

Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt

**Molekulare Funktionen der Komponenten des
IKK2/TAK1/TNIK-Komplexes im Signalweg des LMP1-
Onkoproteins des Epstein-Barr-Virus und weiteren
onkogenen Signalwegen**

Stefanie Voigt

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Kay H. Schneitz

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Arnd Kieser
2. Prof. Dr. Dirk Haller

Die Dissertation wurde am 13.06.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 16.10.2019 angenommen.

HelmholtzZentrum münchen

Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

Die Forschungsarbeit für die vorliegende Dissertation wurde am Helmholtz Zentrum München in der Abteilung Genvektoren, Arbeitsgruppe Signaltransduktion betreut durch Prof. Dr. Arnd Kieser durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Zusammenfassung	XII
Summary	XIV
1 Einleitung	1
1.1 Das Epstein-Barr-Virus	1
1.1.1 LMP1 als primäres Onkoprotein von EBV	2
1.1.2 Durch LMP1 induzierte Signalwege	4
1.1.2.1 Der von LMP1 abhängige, kanonische NF- κ B-Signalweg	6
1.1.2.2 Der durch LMP1 induzierte JNK-Signalweg	8
1.1.2.3 Die Rolle von IKK2 in der Signaltransduktion	10
1.1.3 Die Aufspaltung des kanonischen NF- κ B- und JNK-Signalweges in der LMP1-Signaltransduktion	11
1.2 Die Keimzentrumskinase TNIK	13
1.2.1 Überblick über die Familie der Keimzentrumskinasen	13
1.2.2 Struktur und Funktion von TNIK	14
1.2.3 Die Rolle von TNIK in der Karzinogenese	16
1.3 Das Signalmolekül TRAF6	19
1.3.1 Die Familie der TRAF-Proteine	19
1.3.2 Die Rolle von TRAF6 bei der Aktivierung von NF- κ B und JNK im LMP1-Signalweg	20
1.3.3 Sekundäre Modifikationen von TRAF6	21
1.4 Die Serin/Threonin-Kinase TPL2	23
1.4.1 Struktur und Funktion von TPL2	23
1.4.2 Die Rolle von TPL2 in der Signaltransduktion	26
1.5 Der TGF β -Signalweg	28
1.5.1 Die TGF β -induzierte Signalkaskade	28
1.5.2 Durch TGF β induzierte EMT in der Karzinogenese von Brustkrebs	30
1.6 Fragestellung	33
2 Material	35
2.1 Chemikalien, Reagenzien, Apparative Ausstattung	35
2.1.1 Inhibitoren	35
2.1.2 Liganden	35
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Medien	35
2.1.4 Apparative Ausstattung	37
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	37

Inhaltsverzeichnis

2.2 Antikörper	38
2.2.1 Primäre Antikörper	38
2.2.2 Sekundäre Antikörper	39
2.2.3 Quervernetzungsantikörper	39
2.3 Plasmide	39
2.4 siRNA Oligonukleotide	43
2.5 Eukaryotische Zelllinien	43
2.6 Prokaryotische Zelllinien	45
2.7 Primer	45
2.7.1 Primer für PCR von CRISPR/Cas9-Knockout-Klonen und Sequenzierung	45
2.7.2 Primer für qPCR	46
2.8 Kommerziell erhältliche Kits	46
2.9 Software	47
3 Methoden	48
3.1 Methoden der Zellbiologie	48
3.1.1 Zellkultur	48
3.1.2 Kryo-Konservierung von Zellen	49
3.1.3 Transiente Transfektion	49
3.1.4 Transfektion von embryonalen Mausfibroblasten mit siRNA	50
3.1.5 Herstellung lentiviraler infektiöser Partikel	50
3.1.6 Lentivirale Transduktion von humanen Zelllinien	50
3.1.7 Durchflusszytometrische Analyse	51
3.1.8 Generierung von Knockout-Klonen mittels CRISPR/Cas9-Technologie	51
3.1.8.1 Generierung von Knockout-Klonen mittels Zellsortierung am Durchflusszytometer	51
3.1.8.2 Generierung von Knockout-Klonen durch Puromycin-Selektion	52
3.1.9 Stimulation von Zellen	52
3.1.9.1 Aktivierung von NGFR-LMP1 durch Quervernetzung mit Antikörpern	52
3.1.9.2 CD40L-Stimulation von B-Zellen	53
3.1.9.3 TGF β -Stimulation von Brustkrebszelllinien	53
3.1.10 Bestimmung der Proliferationsrate durch Messung des MTT-Umsatzes	53
3.1.11 Bestimmung der Apoptoserate	54
3.1.12 Soft-Agar-Experiment	54
3.1.13 Zellmigrationsassay (Wundheilungs-Experiment)	55
3.2 Proteinbiochemische Methoden	55
3.2.1 Herstellung von Zelllysaten	55
3.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mit Bradford	56
3.2.3 SDS-PAGE	56
3.2.4 Immunoblot-Analysen	58
3.2.5 Kovalente Koppelung von Antikörpern an Protein G-Sepharose	59
3.2.6 Immunpräzipitation	60
3.2.7 Subzelluläre Fraktionierung und Kerntranslokations-Analyse	60

Inhaltsverzeichnis

3.2.8 In vivo Ubiquitinierung	61
3.2.9 Immunkomplex Kinaseassay	61
3.3 DNA-Methoden	62
3.3.1 Polymerasekettenreaktion zur Überprüfung von Gentargetierung	62
3.3.2 Agarosegelelektrophorese und Extraktion von DNA-Fragmenten	63
3.3.3 Maxipreparation von Plasmid-DNA	63
3.3.4 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)	63
3.3.4.1 RNA-Extraktion aus Zellen	63
3.3.4.2 cDNA-Synthese	64
3.3.4.3 qRT-PCR Reaktion	64
3.4 Statistik	65
3.5 Next-generation sequencing (NGS) und Bioinformatik	66
4 Ergebnisse	67
4.1 Die Rolle von IKK2, TAK1 und TPL2 bei der Aktivierung von JNK und NF- κ B durch LMP1	67
4.1.1 Die Rolle des IKK-Komplexes bei der Aktivierung von JNK und NF- κ B durch LMP1	67
4.1.1.1 Das experimentelle System für die systematische Analyse des LMP1-Signalweges	67
4.1.1.2 IKK2 ist essenziell für die Aktivierung von NF- κ B und JNK durch LMP1	69
4.1.1.3 IKK1 und NEMO in der Aktivierung von JNK durch LMP1	70
4.1.1.4 NEMO ist in der Bildung des LMP1/IKK2/TAK1-Komplexes involviert	73
4.1.2 Die Rolle von TAK1 bei der Aktivierung der durch LMP1 induzierten Signalwege	75
4.1.2.1 Die Kinasefunktion von TAK1 ist essenziell für JNK, aber nicht für NF- κ B	76
4.1.2.2 Das TAK1-Protein wird für die Rekrutierung des IKK2/LMP1-Komplexes benötigt	80
4.1.3 Tpl2 wird im LMP1-Signalweg aktiviert und aus dem TPL2/p105-Komplex freigesetzt	81
4.1.4 TPL2 aktiviert JNK im LMP1-Signalweg	85
4.1.5 TPL2 ist nicht notwendig um NF- κ B durch LMP1 zu aktivieren	88
4.1.6 IKK2, TPL2 und TAK1 besitzen unterschiedliche Funktionen in der Aktivierung von JNK und NF- κ B durch LMP1 und CD40	91
4.1.7 Die Inhibition von TPL2 senkt die Zellproliferation und induziert Apoptose in humanen B-Zellen	95
4.1.8 LMP1-abhängige, murine Lymphomzelllinien zeigen eine erhöhte Apoptoserate nach Inhibition von TPL2	99
4.2 Molekulare Funktionen der Keimzentrumskinasen TNIK im LMP1-Signalweg	101
4.2.1 Die Interaktionspartner von TNIK und seinem Homolog MINK1 in der LMP1-Signaltransduktion	102
4.2.1.1 TNIK interagiert mit TRAF2 und TRAF6 nach Induktion durch LMP1	102

Inhaltsverzeichnis

4.2.1.2 MINK1 ist ebenfalls ein Interaktionspartner von TRAF6	103
4.2.2 TNIK und MINK1 phosphorylieren TRAF6	105
4.2.2.1 Humanes TRAF6 wird durch TNIK und MINK1 an Threonin 463 und Serin 507 phosphoryliert	105
4.2.2.2 Untersuchungen zur Rolle der durch TNIK und MINK1 induzierten Phosphorylierung von TRAF6 in der LMP1-Signaltransduktion	109
4.2.3 Der Einfluss von TNIK auf die Ubiquitinierung von TRAF6	115
4.2.4 Für die Bildung des LMP1/IKK2/TAK1-Signalkomplexes sind TNIK und MINK1 nicht essenziell	119
4.2.5 TAK1, nicht aber NEMO, kann durch TNIK phosphoryliert werden	120
4.3 Die Rolle von TNIK in der Karzinogenese	123
4.3.1 Die Expression von TNIK in verschiedenen Tumorentitäten	124
4.3.2 Herstellung von TNIK-Knockdown Zelllinien über ein short hairpin-System	126
4.3.3 Der Einfluss von TNIK auf die Proliferation und Apoptose	129
4.3.4 Der Einfluss von TNIK auf das Soft-Agar-Wachstum und die Wundheilungskapazität	131
4.3.5 Der Einfluss des Knockouts von TNIK auf MDA-MB-231 Zellen	137
4.3.6 Die Wirkung des TNIK-Inhibitors KY-05009 auf MDA-MB-231 Zellen	140
4.3.7 Die Phosphorylierung von Smad2 nach TGF β -Stimulation wird in triple-negativen Brustkrebszellen von TNIK beeinflusst	143
4.3.8 Die Genexpression in MDA-MB-231 Zellen nach Knockout von TNIK	146
4.3.8.1 RNASeq-Analyse	146
4.3.8.2 qPCR-Analyse ausgewählter Zielgene aus der RNASeq-Analyse	155
5 Diskussion	158
5.1 Die Rolle von IKK2 jenseits der Aktivierung von NF- κ B	159
5.2 TPL2 als Mediator der durch LMP1 induzierten IKK2-abhängigen Aktivierung von JNK	162
5.3 TPL2 ist für eine Aktivierung von NF- κ B im LMP1-Weg nicht essenziell	164
5.4 TPL2 als potenzieller Ansatzpunkt für Krebstherapien	166
5.5 Die Rolle der Keimzentrumskinase TNIK im LMP1-Signalkomplex	167
5.5.1 Der TNIK-Interaktionspartner TRAF6	168
5.5.2 TRAF6 als Substrat der TNIK-Kinaseaktivität	170
5.6 Die Rolle von TNIK in Brustkrebs	175
5.7 Ausblick	183
Literaturverzeichnis	185
Publikationen	206
Anhang	207
Eidesstattliche Erklärung	215
Danksagung	216

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Übersicht von LMP1.	3
Abb. 2: Der NF- κ B- und JNK-Signalweg nach Induktion durch LMP1.	5
Abb. 3: Schematische Übersicht des kanonischen NF- κ B-Signalweges.	7
Abb. 4: Überblick über die MAPK-Signalkaskade.	9
Abb. 5: Modell des TNIK-Signalkomplexes und die Aufspaltung von NF- κ B und JNK.	13
Abb. 6: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von TNIK und MINK1.	14
Abb. 7: Schematische Darstellung der Struktur des TRAF6-Proteins.	20
Abb. 8: Die Aktivierung von TPL2 in verschiedenen Signalwegen.	26
Abb. 9: Der TGF β -Signalweg.	29
Abb. 10: Schematische Darstellung des chimären NGFR-LMP1-Fusionskonstruktes.	68
Abb. 11: IKK2 ist essenziell für die Aktivierung von JNK und NF- κ B durch LMP1 in MEFs.	70
Abb. 12: LMP1 induziert JNK und NF- κ B durch IKK2, nicht aber durch IKK1.	72
Abb. 13: Der Verlust von NEMO blockiert den NF- κ B- und JNK-Signalweg nach Induktion von LMP1.	73
Abb. 14: NEMO ist für die Bildung des LMP1/IKK2/TAK1-Komplexes notwendig.	75
Abb. 15: Die Inhibition von TAK1 blockiert die Aktivierung von JNK, nicht aber die Degradation von I κ B α induziert durch LMP1.	76
Abb. 16: Das TAK1-Protein ist im LMP1-Signalweg essenziell für die Aktivierung von NF- κ B und JNK, während die Kinaseaktivität von TAK1 nur für JNK notwendig ist.	78
Abb. 17: Das TAK1-Protein ist essenziell für eine durch LMP1 induzierte NEMO-K63-Ubiquitinierung.	80
Abb. 18: Das TAK1-Protein ist für die Bildung des IKK2/LMP1-Signalkomplexes notwendig.	81
Abb. 19: LMP1 induziert die Phosphorylierung von TPL2 an Serin 400.	82
Abb. 20: Die Induktion von LMP1 führt zur Freisetzung von TPL2 aus dem p105/TPL2-Komplex.	83
Abb. 21: TPL2 wird in Abhängigkeit von IKK2 in den Zellen nach Induktion durch LMP1 degradiert und aktiviert.	84
Abb. 22: Die Degradation und Aktivierung von TPL2 findet unabhängig von TAK1 statt.	85
Abb. 23: TPL2 wird für eine vollständige Aktivierung von JNK im LMP1-Signalweg benötigt.	86
Abb. 24: Der Knockout von TPL2 senkt die Aktivität von JNK nach Induktion von LMP1.	88
Abb. 25: Die Aktivierung von NF- κ B durch LMP1 verläuft unabhängig von TPL2.	90
Abb. 26: LMP1 und CD40 unterscheiden sich in den Funktionen von IKK2, TAK1 und TPL2 in der Aktivierung von JNK und NF- κ B in B-Zellen.	93
Abb. 27: Die Inhibition von IKK hemmt in EBV-transformierten humanen B-Zellen die Aktivierung von JNK durch LMP1.	95

