzipitiert und gebundene HA-LMP1-Proteine mittels Immunblot Analysen detektiert. Die Flag-TRAF6-Proteine wurden mit dem  $\alpha$ -TRAF6-Antikörper H274 detektiert, die HA-LMP1-Proteine mit dem  $\alpha$ -HA-Antikörper 12CA5. Für die Immunblot-Analysen wurden 10  $\mu$ g Gesamtprotein der Lysate und 25 % der Immunpräzipitationen geladen [IP - Immunpräzipitation, IB - Immunblot]

Wie in den *in vitro* Studien zeigte sich auch in diesen Experimenten, dass HA-LMP1 wt spezifisch sowohl mit Flag-TRAF6 als auch Flag-TRAF6(K469A) in HEK293-D-Zellen interagiert. Vergleichbar mit den GST-Ko-Präzipitationsexperimenten (Abb. 4.24) inhibierten die Punktmutationen R392A, F471A und Y473A in Flag-TRAF6-Proteinen die Bindung von HA-LMP1 wt auch *in vivo* (Abb. 4.25) und bestätigten damit die Daten aus den *in vitro* Experimenten aus dem vorangegangenen Abschnitt.

#### **4.5.6 Die Mutationen R392A, F471A und Y473A in TRAF6 verhindern die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch die CTAR2-Domäne**

TRAF6 bindet also an die CTAR2-Sequenz P<sub>379</sub>VQLSY. Diese Sequenz vermittelt die Aktivierung des JNK-, des kanonischen NF- $\kappa$ B-, des IRF7- und des p38 MAPK-Signalweges durch die CTAR2-Domäne und TRAF6 ist essenziell für die Aktivierung dieser Signalwege durch LMP1 (Floettmann *et al.*, 1997; Kieser *et al.*, 1999; Schultheiss *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2008). Da die Mutationen R392A, F471A und Y473A in TRAF6 die Bindung von TRAF6 an LMP1 inhibieren, sollten TRAF6-Proteine mit diesen Mutationen die Aktivierung von Signalwegen durch die CTAR2-Domäne nicht mehr vermitteln können. Um also die Relevanz der direkten Bindung von TRAF6 an LMP1 für die Aktivierung dieser Signalwege zu zeigen, wurden Rekonstitutionsexperimente mit einem NF- $\kappa$ B-Luciferase-Reportergen in embryonalen TRAF6<sup>-/-</sup> Mausfibroblasten durchgeführt. Die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren durch die Interaktion der TRAF6-Proteine mit LMP1 wurde in diesen Versuchen durch die Verwendung des Luciferase-Reportergenkonstruktes 3 $\kappa$ B-Luc detektiert (Mitchell *et al.*, 1995). LMP1 aktiviert beide NF- $\kappa$ B-Signalwege, also sowohl den nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg über die CTAR1-Domäne als auch den kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg über die CTAR2-Domäne (Atkinson *et al.*, 2003; Eliopoulos, Caamano, *et al.*, 2003; Luftig *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 2003; Luftig *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006; Kieser, 2007). Da in diesen Experimenten jedoch nur die Aktivierung des TRAF6-abhängigen, kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges durch die CTAR2-Domäne untersucht werden sollte, wurden LMP1-Mutanten mit mutierter CTAR1-Domäne verwendet (HA-LMP1(A<sub>204</sub>XAXA)). Um die spezifische Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signale durch die direkte Interaktion von TRAF6 mit der CTAR2-Domäne zu zeigen, wurde weiterhin eine LMP1-Nullmutante sowohl mit mutierter CTAR1-Domäne als auch deletierter CTAR2-Domäne verwendet (HA-LMP1(A<sub>204</sub>XAXA/ $\Delta$ 371-386)). Beide LMP1-Mutanten wurden sowohl mit TRAF6-Wildtyp-Proteinen (FLAG-TRAF6 wt) als auch Flag-TRAF6-Mutanten mit den Punktmutationen R392A, K469A, F471A und Y473A zusammen in den embryonalen TRAF6<sup>-/-</sup> Mausfibroblasten exprimiert. Als Referenz für die x-fache Induktion der NF- $\kappa$ B-Reporteraktivität in den einzelnen Ansätzen wurde die Aktivität des Luciferase-Reportergens 3 $\kappa$ B-Luc in dem Ansatz mit der LMP1-

Nullmutante und dem pRK5-Leervektor verwendet. Alle gemessenen Werte wurden auf diesen Referenzwert bezogen (Abb. 4.26 A).



**Abb. 4.26: Die TRAF6-Mutanten R392A, F471A und Y473A sind nicht mehr in der Lage, CTAR2-induzierte NF-κB-Aktivierung in embryonalen TRAF6<sup>-/-</sup> Mausfibroblasten zu vermitteln.**

**A** Die LMP1-Mutanten HA-LMP1(A<sub>204</sub>xAxA/Δ371-386) und HA-LMP1(A<sub>204</sub>xAxA) sowie die TRAF6-Mutanten Flag-TRAF6 wt, Flag-TRAF6(R392A), Flag-TRAF6(K469A), Flag-TRAF6(F471A) und Flag-TRAF6(Y473A) wurden wie angegeben in embryonalen TRAF6<sup>-/-</sup> Mausfibroblasten exprimiert und die Reporteraktivität der Luciferasen in den Ansätzen gemessen. Pro Ansatz wurden 0,05 µg des NF-κB-Reporterplasmids 3xκB-Luc und 0,2 µg des pPGK-Renilla-Reporterplasmids eingesetzt. Die x-fache Induktion der Luciferaseaktivität des NF-κB-Reporters jedes Ansatzes wurde in einem ersten Schritt auf die Transfektionseffizienz, also die Aktivität der Renilla-Luciferase und in einem weiteren Schritt auf die Expression der LMP1- und TRAF6-Proteine normiert (B). Die x-fache Induktion jedes Ansatzes ist angegeben im Vergleich zu dem Referenzwert aus der Aktivierung des HA-LMP1(A<sub>204</sub>xAxA/Δ371-386)-Konstrukts zusammen mit dem TRAF6-Leervektor (pRK5). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten, die p-Werte wurden mit dem T-Test (zweiseitig, gepaart) berechnet. **B** Die Expression der HA-LMP1- und Flag-TRAF6-Proteine in den embryonalen TRAF6<sup>-/-</sup> Mausfibroblasten wurde in Immunblot-Analysen kontrolliert. Die einzelnen Expressionslevel wurden mit der Software ImageJ quantifiziert. Gezeigt ist eine repräsentative Abbildung eines Experimentes. [IB - Immunblot, n - Anzahl der Experimente, p - Signifikanzwert]

Die spezifische Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch die CTAR2-Domäne war in den durchgeführten Experimenten strikt abhängig von TRAF6. HA-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) zeigte keine Aktivierung des NF- $\kappa$ B-abhängigen Luciferase-Reportergens im Vergleich zu dem Referenzansatz mit HA-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA/ $\Delta$ 371-386). Im Gegensatz dazu erzeugte schon die Überexpression von TRAF6 eine gewisse LMP1-unabhängige Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges in den embryonalen TRAF6<sup>-/-</sup> Mäusfibroblasten. In Ansätzen, in denen Flag-TRAF6 wt zusammen mit HA-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA/ $\Delta$ 371-386) exprimiert wurde, zeigte sich eine 9,3-fache Induktion der NF- $\kappa$ B-Reporteraktivität gegenüber Ansätzen ohne Flag-TRAF6 (Abb. 4.26 A). Diese Autoaktivierung war auch in den Ansätzen mit den Flag-TRAF6-Mutanten R392A, K469A, F471A und Y473A zu beobachten. Die Überexpression von TRAF6 erzeugt also, unabhängig von der Stimulation durch einen Rezeptor, eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges. Jede der Mutanten erzeugte ebenfalls mindestens eine 5-fache Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Luciferasereporteraktivität, wenn sie zusammen mit der LMP1-Nullmutante exprimiert wurde. Die Autoaktivierung der drei Flag-TRAF6-Mutanten R392A, K469A und F471A zusammen mit HA-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA/ $\Delta$ 371-386) war dabei etwas geringer (im Mittel 6-fach) im Vergleich zu der Autoaktivierung von Flag-TRAF6 wt (9,3-fach) und Flag-TRAF6 Y473A (11,2-fach).

Zusätzlich zu dieser LMP1-unabhängigen Autoaktivierung war ein kooperativer Effekt bei der gemeinsamen Expression von Flag-TRAF6 wt zusammen mit HA-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) in den TRAF6<sup>-/-</sup>-Zellen zu beobachten. Die Ko-Expression von Flag-TRAF6 zusammen mit HA-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) erzeugte eine 30-fache Induktion der Luciferase-Aktivität. Diese Aktivierung ist um den Faktor 3,2 höher als die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Luciferase-Aktivität in Ansätzen, in denen Flag-TRAF6 zusammen mit HA-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA/ $\Delta$ 371-386) exprimiert wurde und war signifikant ( $p = 0,045$ ) gegenüber der Autoaktivierung von NF- $\kappa$ B-Signalen durch TRAF6 allein.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Bindestudien (vgl. Abb. 4.23 und 4.24 mit 4.26) war kein signifikanter, kooperativer Anstieg der NF- $\kappa$ B-Reporteraktivität bei der Expression von Flag-TRAF6(K469A) zusammen mit HA-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) gegenüber den Ansätzen mit Flag-TRAF6(K469A) und HA-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA/ $\Delta$ 371-386) zu beobachten. In den Ansätzen mit Flag-TRAF6(K469A) und LMP1-Proteinen mit intakter CTAR2-Domäne war die NF- $\kappa$ B-Reporteraktivität zwar um das 2-fache höher als in den Ansätzen mit Flag-TRAF6(K469A) und der HA-LMP1-Nullmutante. Dieser Anstieg war jedoch nicht signifikant ( $p = 0,163$ ) und die quantitative Ausbeute an NF- $\kappa$ B-Signalen nur 11,4-fach. Damit erreichte Flag-TRAF6(K469A) keine mit Wildtyp-TRAF6 vergleichbare Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Obwohl also die TRAF6-Mutante K469A an LMP1 binden kann, scheint sie die Induktion von NF- $\kappa$ B-



Signalen nicht initiieren zu können. Diese Diskrepanz konnte bisher nicht weiter geklärt werden. Es könnte aber sein, dass die K469A Mutation die Bindung von TRAF6 an LMP1 nicht beeinflusst aber die Interaktion mit weiteren Signalmolekülen des CTAR-Signalkomplexes inhibiert, die ebenfalls mit der TRAF-Domäne von TRAF6 interagieren können, z.B. BS69 oder TNIK (siehe Kapitel 1.3 sowie 5.3).

Das wichtigste Ergebnis dieser Experimente war, dass die Flag-TRAF6-Mutanten Flag-TRAF6(R392A), Flag-TRAF6(F471A) und Flag-TRAF6(Y473A) keine kooperative Induktion der NF- $\kappa$ B-Reporteraktivität mit HA-LMP1(A<sub>204</sub>XAxA) in den TRAF6<sup>-/-</sup>-Zellen mehr zeigten. Keine der TRAF6-Mutanten, die nicht mehr in der Lage sind, an LMP1 zu binden, konnte also noch die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch die CTAR2-Domäne vermitteln. Die Inhibition der direkten Interaktion von TRAF6 mit LMP1 durch die Mutationen in der TRAF6-Bindetasche verhinderte ebenso die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade. Somit ist die direkte Bindung von TRAF6 an die CTAR2-Domäne essenziell für die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch die CTAR2-Domäne. Diese Experimente zeigten also, dass die direkte Interaktion von TRAF6 mit LMP1 kein Artefakt aus *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien war, sondern essenziell für die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch die CTAR2-Domäne in zellulären Systemen ist.

#### 4.6 TRADD und TRAF6 sind direkte Interaktionspartner

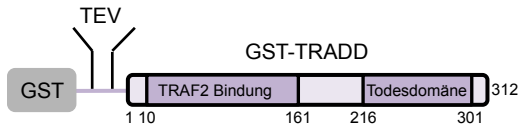
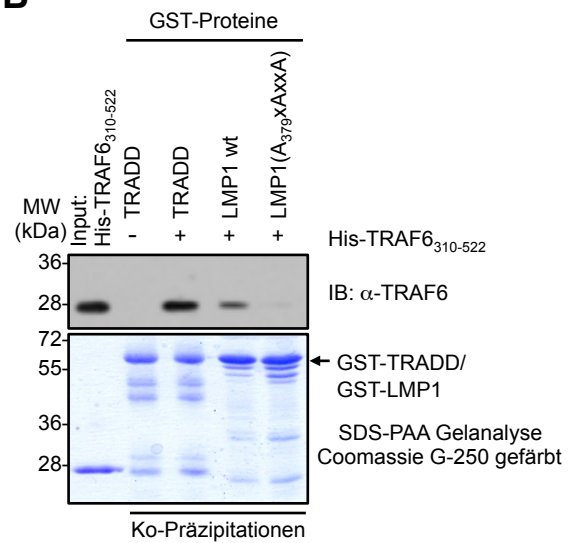
Neben TRAF6 ist das Todesdomänenprotein TRADD als wichtiger Interaktionspartner von LMP1 beschrieben. Wie TRAF6 spielt TRADD ebenfalls eine wichtige Rolle in der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch die CTAR2-Domäne (Izumi & Kieff, 1997; Schneider *et al.*, 2008). Weiterhin wird die Interaktion von TRADD mit LMP1 ebenfalls durch die CTAR2-Domäne vermittelt (Izumi & Kieff, 1997; Schneider *et al.*, 2008). Da TRAF6 und TRADD somit von LMP1 in räumlicher Nähe zueinander rekrutiert werden und beide Moleküle eine wichtige Rolle für die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch die CTAR2-Domäne spielen, stellte sich die Frage, ob diese beiden Proteine auch miteinander interagieren können. Um dies zu untersuchen, wurden *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien zwischen rekombinanten TRADD- und TRAF6-Proteinen durchgeführt.

In einem ersten GST-Ko-Präzipitations-Experiment wurden GST-fusioniertes TRADD (GST-TRADD, siehe Abb. 4.27 A) sowie GST-LMP1 wt und GST-LMP1(A<sub>379</sub>XAxX) an GSH-Kügelchen immobilisiert und mit His-TRAF6<sub>310-522</sub> inkubiert. Die Immunblot-Analyse dieses Experimentes zeigte, dass His-TRAF6<sub>310-522</sub> spezifisch mit GST-TRADD und GST-LMP1 wt interagiert (Abb. 4.27 B). Damit konnte erstmals eine Interaktion zwischen TRAF6 und TRADD gezeigt werden.

**A**

GST-rTEV-TRADD-Fusionsprotein:

Wildtyp-TRADD wurde N-terminal mit GST fusioniert. Um TRADD von GST trennen zu können, wurde eine TEV-Schnittstelle eingefügt

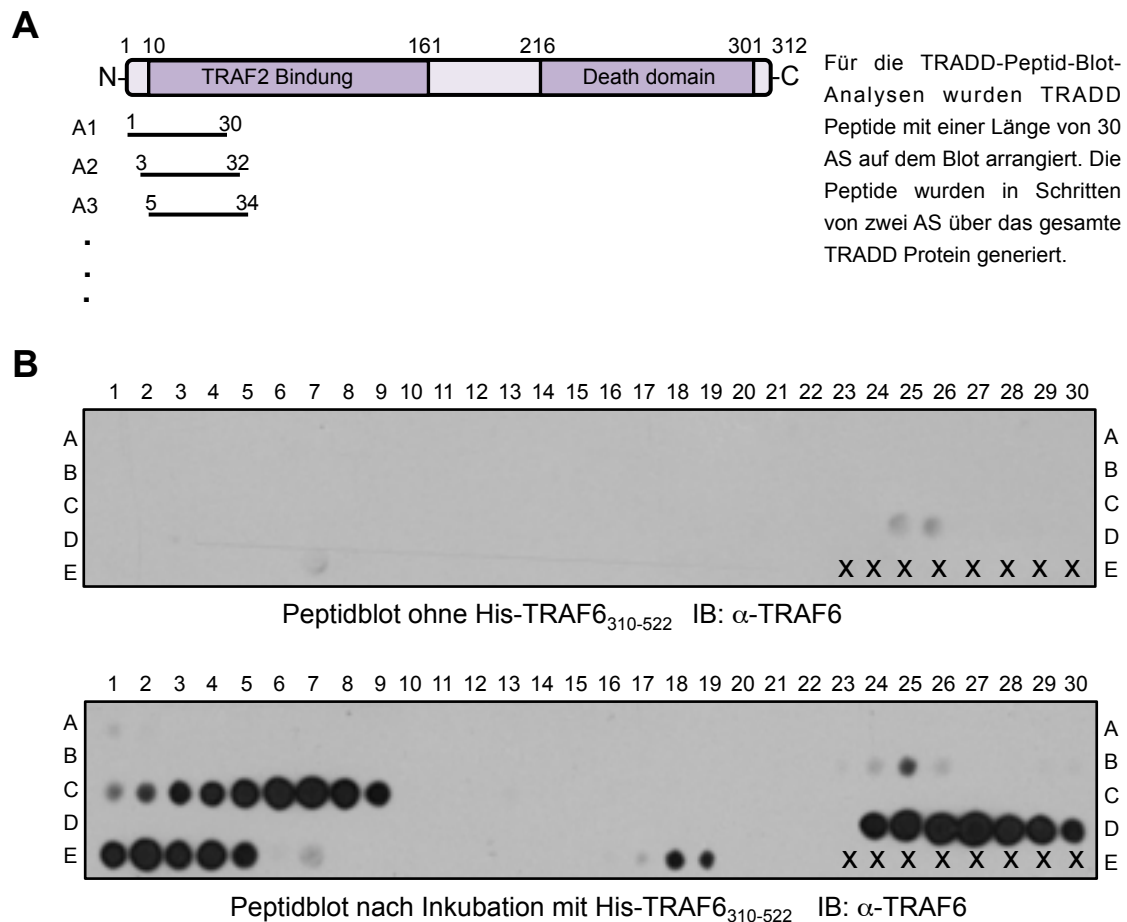
**B**

**Abb. 4.27: Die TRAF-Domänen von TRAF6 interagieren mit TRADD *in vitro*.** **A** Schematische Darstellung des GST-TRADD-Fusionsproteins. **B** His-TRAF6<sub>310-522</sub> bindet direkt an GST-TRADD in GST-Ko-Präzipitationsexperimenten. GST-TRADD und die GST-LMP1-Fusionsproteine (GST-LMP1 wt und GST-LMP1(A<sub>379</sub>XAXXA)) wurden an GSH-Kügelchen immobilisiert und mit His-TRAF6<sub>310-522</sub> inkubiert. Das an die TRADD- und LMP1-Proteine gebundene His-TRAF6<sub>310-522</sub> wurde in Immunblot-Analysen mit dem α-TRAF6-Antikörper C-16 detektiert. His-TRAF6<sub>310-522</sub> interagiert in diesem Experiment sowohl mit GST-TRADD als auch mit GST-LMP1 wt. In den Immunblot-Analysen wurden jeweils 6,5 % des Gesamtansatzes eingesetzt. Das SDS-PAA-Gel zeigte die vergleichbare Bindung der GST-LMP1-Proteine und GST-TRADD an die GSH-Kügelchen. [IB-Immunblot]

Um dieses Ergebnis zu bestätigen und zur weiteren Charakterisierung der Interaktion zwischen TRAF6 und TRADD wurden Peptidblot-Experimente mit TRADD-Peptiden durchgeführt. In diesen sollte zusätzlich die Region von TRADD identifiziert werden, an die TRAF6 bindet. Daher wurden für diese Experimente die TRADD-Peptidsequenzen so gewählt, dass jedes der TRADD-Peptide jeweils 30 Aminosäuren umfasste und in Schritten von 2 Aminosäuren das gesamte TRADD-Protein abgedeckt wurde (Abb. 4.28 A). Somit ergaben sich 142 zu testende TRADD-Peptide, die auf Membranen arrangiert wurden (Abb. 4.28 B).

Äquivalent zu den Peptidblot-Experimenten zwischen TRAF6 und immobilisierten LMP1- und CD40-Peptiden (siehe Abschnitt 4.5.2) wurde die Membran mit den TRADD-Peptiden mit 10 ng/μL (386 μM) His-TRAF6<sub>310-522</sub> inkubiert und das gebundene His-TRAF6<sub>310-522</sub> in Immunblot-Analysen unter Verwendung des α-TRAF6-Antikörpers C-20 in Kombination mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen (Abb. 4.28 B). Die verwendeten Antikörper zeigten selbst keine unspezifische Bindung an die Membranen (Abb. 4.28 B, oberer Blot).

In diesen Experimenten konnten sehr deutlich zwei Gruppierungen von TRADD-Peptiden identifiziert werden, an die His-TRAF6<sub>310-522</sub> gebunden hatte (Abb. 4.28 B, unterer Blot). Die erste große Peptidgruppe umfasste die TRADD-Peptide C1 bis C9. Innerhalb dieser Gruppe zeigten die TRADD-Peptide C1-C9 eine graduelle Zunahme des Signals, also der Bindung von His-TRAF6<sub>310-522</sub> (Abb. 4.28 B). Diese Peptidgruppe inklusive der Peptide C1 und C2 umfasst die TRADD Aminosäuren 121-168 mit einer überlappenden Kernsequenz S<sub>137</sub>CILAQQPDRLRDE<sub>150</sub> (Abb. 4.29 B).