Abb. 28: Die Inhibition von TPL2 führt zu einer starken Reduktion in der Proliferation und einem Anstieg der Apoptose in EBV-transformierten humanen B-Zellen.	96
Abb. 29: Die Inhibition von TPL2 in EBV-transformierten B-Zellen blockiert die Induktion der MAPK-Signalwege.	98
Abb. 30: Von LMP1 abhängige, murine Karzinomzellen zeigen eine signifikante Erhöhung in der Apoptoserate nach Inhibition von TPL2.	100
Abb. 31: TNIK interagiert mit TRAF2 und TRAF6 nach Induktion durch LMP1.	102
Abb. 32: MINK1 interagiert mit TRAF6 nach Induktion durch LMP1, wobei die Kinasedomäne von MINK1 nicht für die Interaktion verantwortlich ist.	104
Abb. 33: TNIK und MINK1 phosphorylieren TRAF6 an den Phosphorylierungsstellen T463 und S507.	106
Abb. 34: Die Überexpression von TNIK und MINK1 induziert die Phosphorylierung von TRAF6 an Serin 507.	108
Abb. 35: Die TRAF6-Phosphorylierungsmutanten T463A und S507A können nach Induktion durch LMP1 mit TNIK und MINK1 interagieren.	111
Abb. 36: TNIK und MINK1 sind essenziell für die Phosphorylierung von TRAF6 an Serin 507 durch LMP1.	113
Abb. 37: Die Phosphorylierungsmutanten TRAF6 T463A, TRAF6 S507A und TRAF6 T463A/S507A zeigen eine verstärkte Ubiquitinierung an K63 nach Aktivierung durch LMP1.	116
Abb. 38: Der Knockout von TNIK und/oder MINK1 reduziert die durch LMP1 induzierte K63-verknüpfte Ubiquitinierung von TRAF6.	118
Abb. 39: Die Interaktion von LMP1 mit IKK2 und die Interaktion von LMP1 mit TAK1 ist unabhängig von TNIK und MINK1.	120
Abb. 40: TAK1, nicht aber NEMO, wird durch TNIK <i>in vitro</i> phosphoryliert.	122
Abb. 41: Die Expression von TNIK unterscheidet sich stark in verschiedenen Tumorzelllinien aus unterschiedlichen Tumorentitäten.	125
Abb. 42: Die Generierung und Überprüfung des <i>short hairpin</i> -Knockdowns von TNIK in den ausgewählten Tumorzelllinien.	128
Abb. 43: Der Knockdown von TNIK führt zu keiner signifikanten Erhöhung der Apoptoserate.	129
Abb. 44: Der Knockdown von TNIK führt nicht zur Beeinträchtigung der Proliferation und der Viabilität der angegebenen Brustkrebszelllinien.	130
Abb. 45: Der Einfluss des Knockdowns von TNIK auf die Koloniebildung der verschiedenen Tumorzelllinien im Soft-Agar-Experiment.	132
Abb. 46: Der Einfluss des Knockdowns von TNIK auf die Migrationsfähigkeit der getesteten Brustkrebszelllinien.	134
Abb. 47: Die Rekonstitution von HA-TNIK in den MDA-MB-231 sh5 TNIK-Knockdown-Zellen führt zur Aufhebung des Migrationsdefektes im Wundheilungsexperiment.	136
Abb. 48: Der durch CRISPR/Cas9 vermittelte Knockout von TNIK führt in MDA-MB-231 Zellen zu keiner Beeinträchtigung der Apoptoserate und der Proliferation der Zellen. Die Koloniebildung im Soft-Agar und die Wundheilungskapazität sind jedoch von TNIK abhängig.	139
Abb. 49: Die Behandlung von MDA-MB-231 mit dem TNIK-Inhibitor KY-05009 ruft eine Morphologieänderung der Zellen hervor und reduziert die Wundheilungskapazität.	142

Abb. 50: Der Knockdown von TNIK reduziert die durch TGF β induzierte Phosphorylierung von Smad2 in den triple-negativen Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und BT20.	144
Abb. 51: Der Knockout von TNIK in MDA-MB231 Zellen, sowie die Inhibition von TNIK durch KY-05009, senkt die Phosphorylierung von Smad2 nach TGF β -Stimulation.	145
Abb. 52: PCA Blot der Rohdaten der Expressionswerte für WT-Zellen (rot) aufgetragen gegen TNIK-KO-Zellen (grün).	147
Abb. 53 : Die am stärksten signifikanten IPA-Ergebnisse für die Kategorie "Krankheit und Funktion" der RNASeq-Analyse der MDA-MB-231 WT-Zellen im Vergleich zu den MDA-MB-231 TNIK KO cl.1 und cl.5 Zellen.	152
Abb. 54: Heatmaps zu den Ergebnissen der IPA-Analyse in der Kategorie „Krankheit und Funktion“.	152
Abb. 55: Heatmap zu den Ergebnissen der IPA-Analyse in der Kategorie „ <i>Granulocyte adhesion and diapedesis</i> “.	153
Abb. 56: Grafik zu „ <i>Granulocyte Adhesion and Diapedesis</i> “ generiert aus IPA.	154
Abb. 57: qPCR-Analyse ausgewählter stark regulierter Gene aus der RNASeq-Analyse von MDA-MB-231 WT-Zellen gegen MDA-MB-231 TNIK-Knockout-Zellen.	156
Abb. 58: Überblick über das LMP1-CTAR2- <i>Signaling</i> .	163
Anhang Abb. 1: Der Knockdown von TNIK führt zu keiner Beeinträchtigung der Proliferation und der Viabilität verschiedener Tumorzelllinien.	207
Anhang Abb. 2: Die Koloniebildung im Soft-Agar nach Knockdown von TNIK in verschiedenen Tumorzelllinien.	208
Anhang Abb. 3: Die Migrationsfähigkeit verschiedener Tumorzelllinien nach Knockdown von TNIK im Wundheilungsexperiment.	209
Anhang Abb. 4: Sequenzierung der MDA-MB-231 TNIK-Knockout Zellklone.	210
Anhang Abb. 5: Heatmaps der 157 am stärksten hochregulierten Gene (links) und der 200 am stärksten herunterregulierten Gene (rechts) in MDA-MB-231 Zellen nach Knockdown von TNIK.	212
Anhang Abb. 6: <i>TREM1 Signaling</i> Signalweg-Grafik generiert aus IPA.	212
Anhang Abb. 7: <i>Agranulocyte Adhesion and Diapedesis</i> Signalweg-Grafik generiert aus IPA.	213

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Inhibitoren	35
Tab. 2: Liganden	35
Tab. 3: Chemikalien, Reagenzien, Medien	35
Tab. 4: Substrate	36
Tab. 5: Apparative Ausstattung	37
Tab. 6: Verbrauchsmaterialien	37
Tab. 7: Primäre Antikörper	38
Tab. 8: Sekundäre Antikörper	39
Tab. 9: Quervernetzungsantikörper	39
Tab. 10: Plasmide	39
Tab. 11: CRISPR/Cas9-Plasmide	42
Tab. 12: Zusammenfassung des Wachstumsverhaltens in Soft-Agar und der Wundheilungskapazität der Kontrollzellen im Vergleich zu den Zellen mit Knockdown von TNIK.	135
Tab. 13: Kanonische Signalwege, die am stärksten durch den Knockout von TNIK in der triple-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 beeinflusst werden.	149
Tab. 14: Ausgewählte Gene aus der RNASeq-Analyse, die über qPCR-Experimente bestätigt wurden.	150

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AP-1	Aktivatorprotein-1
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BL41	Burkitt Lymphim Zelllinie
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40 Ligand
CTAR	<i>C-terminal activation region</i>
C-terminal	carboxyterminal
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyrinonukleosidtriphosphat
DTT	Dithioreithol
EBV	Epstein-Barr Virus
ECL	Chemilumineszenz-Reaktionslösung (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
<i>et al.</i>	et alii, deutsch: und andere
EtOH	Ethanol
FCS	<i>fetal calf serum</i> , deutsch: fötales Kälberserum
GCK	Keimzentrumskinas (<i>germinal center kinase</i>)
GCKH	<i>germinal center kinase homology</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
°C	Grad Celsius
h	Stunden
HA	Hämagglutinin
HEK	humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie (<i>human embryonic kidney</i>)
His	Histidin
HMGU	Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Ig	Immunglobulin
IκB	<i>inhibitor of NF-κB</i>
IKK	IκB-Kinase

Abkürzungsverzeichnis

IL	Interleukin
IMD	Intermediär-Domäne
IP	Immunpräzipitation
IRAK	IL-Rezeptorassoziierte Kinase
IRF7	<i>Interferon regulatory factor 7</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KD	Kinasedomäne
kDa	Kilo-Dalton
KM	Kinase mutante
KO	Knockout
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> -Medium
LCL	lymphoblastoide Zelllinie (<i>lymphoblastoid cell line</i>)
LMP1	Latentes Membranprotein1
LPS	Lipopolysaccharid
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M	Molar
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase (<i>mitogen activated protein kinase</i>)
MEF	embryonale Fibroblasten-Zelllinie aus Mäusen (<i>mouse embryonic fibroblast</i>)
Min	Minute
MINK	Misshapen/NIKs-related kinase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B-cells
ng	Nanogramm
NGFR	<i>nerve growth factor receptor</i>
N-terminal	aminoterminal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RING	<i>really interesting new gene</i>
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfat</i>)
sec	Sekunde

Abkürzungsverzeichnis

TAB1	TAK1-bindendes Protein (<i>TAK1 binding protein</i>)
TAK1	TGF β -aktivierte Kinase
TBE	Tris/Borat/EDTA Puffer
TBS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanpuffer (<i>tris buffered saline</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TM	Transmembranhelix
TNF	Tumornekrosefaktor
TNIK	TRAF2- und Nck-interagierende Kinase
TRADD	<i>TNF-receptor associated via death domain</i>
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziierte Faktoren
Tris	Tri(hydroxymethyl)-aminoethan
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	x-fache Erdbeschleunigung

Zusammenfassung

Das Epstein-Barr-Virus ist mit malignen Erkrankungen des Menschen wie dem Hodgkin-Lymphom, dem Nasopharynxkarzinom oder Posttransplantations-Lymphoproliferativer Erkrankung assoziiert. Das latente Membranprotein 1 (LMP1) stellt das wichtigste Onkogen des EBV dar. LMP1 ist ein konstitutiv aktiver, ligandenunabhängiger Pseudorezeptor, der zelluläre Signalwege induziert und an der Regulation von Proliferation und Zellüberleben beteiligt ist. Über die Rekrutierung des Signalmoleküls TRAF6 an die C-terminale Region CTAR2 von LMP1 werden unter anderem NF- κ B und JNK aktiviert. Beide Signalwege sind kritisch für die Zelltransformation durch LMP1, jedoch sind molekulare Aspekte der Signalweiterleitung nach wie vor unvollständig geklärt oder kontrovers diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit war es das Ziel, die Rolle von IKK2, TAK1 und TNIK, einzelner Komponenten des LMP1-Signalsoms, in der Signalkaskade von LMP1 näher zu untersuchen. Dabei stellte sich IKK2 neben seiner etablierten Rolle im kanonischen NF- κ B-Signalweg auch erstmals überhaupt als zentrale Komponente des JNK-Signalwegs heraus. IKK2 aktiviert JNK über die Serin/Threonin-Kinase TPL2. Dieser neu entdeckte Mechanismus der Aktivierung von JNK ist für LMP1 spezifisch und unterscheidet sich von den Signalwegen von TNF α , Interleukin-1 und CD40. Unabhängig von seiner Kinaseaktivität ist TAK1 in der Lage, die Bildung des LMP1-Signalkomplexes zu vermitteln und weiterhin die Ubiquitinierung von NEMO sowie die Aktivierung von IKK2 hervorzurufen. Diese neu entdeckte IKK2/TPL2/JNK-Achse im LMP1-Signalweg erwies sich weiterhin als essenziell für die Aufrechterhaltung von Überlebenssignalen durch LMP1 in EBV-transformierten B-Zellen und stellt somit einen möglichen neuen Ansatzpunkt für die Entwicklung von Interventionsstrategien zur Behandlung EBV-induzierter Erkrankungen dar.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde TNIK als wichtiger Teil des LMP1-Signalkomplexes genauer in seiner molekularen Funktion in Bezug auf posttranslationale Proteinmodifikationen sowie in der Kazinogenese von unterschiedlichen Krebsentitäten analysiert. Das Multidomänenprotein TNIK sowie sein Homolog MINK1 waren dabei in der Lage, nach Aktivierung durch LMP1 mit TRAF6 zu interagieren. TNIK und MINK1 können TRAF6 an Serin 507 und Threonin

463 phosphorylieren. Hier konnte nun erstmals mit Hilfe von phosphorylierungsstellenspezifischen Antikörpern nachgewiesen werden, dass LMP1 die Phosphorylierung von TRAF6 an S507 über TNIK und MINK1 induziert. Ein durch siRNA bzw. shRNA vermittelter Knockdown von TNIK und MINK1 bestätigte die Abhängigkeit der TRAF6-Phosphorylierung an S507 von den beiden Keimzentrumskinasen. Auch die K63-verknüpfte Autoubiquitinierung von TRAF6, welche ein Anzeichen für die Aktivität von TRAF6 ist, war von TNIK und MINK1 abhängig.

Neben diesen neuen molekularen Funktionen von TNIK in der LMP1-Signaltransduktion, wurde außerdem eine mögliche Rolle von TNIK in der Tumorigenese evaluiert. Ein TNIK-Knockdown-*Screening* mit Zelllinien verschiedener solider Tumorentitäten zeigte, dass die Abwesenheit von TNIK vor allem in triple-negativen Brustkrebszellen die Migration und das Auswachsen der Zellen in Soft-Agar beeinträchtigt. Dieser Einfluss von TNIK auf die Migration wurde in MDA-MB-231 Zellen mit Hilfe eines CRISPR/Cas9-vermittelten Knockouts von TNIK und durch Behandlung mit einem TNIK-Inhibitor bestätigt. Es wurde außerdem gezeigt, dass die Phosphorylierung von Smad2 nach Stimulation durch TGF β in Abwesenheit von TNIK gehemmt ist. Auch eine anschließende RNASeq-Analyse des Transkriptoms sowie qPCR-Experimente gaben Hinweise darauf, dass TNIK in der Migration und Metastasierung von Brustkrebszellen beteiligt sein könnte. Unter den durch einen Knockout von TNIK regulierten Genen befanden sich Tumor-relevante Gene, wie z.B. MMP-2 oder ICAM1, aber auch regulierte Gengruppen, welche zum Prozess der Diapedese gehören und somit für migratorische Prozesse wichtig sind. Die vorliegende Arbeit identifizierte die Keimzentrumskinase TNIK damit auch als ein neues potenzielles Ziel für therapeutische Ansätze im Kampf gegen Brustkrebs.