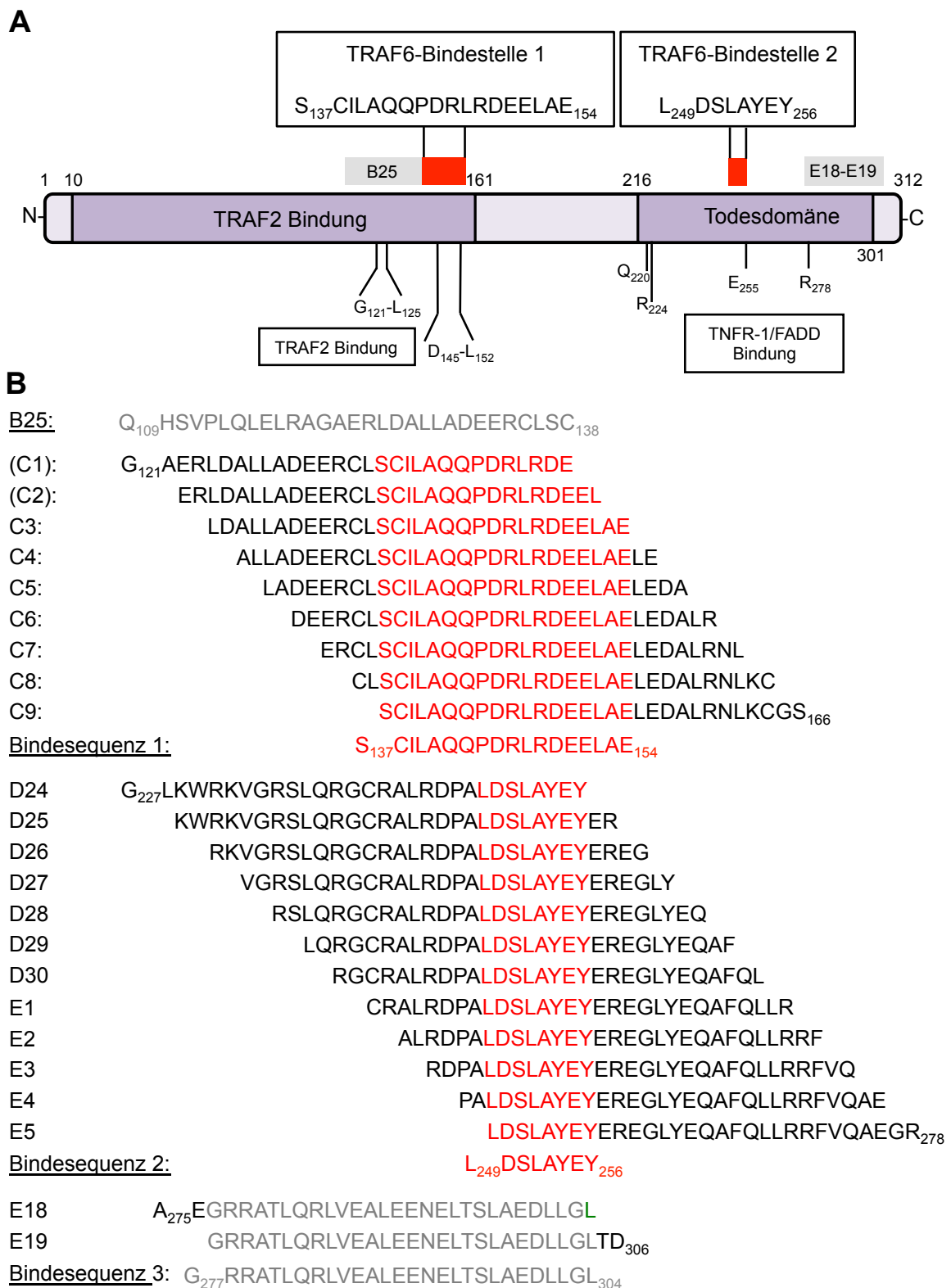
**Abb. 4.28: Analyse der TRAF6-Bindestellen im TRADD-Protein.** **A** Aufbau des TRADD-Peptidblots: Jeweils 30 Aminosäuren umfassende TRADD-Peptide wurden für die Experimente auf der Membran arrangiert. Die Peptide wurden in Schritten von zwei Aminosäuren über das gesamte TRADD-Protein generiert. Für die 312 Aminosäuren von TRADD ergab sich so eine zu testende Anzahl von 142 Peptiden. Die Nummerierung der Peptide erfolgte nach der Position auf der Membran (A01-E22). Die Positionen ohne Peptide sind auf den Membranen mit Kreuzen gekennzeichnet. **B** Peptidblot-Analyse zwischen His-TRAF6<sub>310-522</sub> und den immobilisierten TRADD-Peptiden. Die Membranen wurden mit 10 ng/ $\mu$ L (386  $\mu$ M) His-TRAF6<sub>310-522</sub> inkubiert. Das gebundene His-TRAF6<sub>310-522</sub> wurde mit dem  $\alpha$ -TRAF6-Antikörper C20 detektiert. His-TRAF6<sub>310-522</sub> interagiert in diesen Experimenten mit 2 TRADD-Peptidregionen, C1-C9 und D24-E5, sowie mit 2 weiteren kürzeren TRADD-Peptidsequenzen, B25 und E18/E19 (unterer Peptidblot). Die Aminosäuresequenzen dieser Peptide sind in Abb. 4.29 dargestellt. [IB-Immunblot]

Da die schwächere Bindung von TRAF6 an die beiden TRADD-Peptide C1 und C2 wahrscheinlich darauf beruht, dass diese TRADD-Peptide nicht alle Aminosäuren, die in dieser Region eine Interaktion mit TRAF6 ausbilden können, umfassen, wurde die TRAF6-Bindesequenz 1 von TRADD um 4 Aminosäuren erweitert. Demnach beinhaltet die TRAF6-Bindesequenz 1 die TRADD-Aminosäuren S<sub>137</sub>CILAQQPDRLRDEELAE<sub>154</sub> (Abb. 4.29 B).

Die zweite große Peptidgruppe von TRAF6-bindenden Peptiden umfasste die TRADD-Peptide D24 bis E5 (Abb. 4.29, B). Diese Peptide basieren insgesamt auf den TRADD-Aminosäuren 227-278 und haben eine gemeinsame TRAF6-Bindesequenz 2 L<sub>249</sub>DSLAYEY<sub>256</sub> (Abb. 4.29 B). Neben diesen beiden sehr deutlichen Signalgruppen konnten zwei schwächere Interaktionsregionen identifiziert werden, das TRADD-Peptid B25 sowie die TRADD-Peptide E18 und E19. Aus den beiden TRADD-Peptiden E18 und E19 wurde ebenfalls eine gemeinsame TRAF6-Bindesequenz 3, G<sub>277</sub>RRATLQRLVEALEENELTS<sub>LAEDLLGL</sub><sub>304</sub>, identifiziert (Abb. 4.29 B).

Besonders interessant ist, dass die TRAF6 bindenden Peptidsequenzen, die im N-Terminus von TRADD identifiziert wurden, also die Gruppe C1-C9 und das Peptid B25, teilweise deckungsgleich mit der Region sind, die von TRAF2 innerhalb des TRADD-N-Terminus gebunden wird (Abb. 4.29). Dies bedeutet, dass diese Peptide auf der Oberfläche von TRADD lokalisiert sind und somit wahrscheinlich auch im Wildtyp-TRADD für die Interaktion mit TRAF6 zur Verfügung stehen. Das Peptid B25 beinhaltet die TRADD-Aminosäuren Gly<sub>121</sub>-Leu<sub>125</sub>, die in die Bindung von TRADD an den C-Terminus von TRAF2 involviert sind (Tsao *et al.*, 2000). Zusätzlich umfasst die TRAF6-Bindesequenz 1 aus der Peptidgruppe C1-C9 die TRADD-Aminosäuren Asp<sub>145</sub>-Leu<sub>152</sub>, die ebenfalls eine Rolle in der Bindung von TRAF2 durch TRADD spielen (Park *et al.*, 2000; Tsao *et al.*, 2000). Vor allem die TRADD Aminosäure Arg<sub>146</sub> in dieser Region spielt eine zentrale Rolle für die Bindung von TRAF2 (Park *et al.*, 2000).

Auch die TRAF6-Bindesequenzen 2 und 3 (Abb. 4.29 B), die aus der Todesdomäne von TRADD stammen, beinhalten Aminosäuren, die auch im Wildtyp-TRADD auf der Oberfläche exponiert sind. Die Bindesequenz 2 beinhaltet die TRADD-Aminosäure Glu<sub>255</sub>, die auch in die Bindung von TRADD an FADD involviert ist (Sandu *et al.*, 2005). Die TRAF6-Bindesequenz 3 umfasst Aminosäuren, die sowohl an der Bindung von TRADD an den TNF-Rezeptor1 (Gly<sub>277</sub>, Arg<sub>278</sub> und Arg<sub>279</sub>) als auch an der Bindung von TRADD an FADD (Arg<sub>278</sub>) beteiligt sind (Abb. 4.29 A) (Sandu *et al.*, 2005).



**Abb. 4.29: Schematische Darstellung der Regionen von TRADD, die mit TRAF6 interagieren.**

**A** Von den beiden TRADD-Regionen, die in den Peptidblot-Experimenten (Abb. 4.28) als Interaktionsstellen für die Bindung von TRAF6 identifiziert wurden, befindet sich eine im N-Terminus (C1-C9) in dem bekannten TRAF2-Interaktionsmotiv und eine in der Todesdomäne (D24-E5). Auch von den Peptiden, die ein schwächeres Signal in den Analysen gezeigt haben, stammt jeweils eine Peptidsequenz aus dem N-terminalen Teil (B25) und eine aus dem C-terminalen Teil (D24-E5). TRADD Aminosäuren, die an der Bindung von TRADD an TRAF2, TNFR-1 und FADD beteiligt sind,

sind unterhalb der schematischen Darstellung des TRADD Proteins vermerkt (nach Tsao *et al.* (2000), Park *et al.* (2000), Sandu *et al.* (2005) und Tsao *et al.* (2007)). **B** Bestimmung der Bindesequenzen aus dem TRADD-Peptidblot-Analysen mit TRAF6 (Abb. 4.28, B). Die TRAF6-Bindesequenz 1, S<sub>137</sub>CILAQQPDRLRDEELAE<sub>154</sub>, wurde nur aus den TRADD-Peptiden C3-C9 kombiniert, da die Bindung von TRAF6 an die TRADD-Peptide C1 und C2 deutlich schwächer war als an die TRADD-Peptide C3-C9 und daher in diesen beiden Peptiden wahrscheinlich nicht das gesamte TRAF6-Interaktionsmotiv vorhanden ist. Die TRAF6-Bindesequenz 2, L<sub>249</sub>DSLAYEY<sub>256</sub>, wurde aus den Peptiden D24-E05 ermittelt.

Basierend auf diesen Ergebnissen sollten in Zukunft weitere Experimente, die die Bindung von TRAF6 an die verschiedenen TRADD-Domänen untersuchen, durchgeführt werden. Denn obwohl sowohl die GST-Ko-Präzipitationen (Abb. 4.27) als auch die Peptidblot-Experimente zeigten, dass der C-Terminus von TRAF6 an GST-TRADD bindet, sollte die hier entdeckte Interaktion von TRAF6 mit den beiden TRADD-Domänen noch genauer analysiert werden. So sind zwar verschiedene Aminosäuren innerhalb der TRADD-Peptide, an die His-TRAF6<sub>310-522</sub> gebunden wurde, an der Oberfläche von Wildtyp TRADD exponiert (Abb. 4.29) und sollten somit bei einem nativ gefalteten TRADD für die Bindung von TRAF6 zugänglich sein. In den Peptidblot-Experimenten liegen die Peptide jedoch nur linear und nicht nativ gefaltet vor. Daher sollten in zukünftigen Experimenten beide TRADD-Domänen unabhängig voneinander auf ihre Bindung an TRAF6 untersucht werden.

Zusammenfassend gewähren diese Erkenntnisse einen neuen Einblick in den Aufbau des Signalkomplexes an der CTAR2-Domäne. Der Nachweis der direkten Bindung von TRAF6 an LMP1 zeigte (siehe Kapitel 4.5), dass die bisherige Modellvorstellung von der indirekten Rekrutierung von TRAF6 an LMP1 über weitere Adapterproteine überholt ist (Schultheiss *et al.*, 2001; Wan *et al.*, 2006). Zusammen mit der neu entdeckten Interaktion von TRAF6 mit TRADD weisen die Ergebnisse dieser Arbeit vielmehr darauf hin, dass verschiedene Proteine direkt an die CTAR2-Domäne rekrutiert werden können, sich aber im gesamten Signalkomplex gegenseitig stabilisieren (siehe Kapitel 5.3).

## 5. Diskussion

Die Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch das EBV-Protein LMP1 ist abhängig von der Rekrutierung weiterer zellulärer Adapterproteine durch die intrazelluläre Signaldomäne von LMP1. Für die Induktion von Signalwegen, die essenziell für die Transformation von B-Zellen und das Überleben von LCLs sind, werden zelluläre Proteine der TRAF-Familie (u.a. TRAF2 und TRAF6) an die CTAR1- und CTAR2-Domänen von LMP1 rekrutiert (siehe Kapitel 1).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Signalkomplex aus LMP1 und TRAF2 als Zielstruktur für Inhibitoren verwendet. Durch die Verwendung von rekombinanten LMP1- und TRAF2-Proteinen konnte ein ELISA-basiertes Screeningsystem etabliert werden, das in einem Pilotscreen zur Identifizierung von verschiedenen Substanzen führte, die die Bindung von TRAF2 an LMP1 *in vitro* inhibieren. Zwei dieser Substanzen, AD01-E11 (DMAC) und AD05-F07 (Aloesaporanin I) inhibierten die Interaktion von TRAF2 und LMP1 nicht nur in den ELISA-basierten Protein-Protein-Interaktionsstudien, sondern zeigten darüber hinaus eine spezifische, inhibierende Wirkung auf EBV-transformierte B-Zellkulturen.

Weiterhin konnte durch die Verwendung rekombinanter TRAF6-Proteine erstmals seit der Entdeckung von TRAF6 als Signalmolekül in LMP1-induzierten Signalkaskaden (Schultheiss *et al.*, 2001) die direkte Bindung von TRAF6 an die CTAR2-Domäne gezeigt werden. Durch die Verwendung verschiedener biochemischer Systeme konnte die Interaktion von TRAF6 mit der CTAR2-Domäne *in vitro* charakterisiert werden und es zeigte sich, dass die Bindung durch die LMP1-Sequenz P<sub>379</sub>VQLSY vermittelt wird. Zusätzlich wurden die gewonnenen Informationen über die direkte Bindung von TRAF6 an LMP1 in einem zellulären System überprüft. Hierbei konnte bestätigt werden, dass die direkte Interaktion von TRAF6 mit LMP1 essenziell für die Induktion des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch die CTAR2-Domäne ist. Diese Grundlagenforschung sollte es in Zukunft ermöglichen, auch die Interaktion von TRAF6 mit der CTAR2-Domäne als Zielstruktur für Inhibitoren zu etablieren.

Zusammenfassend zeigten die Experimente das große Potential, das in der Verwendung von rekombinanten TRAF-Proteinen steckt. Diese eigneten sich nicht nur für den Aufbau von *in vitro* Screeningsystemen, sondern auch für die biochemische Charakterisierung sowohl bekannter als auch neuer TRAF-Interaktionsmotive. Dies wird in den folgenden Abschnitten noch eingehender diskutiert.

### 5.1 Identifizierung von Inhibitoren, die gegen den Signalkomplex LMP1-TRAF2 gerichtet sind

Von den verschiedenen TRAF-Proteinen, für die die Interaktion mit der CTAR1-Domäne beschrieben ist (siehe Kapitel 1.2 und 1.3), wurde in der vorliegenden Arbeit die Interaktion

von TRAF2 mit dem P<sub>204</sub>xQxT-Motiv innerhalb der CTAR1-Domäne als Zielstruktur für inhibitorische Moleküle verwendet. Dabei sind verschiedene Kriterien beachtet worden. Zum einen ist die Interaktion von TRAF2 mit LMP1 essenziell für die Induktion des NF-κB-Signalweges durch die CTAR1-Domäne (Kaye *et al.*, 1996; Soni *et al.*, 2007; Guasparri *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2010). Da jedoch auch andere TRAF-Proteine in die Aktivierung des NF-κB-Signalweges durch die CTAR1-Domäne involviert sind (siehe Kapitel 1.2), wurde als Grundlage für den Aufbau eines *in vitro* Screeningsystems nicht nur die Bindung von TRAF2, sondern auch die der TRAF-Proteine TRAF1, TRAF3, TRAF4, TRAF5 und TRAF6 an LMP1 untersucht. Dafür wurden von jedem dieser TRAF-Proteine die TRAF-Domänen (TRAF-N- und TRAF-C-Domäne) als rekombinante Proteine aus Bakterien gereinigt. Die Auswahl der Aminosäuren der TRAF-Proteine stützten sich auf die strukturbasierten Sequenzanalysen beschrieben von Park *et al.* (1999). Bei der Reinigung zeigte sich, dass alle rekombinanten TRAF-Proteine mit hoher Reinheit isoliert werden konnten, wobei die Ausbeute an Protein je Liter bakterieller Expressionskultur für TRAF2 am höchsten war. Dies ermöglicht es, große Mengen von rekombinanten TRAF2-Proteinen herzustellen, die bei den zukünftigen Screens von großen Molekülbibliotheken benötigt werden.

Da jedoch nicht nur die Menge an rekombinanten Proteinen entscheidend für den Aufbau eines *in vitro* Screens ist, sondern vor allem die Art und Weise der Protein-Protein-Interaktion eine Rolle spielt, wurden die TRAFs 1-6 auf ihre Bindung an LMP1 untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Interaktion zwischen TRAF1, TRAF2 und TRAF5 durch Mutation des P<sub>204</sub>xQxT-Motivs vollständig inhibiert wird, während TRAF3 noch in der Lage war, mit GST-LMP1(A<sub>204</sub>xAxA) zu interagieren. Dieser Umstand beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass die Bindung von TRAF3 an LMP1 durch weitere Aminosäuren außerhalb des P<sub>240</sub>xQxT-Motivs stabilisiert wird (siehe auch Kapitel 1.4) (Wu *et al.*, 2005). Da nun TRAF2 eine essenzielle Rolle in der Aktivierung des NF-κB-Signalweges spielt (s.o.), zudem große Mengen von His-TRAF2<sub>311-501</sub> gereinigt werden konnten und die Interaktion von His-TRAF2<sub>311-501</sub> mit LMP1 auf einer klar definierten räumlich begrenzten Struktur beruht, wurde folglich der Komplex aus TRAF2 und LMP1 als Zielstruktur für inhibitorische Moleküle ausgewählt. Diese Auswahl zeigte sich später als gerechtfertigt, denn sie ermöglichte die Aufstellung eines Screeningsystems, die Durchführung eines Pilotscreens sowie die Identifizierung verschiedener Substanzen als Inhibitoren.

### 5.1.1 Aufbau des ELISA-basierten Screeningsystems

Ziel war es nun, ein Screeningsystem zu etablieren, bei dem der Komplex aus LMP1 und TRAF2 als Zielstruktur verwendet wurde. Als Komponenten wurden letztendlich die mit GST-fusionierte LMP1-Signaldomäne und die mit einem 6xHis-Epitop fusionierte TRAF-Domäne von TRAF2 genutzt. Der Aufbau des ELISA-Systems war vielversprechend, und das



etablierte System konnte für die Durchführung eines Pilotscreens verwendet werden. Da in Zukunft jedoch nicht nur kleine Bibliotheken wie die in dieser Arbeit verwendete AD-Bibliothek (800 Substanzen), sondern Bibliotheken mit mehr als  $10^4$  Molekülen nach Inhibitoren durchsucht werden sollen, sollte das Screeningsystem möglichst hohe Qualitätsstandards erfüllen. Diese werden hier anhand des Pilotscreens im einzelnen diskutiert.

Da der Screen der AD-Bibliothek erfolgreich über mehrere Tage durchgeführt wurde, zeigte sich, dass beide Proteine über mehrere Tage gelagert werden können, ohne an spezifischer Aktivität zu verlieren. Somit sollte die Durchführung von Screens, die aufgrund sehr großer Molekülbibliotheken meist über mehrere Tage durchgeführt werden müssen, ohne Einbußen in der Qualität des Systems gewährleistet sein. Dieser Umstand zeigt sich vor allem, wenn man die Z- und Z'-Faktoren des Pilotscreens analysiert. Die Z'-Faktoren des Screens der AD-Bibliothek waren für jede Platte über 0,74. Die Z-Faktoren in diesem ersten Screen betrugen minimal 0,61. Damit ist das in dieser Arbeit entwickelte ELISA-basierte System nach den Kriterien von Zhang *et al.* (1999) als exzellent zu definieren. Gemäß der Erwartung zeigte sich, dass der Z'-Faktor jeder Platte größer als der zugehörige Z-Faktor war. Dies bedeutet, dass die Kontrollen für den Screen korrekt gewählt wurden und das System selbst stabil war. Die Z-Faktoren zeigten weiterhin, dass das System robust genug war, um bei der Addition von Testsubstanzen nicht zusammenzubrechen. Somit waren verlässliche Aussagen über die spezifische Inhibition der Bindung von TRAF2 an LMP1 in dem entwickelten Screen möglich. Bestätigt wurde dies dadurch, dass von den 11 Treffern aus dem Screen nur eine Substanz, AD05-C05, als falsch positiv identifiziert wurde. Das etablierte System war also funktionell und erlaubte es nicht nur die Interaktion zwischen LMP1 und TRAF2 *in vitro* darzustellen, sondern gleichfalls niedermolekulare Substanzen zu identifizieren, die diese Interaktion inhibieren. Somit zeigte sich, dass die Theorie, die Bindung von TRAF2 an LMP1 *in vitro* durch ein kleines organisches Molekül zu inhibieren, richtig war und der Komplex aus LMP1 und TRAF2 als Zielstruktur für Inhibitoren verwendet werden kann. Es ist also durchaus sinnvoll, weitere Molekülbibliotheken nach potenten Inhibitoren für diese Interaktion zu durchsuchen. Es sollte möglich sein, die erarbeiteten Kenntnisse über den Aufbau des Screeningsystems, das die Interaktion von LMP1 mit TRAF2 als Ziel hat, zu verwenden, um ein vollautomatisches, hochdurchsatzfähiges System zu erstellen, um sehr große Molekülbibliotheken nach weiteren Inhibitoren zu durchsuchen.

### 5.1.2 Identifizierung und Charakterisierung von Inhibitoren

Nun konnte ich in diesem ersten Screen 5 Substanzen aus einer kleinen Bibliothek von Naturstoffen identifizieren, welche die Bindung von TRAF2 an LMP1 *in vitro* mit  $IC_{50}$ -Konzentrationen im niedrigen ( $IC_{50}$  AD01-E11 = 8,8  $\mu$ M) bis mittleren mikromolaren

Konzentrationsbereich (höchster zweistelliger  $IC_{50}$ : AD05-A07 = 65,3  $\mu$ M) inhibierten. Damit sind diese Substanzen ähnlich potent wie beschriebene Inhibitoren verschiedenartiger Interaktionen aus diversen Screeningsystemen.

So zeigten Miao *et al.* (2010) die Identifizierung von Inhibitoren gerichtet gegen den Komplex aus Phosphatidylinositol-3,4,5-bisphosphat und der Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne mit  $IC_{50}$ -Konzentrationen von 13,4 bis 31  $\mu$ M aus einer Bibliothek, die ca. 50000 Moleküle umfasste. Mittels eines Fluoreszenz-basierten Screeningsystems identifizierten Reindl *et al.* (2008) Poloxin als Inhibitor der Protein-Protein-Interaktionen der Polo-Box-Domäne (PBD) der Polo-ähnlichen Kinase 1 (Plk1 - *Polo-like kinase* 1). Poloxin inhibiert die Bindung eines optimierten Plk1-PBD-bindenden Peptids an die PBD mit einer  $IC_{50}$  von 4,8  $\mu$ M (Reindl *et al.*, 2008). Aus 30000 Substanzen identifizierten Stebbins *et al.* (2008) in einem ELISA-ähnlichen Assay einen neuen Inhibitor, gerichtet gegen die Interaktion zwischen JNK und dem JNK-interagierenden Protein 1 (JIB1). Dieser Inhibitor BI-78D3 hat eine  $IC_{50}$  von 0,5  $\mu$ M in *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien (Stebbins *et al.*, 2008) und ist damit zwar um den Faktor 16 wirksamer als AD01-E11, wurde aber auch aus einer weitaus größeren Bibliothek identifiziert. Da AD01-E11 aus einer weit kleineren Bibliothek entdeckt wurde, impliziert dies die Möglichkeit, ebenfalls noch weitaus potentere Inhibitoren durch das Screening von sehr viel größeren Bibliotheken zu identifizieren.

Da die identifizierten Substanzen jedoch nach Möglichkeit nicht nur den Komplex aus LMP1 und TRAF2 *in vitro* inhibieren, sondern darüber hinaus auch eine spezifische biologische Aktivität zeigen sollten, wurden die beiden potentesten Inhibitoren auf ihre Wirkung auf EBV-transformierte Zelllinien getestet. Dabei zeigten die zwei Substanzen, AD01-E11 und AD05-F07, bereits bei Konzentrationen im niedrigen zweistelligen mikromolaren Bereich (25  $\mu$ M) eine spezifische Wirkung auf EBV-transformierten Zelllinien. Der Umsatz an MTT-Substrat in Ansätzen mit EBV-transformierten Zellen, die mit den beiden Substanzen behandelt wurden, war deutlich reduziert gegenüber Ansätzen mit EBV-transformierten Zellen, die nur mit DMSO inkubiert wurden. Dagegen hatten die beiden Substanzen, bei den eingesetzten Konzentrationen, keine Wirkung auf B-Zellen, die nicht mit EBV transformiert wurden. Vor allem die Verwendung der B-Zelllinie P493-6 sollte die Spezifität für LMP1-abhängige Zellen und eine allgemeine Zytotoxizität von AD01-E11 gegenüber B-Zellen ausschließen. Die Experimente mit diesen Zellen zeigten, dass AD01-E11 nur eine spezifische Wirkung auf P493-6-Zellen hatte, deren Proliferation von dem Östrogenrezeptor/EBNA2-Fusionsprotein abhängig war, das die Expression von LMP1 reguliert (Kempkes *et al.*, 1995; Pajic *et al.*, 2000). Die Vitalität von P493-6-Zellen, deren Proliferation durch die Expression des Transkriptionsfaktors Myc induziert wurde, war durch AD01-E11 nicht gehemmt. Also hatte AD01-E11 im gleichen zellulären Hintergrund nur eine Wirkung auf die Zellen, deren

Wachstum von LMP1 abhängig war, und diese Wirkung beruhte nicht auf Zytotoxizität von AD01-E11 gegenüber den P493-6-Zellen.

Die genaue Wirkung der beiden Substanzen sollte jedoch in Zukunft ausgehend von diesen Beobachtungen in weiteren Experimenten noch detaillierter analysiert werden. MTT-Experimente zeigen nur den Umsatz von MTT durch die Zellen und lassen daher nur bedingt Aussagen auf den Zustand von Zellkulturen zu. Zwar wird MTT nur in den Mitochondrien lebender Zellen umgesetzt (Mosmann, 1983), dies klärt jedoch nicht, ob sich die Zellen zum Beispiel in einem Zellzyklusarrest befinden, wie es bei der Inhibition des JNK-Signalweges der Fall ist (Kutz *et al.*, 2008), oder durch den Inhibitor Apoptose in den Zellen ausgelöst wird, wie es bei Behandlung von EBV-transformierten Zellen mit den beiden NF- $\kappa$ B-Inhibitoren DHMEQ und BAY11-7082 der Fall ist (Cahir-McFarland *et al.*, 2004; Miyake *et al.*, 2008). Letztere Substanzen inhibieren jedoch den kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg (Pierce *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 2008). Die beiden Inhibitoren AD01-E11 und AD05-F07 sollten dagegen durch die Inhibition der Bindung von TRAF2 an LMP1 eine Inhibition des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges zeigen und könnten sich somit in der Wirkung auf die Zellen von DHMEQ und BAY11-7082 unterscheiden. Es ist aber wahrscheinlich, dass die Inhibition der Bindung von TRAF2 an LMP1 eine Negativregulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges erzeugt (s.u.). Durch die Inhibition von TRAF2-regulierten NF- $\kappa$ B-Signalwegen wird Apoptose in EBV transformierten B-Zellen ausgelöst (Guasparri *et al.*, 2008). Dies sollte in zukünftigen Experimenten jedoch genauer adressiert werden.

In einem ersten Experiment, das in Kooperation mit Kai Sterz aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurde, wurde die Wirkung von AD01-E11 auf die Aktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg durch LMP1 untersucht. In embryonalen Mausfibroblasten, die mit einem NGF-Rezeptor/LMP1-Fusionsprotein stimuliert wurden, verhinderte AD01-E11 den CTAR1-spezifischen Abbau von TRAF3 (persönliche Mitteilung von Kai Sterz). Die Degradation von TRAF3 ist ein wichtiger Schritt bei der Aktivierung des nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges. Durch diese Stabilisierung von TRAF3 sollte NIK in diesen Zellen abgebaut und somit der nicht-kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg inhibiert werden (Vallabhapurapu *et al.*, 2008; Zarnegar *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2010). Diese Experimente konnten bisher jedoch nicht weiter verfolgt werden, da es gegen Ende der vorliegenden Arbeit zu Lieferengpässen der Substanzen kam.

Im Folgenden wird davon ausgegangen, dass AD01-E11 eine ähnliche Wirkung wie die Inhibition des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch TRAF2-spezifische siRNA hatte (Guasparri *et al.*, 2008) und der reduzierte Umsatz von MTT in Zellkulturansätzen mit EBV-transformierten Zellen, die mit AD01-E11 oder AD05-F07 behandelt wurden, an der Inhibition der

Proliferation dieser Zellen lag. Vergleicht man nun die Wirkung von AD01-E11 und AD05-F07 mit den NF- $\kappa$ B- und JNK-Inhibitoren (SP600125, DHMEQ und BAY11-7082), die bisher erfolgreich zur Inhibition von LMP1-induzierten Signalwegen eingesetzt wurden (Cahir-McFarland *et al.*, 2004; Kutz *et al.*, 2008; Miyake *et al.*, 2008), zeigt sich, dass die LMP1-TRAF2-Inhibitoren einen ähnlichen Wirkungsbereich hatten. Sowohl von AD01-E11 als auch von AD05-F07 war die Konzentration von 25  $\mu$ M ausreichend für eine weitreichende Inhibition der Proliferation von EBV-transformierten Zelllinien. Dies entspricht in etwa den Konzentrationen (10 bis 40  $\mu$ M), mit denen der JNK-Inhibitor SP600125 sowie die NF- $\kappa$ B-Inhibitoren DHMEQ und BAY11-7082 eingesetzt wurden, um das Wachstum von LCLs und NPC-Zellen zu inhibieren (Cahir-McFarland *et al.*, 2004; Kutz *et al.*, 2008; Miyake *et al.*, 2008).

Da sowohl der JNK-Inhibitor SP600125 als auch der NF- $\kappa$ B-Inhibitor DHMEQ schon erfolgreich in Maussystemen getestet wurden, ist es von Interesse, auch die Wirkung von AD01-E11 und AD05-F07 in einem Maussystem zu untersuchen (Kutz *et al.*, 2008; Miyake *et al.*, 2008). Im Optimalfall sollte das Wachstum von Tumoren, die durch Xenotransplantation von EBV-transformierten Zellen in SCID-Mäuse induziert wurden, durch die beiden Substanzen reduziert werden. Die Bedingungen für einen solchen Test sind durchaus günstig. Das Molekulargewicht der beiden Substanzen AD01-E11 und AD05-F07 ist jeweils geringer als 500 Da, beide Moleküle haben weniger als 5 Wasserstoffbrücken-Donoren und weniger als 10 Wasserstoffbrücken-Akzeptoren und der MlogP-Wert (Lipophilie ausgedrückt im Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ( $\log P$ ), berechnet nach dem Modell von Moriguchi) ist unter 4,15. So beträgt der Mlog P von AD01-E11 1,98 und der Mlog P von AD05-F07 2,2. Die Mlog P-Werte der Substanzen wurden mit dem Programm ALOGPS 2.1 berechnet (siehe Kapitel 3.6.2). Damit erfüllen beide Substanzen die von Lipinski aufgestellten „*Rule of Five*“ (Lipinski *et al.*, 2001). Die „*Rule of Five*“ beruht auf einer statistischen Erhebung von Parametern, die durch die Analyse von Substanzen, die sich in der klinischen Testphase II befinden, erhoben wurde. Substanzen, die diese „*Rule of Five*“ erfüllen, sollten daher eine gute Löslichkeit sowie Zellgängigkeit aufweisen und demnach eine gute Bioverfügbarkeit gegeben sein (Lipinski *et al.*, 2001).

Weiterhin werden Substanzen aus der Stoffklasse der Anthrachinone und Anthrachinon-ähnliche Substanzen bereits in der Chemotherapie von akuter lymphatischer Leukämie, von non-Hodgkin Lymphomen und auch in der Therapie von Brustkrebs und verschiedenen Prostatakarzinomen verwendet (Minotti *et al.*, 2004; Parker *et al.*, 2010; Kao *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012). Allerdings hat AD01-E11 (DMAC) bisher keine mir bekannte beschriebene spezifische biologische Aktivität. Trotz des verwandten Grundgerüsts zu der Substanz Mumbaistatin, einem sehr potenten G6P T1 (Glukose-6-Phosphatase Translokase 1)-

Inhibitor, zeigt DMAC keine Inhibition des G6P T1-Komplexes (Tang *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007). Nichtsdestotrotz ist eine Zytotoxizität von DMAC für die humane Brustkrebszelllinie MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) beschrieben. Die halbmaximale Dosis, bei der DMAC in den MCF-7-Zellen Apoptose auslöst, ist 100 mM (27 µg/mL) (Tang *et al.*, 2004) und liegt damit um ein Vielfaches über den Konzentrationen, mit denen in der vorliegenden Arbeit eine sehr viel spezifischere Aktivität auf EBV-transformierte Zellen gezeigt werden konnte. Bereits ein 1/400stel dieser Konzentration war ausreichend, um spezifisch das Wachstum von LMP1-abhängigen Zellen zu inhibieren (siehe Abb. 4.14 und 4.15). Weiterhin zeigte DMAC in den hier durchgeführten Experimenten keine Zytotoxizität in den eingesetzten Konzentrationen (25 µM) für humane B-Zelllinien, deren Wachstum LMP1-unabhängig ist.

Für die Substanz AD05-F07 (Aloesaporanin I) sind bereits verschiedene biologische Wirkungen beschrieben. So ist Aloesaporanin I zytotoxisch für den Malariaerreger *P.falciparum*. Die IC<sub>50</sub>-Werte für die toxische Wirkung von Aloesaporanin I auf die beiden *P.falciparum* Stämme Dd2 und FCM29 betragen 5,58 µM bzw. 77,6 µM (Hou *et al.*, 2009). Ebenso wurde für Aloesaporanin I eine zytotoxische Wirkung auf die humane Ovarialkarzinom-Zelllinie A2780 beschrieben. Die IC<sub>50</sub> von Aloesaporanin I gegenüber A2780-Zellen liegt bei über 30 µM (Hou *et al.*, 2009). In dieser Arbeit konnte ich mit vergleichbaren Konzentrationen ebenfalls eine spezifische Wirkung von Aloesaporanin I auf EBV-transformierte Zellen feststellen. Im Gegensatz dazu wurden die Zelllinien Bjab und BL41 durch Aloesaporanin I nicht gehemmt (Abb. 4.16). Der Effekt von Aloesaporanin I auf die verschiedenen Zellkulturen beruht daher wahrscheinlich nicht auf einer allgemeinen Zytotoxizität für humane B-Zelllinien.

### 5.1.3 Zukünftige weiterführende Charakterisierung der Inhibitoren

Wie bereits erwähnt, sollte als nächster Schritt die Wirkungsweise der beiden LMP1-TRAF2-Inhibitoren genau charakterisiert werden. Hierfür ist es sinnvoll zu klären, mit welchem der beiden Proteine die Inhibitoren interagieren. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sattler (Lehrstuhl für biomolekulare NMR-Spektroskopie Department Chemie der TU München und Institut für Strukturbiologie, Helmholtz Zentrum München) wurden daher erste STD-NMR (*saturation difference* NMR)-Experimente zwischen AD01-E11 und TRAF2 durchgeführt. In STD-NMR-Experimenten kann die direkte Bindung eines Liganden an ein Protein untersucht werden. Das Protein wird selektiv durch Bestrahlung gesättigt und mit dem Liganden inkubiert. Wenn der Ligand an das Protein bindet, wird diese Sättigung auf den Liganden übertragen. Nach der Dissoziation des Liganden vom Protein kann diese Sättigung gemessen werden (Mayer *et al.*, 2001).

Die vorläufigen Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass AD01-E11 mit TRAF2 und nicht mit LMP1 interagiert (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Sattler und Dr. Friberg). Um dies jedoch genauer zu untersuchen, sollten die Studien zwischen AD01-E11 und TRAF2 sowohl in weiteren STD-NMR-Experimenten bestätigt als auch mit weiteren Methoden bewiesen werden. Dies könnte zum Beispiel mit Hilfe eines Biacore-Gerätes analysiert werden. Durch die Verwendung beider Proteine als Liganden und der Inhibitoren als Analyten könnte in Oberflächenplasmonresonanzstudien das Protein, mit dem die beiden Substanzen jeweils interagieren, identifiziert beziehungsweise bestätigt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung der *Microscale-Thermophorese*-Technologie (Jerabek-Willemsen *et al.*, 2011).

Sollte sich TRAF2 als Interaktionspartner von AD01-E11 bestätigen, wären ebenfalls Strukturbasierte-Studien (z.B. NMR-Experimente) zwischen TRAF2 und den Substanzen aufschlussreich. Vor allem könnte die Kenntnis der Struktur und der genauen Interaktion der Substanzen im Komplex mit TRAF2 sowie der funktionellen Gruppen, welche die Bindung vermitteln, wertvolle Informationen für die gezielte Synthese von noch potenteren Inhibitoren ergeben. Denn sollten sich die identifizierten Inhibitoren trotz der guten Grundlagen dennoch in *in vivo* Experimenten als pharmazeutisch eingesetzte Wirkstoffe als ungenügend erweisen, z.B. durch gravierende Nebeneffekte auf den gesamten Organismus in Mausstudien, gibt es verschiedene Möglichkeiten, diese Moleküle als Leitsubstanzen zu etablieren und gezielt zu modifizieren. Zum einen könnte gezielt das Anthrachinon-Grundgerüst oder die Anordnung der funktionellen Gruppen am Anthrachinon-Grundgerüst verändert werden. Zum anderen könnten die Substanzen als Grundlage für die Entwicklung einer neuen Substanzklasse verwendet werden, in der zwar die funktionellen Gruppen in der gleichen räumlichen Orientierung zueinander zur Verfügung stehen, aber ein anderes Grundgerüst verwendet wird.

Diese gezielte Modifikation setzt jedoch nicht nur die Identifikation der Interaktionsstelle der Substanzen in den Proteinen voraus, sondern auch die Kenntnis des Pharmakophors, also der funktionellen Gruppen der Substanzen, die die Bindung an das Protein vermitteln. Interessanterweise konnte schon aus den Substanzen, die in dem hier durchgeführten Screen als Inhibitoren identifiziert wurden, eine ähnliche Anordnung einiger funktioneller Gruppen identifiziert werden. So ist z.B. bei vier der identifizierten Substanzen eine Carbonylgruppe in räumlicher Nähe zu einer Hydroxylgruppe an einem Ringsystem angeordnet. Die Identifizierung einer solchen übergeordneten Leitstruktur wird jedoch sicherlich durch größere Datenmengen von weiteren Inhibitoren vereinfacht. Dementsprechend wären Treffer aus weiteren Screens dabei hilfreich (siehe hierzu auch Kapitel 5.4).

Neben den bereits erwähnten Experimenten (s.o.), die zur Aufklärung der Spezifität von AD01-E11 beitragen sollen, gibt es noch eine Reihe weiterer Experimente, die zur Klärung offener Fragen beitragen würden. Solche Experimente waren in dem zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchführbar, da es, wie schon erwähnt, zu Lieferengpässen von AD01-E11 kam.

Demnach sollte weiterhin die spezifische Wirkung von AD01-E11 in Zellen weiter aufgeklärt werden. Ein möglicher Ansatzpunkt, um die spezifische Inhibition des LMP1-TRAF2 Komplexes *in vivo* zu testen, wären Ko-Immünpräzipitationsstudien mit LMP1 und TRAF2 aus Zellen, die mit AD01-E11 inkubiert wurden. Diese Experimente könnten klären, ob die Inhibition der Bindung von TRAF2 an LMP1, die bisher nur *in vitro* experimentell dargestellt wurde, auch *in vivo* bestätigt werden kann. Außerdem ist es erforderlich, die Wirkung des Inhibitors auf die Aktivierung der Signalwege genau zu untersuchen. Letztendlich sollte AD01-E11 die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren durch die CTAR1-Domäne von LMP1 verhindern. Dies könnte zum Beispiel in NF- $\kappa$ B-Reporterexperimenten, wie sie in dieser Arbeit mit TRAF6 und LMP1 durchgeführt wurden, analysiert werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt wäre es, die Wirkung der Inhibitoren auf die Interaktion der anderen TRAF-Proteine mit LMP1 zu untersuchen. Da die TRAF-Domäne innerhalb der TRAF-Familie weitestgehend homolog ist (siehe Kapitel 1.4) wäre es möglich, dass die identifizierten Inhibitoren nicht nur die Bindung von TRAF2 an LMP1, sondern auch die der anderen TRAF-Proteine beeinflusst. Es ist also von Interesse herauszufinden, inwieweit z.B. die Substanzen AD01 E11 und AD5 F07 auch an andere TRAF-Proteine binden und deren Interaktion mit Rezeptoren inhibieren. Es wäre möglich, dass die beiden Substanzen ebenfalls die Bindung der anderen TRAF-Proteine an LMP1 (und weitere Rezeptoren) inhibieren. Dieser Umstand kann Vor- und Nachteile bergen. Zusätzlich zu TRAF2 sind TRAF3 und TRAF1 ebenfalls in der Lage an die CTAR1-Domäne zu binden und spielen eine Rolle in der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch LMP1 (siehe Abschnitt 1.3.3). Die Inhibition dieser Interaktionen könnte also ebenfalls zur Reduktion des Transformationspotentials von LMP1 beitragen.