Summary

Epstein-Barr virus is associated with human malignancies such as Hodgkin's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma or post-transplant lymphoproliferative disorders. LMP1, the major oncogene of EBV, acts as a constitutively active, ligand-independent receptor, which induces cellular signaling pathways and is involved in the regulation of proliferation and survival of EBV-transformed cells. It recruits signaling molecules like TRAF6 at its C-terminal signaling region CTAR2, which leads to the activation of the canonical NF- κ B and JNK signaling pathway. The molecular signaling mechanisms at the CTAR2 domain, which is critical for cell transformation, still remains incompletely understood and controversially discussed. This thesis aimed at clarifying some of these unknown aspects of CTAR2 signaling. In particular, the individual signaling components of the LMP1-CTAR2 signalosome, IKK2, TAK1 and TNIK, were examined for their role in the LMP1 signaling cascade. IKK2 was found to be the central mediator not only of NF- κ B signaling, but unexpectedly also of JNK activation. Upstream of IKK2 and independent of its kinase activity, TAK1 mediates LMP1 signaling complex formation, NEMO ubiquitination and IKK2 activation. Specific for LMP1 pathway and in contrast to TNF, interleukin-1 and CD40 signaling, the serine/threonine kinase TPL2 acts as the signaling mediator to JNK downstream of IKK2. This newly discovered IKK2-TPL2-JNK axis in the LMP1 pathway was further demonstrated to be important for the survival of LMP1-transformed cells, qualifying TPL2 as a new potential therapeutic target for EBV-induced cancers.

The second part of this thesis focussed at one important component of the LMP1 signaling complex, the germinal center kinase TNIK. The molecular role of TNIK in posttranslational protein modification in LMP1 signaling as well as potential functions of TNIK in cell transformation of cell lines of selected solid cancer entities were addressed. An interaction of the multidomain protein TNIK and its homologue MINK1 with TRAF6 was detected after induction by LMP1. Both, TNIK and MINK1 possess kinase activity, which enables the kinases to phosphorylate TRAF6 at serine 507 and threonine 463. This TNIK/MINK1-induced TRAF6 phosphorylation at S507 was detected for the first time in different cell systems upon receptor

Summary

stimulation by the usage of phosphorylation site-specific antibodies. Furthermore, it was shown with siRNA and shRNA approaches that TRAF6 phosphorylation at S507 is dependent on TNIK and MINK1. Also the K63-conjugated ubiquitination of TRAF6, which is indicative for TRAF6 activity, is dependent on TNIK and MINK1 in LMP1 signaling.

Besides the newly discovered molecular functions of the germinal center kinase TNIK in LMP1 signaling, a potential role of TNIK in different solid cancers was evaluated. A screening with different cell lines of various tumor entities showed that the TNIK knockdown affected the migratory capacity and the potential of anchorage-independent growth especially of triple negative breast cancer cells. The CRISPR/Cas9-mediated knockout of TNIK in the breast cancer cell line MDA-MB-231 and chemical inhibition of TNIK kinase activity confirmed these results. In all tested systems the absence of TNIK leads to a decrease in Smad2 phosphorylation after TGF β stimulation as important factor for breast cancer cell migration. Furthermore, a RNAseq transcriptome analysis as well as qPCR experiments corroborated the hypothesis that TNIK might be involved in migration and metastasis of breast cancer cells. Thus, TNIK has been identified as a potential target for new therapeutical approaches in the fight against breast cancer.

1 Einleitung

1.1 Das Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) zählt zu den am weitesten verbreiteten humanen Viren und wurde 1964 von M. Epstein, Y. Barr und B. Anchong identifiziert (Epstein et al, 1964). EBV gehört dabei zu den gamma-1 Herpesviren und besitzt ein doppelsträngiges, lineares Genom, welches in einem ikosaedrischen Kapsid, umhüllt von einer Membran, verpackt vorliegt (Baer et al, 1984). Die Durchseuchungsrate mit dem Virus liegt innerhalb der Erwachsenenpopulation bei mehr als 90%. Kommt es im frühen Kindesalter zur Primärinfektion, treten kaum auffallende Symptome auf, die einem grippalen Infekt ähneln (Evans, 1972; Lang et al, 1977; Young & Rickinson, 2004). Kommt es jedoch erstmals zu einer Infektion mit EBV von Jugendlichen oder Erwachsenen, kann es zur infektiösen Mononukleose kommen (Diehl et al, 1968). EBV hat die Fähigkeit, ein Leben lang in einem infizierten Individuum zu persistieren, was durch das Umschalten des genetischen Programms von einem lytischen in ein latentes Programm gewährleistet wird. Während der Latenz wird dabei kein neues Virus produziert, sondern es verbleibt versteckt in langlebigen B-Gedächtniszellen (Amon & Farrell, 2005; Koppers, 2003). Eine Aktivierung der B-Gedächtniszellen führt zu einer Reaktivierung des Virus und zur Produktion von Viruspartikeln (Babcock et al, 1998; Koppers, 2003). Auch wenn die meisten Menschen Träger des Virus sind und keinerlei gesundheitliche Beschwerden aufweisen, wurde EBV 1997 von der Weltgesundheitsorganisation als Typ I Karzinogen eingestuft, da es auch schwere bis lebensbedrohliche Krankheiten zur Folge haben kann. Dabei gilt EBV als Auslöser maligner Erkrankungen wie dem Burkitt-Lymphom, dem Hodgkin-Lymphom, Lymphoproliferativer Erkrankung nach Transplantation und dem Nasopharynxkarzinom (Niedobitek, 1999; Young & Rickinson, 2004).

Für die Latenz von EBV sind vier verschiedene Latenzprogramme bekannt, welche durch die Transkription einer bestimmten Anzahl von Latenzgenen charakterisiert sind (Klein et al, 2010; Niedobitek et al, 2001). Bei diesen Latenzgenen handelt es sich um sechs durch EBV kodierte nukleäre Antigene (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP), zwei nicht-polyadenylierte RNAs (EBV-kodierte kleine RNAs (EBER) 1 und 2) und

drei Membranproteine (LMP1, 2A und 2B) (Kuppers, 2003). Die Funktion all dieser latent exprimierten Proteine liegt entweder in der Persistenz des EBV-Genoms oder in der Transformation der Zellen durch Vorantreiben der Proliferation, Beeinflussung des Zellzyklus oder Eingreifen in die Apoptose. LMP1 ist dabei das primäre Onkogen von EBV und wird in Kapitel 1.1.1 genauer beschrieben.

1.1.1 LMP1 als primäres Onkoprotein von EBV

LMP1 ist ein virales, Rezeptor-ähnliches Onkoprotein, welches in allen EBV-transformierten Zellen exprimiert wird und essenziell für die zelluläre Transformation durch EBV ist (Kieser & Sterz, 2015). Dieses Membranprotein wird in den EBV Latenzprogrammen II und III exprimiert. Fibroblasten der Ratte zeigten nach Transfektion mit LMP1 phänotypische Veränderungen, die mit dem Ereignis der Transformation verbunden sind, wie Fokusbildung im Zellrasen oder Serum-unabhängiges Zellwachstum (Moorthy & Thorley-Lawson, 1993). Weiterhin ist bekannt, dass EBV ohne funktionales LMP1 nicht in der Lage ist, B-Zellen effizient zu transformieren (Kaye et al, 1993). Durch LMP1 transformierte Rat-1 Zellen konnten außerdem als tumorigen in Nacktmäusen identifiziert werden (Wang et al, 1985).

EBV nutzt zelluläre Signalwege für die virale Zelltransformation und stetige *in vitro* Proliferation von latent infizierten B-Zellen, genannt lymphoblastoide Zelllinien (LCL) (Young & Rickinson, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass LMP1 für das Auswachsen dieser LCLs und die durch EBV vermittelte Transformation von B-Zellen essenziell ist (Dirmeier et al, 2003; Kaye et al, 1993; Kilger et al, 1998). Auch in B-Zellen transgener Mäuse weist LMP1 onkogenes Potential auf. Die konditionale Aktivierung von LMP1 im Pro/Pre-B-Zellstadium verursacht in Abwesenheit von T-Zellen eine starke, hocheffiziente Lymphoproliferation in Mäusen, was das transformierende Potential von LMP1 auch *in vivo* weiter bestätigt (Zhang et al, 2012).

LMP1 agiert als ein hocheffizienter viraler Pseudorezeptor, welcher Liganden-unabhängig ist und eine große Anzahl an Signalwegen in der Zelle aktiviert. Diese Signalwege sichern das Zellüberleben und die Proliferation und verhindern die Apoptose, was die Voraussetzung für ein malignes Auswachsen darstellt (Kieser & Sterz, 2015). Bei LMP1 handelt es sich dabei um ein 386 Aminosäuren

umfassendes Transmembranprotein, welches sich aus drei Domänen zusammensetzt (Eliopoulos & Rickinson, 1998). Dabei besteht LMP1 aus einem kurzen zytoplasmatischen N-Terminus (Aminosäuren 1-24), gefolgt von einer Transmembrandomäne bestehend aus sechs Helices (Aminosäuren 25-186) und einem langen zytoplasmatischen C-Terminus (Aminosäuren 187-386) (Abb. 1) (Liebowitz et al, 1986). Jede dieser Domänen trägt dabei bestimmte Eigenschaften. Der N-Terminus stellt sicher, dass die Orientierung und Ausrichtung des LMP1-Pseudorezeptors in der Membran infizierter Zellen richtig erfolgt und die Aktivität und Verknüpfung von LMP1 mit dem Zytoskelett, sowie die Regulation des Abbaus stattfinden kann (Wang et al, 1988). Die ligandenunabhängige Bildung von LMP1-Oligomeren in der Plasmamembran, welche für eine am C-Terminus stattfindende Signaltransduktion von Nöten ist, erfolgt über die Transmembrandomänen (Floettmann & Rowe, 1997; Gires et al, 1997; Hatzivassiliou et al, 1998).

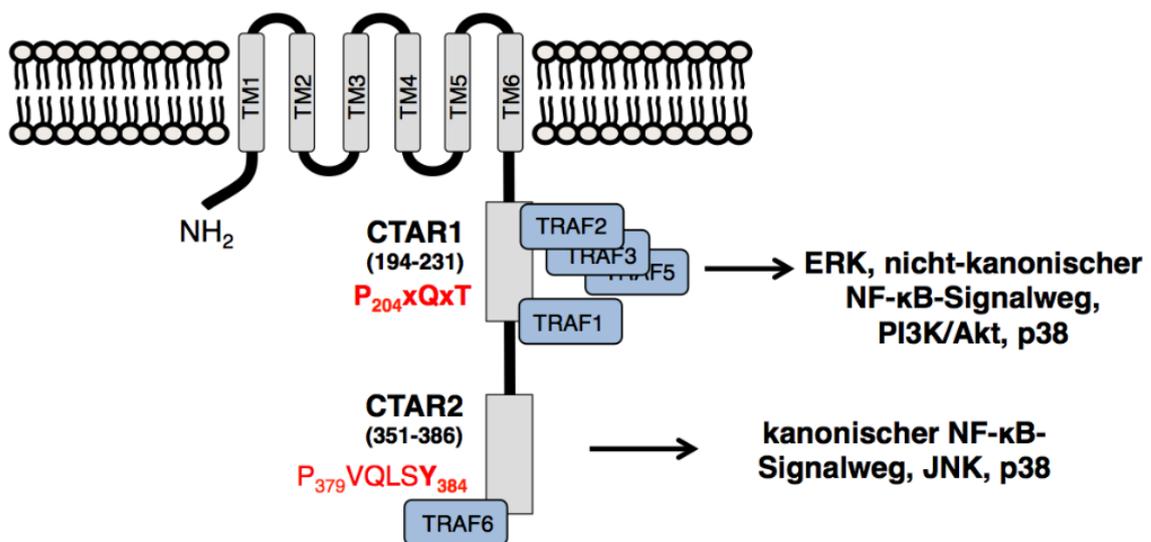


Abb. 1: Schematische Übersicht von LMP1. Die angegebenen Zahlen stellen Aminosäuren von LMP1 dar. LMP1 besteht aus einem kurzen N-Terminus, 6 Transmembrandomänen (TM1-6) und einer C-terminalen Signaldomäne, welche CTAR1 und CTAR2 beinhaltet. LMP1 rekrutiert TRAF-Familienmitglieder über das PxQxT und PVQLSY Motiv und aktiviert die aufgeführten Signalwege. Abbildung modifiziert nach Kai Sterz (Sterz, 2013).

Am C-Terminus von LMP1 wird ein Netzwerk an Signalwegen induziert. Dabei spielen die C-terminalen Aktivierungsregionen der Signaldomäne, CTAR1 (*C-terminal activating region 1*) und CTAR2, eine entscheidende Rolle (Brodeur et al, 1997; Huen et al, 1995; Kieser & Sterz, 2015). Es wurde nachgewiesen, dass beide Aktivierungsdomänen für eine B-Zell-Transformation durch EBV von Nöten sind

(Dirmeier et al, 2003). Der Bereich zwischen CTAR1 und CTAR2 hingegen ist nicht für die B-Zell-Transformation erforderlich, spielt aber eine Rolle in der Interaktion mit Januskinasen (JAK) (Gires et al, 1999). Beide Aktivierungsdomänen können mit einer Vielzahl von Signal- und Adapterproteinen, wie den TRAFs (TNF-Rezeptor-assoziierte Faktoren) und TRADD (*TNF receptor-associated death domain protein*), interagieren, was es ihnen ermöglicht, ein breites Spektrum an Signalwegen zu regulieren. Im Weiteren soll vor allem auf die durch CTAR2 induzierten Signalwege näher eingegangen werden.