Natürlich muss jedoch dabei geklärt werden, wie die Bindung der Substanzen an TRAF2 und mögliche Bindung an andere TRAFs die Induktion von Signalwegen durch zelluläre Rezeptoren beeinflussen könnte. Es muss als untersucht werden, ob die Spezifität von AD01-E11 auf die Interaktion von TRAF2 mit LMP1 beschränkt ist, oder ob AD01-E11 auch die Bindung von TRAF2 an zelluläre Rezeptoren inhibiert. Daher sollte weiterhin auch der Effekt von AD01-E11 auf die Induktion von TRAF2-abhängigen Signalwegen durch zelluläre Rezeptoren analysiert werden. Zum Beispiel ist TRAF2 in die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-

Signalweges durch CD40 involviert (Rothe, Sarma, *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1999). Für die Entwicklung eines Medikaments wäre die Inhibition von Signalwegen, die durch zelluläre Rezeptoren stimuliert werden, eventuell nachteilig, da dies Nebenwirkungen im Organismus hervorrufen könnte.

Betrachtet man z.B. AD01-E11 jedoch nicht nur als pharmazeutisch aktives Molekül, sondern als Werkzeug für die Analyse von Signalwegen, wäre die Inhibition aller TRAF2-Rezeptor-Komplexe eine interessante Möglichkeit, die Aktivierung von TRAF2-abhängigen Signalwegen zu studieren. AD01-E11 könnte zum Beispiel dafür verwendet werden, die Rolle von TRAF2 in allen LMP1-induzierten Signalwegen zu analysieren. So ist zum Beispiel für die Aktivierung des ERK-MAPK-Signalweges durch die CTAR1-Domäne zwar noch keine Beteiligung von TRAF-Proteinen experimentell bestätigt, es wird aber für TRAF2 eine Beteiligung vermutet (Dawson *et al.*, 2008). Falls die Inhibition des Komplexes aus LMP1 und TRAF2 durch AD01-E11 die Aktivierung dieses Signalweges beeinträchtigt, könnte dies helfen, die Rolle von TRAF2 in diesem Signalweg zu entschlüsseln. Äquivalent hierzu könnte die Inhibition der Bindung von TRAF2 an verschiedene zelluläre Rezeptoren das Verständnis verbessern, wie TRAF2 in weitere zelluläre Signalwege involviert ist.

#### 5.1.4 Der Nutzen rekombinanter TRAF-Proteine für Interaktionsstudien

Neben der Aufstellung eines Screeningsystems war die Verfügbarkeit der rekombinanten His-TRAF-Proteine noch von weiterem Nutzen für die Analyse ihrer Interaktionseigenschaften mit LMP1. Für TRAF1, TRAF2 und TRAF3 war die direkte Interaktion mit dem P<sub>204</sub>xQxT-Motiv in der CTAR1-Domäne schon bekannt (Devergne *et al.*, 1996). Diese direkte Bindung konnte mit den rekombinanten Proteinen His-TRAF1<sub>226-416</sub>, His-TRAF2<sub>311-501</sub> und His-TRAF3<sub>375-568</sub> bestätigt werden.

Zusätzlich zeigte sich, dass zwei weitere TRAF-Proteine, TRAF5 und TRAF6, in der Lage sind, direkt an LMP1 binden. TRAF5 wurde in diesen Experimenten, wie TRAF1, TRAF2 und TRAF3, an das Motiv P<sub>204</sub>xQxT rekrutiert. TRAF5 wird also, nicht nur wie bisher gezeigt war aus Zelllysaten an LMP1 rekrutiert (Brodeur *et al.*, 1997), sondern ist in der Lage, *in vitro* ohne weitere Ko-Faktoren direkt mit LMP1 zu interagieren. Im Gegensatz zu den TRAFs 1, 2, 3 und 5 wurde TRAF6 zwar ebenfalls von LMP1 gebunden, interagierte jedoch nicht mit dem Motiv P<sub>204</sub>xQxT innerhalb von CTAR1, sondern mit Teilen der CTAR2-Domäne. Auf die Bedeutsamkeit dieser direkten Interaktion werde ich in Kapitel 5.2 dieser Arbeit genauer eingehen.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Interaktionsstudien zwischen den TRAF-Proteinen und LMP1 konnten noch weitere neue TRAF-Interaktionen charakterisiert werden. Neben der



Bindung von TRAF6 an LMP1 konnte erstmals eine direkte Interaktion von TRAF6 mit dem Todesdomänenprotein TRADD, einem weiteren Signaladapter von LMP1 gezeigt werden (siehe hierzu Kapitel 5.3).

Weiterhin wurden in Kooperation mit der Forschergruppe von PD Dr. Biesinger verschiedene TRAF-Proteine verwendet, um die TRAF3-Interaktionsdomäne im viralen Onkoprotein Tio zu charakterisieren (de Jong *et al.*, 2013). Das Protein Tio besitzt ein neuartiges TRAF3-Interaktionsmotiv, das nur von TRAF3 erkannt wird. TRAF2 ist nicht in der Lage, mit diesem Motiv zu interagieren. Da dies jedoch kein elementarer Teil dieser Arbeit ist, wird im weiteren nicht auf die Interaktionsstudien zwischen den Proteinen Tio und TRAF3 eingegangen. Die Ergebnisse dieser Studien sind in der Publikation „Noncanonical NF-kappaB Activation by the Oncoprotein Tio Occurs Through a Nonconserved TRAF3-Binding Motif“. (de Jong *et al.*, 2013) zu finden.

## **5.2 TRAF6 ist ein direkter Interaktionspartner von LMP1**

### **5.2.1 Identifizierung des TRAF6-Interaktionsmotivs in LMP1**

Seit der Identifizierung von TRAF6 als Adaptermolekül für die Aktivierung von Signalkaskaden durch LMP1 sind nun mehr als zehn Jahre vergangen (Schultheiss *et al.*, 2001). Während dieser Zeit wurde die kritische Rolle von TRAF6 als Adapterprotein in allen Signalwegen, die durch die CTAR2-Domäne induziert werden, bestätigt (Schultheiss *et al.*, 2001; Luftig *et al.*, 2003; Wan *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006; Huye *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2008). Dazu zählen neben dem NF- $\kappa$ B-Signalweg (Schultheiss *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2006) der p38-MAPK-Signalweg (Schultheiss *et al.*, 2001), die JNK-Signalkaskade (Wan *et al.*, 2004) und der IRF7-Signalweg (Song *et al.*, 2008). Aufgrund der Tatsache, dass die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 bisher in verschiedenen Experimenten nicht gezeigt werden konnte, und BS69 einen Einfluss auf die Rekrutierung von TRAF6 an LMP1 hat, wurde die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 bisher als indirekt über BS69 beschrieben (Ishida, Mizushima, *et al.*, 1996; Wan *et al.*, 2004; Wan *et al.*, 2006). In dieser Arbeit konnte jedoch erstmals eine direkte Bindung von TRAF6 an LMP1 gezeigt werden. Im Verlauf der Experimente wurde ersichtlich, dass die 16 carboxyterminalen Aminosäuren von LMP1 nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend sind, um die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 zu vermitteln. In Ko-Immünpräzipitationen hatte die Deletion dieser Aminosäuren in rekombinanten LMP1-Proteinen den Verlust der Interaktion von TRAF6 mit LMP1 zur Folge. Weiterhin war diese kurze Peptidsequenz ausreichend, um in den Peptidblot-Experimenten die Bindung von TRAF6 zu vermitteln.

Die Aktivierung der beiden Signalwege NF- $\kappa$ B und JNK wird innerhalb der CTAR2-Domäne von der Sequenz P<sub>379</sub>VQLSY vermittelt (Floettmann *et al.*, 1997; Kieser *et al.*, 1999). Die

Daten aus den GST-Ko-Präzipitationsexperimenten (Abb. 4.4) und den Peptidblot-Experimenten (Abb. 4.18) zeigten bereits, dass verschiedene Aminosäuren innerhalb dieser CTAR2-Sequenz für die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 wichtig sind. Die Aminosäure Tyr<sub>384</sub> ist essenziell für die Bindung von TRAF6 an LMP1. Die Mutation dieser Aminosäure in Glycin (GST-LMP1(Y384G)) inhibierte die Bindung von TRAF6 an LMP1 um mehr als 90 % (siehe Abb. 4.4). Auch in den Peptidblot-Experimenten verhinderte die Doppelmutation von Tyr<sub>384</sub> und Tyr<sub>385</sub> jeweils in die Aminosäure Alanin die Bindung von TRAF6. Zusätzlich spielen die Aminosäuren Pro<sub>379</sub> und Gln<sub>381</sub> bei der Bindung von TRAF6 an LMP1 eine Rolle. Die Doppelmutation von Pro<sub>379</sub> und Gln<sub>381</sub> in A<sub>379</sub>xA innerhalb der CTAR2-Peptide inhibierte ebenfalls die Bindung von TRAF6. Dementsprechend war auch das CTAR2-Peptid mit dem mutierten (putativen) TRAF-Interaktionsmotiv, P<sub>379</sub>xQxT/S in A<sub>379</sub>xAxA, nicht mehr in der Lage, TRAF6 zu binden.

Der Vergleich der LMP1-Sequenz P<sub>379</sub>VQLSY mit dem TRAF6-Interaktionsmotiv PxExxF/Y/D/E zellulärer Rezeptoren zeigt, dass die CTAR2-Sequenz dem TRAF6-Interaktionsmotiv ähnlich aufgebaut ist und legt nahe, dass TRAF6 über ein PxQxxY-Motiv an LMP1 rekrutiert wird. Die Mutation dieses Motivs führte jedenfalls zum Verlust der Bindung von TRAF6 an LMP1. Lediglich der P<sub>0</sub>-Rest in dem TRAF6-Interaktionsmotiv von LMP1 unterscheidet sich von dem P<sub>0</sub>-Rest des TRAF6-Konsensusmotivs zellulärer Rezeptoren. In der LMP1-Sequenz befindet sich an dieser Stelle ein Glutaminrest statt eines Glutaminsäurerestes, wie er in den TRAF6-bindenden zellulären Rezeptoren zu finden ist. Die hier durchgeführten Experimente zeigten dennoch, dass LMP1 ebenso wie CD40 in der Lage ist, TRAF6 zu binden. Die Affinität der Bindung ist zwar um den Faktor 4 schwächer, aber existent. Dementsprechend scheint der Austausch von Glutaminsäure in Glutamin sterisch keine Behinderung der Interaktion darzustellen. Der CD40-Rest an P<sub>0</sub>, Glu<sub>235</sub>, bildet jedoch Wasserstoffbrücken mit dem Peptidrückgrat der TRAF6-Aminosäuren Ala<sub>458</sub> und Leu<sub>457</sub> (Ye *et al.*, 2002). Aufgrund der unterschiedlichen Aminosäurekomposition an P<sub>0</sub> sollte LMP1 dazu nicht mehr in der Lage sein. Dieser Umstand könnte die schwächere Bindung von TRAF6 an LMP1 erklären. Ein mögliches Experiment, um diese Frage zu klären, wären Bindestudien einer LMP1-Mutante, in der die Aminosäure Gln<sub>381</sub> in Glutaminsäure „rück“-mutiert wird. Falls die schwächere Interaktionsstärke von LMP1 mit TRAF6 auf der unterschiedlichen Aminosäurekomposition an P<sub>0</sub> in LMP1 beruht, sollte eine LMP1(Q381E)-Mutante eine stärkere, mit CD40 vergleichbare Affinität zu TRAF6 aufweisen.

Durch die geringere Affinität von TRAF6 zu LMP1 im Vergleich zu CD40 steigt wahrscheinlich die Bedeutung der anderen kritischen Aminosäuren in der LMP1-Sequenz P<sub>379</sub>VQLSY. Die Mutation jeder dieser Aminosäuren hat große Auswirkung auf die Induktion der TRAF6-abhängigen Signalwege JNK und NF-κB durch LMP1 (Floettmann *et al.*, 1997;

Kieser *et al.*, 1999). Zum Beispiel inhibiert die Mutation des LMP1-Restes Tyr<sub>384</sub> die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges in vergleichbarem Maß wie die komplette Deletion der P<sub>379</sub>VQLSY-Sequenz (Floettmann *et al.*, 1997). Dagegen hat die Mutation des P<sub>3</sub>-Restes des TRAF6-Interaktionsmotivs in CD40 keine so große Auswirkung auf die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade (Ye *et al.*, 2002).

Zusammenfassend zeigten die verschiedenen *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien, dass die für die Induktion der NF- $\kappa$ B- und JNK-Signalwege wichtige LMP1-Sequenz P<sub>379</sub>VQLSY (Floettmann *et al.*, 1997; Kieser *et al.*, 1999) die Bindung des TRAF6-C-Terminus an LMP1 vermittelt. Diese direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen wurde in der Vergangenheit zwar schon vermutet (Wan *et al.*, 2004), aber nie experimentell bestätigt. Ursprünglich wurde die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 in GST-Ko-Präzipitationsexperimenten aus Zelllysaten untersucht. Dabei konnte keine Bindung von TRAF6 an LMP1 beobachtet werden (Ishida, Mizushima, *et al.*, 1996). Der Nachweis, dass TRAF6 zu dem LMP1-Signalkomplex rekrutiert wird, konnte jedoch sowohl in Immunfluoreszenz-Experimenten, als auch ELISA-Experimenten aus Zelllysaten gezeigt werden (Schultheiss *et al.*, 2001). Die Autoren dieser Studie gingen damals jedoch von einer indirekten Bindung von TRAF6 über TRAF2 und TRADD aus (Schultheiss *et al.*, 2001). Auch in Immunpräzipitationen interagiert TRAF6 mit LMP1 (Abb. 4.17) (Wan *et al.*, 2004). Dennoch zeigte TRAF6 keine Interaktion mit LMP1 in Hefe-zwei-Hybrid-Experimenten (Wan *et al.*, 2004). Daher wurde die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 bisher als indirekt beschrieben (Wan *et al.*, 2006).

Da TRAF6 und LMP1 jeweils mit anderen Proteinen in Hefe-zwei-Hybrid-Experimenten interagieren können, ist diese Methode somit grundsätzlich für die Identifizierung von Bindepartnern für diese beiden Proteine geeignet. TRAF6 selbst wurde als direkter Interaktionspartner der Signaldomäne von CD40 in Hefe-zwei-Hybrid-Experimenten entdeckt (Ishida, Mizushima, *et al.*, 1996). Als direkte Interaktionspartner von LMP1 wurden unter anderem TRAF3, TRADD und RIP in Hefe-zwei-Hybrid-Experimenten identifiziert (Izumi, Kaye, *et al.*, 1997; Izumi & Kieff, 1997). Ebenso wie TRAF6 interagiert jedoch auch TRAF2 nicht in Hefe-zwei-Hybrid-Experimenten mit LMP1 (Devergne *et al.*, 1996; Sandberg *et al.*, 1997; Wan *et al.*, 2004). Aber auch TRAF2 wurde in Hefe-zwei-Hybrid-Experimenten als direkter Interaktionspartner des TNF-Rezeptor 2 beschrieben (Rothe *et al.*, 1994). Daher soll hier kurz darauf eingegangen werden, warum Hefe-zwei-Hybrid-Experimente die Interaktion zwischen diesen TRAF-Proteinen und LMP1 wahrscheinlich nicht darstellen konnten.

Wie bereits erwähnt, ist sowohl für die Interaktion von TRAF2 als auch für die Interaktion von TRAF6 mit Rezeptoren gezeigt, dass sich die Affinität der TRAF-Moleküle an multimeren

Rezeptoren gegenüber singulären Rezeptormolekülen erhöht (Pullen *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2002). Diese Bedingung ist von hoher Bedeutung für die Analyse der Bindung von TRAF-Proteinen an Rezeptoren. Aus den Studien von Pullen *et al.* (1999) geht ganz klar hervor, dass sowohl für die Rekrutierung von TRAF6 als auch von TRAF2 an den CD40-Rezeptor eine hohe Dichte von CD40-Molekülen erforderlich ist. Da nun die Interaktion sowohl von TRAF6 und TRAF2 mit LMP1 über ähnliche Interaktionsmotive vermittelt wird, liegt es nahe, dass dieser Umstand auch für LMP1 wichtig ist. In den Experimenten wurde daher immer darauf geachtet, die Bindestellen der verwendeten GSH-Kügelchen vollständig zu sättigen und so eine möglichst hohe Dichte an GST-LMP1-Proteinen zu erreichen. So konnte die Bindung von TRAF6 gezeigt werden. Dementsprechend war offenbar auch die Dichte von LMP1-Peptiden in den Peptidblot-Analysen groß genug, um die Bindung von TRAF6 zu vermitteln.

Da in den Hefe-zwei-Hybrid-Experimenten jedoch üblicherweise nur die intrazelluläre Signaldomäne von LMP1, fusioniert mit einer GAL4-DNA-Bindedomäne, verwendet wurde (Devergne *et al.*, 1996; Izumi & Kieff, 1997; Sandberg *et al.*, 1997), ist die Multimerisierung der LMP1-Moleküle nicht gegeben und die Affinität von TRAF-Proteinen dementsprechend gering (Anmerkung: Die Literaturverweise beziehen sich nur auf LMP1-TRAF2 Experimente. Der experimentelle Aufbau und die Ergebnisse der Hefe-zwei-Hybrid-Experimente zwischen TRAF6 und LMP1 werden in der Publikation von Wan *et al.* (2004) nur diskutiert, nicht als Daten gezeigt).

Vergleicht man nun die Affinität von TRAF6 zu GST-LMP1-Proteinen und die von TRAF6 zu GST-CD40-Proteinen in den hier durchgeführten Experimenten (siehe Abb. 4.21), so ist es ersichtlich, dass die Bindung von His-TRAF6<sub>310-522</sub> an GST-LMP1 wt um den Faktor 4 schwächer ist als an GST-CD40 wt. Die Bindung von TRAF6 an monomere LMP1-Proteine ist also dementsprechend ebenfalls schwächer als an monomere CD40-Moleküle. Es ist daher wahrscheinlich, dass durch die geringere Affinität von TRAF6 an monomere LMP1-Moleküle diese Interaktion unterhalb der Detektionsgrenze von Hefe-zwei-Hybrid-Experimenten liegt und sich Hefe-zwei-Hybrid-Systeme somit nicht eignen, die Bindung von TRAF6 an LMP1 darzustellen, vergleichbar mit der fehlenden Interaktion von TRAF2 mit LMP1 in Hefe-zwei-Hybrid-Experimenten. In Zellen dagegen, können LMP1 und TRAF6 multimere Komplexe bilden und interagieren miteinander. Zusätzlich zu der direkten Interaktion der beiden Proteine scheint es jedoch auch, dass die Interaktion von TRAF6 mit LMP1 in Zellen durch weitere Proteine stabilisiert werden kann. Zum Beispiel ist die Formation des Komplexes aus LMP1 und TRAF6 abhängig von BS69 (Wan *et al.*, 2006). Ein weiterer Faktor, der die Bindung von TRAF6 an LMP1 stabilisieren könnte, ist das Protein TRADD. Dies wird in Kapitel 5.3 eingehender diskutiert.

### 5.2.2 Die LMP1-Bindetasche auf der Oberfläche von TRAF6

Der Vergleich der TRAF6-Interaktionsmotive von LMP1 und CD40 (bzw. weiteren zellulären Rezeptoren) zeigte, dass die LMP1-Sequenz P<sub>379</sub>XQxxY dem TRAF6-Interaktionsmotiv zellulärer Rezeptoren ähnelt (siehe Kapitel 5.2.1). Daher war es naheliegend zu vermuten, dass die Bindung von TRAF6 an LMP1 von derselben Bindetasche auf der Oberfläche von TRAF6 vermittelt wird, die auch für die Bindung an CD40 verantwortlich ist. Um dies zu überprüfen wurden verschiedene TRAF6-Aminosäuren, welche die Bindung von TRAF6 an CD40 vermitteln, ausgewählt und in rekombinanten TRAF6-Proteinen jeweils in Alanin mutiert. In den darauf folgenden *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien mit diesen TRAF6-Mutanten zeigte sich, dass die Rekrutierung von TRAF6 an LMP1 der Bindung von TRAF6 an CD40 auf molekularer Ebene ähnelt und teilweise durch dieselben Aminosäuren innerhalb von TRAF6 vermittelt wurde. Die Punktmutationen R392A, F471A und Y473A innerhalb von TRAF6 inhibierten die Bindung von TRAF6 an LMP1. Zwei dieser Mutationen in TRAF6, F471A und Y473A, inhibierten ebenfalls die Bindung an CD40. Diese TRAF6-Aminosäuren bilden die Rezeptorbindetasche an der P<sub>-2</sub> der TRAF6-Interaktionsmotive. Diese Position ist sowohl in dem TRAF6-Interaktionsmotiv zellulärer Rezeptoren (Ye *et al.*, 2002) als auch in LMP1 hoch konserviert und immer mit der Aminosäure Prolin besetzt. Wie erwartet hatten also Mutationen der TRAF6-Aminosäuren, die die Bindetasche an dieser Stelle bilden, großen Einfluss auf die Bindung von TRAF6 an CD40 als auch an LMP1.

Im Gegensatz dazu hatte die Punktmutation R392A innerhalb von TRAF6 unterschiedliche Auswirkung auf die Interaktion von TRAF6 mit CD40 im Vergleich zur Interaktion mit LMP1. Während TRAF6-Proteine mit dieser Mutation noch an CD40 gebunden haben, war die Interaktion dieser TRAF6-Mutanten mit LMP1 unter den gegebenen Bedingungen komplett inhibiert. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Bindung von TRAF6(R392A) könnte die ohnehin schwächere Affinität von LMP1 zu TRAF6 im Vergleich zu CD40 sein. Während die Bindung von CD40 an TRAF6(R392A) durch die umliegenden Aminosäuren wahrscheinlich noch ausreichend stabilisiert wird, kann der LMP1-Rest an P<sub>0</sub> keine mit CD40 vergleichbaren Interaktionen mit TRAF6 ausbilden (siehe Abschnitt 5.2.1). Somit wird die ohnehin schon schwächere Interaktion von LMP1 mit TRAF6 durch die Mutation R392A noch weiter verringert. Weiterhin ist die TRAF6 Aminosäure Arg<sub>392</sub> Teil der TRAF6-Bindetasche, welche den P<sub>3</sub>-Rest der Rezeptorpeptide erkennt. An dieser Position unterscheidet sich nicht nur die LMP1-Sequenz (Tyr<sub>384</sub>) von der Sequenz von CD40 (Phe<sub>238</sub>), sondern die P<sub>3</sub> kann in zellulären Rezeptoren sowohl eine aromatische (Phe, Tyr) als auch eine saure Aminosäure (Glu, Asp) sein (Ye *et al.*, 2002). Es wäre also auch möglich, dass unterschiedliche TRAF6-Reste jeweils die Interaktion mit der Aminosäure an P<sub>3</sub> von LMP1 und P<sub>3</sub> von CD40 unterschiedlich gut stabilisieren.

Ein besonderes Augenmerk wurde bei der Planung der Experimente mit den TRAF6-Mutanten zur Charakterisierung der Interaktion zwischen LMP1 und TRAF6 auf die Aminosäuren innerhalb von TRAF6 gelegt, welche die Bindetasche für den Aminosäurerest an P<sub>0</sub> der Interaktionsmotive bilden. Wie in Abschnitt 5.2.1 beschrieben, unterscheidet sich diese Position in der Aminosäurekomposition des TRAF6-Interaktionsmotivs von LMP1 von dem zellulärer Rezeptoren. Innerhalb von TRAF6 wurde die Aminosäure Lys<sub>469</sub> ausgewählt, um die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Bindung von TRAF6 an LMP1 bzw. CD40 an dieser Stelle zu charakterisieren. Dieser TRAF6-Rest interagiert wahrscheinlich durch eine Ladungswechselwirkung mit der Seitenkette des Glutaminsäurerestes zellulärer Rezeptoren (Ye *et al.*, 2002). Interessanterweise zeigte sich in den Protein-Protein-Interaktionsstudien (siehe Abb. 4.24), dass die Mutation dieses TRAF6-Restes jedoch keinen Einfluss auf die direkte Bindung von TRAF6 sowohl an LMP1 als auch an CD40 hatte. Daraus kann man schlussfolgern, dass die Interaktion von TRAF6 mit Rezeptoren an dieser Position ein gewisses Maß von Veränderungen der Bindemodalitäten toleriert. Demgegenüber steht jedoch die Tatsache, dass die Wasserstoffbrückenbildung des P<sub>0</sub>-Restes von CD40 mit den TRAF6-Resten Leu<sub>457</sub> und Ala<sub>458</sub> gebildet wird (Ye *et al.*, 2002). Da diese Wasserstoffbrücken des CD40-Restes Glu<sub>235</sub> jedoch jeweils mit den Aminogruppen des Peptidrückrats der TRAF6-Reste gebildet werden (Ye *et al.*, 2002), erschien die Mutation dieser TRAF6-Reste jedoch nicht aussagekräftig, um das Bindevverhalten der Proteine weiter zu analysieren.

Festhalten lässt sich also, dass die Bindung von TRAF6 an LMP1 und CD40 nicht nur über ein ähnliches Interaktionsmotiv innerhalb der beiden Rezeptoren, sondern auch über die gleiche Bindetasche auf der Oberfläche von TRAF6 vermittelt wird. Die Relevanz dieser Erkenntnis für die Aktivierung von Signalwegen durch LMP1 wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

### **5.2.3 Einfluss der direkten Bindung von TRAF6 an LMP1 auf die Signalwege, die durch die CTAR2-Domäne aktiviert werden**

Es war bisher bekannt, dass TRAF6 essenziell für die Induktion des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch die CTAR2-Domäne ist (Schultheiss *et al.*, 2001; Luftig *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2008). Weiterhin war bekannt, dass die LMP1(A<sub>204</sub>XAXA/Y384G)-Mutante nicht mehr in der Lage ist, TRAF6 zu rekrutieren (Schultheiss *et al.*, 2001). Zu dem Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Ergebnisse konnte jedoch noch nicht gezeigt werden, dass TRAF6 direkt an LMP1 bindet. Daher gingen die Autoren von einer indirekten Bindung aus, die unter anderem über das Adapterprotein TRADD vermittelt werden könnte (Schultheiss *et al.*, 2001). Da nun die NF- $\kappa$ B-Signalkaskade durch die Sequenz P<sub>379</sub>VQLSY aktiviert wird (Floettmann *et al.*, 1997) und diese Sequenz die Bindung von TRAF6 vermittelt, wurde in der

vorliegenden Arbeit untersucht, ob die direkte Bindung von TRAF6 notwendig für die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs ist. Dementsprechend wurden NF- $\kappa$ B-Rekonstitutionsexperimente mit den TRAF6-Mutanten in embryonalen TRAF6<sup>-/-</sup> Mausfibroblasten durchgeführt und die Effekte der Mutationen auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B-Signalen durch die CTAR2-Domäne untersucht.

In diesen Experimenten war nur Wildtyp-TRAF6 in der Lage, die Induktion des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch die CTAR2-Domäne wieder herzustellen. Die TRAF6-Proteine mit den Mutationen R392A, F471A und Y473A, die nicht mehr an LMP1 binden können, waren auch nicht mehr im Stande, die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges zu vermitteln. Die direkte Bindung von TRAF6 an die CTAR2-Domäne ist also essenziell für die Aktivierung dieses Signalweges. Obwohl Flag-TRAF6(K469A) noch mit LMP1 interagiert, war diese Mutante jedoch ebenfalls nicht in der Lage, die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch die CTAR2-Domäne wieder herzustellen. Die Ursache hierfür konnte während der Anfertigung dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es wäre jedoch möglich, dass durch die Mutation K469A zwar die Bindung von TRAF6 an LMP1 nicht beeinflusst wird, aber die Interaktion von TRAF6 mit weiteren Proteinen im LMP1-Signalkomplex unterbunden wird. Sowohl BS69 (Wan *et al.*, 2006) als auch TNIK (Shkoda *et al.*, 2012) und TRADD interagieren ebenfalls mit der TRAF-Domäne von TRAF6 (siehe hierzu auch Kapitel 5.3). Es könnte also sein, dass diese Interaktionen durch die TRAF6-Mutation beeinflusst sind, und Flag-TRAF6(K469A) daher nicht mehr in der Lage ist, den NF- $\kappa$ B-Signalweg vergleichbar mit Wildtyp TRAF6 zu aktivieren.

Die LMP1-Sequenz P<sub>379</sub>VQLSY ist jedoch nicht nur der Ausgangspunkt für die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges, sondern auch für die Induktion der JNK-Signalkaskade (Kieser *et al.*, 1999). Da die gleichen Mutationen innerhalb dieser Sequenz sowohl die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges als auch der JNK-Signalkaskade inhibieren (Floettmann *et al.*, 1997; Kieser *et al.*, 1999), und die Induktion des JNK-Signalweges, vergleichbar mit der Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren, durch die CTAR2-Domäne ebenfalls TRAF6 abhängig ist (Wan *et al.*, 2004), ist anzunehmen, dass die Induktion des JNK-Signalweges ebenfalls durch die direkte Bindung von TRAF6 an die CTAR2-Domäne vermittelt wird. Jedoch wurde bisher angenommen (wie bereits oben erwähnt), dass für die Aktivierung des JNK-Signalweges TRAF6 über BS69 an LMP1 rekrutiert wird. BS69 bindet in diesem Modell an die CTAR2-Domäne von LMP1 und rekrutiert dann, ebenfalls über eine direkte Interaktion, TRAF6 (Wan *et al.*, 2006). Da die Bindung von BS69 an LMP1 durch die Deletion der letzten acht carboxyterminalen Aminosäuren von LMP1 inhibiert wird (Wan *et al.*, 2006), überlappen somit Teile des BS69-Interaktionsmotivs mit dem TRAF6-Interaktionsmotiv innerhalb der CTAR2-Domäne.

Diese beiden Interaktionen müssen sich jedoch nicht gegenseitig ausschließen, denn die Aktivierung von Signalwegen durch LMP1 wird nicht nur von einem LMP1-Molekül, sondern von einem multimerisierten LMP1-Komplex ausgebildet. Daher ist es möglich, dass in dem multimeren Signalkomplex beide Proteine durch Interaktion mit verschiedenen LMP1-Molekülen rekrutiert werden (siehe hierzu auch Abb. 5.1 und Kapitel 5.3). Zu diesem Modell passt auch die Tatsache, dass TRAF1, TRAF2, TRAF3 und TRAF5 dasselbe TRAF-Interaktionsmotiv in der CTAR1-Domäne binden (siehe Abb. 4.4) und alle vier TRAF-Proteine mit LMP1 in LCLs komplexiert sind (Devergne *et al.*, 1996; Devergne *et al.*, 1998).

Nichtsdestotrotz sollte in Zukunft genauer adressiert werden, in wie weit die direkte Bindung von TRAF6 neben der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges auch einen Einfluss auf alle Signalwege hat, die durch die CTAR2-Domäne aktiviert werden. Zu diesen zählen die JNK-Signalkaskade (Wan *et al.*, 2004) die p38-MAPK-Signalkaskade (Schultheiss *et al.*, 2001) sowie die IRF7-Signalkaskade (Huye *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2008). Da TRAF6 in diesen Signalwegen essenziell beteiligt ist (Schultheiss *et al.*, 2001; Wan *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2008), ist es sehr wahrscheinlich, dass die direkte Bindung von TRAF6 an die CTAR2-Domäne ebenfalls für diese Signalwege wichtig ist.

### 5.3 Die Rolle von TRADD im CTAR2-Signalkomplex

Zuletzt konnte ich in meiner Arbeit erstmals zeigen, dass TRADD ebenfalls direkt mit TRAF6 interagieren kann. Innerhalb von TRADD konnten zwei Regionen identifiziert werden, die an den TRAF6 C-Terminus binden. Es befindet sich jeweils eine davon im N-Terminus und eine in der Todesdomäne des TRADD Proteins. Es ist bekannt, dass die TRAF-Proteine TRAF1, TRAF2 und TRAF3 innerhalb des N-Terminus von TRADD an die sogenannte TRAF2-Interaktionsdomäne binden können (Hsu *et al.*, 1996; Arch, Gedrich, *et al.*, 1998; Michallet *et al.*, 2008). Da jedoch die Aminosäuren, welche die Bindung von TRAF2 an TRADD vermitteln, in TRAF6 nicht konserviert sind (Park *et al.*, 2000), unterscheidet sich die Art und Weise der Interaktion von TRAF6 mit dem N-Terminus von TRADD wahrscheinlich von der Interaktion mit anderen TRAF-Proteinen. Zusätzlich ist mir nicht bekannt, dass bisher für ein anderes TRAF-Protein eine Bindung an die Todesdomäne von TRADD beschrieben ist. Diese Interaktion von TRAF6 mit TRADD ist also wahrscheinlich einzigartig innerhalb der TRAF-Familie.

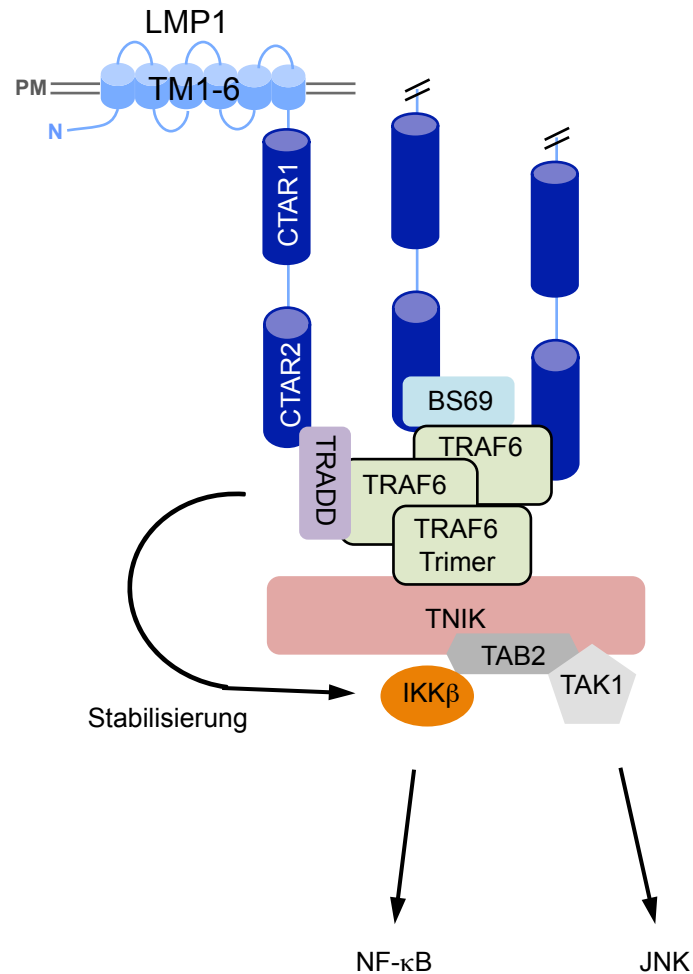
Die Erkenntnis über die direkte Interaktion von TRAF6 sowohl mit TRADD als auch LMP1 bietet nun einen neuen Einblick in den Aufbau des CTAR2-Signalkomplexes. Bisher wurden statt der direkten Bindung von TRAF6 an LMP1 sowohl TRADD als auch BS69 als Adapterproteine für die Rekrutierung von TRAF6 an die CTAR2-Domäne diskutiert (Schultheiss *et al.*, 2001; Wan *et al.*, 2006). Da TRAF6 jedoch ebenfalls direkt an die



CTAR2-Domäne binden kann (siehe Kapitel 5.2), ist dieses Modell für die Ausbildung des CTAR2-Komplexes überholt. Daher würde ich folgendes hypothetisches Modell vorschlagen: Da die Todesdomäne von TRADD sowohl ausreichend, als auch notwendig ist, um mit monomeren LMP1-Molekülen in Hefe-zwei-Hybrid-Experimenten zu interagieren, bindet TRADD direkt über den C-Terminus an die LMP1-Aminosäuren Y<sub>384</sub>YD (Izumi & Kieff, 1997). BS69 ist genauso in der Lage, in Hefe-zwei-Hybrid-Experimenten mit der CTAR2-Domäne zu interagieren und ist auch direkt an LMP1 gebunden (Wan *et al.*, 2006).

Durch die Multimerisierung von LMP1 erhöht sich die Affinität von TRAF6 zu LMP1 und TRAF6 wird ebenfalls über direkte Bindung an die CTAR2-Domäne rekrutiert. Die Interaktion von TRAF6 wird aber zusätzlich über weitere Interaktionen mit den beiden Proteinen TRADD und BS69 im gebildeten Signalkomplex stabilisiert. Ein TRAF6-Trimer könnte über eines der TRAF6-Moleküle an eine LMP1-Signaldomäne rekrutiert werden, während die beiden anderen TRAF6-Moleküle des Trimers sowohl mit weiteren LMP1-Proteinen als auch mit TRADD oder BS69 interagieren könnten. TRADD würde in diesem Komplex also über die Todesdomäne direkt an LMP1 binden und der TRADD N-Terminus könnte zusätzliche Quervernetzung mit TRAF6 bilden. Letztendlich würde dann über TRAF6 der Signalkomplex aus TNF, TAB2, TAK1 und IKK $\beta$  an LMP1 (Shkoda *et al.*, 2012) rekrutiert (Abb. 5.1).

Dieses Modell wird durch verschiedene Fakten weiter gestützt. Trotz der direkten Interaktion der Todesdomäne von TRADD mit LMP1 in Hefe-zwei-Hybrid-Experimenten präzipitieren in GST-Ko-Präzipitationen aus HEK293-D-Zellen sowohl eine TRADD-Mutante ohne Todesdomäne (TRADD Aminosäuren 1-194) als auch eine TRADD-Punktmutante ohne funktionale Todesdomäne (TRADD 296-299 A) mit LMP1 (Kieser *et al.*, 1999). Obwohl nun aber die TRADD-Mutante TRADD(1-194) mit dem LMP1-Signalkomplex interagiert, ist sie dominant negativ und unterbindet die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch LMP1 (Kieser *et al.*, 1999). Die Interaktion von TRADD mit dem LMP1-Signalkomplex könnte also über zwei Protein-Protein-Interaktionen von TRADD vermittelt sein. Es wäre daher möglich, dass diese TRADD-Mutanten, die den TRADD-N-Terminus umfassen, über TRAF6 an den LMP1-Signalkomplex binden, die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges aber durch die Deletion von Teilen der Todesdomäne nicht möglich ist. Weiterhin wird dieses Modell dadurch unterstützt, dass durch die Herunterregulation von BS69 mittels BS69-spezifischer shRNA die Bindung TRAF6-Proteinen an LMP1 reduziert wird, aber nicht komplett inhibiert ist (Wan *et al.*, 2006). Um hierzu jedoch eine genauere Aussage treffen zu können, müssten Ko-Immünpräzipitationen mit LMP1 und TRAF6 in BS69<sup>-/-</sup> Zellen durchgeführt werden, um auszuschließen, dass die Herunterregulation von BS69 durch die shRNA nicht unvollständig war. Nur in einem solchen System könnte die Rolle von BS69 für die Rekrutierung von TRAF6 geklärt werden.



**Abb. 5.1: Modell für den Aufbau des CTAR2-Signalkomplexes.** TRAF6 spielt eine zentrale Rolle in der Ausbildung des CTAR2-Signalkomplexes. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, bindet TRAF6 direkt an die LMP1-Sequenz P<sub>379</sub>VQLSY. Die Ausbildung des LMP1-TRAF6 Proteinkomplexes wird über die Proteine TRADD und BS69 weiter stabilisiert. Sowohl TRADD als auch BS69 können direkt mit LMP1 interagieren und sind ebenfalls beide in der Lage, TRAF6 zu binden. Über TRAF6 wird der Signalkomplex aus TNIK, TAB2, TAK1 und IKKβ an LMP1 rekrutiert. [Abb. modifiziert nach Shkoda et al. (2012). Für weitere Referenzen siehe Text]

Es wäre in Zukunft sicher auch interessant herauszufinden, ob die direkte Interaktion von TRAF6 und TRADD auch in der Aktivierung von Signalwegen durch zelluläre Rezeptoren eine Rolle spielt. Auch wenn bisher keine direkte Interaktion zwischen TRAF6 und TRADD beschrieben wurde, ist die Rekrutierung beider Proteine in Signalkomplexe anderer Rezeptoren bekannt, die sowohl zur Aktivierung des NF-κB-Signalwegs als auch zur Induktion von MAPK-Signalwegen führen. Zum Beispiel spielen beide Proteine eine Rolle bei der Induktion von Signalkaskaden durch den TLR3 (*Toll like receptor 3*). Bei der Aktivierung durch dsRNA rekrutiert der TLR3 das Adapterprotein TRIF (*Toll/Interleukin receptor-domain-containing adapter-inducing interferon-β*) (Dunlevy et al., 2010). Das Protein TRIF wiederum bildet einen Multiproteinkomplex aus, der zur Aktivierung des MAPK- und des NF-κB-Signalweges führt. Zu diesem Multiproteinkomplex gehören unter anderem TRAF6 und

TRADD (Kawai *et al.*, 2010). Ein weiteres Beispiel ist die Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges durch das mitochondriale antivirale Signalprotein (MAVS). Sowohl TRAF6 als auch TRADD werden von MAVS als Signaladapter rekrutiert (West *et al.*, 2011).

#### **5.4 Weiterführende Schritte in der Entwicklung von Inhibitoren, die gegen LMP1-Signalkomplexe gerichtet sind**

Um die Entwicklung von Inhibitoren gegen den Komplex aus LMP1 und TRAF2 voranzutreiben, werden derzeit zwei Ansätze weiterverfolgt. Zum einen werden die Ergebnisse dieser Arbeit als Grundlage für die Durchführung von weiteren Screens verwendet. Während die Testung der 800 Substanzen der AD-Bibliothek in dieser Arbeit noch vollkommen manuell durchgeführt wurde, werden nun die Bedingungen so optimiert, dass ein vollautomatischer Screen durchgeführt werden kann. So sollen in Zukunft Bibliotheken mit mehr als  $10^4$  Substanzen nach weiteren potentiellen Inhibitoren durchsucht werden. Durch das Screening von größeren und vielfältigeren Bibliotheken besteht die Möglichkeit, in Zukunft noch potentere Inhibitoren zu identifizieren.

Darüber hinaus konnte ich durch meine Forschungsarbeit über den CTAR2-Signalkomplex eine weitere potenzielle Zielstruktur identifizieren. Die Interaktion von TRAF6 mit der P<sub>379</sub>VQLSY Sequenz innerhalb der CTAR2-Domäne ähnelt der Interaktion von TRAF2 mit der CTAR1-Sequenz P<sub>204</sub>QQAT. Wie die Bindung von TRAF2 an LMP1 wird die Bindung von TRAF6 über eine Bindetasche auf der Oberfläche von TRAF6 vermittelt. Die Charakterisierung der Interaktion von TRAF6 mit LMP1 zeigte, dass TRAF6 ebenfalls keine große Interaktionsfläche mit LMP1 ausbildet, sondern die Bindung wird durch eine definierte Anzahl von Kontakten zwischen den beiden Proteinen ausgebildet. Somit ist auch der Signalkomplex aus TRAF6 und der CTAR2-Domäne ein ideales Ziel für inhibitorische Moleküle. Es sollte also dementsprechend möglich sein, das gewonnene Wissen zur Aufstellung eines Screeningsystems für die Suche nach Inhibitoren gegen diese Interaktion anzuwenden. Damit wäre man in der Lage, zusätzlich zu Inhibitoren, die gegen den CTAR1-TRAF2-Komplex gerichtet sind, Inhibitoren gegen den CTAR2-TRAF6-Komplex zu entwickeln. Dies würde es ermöglichen, beide für die Zelltransformation essenzielle Signaldomänen von LMP1 zu blockieren. Theoretisch sollte durch die gleichzeitige Inhibition beider Signalkomplexe ein kumulativer Effekt auftreten und so die Wirksamkeit der Inhibitoren erhöht werden.