1.1.2 Durch LMP1 induzierte Signalwege

In Abhängigkeit des rekrutierten Signalmoleküls kann LMP1 unterschiedliche Signalkaskaden über die beiden Aktivierungsdomänen induzieren. Für CTAR1 stellt die Sequenz PxQxT innerhalb der Aminosäuresequenz P₂₀₄QQAT das Konsensusmotiv für die Bindung von TRAF-Molekülen dar. Über dieses Motiv können die Adapterproteine TRAF1, TRAF2, TRAF3 und TRAF5 binden, wodurch der nicht-kanonische/ alternative NF- κ B (*nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B-cells*)-Signalweg, der PI3K/Akt (*phosphatidylinositol 3-kinase/Akt*)-Signalweg und abhängig von der Zelllinie, auch MAPK-Signalwege induziert werden (Abb.1) (Atkinson et al, 2003; Dawson et al, 2008; Dawson et al, 2003; Greenfeld et al, 2015; Luftig et al, 2004; Saito et al, 2003; Schultheiss et al, 2001).

Für CTAR2 wurde bereits gezeigt, dass der kanonische/ klassische NF- κ B-Signalweg, der JNK- (c-Jun N-terminale Kinase)-Signalweg und der IRF7 (*interferon regulatory factor*)-Signalweg aktiviert werden (Eliopoulos & Young, 1998; Floettmann & Rowe, 1997; Huen et al, 1995; Kieser et al, 1999; Mitchell & Sugden, 1995; Schultheiss et al, 2001). Kai Sterz aus unserer Arbeitsgruppe konnte außerdem nachweisen, dass der ERK-, Akt- und STAT3-Signalweg indirekt über CTAR2 angeschaltet werden können (Sterz, 2013). Eine Studie zeigte weiterhin, dass eine Überexpression von CTAR2 in HEK293 Zellen zu einer Aktivierung von ERK in den Zellen führt (Gewurz et al, 2011). Für die von CTAR2 abhängige Aktivierung von JNK und NF- κ B wurde TRAF6 als essenziell beschrieben (Abb. 2) (Luftig et al, 2003; Schultheiss et al, 2001; Wan et al, 2004). Fabian Giehler konnte in unserem Labor außerdem aufklären, dass die CTAR2-Domäne von LMP1 direkt

mit TRAF6 interagieren kann, was für eine Aktivierung der genannten Signalwege notwendig ist (Giehler, 2012) (Abb.1 und 2).

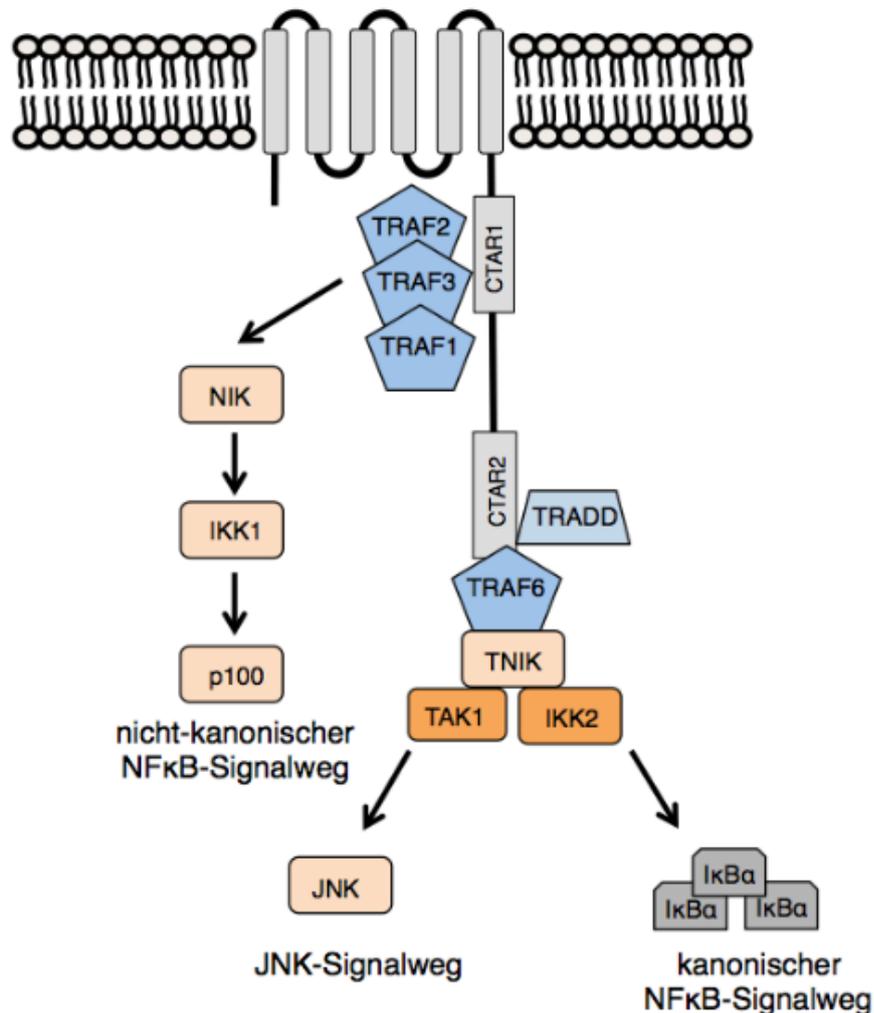


Abb. 2: Der NF-κB- und JNK-Signalweg nach Induktion durch LMP1. Der nicht-kanonische NF-κB-Signalweg wird über die CTAR1-Domäne induziert, während JNK und der kanonische NF-κB-Signalweg über CTAR2 aktiviert werden. Abbildung modifiziert nach Sterz und Kieser 2015 (Kieser & Sterz, 2015).

In der vorliegenden Arbeit stehen die molekularen Mechanismen der von CTAR2 abhängigen Aktivierung von JNK und NF-κB im Vordergrund. Besonders die in den Signalkaskaden beteiligten Faktoren IKK2 (IκB-Kinase 2), TAK1 (*TGFβ-activated kinase*), TNIK (TRAF2- und Nck-interagierende Kinase) und TPL2 (*tumor progression locus 2*) stehen im Fokus der weiteren Analysen.

1.1.2.1 Der von LMP1 abhängige, kanonische NF- κ B-Signalweg

NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*) besteht aus einer Familie von dimeren Transkriptionsfaktoren, die wichtige Regulatoren in der Immunität, Entzündung, Stressantwort, Apoptose und Differenzierung von Zellen sind (Oeckinghaus et al, 2011). Eine Deregulation der Aktivität von NF- κ B konnte mit malignen Erkrankungen, Autoimmunkrankheiten und entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Oeckinghaus et al, 2011). Der NF- κ B-Signalweg ist essenziell für die durch LMP1 induzierte Transformation von B-Zellen (Cahir-McFarland et al, 2004; Devergne et al, 1996).

In Säugetieren besteht die NF- κ B-Familie aus fünf Mitgliedern: p65 (RelA), RelB, c-Rel und den Vorläuferproteinen p105 (NF- κ B1) und p100 (NF- κ B2), welche zu p50 bzw. p52 prozessiert werden können. Dabei können p65 und c-Rel hauptsächlich mit p50 heterodimerisieren, während RelB Heterodimere mit p100/p52 bildet. Im inaktiven Zustand werden die NF- κ B-Dimere durch NF- κ B-Inhibitor-Proteine (I κ B) oder als Vorläuferproteine p100 und p105 im Zytoplasma zurückgehalten (Hayden & Ghosh, 2008). NF- κ B kann über zwei Signalwege aktiviert werden, einerseits den kanonischen NF- κ B-Signalweg und andererseits den nicht-kanonischen NF- κ B-Signalweg. Der kanonische NF- κ B-Signalweg, der hauptsächlich Gegenstand dieser Arbeit ist, wird durch Rezeptor-induzierte Stimuli aktiviert. Beispiele für Rezeptoren, die den kanonischen NF- κ B-Signalweg aktivieren können, sind die TNFR-, IL1-R und *Toll-like* Rezeptor-Familie, aber auch der Pseudorezeptor LMP1. Dabei kommt es zu einer Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes (IKK), welcher aus zwei katalytisch-aktiven Kinasen, IKK1 (IKK α) und IKK2 (IKK β), und der regulatorischen Untereinheit NEMO (IKK γ) besteht (Oeckinghaus et al, 2011). Die Kinaseuntereinheiten werden durch Phosphorylierungen an zwei Serinresten innerhalb der Aktivierungsschleife induziert. Bei IKK1 handelt es sich dabei um die Phosphorylierung an den Aminosäureresten Serin 176 und Serin 180 und bei IKK2 an Serin 177 und Serin 181. Ob es sich bei dieser Phosphorylierung um eine *trans*-Autophosphorylierung oder um eine Phosphorylierung durch eine aufwärts gelegene Kinase wie z.B. TAK1 handelt, ist nicht vollständig geklärt (Delhase et al, 1999; Israel, 2010; Mercurio et al, 1997; Wang et al, 2001). Nach Aktivierung des IKK-Komplexes kommt es zu einer Phosphorylierung von I κ B α an Serin 32 und Serin 36 durch IKK2. I κ B α wird nach erfolgter Phosphorylierung K48-ubiquitiniert

und proteasomal degradiert. Dadurch werden assoziierte NF- κ B-Transkriptionsfaktoren, hauptsächlich p65/p50 Dimere, frei und können in den Nukleus translozieren und dort die Transkription von Zielgenen anschalten (Abb. 3) (Hayden & Ghosh, 2008).

LMP1 kann sowohl den nicht-kanonischen als auch den kanonischen NF- κ B-Signalweg aktivieren. Die CTAR1-Domäne von LMP1 aktiviert dabei hauptsächlich den nicht-kanonischen NF- κ B-Signalweg, was die Prozessierung von p100 zu p52, sowie p50::p52 und p52::p65 Dimere umfasst (Atkinson et al, 2003; Luftig et al, 2004; Saito et al, 2003). Die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalweges wird durch die CTAR2-Domäne von LMP1 induziert, wobei die Aminosäuresequenz P₃₇₉VQLSY essenziell für die Aktivierung ist (Floettmann & Rowe, 1997).

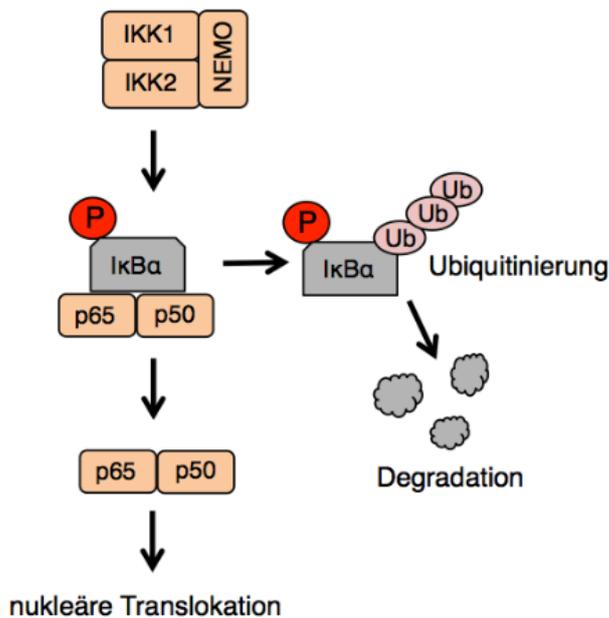


Abb. 3: Schematische Übersicht des kanonischen NF- κ B-Signalweges. Im kanonischen NF- κ B-Signalweg spielt die Aktivierung des IKK-Komplexes eine wichtige Rolle. Diese führt zur Phosphorylierung und proteasomalen Degradation von I κ B α . Die NF- κ B-Heterodimere werden freigesetzt und translozieren in den Zellkern, wo sie die Genexpression regulieren.

Der CTAR2-vermittelte NF- κ B-Signalweg zeigt eine Abhängigkeit von TRAF6 und TRADD. Die Expression eines dominant negativen TRAF6-Proteins ohne RING-Domäne führt zu einer starken Reduktion der durch LMP1 induzierten Aktivierung von NF- κ B (Schultheiss et al, 2001). Auch der Knockout von TRAF6 in embryonalen Mausfibroblasten blockiert die nukleäre Translokation von p65 und die von NF- κ B abhängige Transkription von Genen in den Zellen (Luftig et al, 2003). Zusätzlich kann isoliertes CTAR2 die Aktivierung von NF- κ B in Abhängigkeit von TRAF6 induzieren (Schneider et al, 2008). TRADD war eines der ersten Proteine, welches als wichtig für die durch CTAR2 induzierte Aktivierung von NF- κ B beschrieben

wurde (Izumi & Kieff, 1997; Kieser et al, 1999; Kieser & Sterz, 2015). Es wurde gezeigt, dass TRADD mit der CTAR2-Domäne von LMP1 interagieren kann und wichtig für eine effiziente Rekrutierung von IKK2 in humanen B-Zellen ist (Schneider et al, 2008).

Weitere LMP1-Signalkomplexkomponenten werden zum Teil kontrovers in der Aktivierung von NF- κ B diskutiert. Beispielsweise reduziert ein durch siRNA vermittelter Knockdown von TAK1 in 293T Zellen die durch CTAR2 induzierte Aktivität von IKK2 (Wu et al, 2006b). Andererseits führte die chemische Inhibition von TAK1 durch einen spezifischen TAK1-Inhibitor zu keiner signifikanten Senkung der durch LMP1 induzierten Aktivierung von NF- κ B (Uemura et al, 2006). Diese unklare zur Rolle von TAK1 im LMP1-Signalweg, sowie die durch CTAR2 vermittelte Aktivierung von NF- κ B wurden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

Auch weitere Komponenten des LMP1-Signalkomplexes konnten als unumgänglich für eine Aktivierung von NF- κ B identifiziert werden. So wurde gezeigt, dass die Inhibition von IKK2 oder der Verlust von NEMO zu einer kompletten Blockierung der durch CTAR2 induzierten Aktivierung von NF- κ B führt (Boehm et al, 2010). Außerdem geben siRNA-Experimente Hinweise, dass IKK1 und IKK2 in der Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalweges durch LMP1 redundante Rollen einnehmen können (Gewurz et al, 2012). Auch die Kinasedomäne von TNIK wurde als notwendig für eine vollständige Aktivierung von NF- κ B durch LMP1 beschrieben (siehe Abschnitt 1.1.3) (Shkoda et al, 2012).