## 6. Zusammenfassung

Das Epstein-Barr Virus (EBV) ist mit einer Reihe von lebensbedrohlichen Krankheiten assoziiert. Dazu zählen unter anderem Nasopharynxkarzinome, Hodgkin-Lymphome und lymphoproliferative Erkrankungen nach Organtransplantationen. Dennoch gibt es bisher keinen wirksamen Therapieansatz, der sich spezifisch mit der Rolle von EBV in diesen malignen Erkrankungen auseinandersetzt.

Das latente Membranprotein 1 (LMP1) ist das primäre Onkogen von EBV und essenziell für die Transformation von B-Zellen durch das Virus. Für eine effiziente Transformation von Zellen ist die Aktivierung verschiedener zellulärer Signalwege durch LMP1 notwendig. LMP1 besitzt jedoch keine enzymatische Aktivität und die Induktion der Signalwege ist somit abhängig von der Rekrutierung verschiedener zellulärer Adapterproteine. Die Ausbildung der notwendigen Signalkomplexe wird über zwei C-terminale Aktivierungs-Regionen (CTAR1 und CTAR2) vermittelt. Verschiedene Mitglieder der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-assoziierten Faktoren (TRAF)-Protein-Familie spielen bei der Induktion der Signalwege durch diese beiden CTAR-Domänen eine zentrale Rolle.

Nach grundlegenden Protein-Protein-Interaktionsstudien zwischen LMP1 und rekombinanten TRAF-Proteinen wurde hier die Interaktion zwischen TRAF2 und LMP1 als Zielstruktur für Inhibitoren vorgestellt. TRAF2 ist essenziell für die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch die CTAR1-Domäne und somit für das Überleben EBV-transformierter Zellen. Die Bindung von TRAF2 an LMP1 wurde biochemisch näher charakterisiert und die gewonnenen Erkenntnisse verwendet, um ein System zu etablieren, mit dem Inhibitoren gegen den Komplex aus LMP1 und TRAF2 identifiziert werden können. Dieses ELISA-basierte System erfüllt die Anforderungen, die allgemein an hochdurchsatzfähige Systeme gestellt werden. In einem Pilotscreen einer Bibliothek mit Naturstoffen wurden Substanzen identifiziert, die die Bindung von TRAF2 an LMP1 *in vitro* inhibierten. Die potenteste Substanz inhibierte die Interaktion von TRAF2 und LMP1 mit einem IC<sub>50</sub> von 8  $\mu$ M in diesen *in vitro* Studien. Weiterhin zeigte diese Substanz eine spezifische biologische Wirkung auf die Vitalität von EBV-transformierten B-Zellen.

Zusätzlich konnte in den Protein-Protein-Interaktionsstudien zwischen den verschiedenen TRAF-Proteinen und LMP1 erstmals eine direkte Bindung von TRAF6 an LMP1 gezeigt werden. Entgegen der bisherigen Modellvorstellung, nach der TRAF6 indirekt über Adapterproteine an LMP1 gebunden wird, konnte hier gezeigt werden, dass TRAF6 direkt an die LMP1-Sequenz P<sub>379</sub>VQLSY innerhalb der CTAR2-Domäne bindet. Diese Sequenz ist essenziell für die Aktivierung verschiedener TRAF6-abhängiger Signalwege durch die CTAR2-Domäne. Auf der Oberfläche von TRAF6 wird die Bindung an LMP1 durch dieselbe

Bindetasche vermittelt, über die auch die Interaktion mit zellulären Rezeptoren stattfindet. Diese direkte Interaktion zwischen LMP1 und TRAF6 ist wichtig für die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch die CTAR2-Domäne. TRAF6-Mutanten, die nicht mehr in der Lage waren, mit LMP1 zu interagieren, waren ebenfalls nicht mehr dazu fähig, die Induktion von NF- $\kappa$ B-Signalen durch die CTAR2-Domäne von LMP1 in embryonalen TRAF6<sup>-/-</sup> Mäusfibroblasten wiederherzustellen.

Ebenfalls konnte neben der direkten Bindung von TRAF6 an LMP1 hier eine weitere neue Protein-Protein-Interaktion für TRAF6 beschrieben werden. TRAF6 bindet direkt an das TNF-Rezeptor-assoziierte Todesdomänenprotein (TRADD). Die Interaktion zwischen TRAF6 und TRADD unterscheidet sich jedoch von der Bindung anderer TRAF-Proteine an TRADD. Die *in vitro* Studien zeigten, dass TRAF6 in der Lage ist, sowohl mit Teilen des N-Terminus, als auch mit Teilen des C-Terminus von TRADD zu interagieren. Diese bisher nicht beschriebene Art der direkten Interaktion von TRAF6 mit TRADD eröffnet neue Einblicke in den Aufbau des LMP1-Signalkomplexes.

## 7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AD	AnalytiCon Discovery
AGV	Abteilung für Genvektoren
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AVR	<i>Assay variability ratio</i>
BL41	Burkitt Lymphom Zelllinie
BSA	Rinderserum Albumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
C-	Carboxyl-Terminus (von Proteinen)
CD	Zelldifferenzierungsmarker ( <i>cell differentiation marker</i> )
cIAP	<i>Cellular inhibitor of apoptosis</i>
CMV	Zytomegalie Virus ( <i>cytomegalovirus</i> )
CTAR	<i>C-terminal activation region</i>
CV	Variationskoeffizient
d	Tage ( <i>day</i> )
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsRNA	<i>double stranded RNA</i>
DTT	Dithioereithol
EBNA	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
ECL	Chemilumineszenz-Reaktionslösung ( <i>enhanced chemiluminescence</i> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Antikörperbasiertes Nachweisverfahren ( <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> )
EREB2-5	Estrogen Receptor/ EBNA2
EtOH	Ethanol
FCS	fötale Kälber Serum ( <i>fetal calf serum</i> )
f. K.	finale Konzentration
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
GSH	Glutathion-Sepharose
°C	Grad Celsius
h	Stunden ( <i>hour</i> )
S <sub>50</sub>	halbmaximale Sättigung
HA	Hämagglutinin
HD	Hochdurchsatz
HEK	humane Nieren Zelllinie ( <i>human embryonic kidney</i> )
HRP	Meerrettich Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IC <sub>50</sub>	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
I $\kappa$ B	<i>Inhibitor of <math>\kappa</math>B</i>
IKK	I $\kappa$ B Kinase

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IRF-7	<i>Interferon regulatory factor 7</i>
JNK	c-Jun N-Terminale Kinase
k	Kilo-
$K_a$	Assoziationskonstante
$K_d$	Dissoziationskonstante
$K_D$	Gleichgewichtskonstante
L	Liter
LB Medium	Bakterien Nährmedium ( <i>lysogeny broth</i> )
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie ( <i>lymphoblastoid cell line</i> )
LMP1	Latentes Membranprotein 1
$\mu$	Mittelwert (von Signalpopulationen)
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ L	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
mL	Milliliter
mM	Millimolar
M	Molar
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase ( <i>Mitogen activated protein kinase</i> )
MAVS	Mitochondriales antivirales Signalprotein
Min	Minute
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid
MW	Molekulargewicht ( <i>molecular weight</i> )
n	Nano-
N-	Aminoterminus (von Proteinen)
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells</i>
NIK	NF- $\kappa$ B induzierende Kinase
Ni <sup>2+</sup> NTA	Nickel <sup>2+</sup> -Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
p	Signifikanzwert ( <i>probability</i> )
P <sub>x</sub>	Position x in einer Sequenz (x=...-2, -1, - 0, 1, 2....)
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphatpuffer ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RIP	Rezeptor interagierendes Protein
rpm	Runden pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNaseA	Ribonuklease A
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanzeinheiten ( <i>response units</i> )
$\sigma$	Standardabweichung
S/B	Signal zu Hintergrund (signal/background)
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat ( <i>sodiumdodecylsulfate</i> )
sec	Sekunden ( <i>second</i> )
s.o.	siehe oben
TBS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanpuffer ( <i>TRIS buffered saline</i> )

---

TBE	TRIS/Borat/EDTA Puffer
TEMED	Tetramethyldiamin
TEV	Tabakätzvirus ( <i>tobacco etch virus</i> )
TIO	<i>two in one</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TRADD	TNF-Rezeptor assoziiert via Todesdomäne ( <i>TNF-Rezeptor associated via death domain</i> )
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziierte Faktoren
TMB	<i>3,3',5,5'-tetramethylbenzidine</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tri-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	Einheiten ( <i>units</i> )
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
V	Volt
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
x g	x-fache Erdbeschleunigung



## 8. Literatur

Advani R (2011) Optimal therapy of advanced Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2011**: 310-316

Aizawa S, Nakano H, Ishida T, Horie R, Nagai M, Ito K, Yagita H, Okumura K, Inoue J, Watanabe T (1997) Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 5 and TRAF2 are involved in CD30-mediated NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **272**: 2042-2045

Akiba H, Nakano H, Nishinaka S, Shindo M, Kobata T, Atsuta M, Morimoto C, Ware CF, Malinin NL, Wallach D, Yagita H, Okumura K (1998) CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kappaB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappaB-inducing kinase. *J Biol Chem* **273**: 13353-13358

Albrecht JC, Friedrich U, Kardinal C, Koehn J, Fleckenstein B, Feller SM, Biesinger B (1999) Herpesvirus ateles gene product Tio interacts with nonreceptor protein tyrosine kinases. *J Virol* **73**: 4631-4639

Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB (1998) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev* **12**: 2821-2830

Arch RH, Thompson CB (1998) 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB. *Mol Cell Biol* **18**: 558-565

Arkin MR, Wells JA (2004) Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nat Rev Drug Discov* **3**: 301-317

Arkin MR, Whitty A (2009) The road less traveled: modulating signal transduction enzymes by inhibiting their protein-protein interactions. *Curr Opin Chem Biol* **13**: 284-290

Atkinson PG, Coope HJ, Rowe M, Ley SC (2003) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus stimulates processing of NF-kappa B2 p100 to p52. *J Biol Chem* **278**: 51134-51142

Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell PJ, Gibson TJ, Hatfull G, Hudson GS, Satchwell SC, Seguin C, et al. (1984) DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* **310**: 207-211

Beck B, Chen YF, Dere W, Devanarayan V, Eastwood BJ, Farmen MW, Iturria SJ, Iversen PW, Kahl SD, Moore RA, Sawyer BD (2012) Assay Operation for SAR Support. *Assay Guidance Manual online*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK91994/>

Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW (2001) SP600125, an anthranyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13681-13686

Boucher LM, Marengere LE, Lu Y, Thukral S, Mak TW (1997) Binding sites of cytoplasmic effectors TRAF1, 2, and 3 on CD30 and other members of the TNF receptor superfamily. *Biochem Biophys Res Commun* **233**: 592-600

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254

- Brodeur SR, Cheng G, Baltimore D, Thorley-Lawson DA (1997) Localization of the major NF-kappaB-activating site and the sole TRAF3 binding site of LMP-1 defines two distinct signaling motifs. *J Biol Chem* **272**: 19777-19784
- Cahir-McFarland ED, Carter K, Rosenwald A, Giltnane JM, Henrickson SE, Staudt LM, Kieff E (2004) Role of NF-kappa B in cell survival and transcription of latent membrane protein 1-expressing or Epstein-Barr virus latency III-infected cells. *J Virol* **78**: 4108-4119
- Cahir-McFarland ED, Davidson DM, Schauer SL, Duong J, Kieff E (2000) NF-kappa B inhibition causes spontaneous apoptosis in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6055-6060
- Chen ZJ (2005) Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* **7**: 758-765
- Chi LM, Yu JS, Chang YS (2002) Identification of protein kinase CK2 as a potent kinase of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Biochem Biophys Res Commun* **294**: 586-591
- Chung JY, Park YC, Ye H, Wu H (2002) All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci* **115**: 679-688
- Clements GB, Klein G, 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
- Cochran AG (2000) Antagonists of protein-protein interactions. *Chem Biol* **7**: R85-94
- Cohen JI (2000) Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* **343**: 481-492
- Dawson CW, Laverick L, Morris MA, Tramoutanis G, Young LS (2008) Epstein-Barr virus-encoded LMP1 regulates epithelial cell motility and invasion via the ERK-MAPK pathway. *J Virol* **82**: 3654-3664
- Dawson CW, Tramoutanis G, Eliopoulos AG, Young LS (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
- de Boer HA, Comstock LJ, Vasser M (1983) The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 21-25
- de Jong SJ, Albrecht JC, Giehler F, Kieser A, Sticht H, Biesinger B (2013) Noncanonical NF-kappaB Activation by the Oncoprotein Tio Occurs Through a Nonconserved TRAF3-Binding Motif. *Sci Signal* **6**: ra27
- de Jong SJ, Albrecht JC, Schmidt M, Muller-Fleckenstein I, Biesinger B (2010) Activation of noncanonical NF-kappaB signaling by the oncoprotein Tio. *J Biol Chem* **285**: 16495-16503
- Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ (2000) Activation of the I kappa B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**: 351-361
- Devergne O, Cahir McFarland ED, Mosialos G, Izumi KM, Ware CF, Kieff E (1998) Role of the TRAF binding site and NF-kappaB activation in Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-induced cell gene expression. *J Virol* **72**: 7900-7908

- Devergne O, Hatzivassiliou E, Izumi KM, Kaye KM, Kleijnen MF, Kieff E, Mosialos G (1996) Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* **16**: 7098-7108
- Dirmeier U, Neuhierl B, Kilger E, Reisbach G, Sandberg ML, 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
- Dunlevy F, McElvaney NG, Greene CM (2010) TLR3 Sensing of Viral Infection. *The Open Infectious Diseases Journal* **4**: 1-10
- Eglen RM, Reisine T, Roby P, Rouleau N, Illy C, Bosse R, Bielefeld M (2008) The use of AlphaScreen technology in HTS: current status. *Curr Chem Genomics* **1**: 2-10
- Eliopoulos AG, Blake SM, Floettmann JE, Rowe M, Young LS (1999) 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 AG, Caamano JH, Flavell J, Reynolds GM, Murray PG, Poyet JL, Young LS (2003) Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 regulates the processing of p100 NF-kappaB2 to p52 via an IKKgamma/NEMO-independent signalling pathway. *Oncogene* **22**: 7557-7569
- Eliopoulos AG, Gallagher NJ, Blake SM, Dawson CW, Young LS (1999) Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem* **274**: 16085-16096
- Eliopoulos AG, Waites ER, Blake SM, Davies C, Murray P, Young LS (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
- Elstrom RL, Andreadis C, Aqui NA, Ahya VN, Bloom RD, Brozena SC, Olthoff KM, Schuster SJ, Nasta SD, Stadtmauer EA, Tsai DE (2006) Treatment of PTLN with rituximab or chemotherapy. *Am J Transplant* **6**: 569-576
- Epstein MA, Achong BG, Barr YM (1964) Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* **1**: 702-703
- Evans AS, Niederman JC, McCollum RW (1968) Seroepidemiologic studies of infectious mononucleosis with EB virus. *N Engl J Med* **279**: 1121-1127
- Farrell PJ, Cludts I, Stuhler A (1997) Epstein-Barr virus genes and cancer cells. *Biomed Pharmacother* **51**: 258-267
- Fejzo J, Lepre CA, Peng JW, Bemis GW, Ajay, Murcko MA, Moore JM (1999) The SHAPES strategy: an NMR-based approach for lead generation in drug discovery. *Chem Biol* **6**: 755-769
- Floettmann JE, 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

Franken M, Devergne O, Rosenzweig M, Annis B, Kieff E, Wang F (1996) Comparative analysis identifies conserved tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 binding sites in the human and simian Epstein-Barr virus oncogene LMP1. *J Virol* **70**: 7819-7826

Gedrich RW, Gilfillan MC, Duckett CS, Van Dongen JL, Thompson CB (1996) CD30 contains two binding sites with different specificities for members of the tumor necrosis factor receptor-associated factor family of signal transducing proteins. *J Biol Chem* **271**: 12852-12858

Gewurz BE, Mar JC, Padi M, Zhao B, Shinnars NP, Takasaki K, Bedoya E, Zou JY, Cahir-McFarland E, Quackenbush J, Kieff E (2011) Canonical NF-kappaB activation is essential for Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 TES2/CTAR2 gene regulation. *J Virol* **85**: 6764-6773

Ghosh S, Karin M (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109**: S81-96

Gires O, Kohlhuber F, Kilger E, Baumann M, Kieser A, Kaiser C, Zeidler R, Scheffer B, Ueffing M, Hammerschmidt W (1999) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J* **18**: 3064-3073

Gires O, Zimmer-Strobl U, Gonnella R, Ueffing M, Marschall G, Zeidler R, Pich D, Hammerschmidt W (1997) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J* **16**: 6131-6140

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**: 59-74

Guasparri I, Bubman D, Cesarman E (2008) EBV LMP2A affects LMP1-mediated NF-kappaB signaling and survival of lymphoma cells by regulating TRAF2 expression. *Blood* **111**: 3813-3820

Hajduk PJ (2006) Puzzling through fragment-based drug design. *Nat Chem Biol* **2**: 658-659

Hajduk PJ, Galloway WR, Spring DR (2011) Drug discovery: A question of library design. *Nature* **470**: 42-43

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580

Heeres JT, Hergenrother PJ (2011) High-throughput screening for modulators of protein-protein interactions: use of photonic crystal biosensors and complementary technologies. *Chem Soc Rev* **40**: 4398-4410

Heinemann S, Biesinger B, Fleckenstein B, Albrecht JC (2006) NFkappaB signaling is induced by the oncoprotein Tio through direct interaction with TRAF6. *J Biol Chem* **281**: 8565-8572

Henderson S, Rowe M, Gregory C, Croom-Carter D, Wang F, Longnecker R, Kieff E, Rickinson A (1991) Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* **65**: 1107-1115

Henle G, Henle W, Diehl V (1968) Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **59**: 94-101

- Higuchi M, Kieff E, Izumi KM (2002) The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 putative Janus kinase 3 (JAK3) binding domain does not mediate JAK3 association or activation in B-lymphoma or lymphoblastoid cell lines. *J Virol* **76**: 455-459
- Hodgson DC (2011) Late effects in the era of modern therapy for Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2011**: 323-329
- Hou Y, Cao S, Brodie PJ, Callmender MW, Ratovoson F, Rakotobe EA, Rasamison VE, Ratsimbason M, Alumasa JN, Roepe PD, Kingston DG (2009) Antiproliferative and antimalarial anthraquinones of *Scutia myrtina* from the Madagascar forest. *Bioorg Med Chem* **17**: 2871-2876
- Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV (1996) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* **84**: 299-308
- Hsu H, Solovyev I, Colombero A, Elliott R, Kelley M, Boyle WJ (1997) ATAR, a novel tumor necrosis factor receptor family member, signals through TRAF2 and TRAF5. *J Biol Chem* **272**: 13471-13474
- Hu L, Zaloudek C, Mills GB, Gray J, Jaffe RB (2000) In vivo and in vitro ovarian carcinoma growth inhibition by a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (LY294002). *Clin Cancer Res* **6**: 880-886
- Huen DS, Henderson SA, Croom-Carter D, Rowe M (1995) The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene* **10**: 549-560
- Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL (2011) Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol* **162**: 1239-1249
- Huye LE, Ning S, Kelliher M, Pagano JS (2007) Interferon regulatory factor 7 is activated by a viral oncoprotein through RIP-dependent ubiquitination. *Mol Cell Biol* **27**: 2910-2918
- IARC, WHO (1997) Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* **70**: 47 - 52
- Ikeda O, Miyasaka Y, Yoshida R, Mizushima A, Oritani K, Sekine Y, Kuroda M, Yasui T, Fujimuro M, Muromoto R, Nanbo A, Matsuda T (2010) BS69 cooperates with TRAF3 in the regulation of Epstein-Barr virus-derived LMP1/CTAR1-induced NF-kappaB activation. *FEBS Lett* **584**: 865-872
- Ikeda O, Sekine Y, Mizushima A, Oritani K, Yasui T, Fujimuro M, Muromoto R, Nanbo A, Matsuda T (2009) BS69 negatively regulates the canonical NF-kappaB activation induced by Epstein-Barr virus-derived LMP1. *FEBS Lett* **583**: 1567-1574
- Ishida T, Mizushima S, Azuma S, Kobayashi N, Tojo T, Suzuki K, Aizawa S, Watanabe T, Mosialos G, Kieff E, Yamamoto T, 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
- Ishida TK, Tojo T, Aoki T, Kobayashi N, Ohishi T, Watanabe T, Yamamoto T, Inoue J (1996) TRAF5, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor family protein, mediates CD40 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9437-9442

Iversen P, Beck B, Chen YF, Dere W, Devanarayan V, Eastwood BJ, Farmen MW, Iturria SJ, Iversen PW, Montrose C, Moore RA, Weidner JR (2012) HTS Assay Validation. *Assay Guidance Manual online*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK83783/>

Iversen PW, Eastwood BJ, Sittampalam GS, Cox KL (2006) A comparison of assay performance measures in screening assays: signal window, Z' factor, and assay variability ratio. *J Biomol Screen* **11**: 247-252

Izumi KM, Cahir McFarland ED, Ting AT, Riley EA, Seed B, Kieff ED (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 KM, Kaye KM, Kieff ED (1997) The Epstein-Barr virus LMP1 amino acid sequence that engages tumor necrosis factor receptor associated factors is critical for primary B lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 1447-1452

Izumi KM, Kieff ED (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

Jerabek-Willemsen M, Wienken CJ, Braun D, Baaske P, Duhr S (2011) Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay Drug Dev Technol* **9**: 342-353

Ji X, Zhang P, Armstrong RN, Gilliland GL (1992) The three-dimensional structure of a glutathione S-transferase from the mu gene class. Structural analysis of the binary complex of isoenzyme 3-3 and glutathione at 2.2-A resolution. *Biochemistry* **31**: 10169-10184

Jin BS, Lee WK, Ahn K, Lee MK, Yu YG (2005) High-throughput screening method of inhibitors that block the interaction between 2 helical regions of HIV-1 gp41. *J Biomol Screen* **10**: 13-19

Kamdar KY, Rooney CM, Heslop HE (2011) Post-transplant lymphoproliferative disease following liver transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* **16**: 274-280

Kao SC, Hovey E, Marx G (2011) Second-line therapy for castrate-resistant prostate cancer: a literature review. *Asia Pac J Clin Oncol* **7**: 212-223

Karin M (2006) Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* **441**: 431-436

Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* **18**: 621-663

Kavathas P, Bach FH, DeMars R (1980) Gamma ray-induced loss of expression of HLA and glyoxalase I alleles in lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 4251-4255

Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**: 373-384

Kaye KM, Devergne O, Harada JN, Izumi KM, Yalamanchili R, Kieff E, 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 KM, Izumi KM, 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
- Kempkes B, Spitkovsky D, Jansen-Durr P, Ellwart JW, Kremmer E, Delecluse HJ, Rottenberger C, Bornkamm GW, Hammerschmidt W (1995) B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. *EMBO J* **14**: 88-96
- Kieff E, Rickinson AB (2007) Epstein-Barr Virus and Its Replication. in: *Fields Virology 5th ed*; (eds Knippe, DM & Howley, PM); Lippincott Williams & Wilkins **2**: 2603-2654
- Kieser A (2007) Signal transduction by the Epstein-Barr virus oncogene latent membrane protein 1 (LMP1). *Signal Transduction* **7**: 20-33
- Kieser A (2008) Pursuing different 'TRADDes': TRADD signaling induced by TNF-receptor 1 and the Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1. *Biol Chem* **389**: 1261-1271
- Kieser A, Kaiser C, 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, 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, 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
- Kim JW, Lee HJ, Yi HG, Kim BS, Bang SM, Kim JS, Kim I, Yoon SS, Lee JS, Kim CS, Park S, Kim BK (2012) Mitoxantrone, etoposide, cytarabine, and melphalan (NEAM) followed by autologous stem cell transplantation for patients with chemosensitive aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Am J Hematol* **87**: 479-483
- Kong D, Yamori T (2008) Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors: promising drug candidates for cancer therapy. *Cancer Sci* **99**: 1734-1740
- Kulwichit W, Edwards RH, Davenport EM, Baskar JF, Godfrey V, 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
- Kutz H, Reisbach G, Schultheiss U, Kieser A (2008) The c-Jun N-terminal kinase pathway is critical for cell transformation by the latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *Virology* **371**: 246-256
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lee HH, Dempsey PW, Parks TP, Zhu X, Baltimore D, Cheng G (1999) Specificities of CD40 signaling: involvement of TRAF2 in CD40-induced NF-kappaB activation and intercellular adhesion molecule-1 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1421-1426
- Lee TS, Das A, Khosla C (2007) Structure-activity relationships of semisynthetic mumbaistatin analogs. *Bioorg Med Chem* **15**: 5207-5218

Lenoir GM, Vuillaume M, Bonnardel C (1985) The use of lymphomatous and lymphoblastoid cell lines in the study of Burkitt's lymphoma. *IARC Sci Publ* **60**: 309-318

Leo E, Welsh K, Matsuzawa S, Zapata JM, Kitada S, Mitchell RS, Ely KR, Reed JC (1999) Differential requirements for tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins in CD40-mediated induction of NF-kappaB and Jun N-terminal kinase activation. *J Biol Chem* **274**: 22414-22422

Li J, Tan S, Chen X, Zhang CY, Zhang Y (2011) Peptide aptamers with biological and therapeutic applications. *Curr Med Chem* **18**: 4215-4222

Liao G, Zhang M, Harhaj EW, Sun SC (2004) Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J Biol Chem* **279**: 26243-26250

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **46**: 3-26

Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, 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 JM, Paige CJ, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Goeddel DV, Mak TW (1999) TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* **13**: 1015-1024

Lu ZX, Ma XQ, Yang LF, Wang ZL, Zeng L, Li ZJ, Li XN, Tang M, Yi W, Gong JP, Sun LQ, Cao Y (2008) DNazymes targeted to EBV-encoded latent membrane protein-1 induce apoptosis and enhance radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett* **265**: 226-238

Luftig M, Prinarakis E, Yasui T, Tschritzis T, Cahir-McFarland E, Inoue J, Nakano H, Mak TW, Yeh WC, Li X, Akira S, Suzuki N, Suzuki S, Mosialos G, 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 MS, Jacobson N, Cahir-McFarland E, Seed B, 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

Mainou BA, Everly DN, Jr., Raab-Traub N (2005) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 CTAR1 mediates rodent and human fibroblast transformation through activation of PI3K. *Oncogene* **24**: 6917-6924

Mayer M, Meyer B (2001) Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J Am Chem Soc* **123**: 6108-6117

McWhirter SM, Pullen SS, Holton JM, Crute JJ, Kehry MR, Alber T (1999) Crystallographic analysis of CD40 recognition and signaling by human TRAF2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8408-8413

Mei YP, Zhou JM, Wang Y, Huang H, Deng R, Feng GK, Zeng YX, Zhu XF (2007) Silencing of LMP1 induces cell cycle arrest and enhances chemosensitivity through inhibition of AKT signaling pathway in EBV-positive nasopharyngeal carcinoma cells. *Cell Cycle* **6**: 1379-1385



- Meng Q, Xia Y (2011) c-Jun, at the crossroad of the signaling network. *Protein Cell* **2**: 889-898
- Miao B, Skidan I, Yang J, Lugovskoy A, Reibarkh M, Long K, Brazell T, Durugkar KA, Maki J, Ramana CV, Schaffhausen B, Wagner G, Torchilin V, Yuan J, Degterev A (2010) Small molecule inhibition of phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) binding to pleckstrin homology domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 20126-20131
- Michallet MC, Meylan E, Ermolaeva MA, Vazquez J, Rebsamen M, Curran J, Poeck H, Bscheider M, Hartmann G, Konig M, Kalinke U, Pasparakis M, Tschopp J (2008) TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway. *Immunity* **28**: 651-661
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* **56**: 185-229
- Mitchell T, Sugden B (1995) Stimulation of NF-kappa B-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus. *J Virol* **69**: 2968-2976
- Miyake A, Dewan MZ, Ishida T, Watanabe M, Honda M, Sata T, Yamamoto N, Umezawa K, Watanabe T, Horie R (2008) Induction of apoptosis in Epstein-Barr virus-infected B-lymphocytes by the NF-kappaB inhibitor DHMEQ. *Microbes Infect* **10**: 748-756
- Moriguchi I, Hirono S, Nakagome I, Hirano H (1994) Comparison of Reliability of log P Values for Drugs Calculated by Several Methods. *Chem Pharm Bull* **42**: 976-978
- Mosialos G, Birkenbach M, Yalamanchili R, VanArsdale T, Ware C, Kieff E (1995) The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* **80**: 389-399
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55-63
- Mullard A (2012) Protein-protein interaction inhibitors get into the groove. *Nat Rev Drug Discov* **11**: 173-175
- Ni CZ, Welsh K, Leo E, Chiou CK, Wu H, Reed JC, Ely KR (2000) Molecular basis for CD40 signaling mediated by TRAF3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10395-10399
- Niedobitek G (1999) The Epstein-Barr virus: a group 1 carcinogen? *Virchows Arch* **435**: 79-86
- Niedobitek G, Meru N, Delecluse HJ (2001) Epstein-Barr virus infection and human malignancies. *Int J Exp Pathol* **82**: 149-170
- Ning S, Campos AD, Darnay BG, Bentz GL, Pagano JS (2008) TRAF6 and the three C-terminal lysine sites on IRF7 are required for its ubiquitination-mediated activation by the tumor necrosis factor receptor family member latent membrane protein 1. *Mol Cell Biol* **28**: 6536-6546
- Ning S, Pagano JS, Barber GN (2011) IRF7: activation, regulation, modification and function. *Genes Immun* **12**: 399-414
- Okano M (1998) Epstein-Barr virus infection and its role in the expanding spectrum of human diseases. *Acta Paediatr* **87**: 11-18

- Pajic A, Spitkovsky D, Christoph B, Kempkes B, Schuhmacher M, Staeger MS, Brielmeier M, Ellwart J, Kohlhuber F, Bornkamm GW, Polack A, Eick D (2000) Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line. *Int J Cancer* **87**: 787-793
- Park YC, Burkitt V, Villa AR, Tong L, Wu H (1999) Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2. *Nature* **398**: 533-538
- Park YC, Ye H, Hsia C, Segal D, Rich RL, Liou HC, Myszka DG, Wu H (2000) A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD-TRAF2 interaction. *Cell* **101**: 777-787
- Parker C, Waters R, Leighton C, Hancock J, Sutton R, Moorman AV, Ancliff P, Morgan M, Masurekar A, Goulden N, Green N, Revesz T, Darbyshire P, Love S, Saha V (2010) Effect of mitoxantrone on outcome of children with first relapse of acute lymphoblastic leukaemia (ALL R3): an open-label randomised trial. *Lancet* **376**: 2009-2017
- Parker MW, Lo Bello M, Federici G (1990) Crystallization of glutathione S-transferase from human placenta. *J Mol Biol* **213**: 221-222
- Perkins AS, Friedberg JW (2008) Burkitt lymphoma in adults. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 341-348
- Piche A, Kasono K, Johanning F, Curiel TJ, Curiel DT (1998) Phenotypic knock-out of the latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus by an intracellular single-chain antibody. *Gene Ther* **5**: 1171-1179
- Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Collins T, Gerritsen ME (1997) Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem* **272**: 21096-21103
- Pullen SS, Labadia ME, Ingraham RH, McWhirter SM, Everdeen DS, Alber T, Crute JJ, Kehry MR (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 SS, Miller HG, Everdeen DS, Dang TT, Crute JJ, Kehry MR (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
- Rastelli J, Homig-Holzel C, Seagal J, Muller W, Hermann AC, Rajewsky K, Zimmer-Strobl U (2008) LMP1 signaling can replace CD40 signaling in B cells in vivo and has unique features of inducing class-switch recombination to IgG1. *Blood* **111**: 1448-1455
- Razani B, Reichardt AD, Cheng G (2011) Non-canonical NF-kappaB signaling activation and regulation: principles and perspectives. *Immunol Rev* **244**: 44-54
- Reindl W, Yuan J, Kramer A, Strebhardt K, Berg T (2008) Inhibition of polo-like kinase 1 by blocking polo-box domain-dependent protein-protein interactions. *Chem Biol* **15**: 459-466
- Rickinson AB, Kieff E (2007) Epstein-Barr Virus. in: *Fields Virology 5th ed; (eds Knippe, DM & Howley, PM); Lippincott Williams & Wilkins* **2**: 2655-2700

- Roehrl MH, Wang JY, Wagner G (2004) Discovery of small-molecule inhibitors of the NFAT--calcineurin interaction by competitive high-throughput fluorescence polarization screening. *Biochemistry* **43**: 16067-16075
- Roizmann B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ (1992) The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* **123**: 425-449
- Rosenberg AH, Lade BN, Chui DS, Lin SW, Dunn JJ, Studier FW (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* **56**: 125-135
- Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV (1995) The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* **83**: 1243-1252
- Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV (1995) TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* **269**: 1424-1427
- Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV (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
- Rowe M, Peng-Pilon M, Huen DS, Hardy R, Croom-Carter D, Lundgren E, Rickinson AB (1994) Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF-kappa B activation and to induction of cell surface markers. *J Virol* **68**: 5602-5612
- Rowe M, Rowe DT, Gregory CD, Young LS, Farrell PJ, Rupani H, Rickinson AB (1987) Differences in B cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J* **6**: 2743-2751
- Rowe M, Young LS, Crocker J, Stokes H, Henderson S, Rickinson AB (1991) Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferative disease in the SCID mouse model: implications for the pathogenesis of EBV-positive lymphomas in man. *J Exp Med* **173**: 147-158
- Saito N, Courtois G, Chiba A, Yamamoto N, Nitta T, Hironaka N, Rowe M, Yamamoto N, 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
- Sandberg M, Hammerschmidt W, Sugden B (1997) Characterization of LMP-1's association with TRAF1, TRAF2, and TRAF3. *J Virol* **71**: 4649-4656
- Sandu C, Gavathiotis E, Huang T, Wegorzewska I, Werner MH (2005) A mechanism for death receptor discrimination by death adaptors. *J Biol Chem* **280**: 31974-31980
- Sanjo H, Zajonc DM, Braden R, Norris PS, Ware CF (2010) Allosteric regulation of the ubiquitin:NIK and ubiquitin:TRAF3 E3 ligases by the lymphotoxin-beta receptor. *J Biol Chem* **285**: 17148-17155
- Schall TJ, Lewis M, Koller KJ, Lee A, Rice GC, Wong GH, Gatanaga T, Granger GA, Lentz R, Raab H, et al. (1990) Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* **61**: 361-370

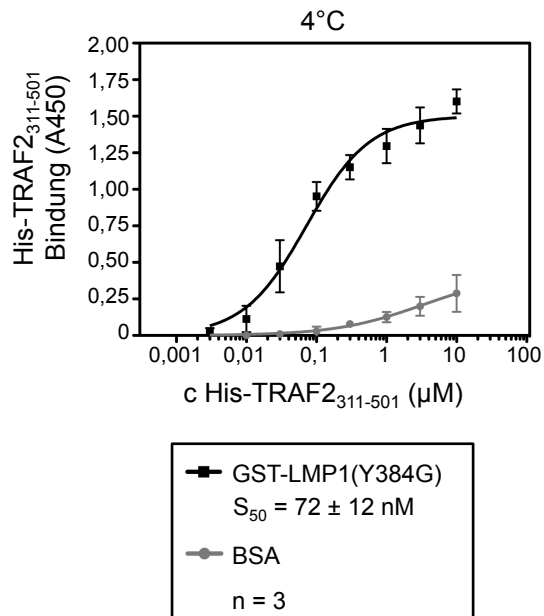
- Schneider F, Neugebauer J, Griese J, Liefold N, Kutz H, Briseno C, Kieser A (2008) The viral oncoprotein LMP1 exploits TRADD for signaling by masking its apoptotic activity. *PLoS Biol* **6**: e8
- Schuhmacher M, Staeger MS, Pajic A, Polack A, Weidle UH, Bornkamm GW, Eick D, Kohlhuber F (1999) Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr Biol* **9**: 1255-1258
- Schultheiss U, Puschner S, Kremmer E, Mak TW, Engelmann H, Hammerschmidt W, Kieser A (2001) TRAF6 is a critical mediator of signal transduction by the viral oncogene latent membrane protein 1. *EMBO J* **20**: 5678-5691
- Seigneuric R, Gobbo J, Colas P, Garrido C (2011) Targeting cancer with peptide aptamers. *Oncotarget* **2**: 557-561
- Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krahn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M (2001) Activation by IKK $\alpha$  of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* **293**: 1495-1499
- Shkoda A, Town JA, Griese J, Romio M, Sarioglu H, Knofel T, Giehler F, Kieser A (2012) The Germinal Center Kinase TNIK Is Required for Canonical NF-kappaB and JNK Signaling in B-Cells by the EBV Oncoprotein LMP1 and the CD40 Receptor. *PLoS Biol* **10**: e1001376
- Sittampalam GS, Iversen PW, Boadt JA, Kahl SD, Bright S, Zock JM, Janzen WP, Lister MD (1997) Design of Signal Windows in High Throughput Screening Assays for Drug Discovery. *J Biomol Screen* **2**: 159-169
- Solan NJ, Miyoshi H, Carmona EM, Bren GD, Paya CV (2002) RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J Biol Chem* **277**: 1405-1418
- Song HY, Regnier CH, Kirschning CJ, Goeddel DV, Rothe M (1997) Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-kappaB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 9792-9796
- Song Y-J, M.-S. K (2010) Roles of TRAF2 and TRAF3 in Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-induced alternative NF-kB activation. *Virus Genes* **41**: 174-180
- Song YJ, Izumi KM, Shinnars NP, Gewurz BE, Kieff E (2008) IRF7 activation by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 requires localization at activation sites and TRAF6, but not TRAF2 or TRAF3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 18448-18453
- Soni V, Cahir-McFarland E, Kieff E (2007) LMP1 TRAFficking activates growth and survival pathways. *Adv Exp Med Biol* **597**: 173-187
- Spano JP, Busson P, Atlan D, Bourhis J, Pignon JP, Esteban C, Armand JP (2003) Nasopharyngeal carcinomas: an update. *Eur J Cancer* **39**: 2121-2135
- Stebbins JL, De SK, Machleidt T, Becattini B, Vazquez J, Kuntzen C, Chen LH, Cellitti JF, Riel-Mehan M, Emdadi A, Solinas G, Karin M, Pellecchia M (2008) Identification of a new JNK inhibitor targeting the JNK-JIP interaction site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 16809-16813
- Stratagene (Instruction Manual) BL21-CodonPlus Competent Cells - Instruction Manual. *Stratagene Catalog* **230280**

- Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130
- Stunz LL, Busch LK, Munroe ME, Sigmund CD, Tygrett LT, Waldschmidt TJ, Bishop GA (2004) Expression of the cytoplasmic tail of LMP1 in mice induces hyperactivation of B lymphocytes and disordered lymphoid architecture. *Immunity* **21**: 255-266
- Sui Y, Wu Z (2007) Alternative statistical parameter for high-throughput screening assay quality assessment. *J Biomol Screen* **12**: 229-234
- Sun L, Chen ZJ (2004) The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 119-126
- Swinnen LJ, Mullen GM, Carr TJ, Costanzo MR, Fisher RI (1995) Aggressive treatment for postcardiac transplant lymphoproliferation. *Blood* **86**: 3333-3340
- Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K (2000) TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* **5**: 649-658
- Tang Y, Lee TS, Khosla C (2004) Engineered biosynthesis of regioselectively modified aromatic polyketides using bimodular polyketide synthases. *PLoS Biol* **2**: E31
- Taylor PB, Stewart FP, Dunnington DJ, Quinn ST, Schulz CK, Vaidya KS, Kurali E, Lane TR, Xiong WC, Sherrill TP, Snider JS, Terpstra ND, Hertzberg RP (2000) Automated assay optimization with integrated statistics and smart robotics. *J Biomol Screen* **5**: 213-226
- Tetko IV (2005) Computing chemistry on the web. *Drug Discov Today* **10**: 1497-1500
- Tetko IV, Gasteiger J, Todeschini R, Mauri A, Livingstone D, Ertl P, Palyulin VA, Radchenko EV, Zefirov NS, Makarenko AS, Tanchuk VY, Prokopenko VV (2005) Virtual computational chemistry laboratory--design and description. *J Comput Aided Mol Des* **19**: 453-463
- Tsao DH, Hum WT, Hsu S, Malakian K, Lin LL (2007) The NMR structure of the TRADD death domain, a key protein in the TNF signaling pathway. *J Biomol NMR* **39**: 337-342
- Tsao DH, McDonagh T, Telliez JB, Hsu S, Malakian K, Xu GY, Lin LL (2000) Solution structure of N-TRADD and characterization of the interaction of N-TRADD and C-TRAF2, a key step in the TNFR1 signaling pathway. *Mol Cell* **5**: 1051-1057
- Uchida J, Yasui T, Takaoka-Shichijo Y, Muraoka M, Kulwichit W, Raab-Traub N, Kikutani H (1999) Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* **286**: 300-303
- Vallabhapurapu S, Karin M (2009) Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* **27**: 693-733
- Vallabhapurapu S, Matsuzawa A, Zhang W, Tseng PH, Keats JJ, Wang H, Vignali DA, Bergsagel PL, Karin M (2008) Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol* **9**: 1364-1370
- Wan J, Sun L, Mendoza JW, Chui YL, Huang DP, Chen ZJ, Suzuki N, Suzuki S, Yeh WC, Akira S, Matsumoto K, Liu ZG, 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 KW, Chui YL, Cui Y, Tao Q, Yamamoto M, Akira S, 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 GR, Inoue J, Chen ZJ (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**: 346-351
- Wang D, Liebowitz D, Kieff E (1985) An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* **43**: 831-840
- Watanabe M, Nakashima M, Togano T, Higashihara M, Watanabe T, Umezawa K, Horie R (2008) Identification of the RelA domain responsible for action of a new NF-kappaB inhibitor DHMEQ. *Biochem Biophys Res Commun* **376**: 310-314
- Wells JA, McClendon CL (2007) Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature* **450**: 1001-1009
- Werneburg BG, Zoog SJ, Dang TT, Kehry MR, Crute JJ (2001) Molecular characterization of CD40 signaling intermediates. *J Biol Chem* **276**: 43334-43342
- West AP, Shadel GS, Ghosh S (2011) Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol* **11**: 389-402
- Wong JH, Lui VW, Umezawa K, Ho Y, Wong EY, Ng MH, Cheng SH, Tsang CM, Tsao SW, Chan AT (2010) A small molecule inhibitor of NF-kappaB, dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), suppresses growth and invasion of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells. *Cancer Lett* **287**: 23-32
- Wu L, Nakano H, 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
- Wu S, Xie P, Welsh K, Li C, Ni CZ, Zhu X, Reed JC, Satterthwait AC, Bishop GA, Ely KR (2005) LMP1 protein from the Epstein-Barr virus is a structural CD40 decoy in B lymphocytes for binding to TRAF3. *J Biol Chem* **280**: 33620-33626
- Xiao G, Fong A, Sun SC (2004) Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking I kappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* **279**: 30099-30105
- Xiao G, Harhaj EW, Sun SC (2001) NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* **7**: 401-409
- Xie P, Bishop GA (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 BS, Bishop GA (2004) Requirement for TRAF3 in signaling by LMP1 but not CD40 in B lymphocytes. *J Exp Med* **199**: 661-671
- Xu LG, Li LY, Shu HB (2004) TRAF7 potentiates MEKK3-induced AP1 and CHOP activation and induces apoptosis. *J Biol Chem* **279**: 17278-17282