1.1.2.2 Der durch LMP1 induzierte JNK-Signalweg

Die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) gehört zusammen mit p38 zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen, der MAP-Kinasen (MAPK). Da beide Kinasen durch Stressantworten in der Zelle aktiviert werden, sind sie auch als Stress-aktivierte Kinasen (SAPKs) bekannt. Zur JNK-Familie gehören drei verschiedenen JNK-Proteine (JNK1-3) (Huang et al, 2009; Rincon & Davis, 2009). Die Aktivierung von JNK erfolgt über hierarchische MAPK-Signalkaskaden (Abb. 4). Die Aktivierung eines Rezeptors wie z.B. LMP1 führt zur Aktivierung von MAP3-Kinasen (MAP3K), welche wiederum MAP2K aktivieren, die dann die entsprechende MAPK wie z.B. JNK phosphorylieren können. Das Substrat für die aktivierte JNK-Kinase ist hauptsächlich die c-Jun Untereinheit des AP-1 Transkriptionsfaktors, was zu einer

nachfolgenden Induktion von AP-1 Zielgenen führt. Für eine Aktivierung von JNK sind die MAP2Kinasen MKK4/SEK1 und MKK7 verantwortlich. Für eine Aktivierung von JNK durch LMP1 wurde SEK1 als notwendige Kinase beschrieben (Kieser et al, 1997). Zu den MAPK3Ks, die zu einer Aktivierung von JNK beitragen können, gehört TAK1, das vor allem für Immunantworten induziert durch den TNFR, IL-1R und die TLR-Familie eine große Wichtigkeit besitzt (Huang et al, 2009; Sato et al, 2005; Shim et al, 2005). Auch der LMP1- und der CD40-Signalweg aktivieren JNK über TAK1 (Sato et al, 2005; Uemura et al, 2006; Wan et al, 2004).

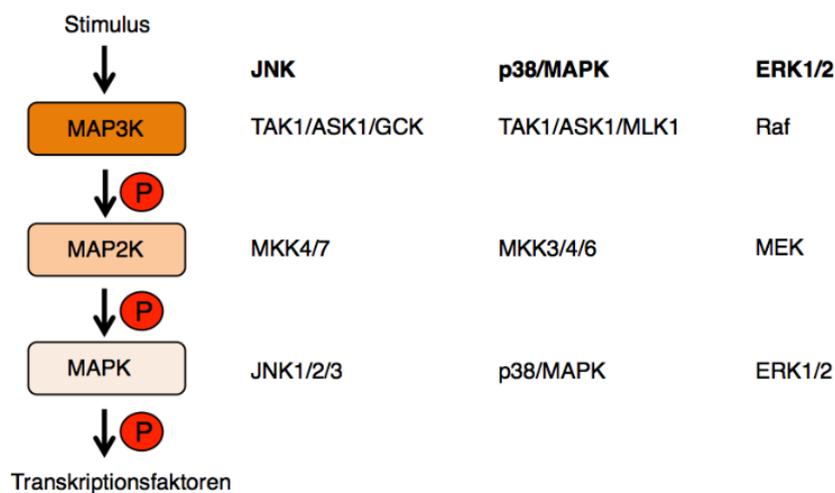


Abb. 4: Überblick über die MAPK-Signalkaskade. Nach einem externen Stimulus werden MAP3K durch kleine GTPasen oder einen spezifischen Signalkomplex aktiviert. MAP3K aktivieren MAP2K, welche wiederum MAPK phosphorylieren. Diese aktivieren wiederum Transkriptionsfaktoren. Abbildung modifiziert nach Kai Sterz (Sterz, 2013).

Innerhalb der CTAR2-Domäne von LMP1 befindet sich das P₃₇₉VQLSY Motiv, welches als TRADD-Bindesequenz bekannt ist (Izumi & Kieff, 1997; Schneider et al, 2008). Der Tyrosinrest an Position 384 ist dabei für die Aktivierung von JNK durch LMP1 essenziell (Eliopoulos & Young, 1998; Kieser et al, 1999; Kieser et al, 1997). Weiterhin wurde gezeigt, dass kein negativer Effekt auf die Aktivierung von JNK erreicht wird, wenn TRAF2, RIP oder TRADD in den Zellen mit Hilfe von RNAi herunterreguliert werden (Wan et al, 2004). Auch der Knockout von TRADD in humanen B-Zellen oder von TRAF2 in murinen B-Zellen führt zu keiner Beeinflussung des JNK-Signalweges, was zeigt, dass keines dieser Moleküle essenziell für eine Aktivierung von JNK durch LMP1 ist (Schneider et al, 2008; Xie & Bishop, 2004).

Unter Verwendung von Knockout Zellen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass TRAF6 und TAK1, nicht aber TAB2, für eine Aktivierung von JNK durch LMP1 notwendig sind (Wan et al, 2004). Auch die TAK1-Inhibition führte zu einer starken Reduktion in der LMP1-induzierten Phosphorylierung von JNK in HEK 293 Zellen (Uemura et al, 2006). Somit zeigen sich vor allem TRAF6 und TAK1 als essenzielle Proteine in der Aktivierung von JNK durch LMP1.

Weitere Studien beschreiben den durch LMP1 induzierten JNK-Signalweg als essenziell für die Transformation von Zellen. Die Inhibition von JNK durch den Inhibitor SP600125 und die Expression von dominant-negativem JNK führte dabei zur Blockierung der Proliferation von LMP1-transformierten Rat-1 Zellen und LCLs (Kutz et al, 2008). Auch die Tumorbildung in SCID Mäusen, welche mit LCLs xenotransplantiert wurden, ist nach Behandlung mit SP600125 signifikant reduziert (Kutz et al, 2008). Diese Studien zeigen, wie wichtig die Aktivierung von JNK durch LMP1 für die Transformation von Zellen ist. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte der genaue Mechanismus der Aktivierung von JNK durch LMP1 aufgeklärt werden, um potenzielle Kandidaten für Therapieansätze EBV-bedingter Erkrankungen zu identifizieren.

1.1.2.3 Die Rolle von IKK2 in der Signaltransduktion

Der IKK-Komplex stellt einen wichtigen Signalkomplex in verschiedenen Signalwegen dar. Wie bereits in Abschnitt 1.1.2.1 erwähnt, besteht der IKK-Komplex aus den beiden Kinasen IKK α (IKK1) und IKK β (IKK2), sowie der regulatorischen Untereinheit NEMO (IKK γ) (Israel, 2010; Solt et al, 2007). Für eine Aktivierung von NF- κ B durch eine Stimulation mit den pro-inflammatorischen Zytokinen TNF (*tumor necrosis factor*) oder Interleukin-1 (IL-1), ist der IKK-Komplex essenziell (Solt et al, 2007). Die Induktion des kanonischen NF- κ B-Signalweges nach TNF α -Stimulation zeigt eine Abhängigkeit von NEMO und IKK2, während IKK1 vernachlässigbar ist (Solt et al, 2007). Jedoch zeigte sich dieser Effekt nicht in allen Signalwegen. So konnte im IL-1 Signalweg auch in Abwesenheit von IKK2 der kanonische NF- κ B-Signalweg aktiviert werden. Unter IL-1 reicht ein Komplex zwischen NEMO und IKK1 aus, um eine Degradation von I κ B α hervorzurufen (Solt et al, 2007).

Im LMP1-Signalweg wurde die Bedeutung von IKK2 bei der Aktivierung von NF- κ B unterschiedlich beschrieben. Einerseits wurde in mehreren Arbeiten gezeigt, dass IKK2 essenziell für eine Aktivierung von NF- κ B durch die CTAR2-Domäne von LMP1 ist (Boehm et al, 2010; Gewurz et al, 2012; Luftig et al, 2003). Trotzdem konnte nach Knockdown von IKK2 in HEK293 Zellen die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalweges nachgewiesen werden (Gewurz et al, 2012). IKK1 scheint zumindest in manchen Situationen die Funktion von IKK2 übernehmen zu können.

Neben der Rolle von IKK2 im kanonischen NF- κ B-Signalweg wurde bisher noch keine weitere Funktion von IKK2 in der LMP1-Signalkaskade beschrieben. Ob IKK2 an weiteren Stellen in der Signaltransduktion der Zelle eingreift, sollte in der vorliegenden Arbeit aufgeklärt werden.

Wie genau der Aktivierungsmechanismus von IKK2 in verschiedenen Signalwegen aussieht, war lange Zeit unklar. Im Jahr 2001 konnten Wang et al. zeigen, dass der TAK1-Kinasekomplex in der Lage ist, IKK2 zu phosphorylieren und zu aktivieren (Wang et al, 2001). Für eine vollständige Aktivierung von IKK2 im TNF-, IL-1- oder TLR-Signalweg sind dabei zwei verschiedene Phosphorylierungen notwendig. Zuerst findet eine durch die TAK1-Kinase induzierte Phosphorylierung an Serin 177 von IKK2 statt, welche von einer durch IKK2 katalysierten Autophosphorylierung an Serin 181 gefolgt wird (Zhang et al, 2014a). Erst diese beiden Phosphorylierungen erlauben es IKK2, seine Substrate, wie z.B. I κ B α oder TPL2, zu phosphorylieren. Inwieweit die Aktivierung von IKK2 im TNF-, IL-1- und TLR-Signalweg sich mit dem Aktivierungsmechanismus im LMP1-Signalweg ähneln, soll weiterhin in dieser Arbeit analysiert werden.

Neben der beschriebenen Funktion von IKK2 in der Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalweges ist keine weitere Rolle der Kinase IKK2 in der Induktion weiterer Signalkaskaden wie z.B. den MAPK beschrieben.

1.1.3 Die Aufspaltung des kanonischen NF- κ B- und JNK-Signalweges in der LMP1-Signaltransduktion

Für die CTAR2-abhängige Aktivierung von JNK und NF- κ B ist bekannt, dass beide Signalwege die gleiche Kernsequenz des LMP1-Pseudorezeptors, bestehend aus den Aminosäuren P₃₇₉- Y₃₈₄, benötigen (Floettmann & Rowe, 1997; Kieser et al,

1999; Schneider et al, 2008). Die letzten 16 C-terminalen Aminosäuren von LMP1-CTAR2 (Aminosäuren 371-386) sind dabei ausreichend, um JNK und den kanonischen NF- κ B-Signalweg zu induzieren, weshalb sie für die LMP1-spezifische Signaltransduktion bestimmend sind (Schneider et al, 2008). Außerdem ist sowohl im JNK- als auch im kanonischen NF- κ B-Signalweg TRAF6 eines der wichtigsten involvierten Signalproteine. Beide Signalwege gehen somit vom selben proximal des Rezeptors gelegenen Signalkomplexes aus und spalten sich erst nachgeschaltet auf. Tatsächlich konnten Shkoda et al. die Keimzentrumskinasen TNIK (*TRAF2- and Nck-interacting kinase*) als einen wichtigen Mediator des LMP1-induzierten NF- κ B- und JNK-Signalweges identifizieren (Shkoda et al, 2012). In Überexpressionsstudien wurde gezeigt, dass die Deletion der N-terminalen Kinasedomäne von TNIK einen Verlust der Fähigkeit zur Induktion des kanonischen NF- κ B-Signalweges nach sich zieht, jedoch die Aktivierung von JNK nicht beeinträchtigt ist. Weiterhin reichte allein die Expression der Kinasedomäne von TNIK in Anwesenheit von endogenem TNIK aus, um den kanonischen NF- κ B-Weg anzuschalten, während JNK nur durch die Expression der GCKH-Domäne (*germinal center kinase homology domain*) induziert werden konnte (Abb. 5) (Shkoda et al, 2012).

Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass TNIK mit TAK1 und TAB2 einen Komplex bilden kann (Shkoda et al, 2012). Vor allem TAK1 ist dabei essenziell für eine Aktivierung von JNK durch LMP1, wie in Abschnitt 1.1.2.2 bereits erwähnt wurde. Die Assoziation von TNIK mit LMP1 erfolgt über TRAF6, wobei TNIK direkt mit TRAF6 interagieren kann (Shkoda et al, 2012). Alle diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass TNIK eine wichtige Rolle im LMP1-Signalweg spielt. In Abbildung 5 sind die wichtigsten Hypothesen zur Funktion von TNIK im LMP1-Signalweg aus der Arbeit von Shkoda et al. zusammengefasst. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit soll besonders auf die Beziehung zwischen TNIK und seinem Interaktionspartner TRAF6 näher eingegangen werden.

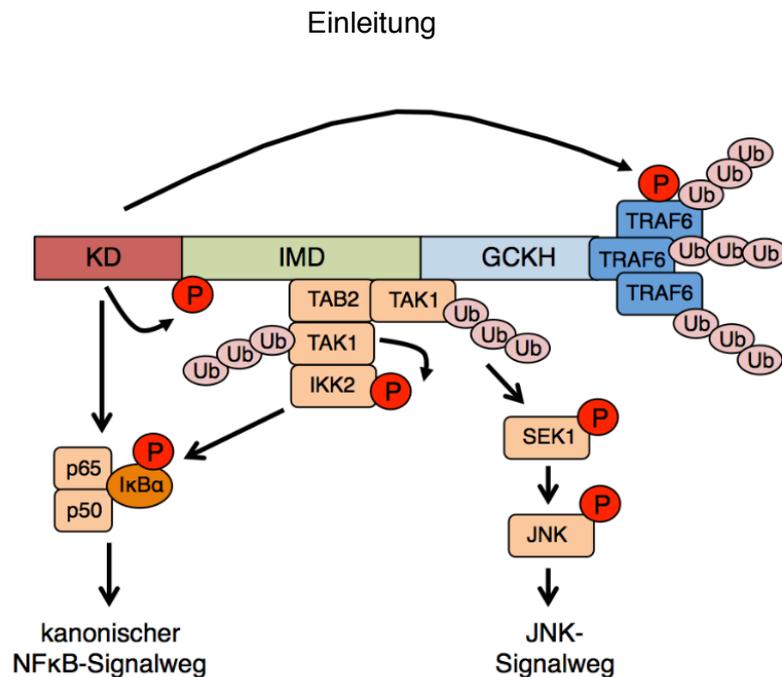


Abb. 5: Modell des TNIK-Signalkomplexes und die Aufspaltung von NF-κB und JNK. TNIK ist in der Lage sich selbst und TRAF6 zu phosphorylieren (Shkoda et al, 2012). Die Bindung von TRAF6 an die Intermediärdomäne (IMD) von TNIK induziert die K63-verknüpfte Ubiquitinierung von TRAF6 und die Interaktion von TRAF6 mit der GCKH-Domäne. TAK1 interagiert mit der Intermediär- und GCKH-Domäne von TNIK und wird durch K63-verknüpfte Ubiquitinketten durch TRAF6 aktiviert (Fan et al, 2010; Hirata et al, 2017). Dieses aktivierte TAK1 ist für die Aktivierung des NF-κB- und JNK-Signalweges notwendig. Die Induktion von NF-κB ist abhängig von der Kinasedomäne (KD) von TNIK. Dieser Signalweg wird durch die Phosphorylierung von IKK2 eingeleitet, welches dann IκBα phosphorylieren kann. IκBα kann proteasomal degradiert werden und p65-p50 NF-κB-Transkriptionsfaktoren werden freigesetzt. Der JNK-Signalweg wird entgegen des NF-κB-Signalweges über die GCKH-Domäne induziert. Dabei findet eine Phosphorylierung von SEK1 und JNK statt. Abbildung modifiziert nach Town 2012 (Town, 2012).

1.2 Die Keimzentrumskinasen TNIK

1.2.1 Überblick über die Familie der Keimzentrumskinasen

TNIK gehört zu der *sterile 20* (Ste20) Kinasefamilie, welche aus 28 Protein-Serin/Threoninkinasen im Menschen besteht (Dan et al, 2001). Die Ste20 Kinasefamilie wird weiter unterteilt in *p21-activated protein kinases* (PAKs) und Keimzentrumskinasen (*germinal center kinases*, GCK) (Dan et al, 2001). TNIK gehört dabei zu der GCK-Subfamilie IV zusammen mit weiteren Kinasen wie *Nck-interacting kinase* (NIK), *Misshapen-NIKs-related kinase* (MINK1), *HPK/GCK-like kinase* (HGK) und *Nck-interacting kinase (NIK)-related kinase* (NRK)/*NIK-like embryo-specific kinase* (NESK) (Dan et al, 2001). Die Mitglieder der GCK IV Subfamilie zeichnen sich durch eine N-terminale Kinasedomäne, eine hoch variable Intermediärdomäne mit mehreren Prolin-reichen Motiven und einer C-terminalen *Germinal center kinase homology* (GCKH)-Domäne aus (Dan et al, 2001).

1.2.2 Struktur und Funktion von TNIK

TNIK besteht insgesamt aus 1360 Aminosäuren und besitzt ein scheinbares Molekulargewicht von 155 kDa. Die N-terminale Kinasedomäne (KD) umfasst dabei die Aminosäuren 1-306, die Intermediärdomäne (IMD) die Aminosäuren 307-1017 und die C-terminale GCKH-Domäne die Aminosäuren 1018-1360 (Fu et al, 1999). Die Kinase- und die GCKH-Domäne von TNIK weisen eine hohe Sequenzhomologie auf Proteinebene zu anderen GCKs wie HGK, NIK und MINK1 auf (Abb. 6). Die Intermediärdomäne hingegen zeigt eine höhere Variabilität mit einer niedrigeren Homologie (Fu et al, 1999). Durch alternatives Spleißen entstehen acht Isoformen von TNIK, wobei die Anzahl der exprimierten Isoformen zwischen unterschiedlichen Geweben variieren kann (Fu et al, 1999). Insgesamt wird TNIK allerdings ubiquitär exprimiert, wobei Northern Blot Analysen zeigen, dass die höchsten Level an TNIK mRNA in Herz, Gehirn, Skelettmuskeln und T-Zellen zu finden sind (Fu et al, 1999).

KD	IMD	GCKH	TNIK
95%	< 53 %	95 %	Sequenz- homologie
KD	IMD	GCKH	MINK1

Abb. 6: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von TNIK und MINK1. TNIK und MINK1 weisen in der Kinasedomäne (KD) und der *Germinal center kinase homology* Domäne (GCKH) eine hohe Sequenzhomologie von etwa 95 % auf Proteinebene auf. Die Intermediärdomäne (IMD) zeigt hingegen mehr Diversität.

Identifiziert wurde TNIK als Protein, welches mit TRAF2 und Nck über die Intermediärdomäne interagieren kann und eine Rolle bei der Reorganisation des Zytoskeletts spielt (Fu et al, 1999). Ebenfalls über die Intermediärdomäne von TNIK konnte eine Interaktion mit Nedd4-1 (*neuronal precursor cell expressed and developmentally downregulated protein*) und β -Catenin identifiziert werden (Kawabe et al, 2010; Mahmoudi et al, 2009). Für TNIK wurden bisher hauptsächlich Funktionen im Zytoskelett, im Neuritenwachstum im Gehirn und im Wnt-Signalweg vor allem in Bezug auf Kolontumore beschrieben.

Einleitung

TNIK wirkt bei der Regulation des Zytoskeletts mit. Dabei verursacht eine Überexpression von TNIK eine auffällige Änderung der Zellmorphologie, ohne dass Apoptose induziert wird (Fu et al, 1999). Es wird angenommen, dass eine Zerstörung der intrazellulären Aktinstruktur diese Morphologieänderung hervorruft und TNIK dabei durch die Phosphorylierung von Gelsolin eine Rolle spielen könnte (Fu et al, 1999). Bei der Regulation des Zytoskeletts spielt die Autophosphorylierung von TNIK eine Rolle. Die Autophosphorylierung von TNIK an K54 wird durch Rap2 gefördert und induziert die Translokation von TNIK in die NP-40-unlösliche Zytoskelett-Fraktion. Rap2 interagiert dabei mit der GCKH-Domäne von TNIK und verstärkt die inhibitorische Funktion von TNIK auf die Ausbreitung der Zellen (Taira et al, 2004).

TNIK ist weiterhin in der Regulation des Wnt-Signalweges involviert (Mahmoudi et al, 2009; Shitashige et al, 2010). Die Aktivierung des Wnt-Rezeptors führt zu einer Stabilisierung von β -Catenin, welches in den Zellkern translozieren kann und dort einen Komplex mit TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren bildet und als transkriptioneller Koaktivator dient. Eine Deregulation des Wnt-Signalweges wird mit verschiedenen humanen malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Polakis, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass TNIK durch die Aktivierung des Wnt-Signalweges an Serin 764 autophosphoryliert wird. Phosphoryliertes TNIK kann anschließend in den Zellkern translozieren und dort mit dem TCF4/ β -Catenin-Transkriptionskomplex interagieren. Dort phosphoryliert und aktiviert TNIK den TCF4-Transkriptionsfaktor (Mahmoudi et al, 2009; Shitashige et al, 2010).

Außerdem wurden verschiedene Funktionen von TNIK im Gehirn bzw. neuronalen Zellen beschrieben. Die Keimzentrumskinasen MAP4K4, MINK1 und TNIK konnten als Regulatoren des JNK-Signalweges in Neuronen identifiziert werden (Larhammar et al, 2017). Dabei agieren die Keimzentrumskinasen redundant in der Aktivierung von DLK und der stromabwärts befindlichen JNK-abhängigen Phosphorylierung von c-Jun als Stressantwort. Die Herunterregulation von allen drei Keimzentrumskinasen gleichzeitig reicht aus, um Neuronen wirkungsvoll vor Degeneration zu schützen (Larhammar et al, 2017). TNIK kann außerdem an Proteinkomplexe am NMDA (*N-methyl-D-aspartate*)-Rezeptor über AKAP9 in Synapsen von Hippocampus-Zellen in Mäusen binden (Coba et al, 2012). Ein TNIK-Knockout in Mäusen verursachte dabei Beeinträchtigungen in der Neurogenese des

Gyrus dentatus und der kognitiven Funktion der Tiere (Coba et al, 2012). Für TNIK und sein Homologes MINK1 wurde gezeigt, dass diese mit Rap2 einen Komplex bilden können, was für das Wachstum von Dendriten und für eine normale Dendritenverzweigung essenziell ist (Hussain et al, 2010; Kawabe et al, 2010). Der von MINK1 vermittelte Effekt auf die neuronale Komplexität ist abhängig von Rap2, während TNIK unabhängig von der Rap2-Aktivität einen Einfluss auf die neuronale Komplexität hat (Hussain et al, 2010). Beide Keimzentrumskinasen sind also in der Regulation von neuronalen Strukturen involviert, nehmen aber keine komplett redundanten Funktionen dabei ein.

Die Überexpression von TNIK ist in der Lage, den JNK-Signalweg in Phoenix-A Zellen zu aktivieren (Fu et al, 1999). Dabei erfolgt die Aktivierung allein über die GCKH-Domäne und unabhängig von der Kinasedomäne (Fu et al, 1999). Ähnliche Beobachtungen konnten von Shkoda et al. gemacht werden, wobei es gelang TNIK als einen LMP1-Interaktionspartner mittels funktioneller Proteomik zu identifizieren. Auch hier stellte sich die GCKH-Domäne von TNIK als wichtig für eine Aktivierung von JNK im LMP1-Signalweg heraus (Shkoda et al, 2012). Außerdem besitzt die Kinasedomäne von TNIK eine Rolle in der kanonischen Aktivierung von NF- κ B nach Induktion durch LMP1, wobei neben der Kinasedomäne die Expression von endogenem TNIK erforderlich ist um IKK2 zu aktivieren. Es wird angenommen, dass sich die beiden Signalwege JNK und NF- κ B auf Höhe von TNIK aufspalten (siehe Abschnitt 1.1.3) (Shkoda et al, 2012). Die Rekrutierung von TNIK an LMP1 wird dabei durch TRAF6 vermittelt. Weiterhin war TNIK für die Proliferation und das Überleben von EBV-transformierten B-Zellen notwendig. TNIK ist dabei in der Lage einen aktivierungsinduzierten Komplex mit den Signalmolekülen TRAF6, TAK1, TAB2 und IKK β einzugehen und die Bildung des Signalosoms an LMP1 zu koordinieren (Abb. 5) (Shkoda et al, 2012). Auch für den CD40-vermittelten Signalweg konnte eine Abhängigkeit der Signalwege JNK und NF- κ B von TNIK bestätigt werden (Shkoda et al, 2012).

1.2.3 Die Rolle von TNIK in der Kazinogenese

Vor allem in den letzten Jahren veröffentlichte Arbeiten deuten auf eine Rolle von TNIK in verschiedenen Krebsentitäten hin. Außerdem wurde TNIK als ein potenzielles Target für neue Krebstherapien postuliert. Der bisherige Schwerpunkt

Einleitung

der Publikationen lag dabei auf der Identifizierung der Rolle von TNIK bei der Entstehung von Kolonkarzinomen.

Im Jahr 2009 wurde TNIK erstmals von Mahmoudi et al. als Aktivator von Wnt-Zielgenen in Kolonkarzinomzellen identifiziert und als potenzielles Ziel für die Medikamentenentwicklung gegen kolorektale Tumore beschrieben (Mahmoudi et al, 2009). Für das Auswachsen kolorektaler Karzinome war TNIK dabei essenziell. Außerdem konnte mit Hilfe des TNIK-Inhibitors NCB-0846 die Wnt-vermittelte intestinale Tumorigenese in Mäusen sowie die Tumorbildung in kolorektalen Tumorzellen gehemmt werden (Masuda et al, 2016). In Patienten mit kolorektalen Karzinomen war zusätzlich ein rückfallfreies Überleben signifikant verschlechtert, wenn eine hohe Expression von TNIK im Gewebe vorliegt (Takahashi et al, 2015). Somit stellt die Keimzentrumsinkinase TNIK für kolorektale Karzinome einen vielversprechenden Kandidaten dar, um neue Therapieansätze zu entwickeln.

Neben der Rolle von TNIK in kolorektalen Tumoren wurde die Keimzentrumsinkinase auch im Zusammenhang mit anderen Tumorentitäten beschrieben. In Studien mit etablierten Tumorzelllinien wurde im Jahr 2016 die Funktion von TNIK in der multiplen Myelom-Zelllinie IM-9 untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine Behandlung der Zellen mit siRNA gegen TNIK oder dem Chemotherapeutikum Dovitinib die Zellproliferation der Krebszellen signifikant reduzierte (Chon et al, 2016). In dieser Studie führte Dovitinib zu einer starken Inhibition der TNIK-Interaktion mit ATP und der Aktivierung wichtiger Wnt-Signalmoleküle, wie β -Catenin und TCF4 (Chon et al, 2016). Weitere Studien an Leukämie-Stammzellen der chronischen myeloischen Leukämie zeigten, dass der dort aktivierte CD27-Signalweg die Expression von Wnt-Zielgenen durch eine gesteigerte nukleäre Lokalisation von aktivem β -Catenin und TNIK erhöht. Dies führt zu einer gesteigerten Proliferation und Differenzierung der Stammzellen (Schurch et al, 2012). In Multiplen Myelom Zellen wurde eine weitere Studie mit dem TNIK-Inhibitor KY-05009 durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass eine Inhibition von TNIK sowie die Behandlung der Zellen mit dem Medikament Dovitinib eine Senkung der IL-6-stimulierten Proliferation sowie eine Induktion der Apoptose durch Inhibition des Wnt-Signalweges zur Folge hat (Lee et al, 2017). Auch in dieser Tumorentität wird TNIK als ein potenzielles Ziel für Krebstherapien postuliert. Weiterhin zeigte der TNIK-Inhibitor KY-05009 signifikante Effekte auf die Epitheliale-mesenchymale

Transition (EMT), welche für eine Metastasierung von Tumoren von großer Bedeutung ist (Kim et al, 2014). Der Inhibitor KY-05009 ist ein Aminothiazol-Inhibitor, der die Kinaseaktivität der Keimzentrumskinase TNIK hemmt, indem er die Bindung von ATP an TNIK blockiert (Kim et al, 2014). Kim et al. zeigten, dass KY-05009 in der Gelenk-Region des TNIK-Proteins bindet und in der Lage ist, die TGF β -aktivierte EMT in der Lungenkarzinomzelllinie A549 zu inhibieren (Kim et al, 2014). Sowohl der Smad-abhängige als auch der nicht-Smad-abhängige Signalweg einschließlich Wnt, NF- κ B und der MAPKinasen ERK und JNK wurden durch eine Inhibition von TNIK in A549 Zellen gehemmt (Kim et al, 2014). TNIK erwies sich somit auch hier als potenzieller Ansatzpunkt für Therapieansätze, um EMT-basierte Erkrankungen wie die Metastasierung von soliden Tumoren zu behandeln.