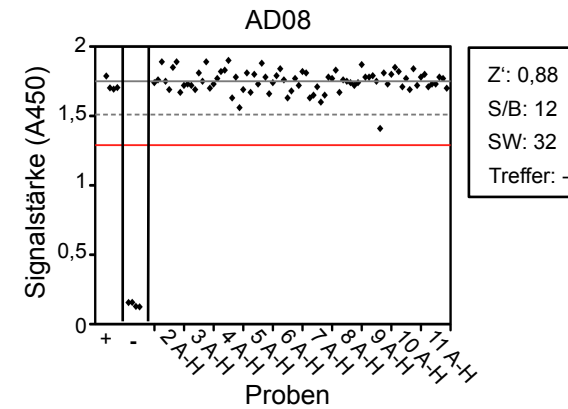
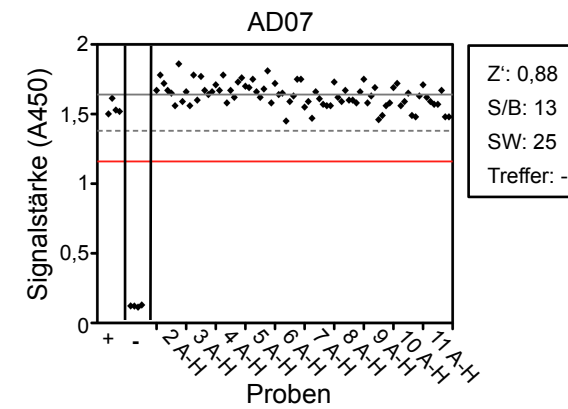
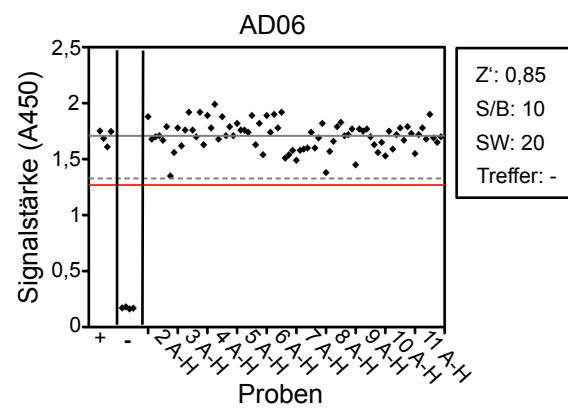
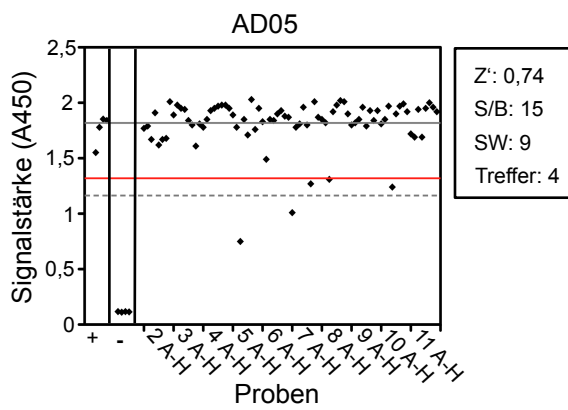
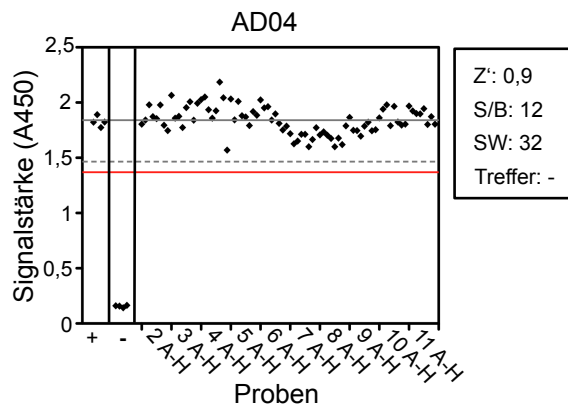
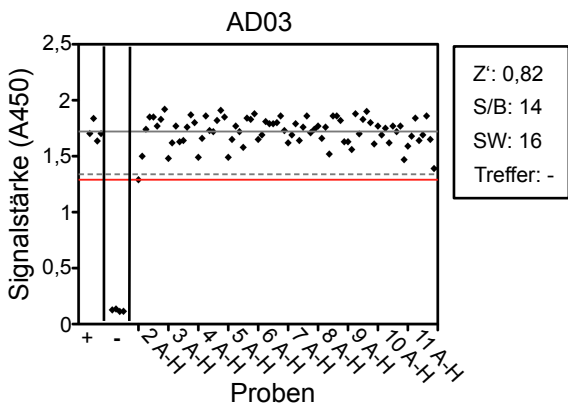
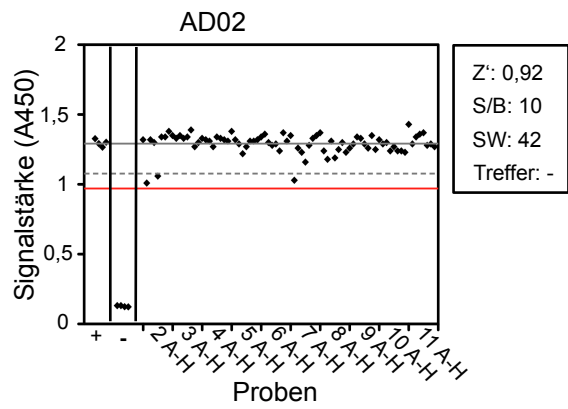
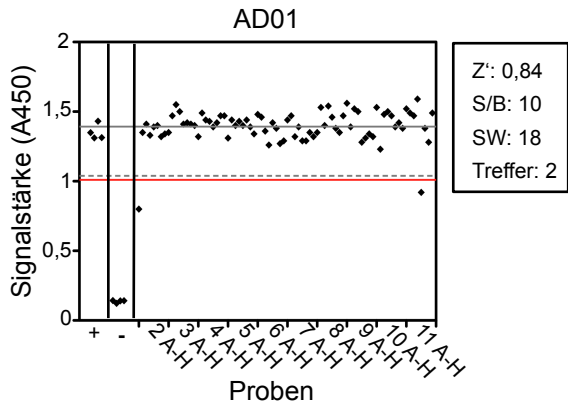
- Ye H, Arron JR, Lamothe B, Cirilli M, Kobayashi T, Shevde NK, Segal D, Dzivenu OK, Vologodskaja M, Yim M, Du K, Singh S, Pike JW, Darnay BG, Choi Y, Wu H (2002) Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* **418**: 443-447
- Ye H, Park YC, Kreishman M, Kieff E, Wu H (1999) The structural basis for the recognition of diverse receptor sequences by TRAF2. *Mol Cell* **4**: 321-330
- Ye H, Wu H (2000) Thermodynamic characterization of the interaction between TRAF2 and tumor necrosis factor receptor peptides by isothermal titration calorimetry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8961-8966
- Yin Q, Lin SC, Lamothe B, Lu M, Lo YC, Hura G, Zheng L, Rich RL, Campos AD, Myszka DG, Lenardo MJ, Darnay BG, Wu H (2009) E2 interaction and dimerization in the crystal structure of TRAF6. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 658-666
- Young LS, Rickinson AB (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* **4**: 757-768
- Zarnegar BJ, Wang Y, Mahoney DJ, Dempsey PW, Cheung HH, He J, Shiba T, Yang X, Yeh WC, Mak TW, Korneluk RG, Cheng G (2008) Noncanonical NF- $\kappa$ B activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol* **9**: 1371-1378
- Zhang B, Kracker S, Yasuda T, Casola S, Vanneman M, Homig-Holzel C, Wang Z, Derudder E, Li S, Chakraborty T, Cotter SE, Koyama S, Currie T, Freeman GJ, Kutok JL, Rodig SJ, Dranoff G, Rajewsky K (2012) Immune surveillance and therapy of lymphomas driven by Epstein-Barr virus protein LMP1 in a mouse model. *Cell* **148**: 739-751
- Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* **4**: 67-73
- Zhang L, Pagano JS (1997) IRF-7, a new interferon regulatory factor associated with Epstein-Barr virus latency. *Mol Cell Biol* **17**: 5748-5757
- Zhang L, Pagano JS (2000) Interferon regulatory factor 7 is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *J Virol* **74**: 1061-1068
- Zhang L, Pagano JS (2001) Interferon regulatory factor 7 mediates activation of Tap-2 by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *J Virol* **75**: 341-350
- Zhang L, Wu L, Hong K, Pagano JS (2001) Intracellular signaling molecules activated by Epstein-Barr virus for induction of interferon regulatory factor 7. *J Virol* **75**: 12393-12401
- Zhang L, Zhang J, Lambert Q, Der CJ, Del Valle L, Miklossy J, Khalili K, Zhou Y, Pagano JS (2004) Interferon regulatory factor 7 is associated with Epstein-Barr virus-transformed central nervous system lymphoma and has oncogenic properties. *J Virol* **78**: 12987-12995
- Zimber-Strobl U, Kempkes B, Marschall G, Zeidler R, Van Kooten C, Banchereau J, Bornkamm GW, Hammerschmidt W (1996) Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) is not sufficient to maintain proliferation of B cells but both it and activated CD40 can prolong their survival. *EMBO J* **15**: 7070-7078
- Zotti T, Vito P, Stilo R (2012) The seventh ring: exploring TRAF7 functions. *J Cell Physiol* **227**: 1280-1284

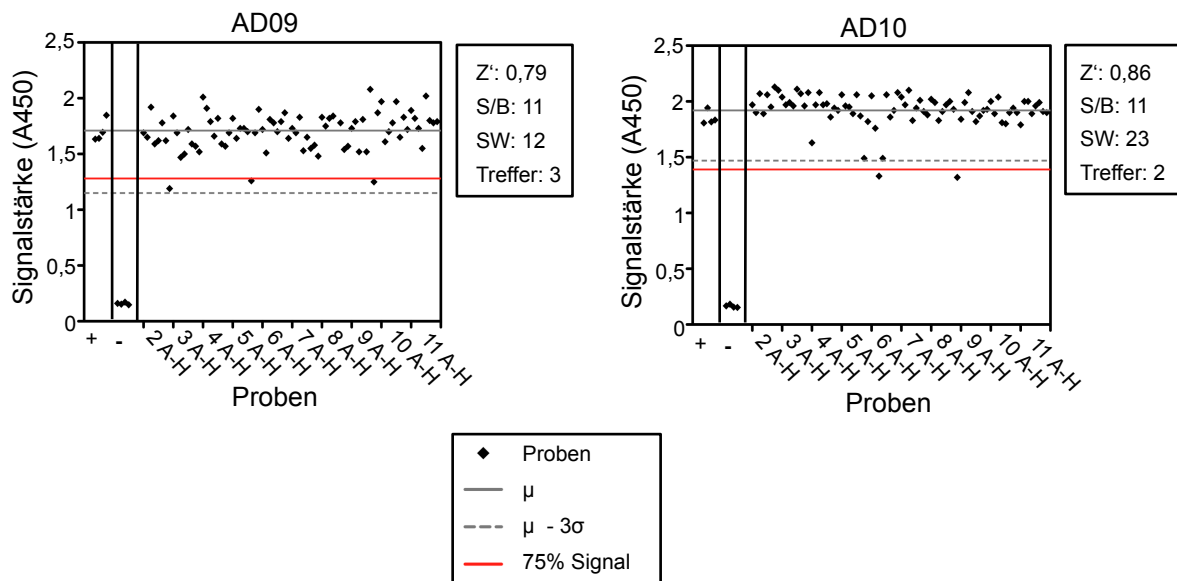
## 9. Anhang



**Anhang 1: Bestimmung der halbmaximalen Sättigung der Interaktion von His-TRAF2<sub>311-501</sub> mit GST-LMP1(Y384G) in ELISA-basierten Experimenten bei 4 °C.** GST-LMP1(Y384G) und BSA wurden auf der Oberfläche von ELISA-Platten immobilisiert und mit Konzentrationsreihen von His-TRAF2<sub>311-501</sub> inkubiert. Die S<sub>50</sub> der gebildeten Komplexe wurden mit Hilfe des Programms Prism 5 berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. [RT - Raumtemperatur, S<sub>50</sub> - halbmaximale Sättigung der Bindung]







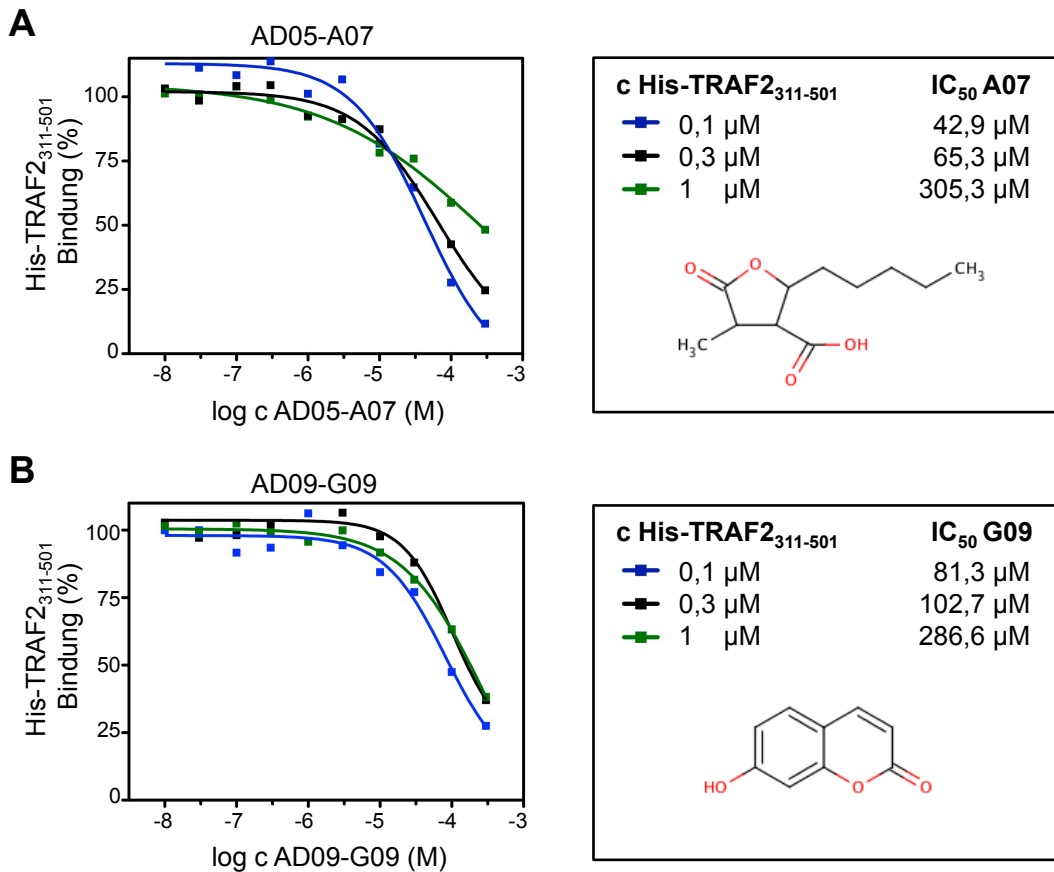
### Anhang 2: Ergebnisse des Screens der AnalytiCon Discovery Bibliothek.

[AD - AnalytiCon Discovery, Z' - Z-Faktor, S/B - Signal zu Hintergrund, SW - Signalfenster,  $\mu$  - Mittelwert der Ergebnisse einer Platte]

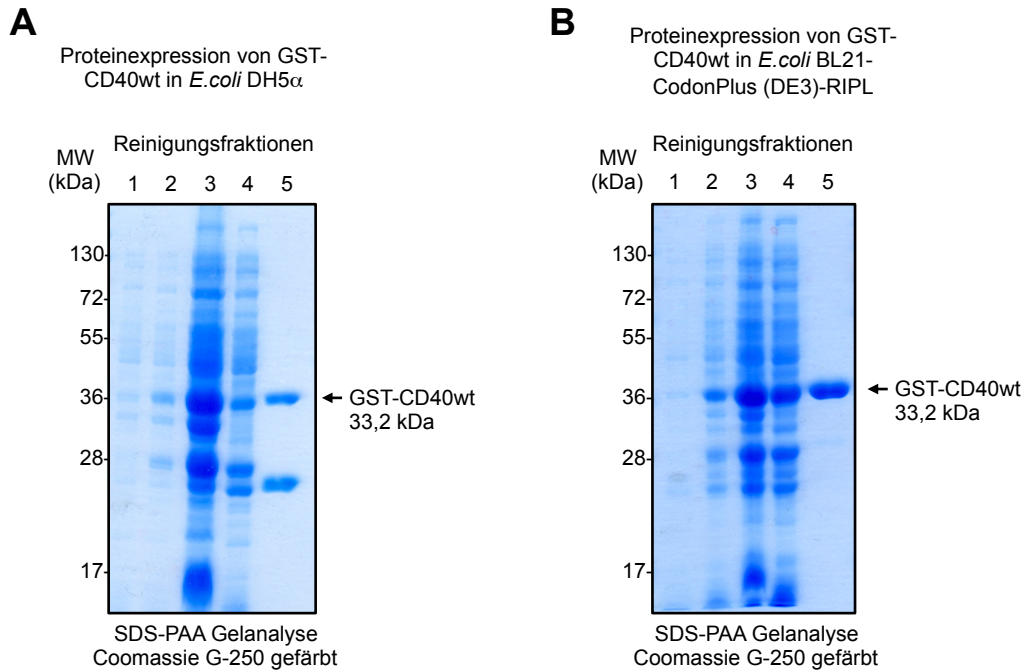
#### Analyse des Screens der AD-Bibliothek

Platte	Z'-Faktor	Z-Faktor	AVR	S/B	SW	Treffer
AD01	0,84	0,7	0,16	10	18	2
AD02	0,92	0,8	0,08	10	42	-
AD03	0,82	0,74	0,18	14	16	-
AD04	0,9	0,76	0,1	12	32	-
AD05	0,74	0,61	0,26	15	9	4
AD06	0,85	0,74	0,15	10	20	-
AD07	0,88	0,81	0,12	13	25	-
AD08	0,88	0,82	0,12	12	32	-
AD09	0,79	0,62	0,21	11	12	3
AD10	0,86	0,72	0,14	11	23	2

**Anhang 3: Z-Faktoren, Z'-Faktoren, AVR, S/B, SW und die Anzahl der Treffer pro Platte.** [AD - AnalytiCon Discovery, AVR - assay variability ratio, S/B - Signal zu Hintergrund, SW - Signalfenster]



**Anhang 4: Inhibitionskurven der Substanzen AD05-A07 und AD09-G09.** Die zwei Substanzen AD05-A07 (**A**), AD09-G09 (**B**) inhibierten die Interaktion von LMP1 und TRAF2 mit IC<sub>50</sub>-Konzentrationen im mittleren bis hohen μM-Bereich. Die IC<sub>50</sub> wurden mit dem Modell „log(Inhibitor) vs. response – Variable slope (four parameters)“ des Programms Prism 5 berechnet.



GST-CD40wt Reinigungsschritte:

- 1 nicht induzierte *E. coli* Zellen, in Laemmli Puffer lysiert
- 2 IPTG induzierte *E. coli* Zellen, in Laemmli Puffer lysiert
- 3 Unlösliche Zellfragmente und Proteine
- 4 Lysat (gelöste Proteine nach der Trennung von Zellfragmenten und unlöslichen Proteinen)
- 5 Eluat: GST-CD40wt

**Anhang 5: Vergleich der Proteinexpression des GST-CD40 wt Fusionsproteins in verschiedenen *E. coli*-Bakterienstämmen.** **A** Proteinexpression von GST-CD40 wt in *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen. Neben dem GST-CD40 wt enthält die Elutionsfraktion einen großen Anteil eines weiteren Proteins (oder Abbauproduktes von GST-CD40 wt), dass bei ~26 kDa migriert. **B** Proteinexpression von GST-CD40 wt in *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL-Zellen. Die Elutionsfraktion der von GST-CD40 wt in BL21 CodonPlus (DE3)-RIPL-Zellen enthält nur die prominente Bande des GST-CD40-Fusionsproteins.