In Studien an Patientenproben verschiedener solider Tumore wurde TNIK außerdem als prognostischer Marker beschrieben. So konnte in Patientenproben hepatozellulärer Karzinome das Auftreten einer phosphorylierten und aktivierten Form von TNIK mit einer schlechteren Prognose der Patienten korreliert werden. TNIK kommt damit als Kandidat für einen prognostischen Marker für hepatozelluläre Karzinome in Frage (Jin et al, 2014). In Pankreastumoren weisen hohe Level von TNIK mRNA und Protein im Gewebe auf eine schlechte Prognose der Patienten hin (Zhang et al, 2016). Eine hohe Expression von TNIK korreliert dabei direkt mit einem kürzeren Gesamt- und krankheitsfreien Überleben der Patienten (Zhang et al, 2016). In follikulären Lymphomen ist TNIK eines der regelmäßig wiederkehrenden mutierten Gene (Pasqualucci et al, 2014).

Insgesamt zeigen somit zahlreiche Studien, dass TNIK besonders im Tumorgewebe häufig stark exprimiert vorliegt und die Keimzentrumskinase in verschiedenen Tumorentitäten als ein prognostischer Marker dienen kann. Außerdem konnten bereits in einigen Tumorzelllinien signifikante Effekte auf tumorrelevante Prozesse wie die EMT oder auf die Regulation des Wnt-Signalweges beschrieben werden. Viele Aspekte, wie TNIK in die Tumorigenese eingreift und in welchen Tumorentitäten die Keimzentrumskinase involviert ist, sind jedoch noch unbekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb in einem *Screening* geklärt werden, ob TNIK einen Einfluss auf Parameter wie Proliferation, Apoptose und die Migrationsfähigkeit in ausgewählten Tumorzelllinien verschiedener Tumorentitäten hat.

1.3 Das Signalmolekül TRAF6

1.3.1 Die Familie der TRAF-Proteine

Das Signalmolekül TRAF6 gehört zur TRAF-Proteinfamilie, welche eine Gruppe von interzellulären Adapterproteinen beschreibt, die mit verschiedenen Rezeptoren interagieren können und somit essenziell für die Initiierung von interzellulären Signalwegen sind. Sowohl bei der TNF-Rezeptor-Familie, der Interleukin-1 Rezeptor/Toll-like-Rezeptor (IL-1R/TLR) Familie und bei LMP1 werden Signalwege über TRAFs weitergeleitet (Chung et al, 2002; Ha et al, 2009; Rothe et al, 1994; Xie, 2013). Eine wichtige Funktion der TRAF-Proteine ist die Bildung von Rezeptor-assoziierten Signalkomplexen, welche Rezeptoren mit abwärts gelegenen Effektor-Enzymen verbinden (Xie, 2013). TRAFs können als Mono- oder Oligomere agieren und sind somit in vielseitigen zellulären Prozessen beteiligt, wie z.B. dem Zellüberleben, Proliferation, Differenzierung, Aktivierung, Cytokinproduktion oder auch Autophagie (Xie, 2013). In Säugetieren sind sechs TRAF-Proteine (TRAF1-6) bekannt. Es ist außerdem noch ein TRAF7 beschrieben, welches jedoch im Gegensatz zu den anderen TRAF-Proteinen keine TRAF-Homologiedomäne aufweist (Xie, 2013). Mit Ausnahme von TRAF1 besitzen alle TRAFs eine N-terminale RING-Fingerdomäne, gefolgt von einer variablen Anzahl von Zink-Fingern. Beide Motive tragen zur Aktivierung von Signalwegen durch die Interaktion mit anderen Proteinen bei (Bradley & Pober, 2001). Dabei kann die RING-Domäne zusätzlich als E3-Ubiquitin-Ligase agieren, was für TRAF6 und TRAF2 gezeigt werden konnte (Chen, 2005). Für die Ubiquitin-Ligase-Funktion von TRAF6 konnte eine Funktion in der Signaltransduktion von Rezeptoren der TIR-Familie (Toll-/IL-1-Rezeptor) und von LMP1 nachgewiesen werden (Lamothe et al, 2007; Schultheiss et al, 2001). Die TRAF2-induzierte K63-Ubiquitinierung der cIAPs stellt einen wichtigen Schritt im nicht-kanonischen NF- κ B-Signalweg dar (Karin & Gallagher, 2009). Eine Eigenschaft, die alle TRAF-Proteine (TRAF1-6) aufweisen, ist eine C-terminale TRAF-Domäne. Diese TRAF-Domäne besteht aus einer N-terminalen *coiled-coil*-Region (TRAF-N) und einer C-terminalen β -*Sandwich*-Region (TRAF-C) (Abb. 7). Die Aufgabe der TRAF-Domäne besteht darin, die Protein-Protein-Interaktion zu steuern. Dazu zählen neben der Interaktion der TRAFs mit anderen

Signalmolekülen auch die Homo- oder Heterooligomerisation von TRAFs untereinander (Ha et al, 2009; Park et al, 1999; Pullen et al, 1998; Xie, 2013).

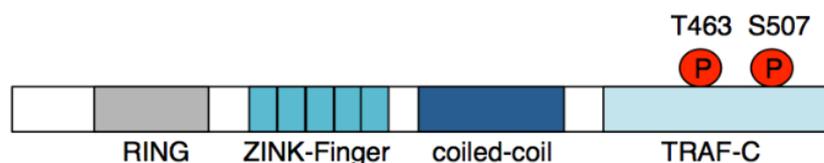


Abb. 7: Schematische Darstellung der Struktur des TRAF6-Proteins. Im N-terminalen Bereich befindet sich die RING-Domäne und die ZINK-Finger-Motive. Der C-terminale Bereich umfasst die TRAF-Domäne, welche sich aus der Coiled-Coil und der TRAF-C-Domäne zusammensetzt. In der TRAF-C Domäne befinden sich die Aminosäuren Threonin 463 und Serin 507, welche durch TNIK phosphoryliert werden können.

1.3.2 Die Rolle von TRAF6 bei der Aktivierung von NF- κ B und JNK im LMP1-Signalweg

Unter den sieben identifizierten TRAF-Proteinen nimmt TRAF6 eine wichtige Rolle in der LMP1-Signaltransduktion ein. Das Anschalten von Signalwegen über die CTAR2-Domäne von LMP1 ist, im Gegensatz zur CTAR1-Domäne, völlig von dem Signalprotein TRAF6 abhängig (Luftig et al, 2003; Schneider et al, 2008; Schultheiss et al, 2001; Wan et al, 2004). TRAF6 vermittelt die Aktivierung von JNK und p38, sowie dem kanonischen NF- κ B-Signalweg (Luftig et al, 2003; Schneider et al, 2008; Schultheiss et al, 2001; Soni et al, 2007; Wan et al, 2004). Experimente in embryonalen TRAF6-defizienten Mausfibroblasten bestätigten, dass LMP1 ohne TRAF6 nicht in der Lage ist, JNK, p38 und IKK β zu aktivieren, sowie die nukleäre Translokation von p65/RelA zu induzieren (Luftig et al, 2003; Schultheiss et al, 2001; Wan et al, 2004; Wu et al, 2006b). Weiterhin wurde das Fusionsprotein CD40-LMP1, bestehend aus der extrazellulären und Transmembrandomäne von CD40 und der intrazellulären Signaldomäne von LMP1, in TRAF6-defizienten murinen B-Zellen getestet. Auch in diesem Zellsystem führte ein Verlust von TRAF6 zu einer Inhibition des JNK-, kanonischen NF- κ B- und p38-Signalweges nach Induktion durch LMP1 (Arcipowski et al, 2011). Eine dominant-negative TRAF6-Mutante, welcher die RING-Domäne fehlt, zeigte außerdem eine Reduktion der von NF- κ B abhängigen Gentranskription induziert durch CTAR2 (Schultheiss et al, 2001). Auch wenn die zentrale Rolle von TRAF6 in der Induktion der Signalwege unter LMP1

beschrieben werden konnte, war der Mechanismus, durch welchen TRAF6 an LMP1 rekrutiert wird, lange unklar. Durch Fabian Giehler konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass TRAF6 direkt über das P₃₇₉VQLSY Motiv an CTAR2 bindet (Kieser & Sterz, 2015). Außerdem scheinen die Faktoren BS69 und TRADD diesen Komplex an CTAR2 weiter zu stabilisieren (Schneider et al, 2008; Wan et al, 2006).

In der LMP1-Signalkaskade spielt TRAF6 außerdem eine Rolle in der Rekrutierung der Keimzentrumskinase TNIK. Dabei ist TNIK an der Bildung des TRAF6/TAB/TAK1/IKK2-Komplexes und der Aktivierung des kanonischen NF- κ B- und JNK-Signalweges beteiligt (Shkoda et al, 2012).

1.3.3 Sekundäre Modifikationen von TRAF6

Zu den sekundären Proteinmodifikationen des TRAF6-Proteins gehören unter anderem die Ubiquitinierung und Phosphorylierung.

Die Verknüpfung von Ubiquitinmolekülen spielt dabei eine wichtige Rolle in Signalkaskaden, welche durch TRAF6 vermittelt werden. Über drei enzymatische Schritte kann das 76 Aminosäuren große Polypeptid Ubiquitin kovalent an Proteine gekoppelt werden (Chen, 2005; Skaug et al, 2009). Dabei wird in einer ATP-abhängigen Reaktion Ubiquitin über das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) aktiviert. Danach wird das Ubiquitin auf den Cysteinrest eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) übertragen, bevor es durch eine Ubiquitin-Protein Ligase (E3), wie z.B. TRAF6, auf das Zielprotein übertragen werden kann (Chen, 2005; Skaug et al, 2009). Es können Polyubiquitinketten durch kovalente Koppelung an Lysinreste eines anderen Ubiquitinmoleküls gebildet werden. Dabei legt die Art der Verknüpfung innerhalb der Ubiquitinkette verschiedene Funktionen für das Zielprotein fest. Beispielsweise führt eine Lysin 48 (K48)-verknüpfte Polyubiquitinierung zu einer proteasomalen Degradation des Proteins (Chen, 2005). Im Gegensatz dazu stellt eine K63-verknüpfte Ubiquitinierung einen wichtigen Schritt in verschiedenen zellulären Prozessen dar. Es ist bekannt, dass diese Art der Ubiquitinierung von Proteinen als Rezeptor-Internalisierung, zur Vesikelweiterleitung, DNA-Reparatur, Stressantwort und als Bindeplattform für verschiedene Signalmoleküle dient (Ning et al, 2008; Walsh et al, 2008).

Die K63-verknüpfte Autoubiquitinierung von TRAF6 stellt einen Schlüsselschritt in der TRAF6-Signaltransduktion dar. Die generierten K63-Ubiquitinketten an TRAF6 scheinen dabei Bindestellen für weitere Signalkomponenten darzustellen (Krappmann & Scheidereit, 2005). In unserem Labor wurde durch einen siRNA vermittelten Knockdown von TNIK gezeigt, dass TNIK eine Rolle bei der K63-verknüpften Autoubiquitinierung im LMP1- und CD40-Signalweg spielt (Town, 2012). Welche genaue Funktion TNIK in dem Prozess der Ubiquitinierung innehat, konnte bis jetzt jedoch noch nicht gezeigt werden.

Die Phosphorylierung ist die am häufigsten untersuchte Art der posttranslationalen Proteinmodifikationen. Eine Phosphorylierung kann die Aktivität von Proteinen ändern, die Protein-Protein-Interaktion modifizieren, aber auch positive oder negative Effekte auf andere posttranslationale Proteinmodifikationen haben (Hunter, 2007).

Jennifer Town konnte 2012 zwei bis dahin unbekannte Phosphorylierungsstellen von TRAF6 mit Hilfe von Massenspektrometrie identifizieren, die durch TNIK phosphoryliert werden (Town, 2012). Dabei handelt es sich um Threonin 463 (T463) und Serin 507 (S507) (Abb. 7). Welche biologische Funktion diesen identifizierten, durch TNIK vermittelten Phosphorylierungsstellen von TRAF6 zukommt, muss jedoch noch gezeigt werden.

Neben TNIK sind auch weitere Kinasen bekannt, die TRAF6 phosphorylieren können. Beispielsweise kann MST4 direkt mit TRAF6 interagieren und das Adaptermolekül phosphorylieren, was die Oligomerisation und Autoubiquitinierung von TRAF6 verhindert (Jiao et al, 2015). In murinen Zellen ist MST4 dabei in der Lage, eine Phosphorylierung von TRAF6 an Threonin 463 und Threonin 486 zu induzieren (Jiao et al, 2015). MST4 besitzt damit über die Interaktion und die Phosphorylierung von TRAF6 eine negativ regulatorische Rolle auf den NF- κ B-Signalweg und verhindert übermäßige Entzündungsantworten in den Zellen. Da TNIK wie auch MST4 zur Familie der Keimzentrumskinasen gehört, könnte TNIK ähnliche Funktionen wie MST4 in der Zelle haben. Ob TNIK beispielsweise auch an der Autoubiquitinierung von TRAF6 beteiligt ist und welche Rolle die durch TNIK induzierten Phosphorylierungen an TRAF6 spielen, sollte in der vorliegenden Arbeit betrachtet werden.

Auch RSK2 kann TRAF6 an Serin 46, 47 und 48 phosphorylieren und steuert die K63-Ubiquitinierung von TRAF6 (Yao et al, 2018). Die durch RSK2 generierte Phosphorylierung von TRAF6 induziert den durch K63-Ubiquitinierung vermittelten Entzündungssignalweg, was durch Immunpräzipitationen in Zelllinien mit einem Knockdown von RSK2 und in Kolongewebe aus RSK2-Knockout Mäusen gezeigt werden konnte. Entzündungssignalwege wie IKK α/β , p38 und JNK waren betroffen (Yao et al, 2018).

1.4 Die Serin/Threonin-Kinase TPL2

1.4.1 Struktur und Funktion von TPL2

Der *Tumor progression locus 2* (TPL2), auch bekannt als COT oder MAP3K8, ist eine Mitogen-aktivierte Proteinkinase, die in viele verschiedene Rezeptorwege, wie dem TLR-, TNFR- und IL1R-Signalweg, involviert ist (Xu et al, 2018). MAPK arbeiten in einer hierarchischen Kaskade, in welcher MAP3Ks wie TPL2 durch eine Serin/Threonin-Phosphorylierung MAP2Ks aktivieren, die wiederum MAPKs durch duale Phosphorylierung von einem Thr-X-Tyr Motif anschalten können (siehe Abschnitt 1.1.2.2) (Gantke et al, 2011a). Das TPL2-Gen kodiert für zwei Isoformen, die 52kDa- und 58kDa-Variante, welche in Zellen exprimiert werden können (Gantke et al, 2011b). Diese beiden Isoformen entstehen während der Translation durch alternative translationale Startstellen an Methionin 1 und Methionin 30. Beide TPL2-Varianten werden hauptsächlich im Zytoplasma exprimiert, wobei die 58kDa-Variante eine kürzere Lebensdauer, jedoch ein höheres transformierendes Potenzial aufweist (Aoki et al, 1993). Die hauptsächliche Funktion von TPL2 liegt in der Aktivierung der MAPK ERK durch eine direkte Phosphorylierung und Aktivierung von MEK (Vougioukalaki et al, 2011). Jedoch konnte bisher ein noch breiteres Substratspektrum von TPL2 identifiziert werden. In Überexpressionsstudien und IL-1- bzw. TNF-Stimulationen in murinen TPL2-Knockout Fibroblasten wurde nachgewiesen, dass TPL2 nicht nur ERK, sondern zu einem geringen Maße auch JNK und die p38- und ERK5-Signalwege durch eine direkte Phosphorylierung der aufwärtsgelegenen MAP2K (MKK4, MKK6, MEK5) aktivieren kann (Das et al, 2005; Salmeron et al, 1996; Vougioukalaki et al, 2011). TPL2 kann außerdem die Aktivierung von NF- κ B regulieren, wobei dies in einer

Einleitung

Zelltyp- und Stimulusabhängigen Weise passiert (Das et al, 2005). TPL2 agiert im TNF-, IL-1, TLR-, CD40-, IL17R (*interleukin-17 receptor*)- und einigen GPCR (*G protein-coupled receptor*)- Signalwegen (Xu et al, 2018).

Der C-Terminus des TPL2-Proteins trägt eine Degron-Sequenz (AA 435-457), welche das Protein zur proteasomalen Degradation steuert (Vougioukalaki et al, 2011). Das NF- κ B-Protein p105 kann die Degron-Sequenz binden und führt somit zu einer Stabilisierung von TPL2, welches in Folge nicht mehr abgebaut werden kann. Außerdem bindet p105 auch die Kinasedomäne von TPL2, welche sich zentral im Protein befindet. Die p105-Bindung verhindert somit den Zugang der Kinase zu seinen Substraten und hält TPL2 in einem inaktiven Zustand (Vougioukalaki et al, 2011).

In unstimulierten Zellen liegt TPL2 in Assoziation mit dem NF- κ B-inhibitorischen Protein p105 vor, was wie oben beschrieben eine Inhibition der Kinaseaktivität von TPL2 zur Folge hat (Waterfield et al, 2003). Nach Agonistenstimulation wie z.B. TLR-, CD40- oder TNF-Stimulation in der Zelle kommt es zu einer Aktivierung von IKK2 und in Folge zu einer Phosphorylierung und Degradation des p105-Proteins. TPL2 wird aus dem TPL2/p105-Komplex freigesetzt, aktiviert und kann seine Substrate phosphorylieren (Abb. 8) (Gantke et al, 2012). Findet eine Aktivierung von TPL2 in der Zelle statt, geht dies auch immer mit einer verstärkten Degradation des Proteins, aufgrund der fehlenden Interaktion mit p105 einher.

Um TPL2 vollständig zu aktivieren, sind außerdem Phosphorylierungen des Proteins notwendig. Nach LPS- oder IL-1 Stimulation konnte dabei eine Phosphorylierung von TPL2 an Thr290, Ser400 und Ser62 nachgewiesen werden (Cho et al, 2005; Robinson et al, 2007). Die Phosphorylierungen an Ser400 und Thr290 wurden durch Stimulation induziert und sind notwendig aber nicht ausreichend für eine Aktivierung von TPL2. In Experimenten mit den phosphomimetischen TPL2-Mutanten T290D und S400D in TPL2-Knockout-Makrophagen konnte eine Aktivierung von ERK nach Stimulation durch LPS nur zum Teil wiederhergestellt werden (Cho et al, 2005; Robinson et al, 2007). Dies gibt Hinweise darauf, dass die beiden identifizierten Phosphorylierungen von TPL2 für eine vollständige Aktivierung der Kinase notwendig sind (Vougioukalaki et al, 2011). Die Phosphorylierung von TPL2 an Thr290 ist für die Dissoziation von TPL2 aus dem p105/TPL2-Komplex notwendig und wird durch IKK β -abhängige Signale

induziert (Cho et al, 2005). Wie genau die Phosphorylierung von TPL2 an Ser400 zu seiner Aktivierung beiträgt, ist noch weitestgehend unbekannt. Da sich die Phosphorylierung jedoch im C-Terminus befindet, wird angenommen dass die S400-Phosphorylierung von TPL2 eine Konformationsänderung des Proteins nach sich zieht, was die inhibitorische Interaktion des C-Terminus und der Kinasedomäne von TPL2 löst (Robinson et al, 2007). Der Rest Serin 62 wird nach IL-1 Stimulation autophosphoryliert und trägt dadurch zu einer maximalen Aktivierung von TPL2 bei (Stafford et al, 2006). IKK2 stellt einen wichtigen Aktivator von TPL2 dar. In Makrophagen führte eine Inhibition von IKK2 zu einer Blockierung der Aktivierung von TPL2 und der Phosphorylierung von ERK nach Stimulation durch LPS und TNF α (Waterfield et al, 2004). In murinen IKK-defizienten Fibroblasten erwies sich IKK2 als essenziell für eine TPL2-Aktivierung, während IKK1 keine Rolle spielte (Waterfield et al, 2004). Dabei ist IKK2 an der Phosphorylierung und Degradation des TPL2-Inhibitors p105 beteiligt (Waterfield et al, 2004).

ABIN-2 (*A20-binding inhibitor of NF- κ B 2*) wurde als weiteres Protein identifiziert, welches über seinen N-Terminus mit TPL2 und p105 interagieren kann (Lang et al, 2004). Eine Defizienz von ABIN-2 in den Zellen führte in TPL2-abhängigen Rezeptorwegen zu einer signifikanten Reduktion der Aktivierung von ERK im Vergleich zu Wildtyp Zellen (Lang et al, 2004). ABIN-2 ist ein Protein, welches für die Proteinstabilität von TPL2 unerlässlich ist (Lang et al, 2004; Papoutsopoulou et al, 2006). Nach einer Ligandenstimulation kommt es zu einer aktiven Dissoziation von TPL2 und ABIN-2 (Handoyo et al, 2009).

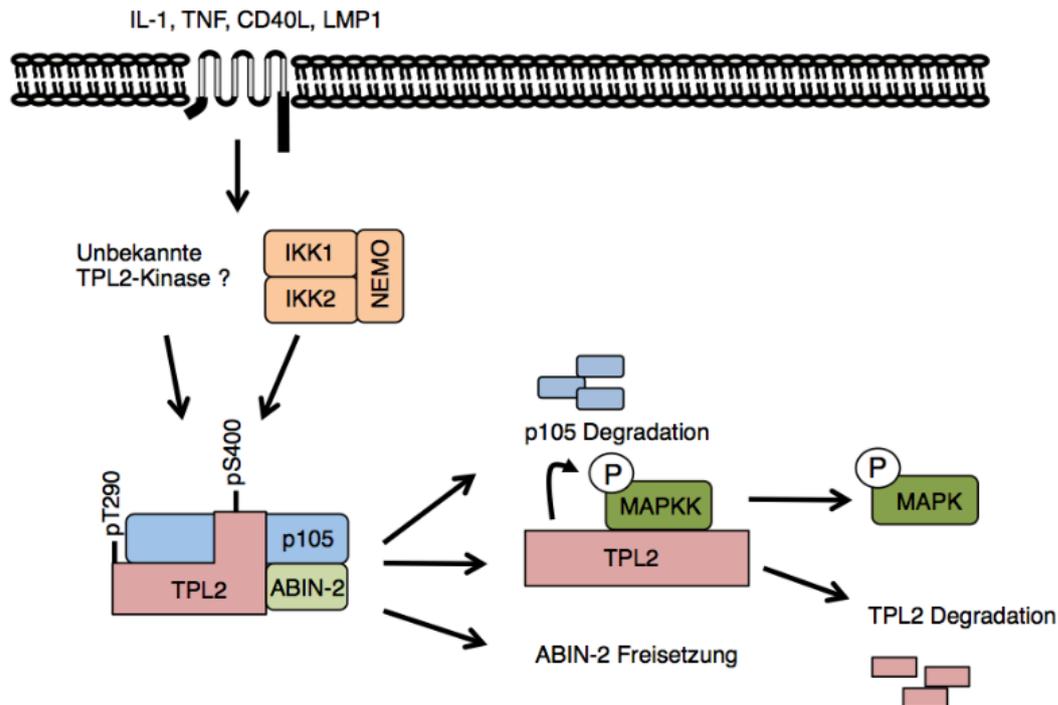


Abb. 8: Die Aktivierung von TPL2 in verschiedenen Signalwegen. In unstimulierten Zellen befindet sich TPL2 in einem Komplex mit dem NF- κ B-Vorläuferprotein p105 und ABIN-2. Dieser Komplex erhält die Proteinstabilität von TPL2 und verhindert die Phosphorylierung der Substrate von TPL2 durch die Kinase. Durch eine Stimulation der verschiedenen angegebenen Signalwege wird IKK2 induziert und p105 phosphoryliert. p105 kann somit proteasomal degradiert werden, was TPL2 aus dem Komplex freisetzt. Außerdem wird ABIN-2 aus dem Komplex gelöst. Nach erfolgter Phosphorylierung von TPL2 an Threonin 290 und Serin 400 ist TPL2 aktiviert und kann seine Substrate phosphorylieren. Abbildung nach Gantke et al. 2012 modifiziert (Gantke et al, 2012).

1.4.2 Die Rolle von TPL2 in der Signaltransduktion

Um eine Rolle der Serin/Threoninkinase TPL2 in der Signaltransduktion aufzuklären, wurden zunächst Überexpressionsstudien durchgeführt. Eine Überexpression von TPL2 in den Zellen führte dabei zu einer Aktivierung der ERK, JNK, p38 γ und ERK5 MAPKinasen (Gantke et al, 2011b; Salmeron et al, 1996; Vougioukalaki et al, 2011). Weiterhin wurde TPL2 als MAP3-Kinase beschrieben, da immunpräzipitiertes TPL2 in der Lage war, MKK1, MKK4, MKK5 und MKK6 zu phosphorylieren (Salmeron et al, 1996; Vougioukalaki et al, 2011).

Im Jahr 2002 beschrieben Eliopoulos et al. TPL2 als Komponente des durch LMP1 induzierten NF- κ B-Signalweges (Eliopoulos et al, 2002). Eine Überexpression einer katalytisch-inaktiven TPL2-Variante (TPL2 K167M) führte zu einer Inhibition des NF- κ B-Signalweges nach Induktion durch LMP1 und CD40 (Eliopoulos et al, 2002). Im Detail scheint TPL2 im LMP1-Signalweg I κ B α und p105 zu modulieren und somit NF- κ B zu beeinflussen (Eliopoulos et al, 2002). Neben dem NF- κ B-Signalweg ist

jedoch kein weiterer TPL2-abhängiger und durch LMP1 induzierter Signalweg beschrieben. Es ist beispielsweise bisher keine von IKK2-abhängige, über TPL2 ablaufende Aktivierung von JNK bekannt.

Doch nicht nur im LMP1-, TLR-, TNFR- und IL-1-Signalweg ist TPL2 involviert. Die Überexpression von TPL2 führt in Jurkat T-Zellen zu einer Aktivierung von NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) und induziert die IL-2 Produktion in den Zellen (Tsatsanis et al, 1998). Die Überexpression von I κ B α in Jurkat Zellen blockierte die durch TPL2 vermittelte Aktivierung des IL-2-Promotors. Überexpressionsexperimente bestätigten, dass TPL2 in der MEK1-abhängigen Aktivierung von NF- κ B beteiligt ist (Tsatsanis et al, 1998).

Außerdem wird TPL2 in B-Lymphozyten, sowie in T-Zellen exprimiert und agiert während der adaptiven Immunantwort in den aktiven Signalkaskaden, wie den TLR-, TNF- und GPCR-Signalwegen (Lee et al, 2015). In TPL2-Knockout B-Zellen führt eine Aktivierung des CD40-Rezeptors zu einem Defekt im ERK-Signalweg, was teilweise den Immunglobulin-Klassenwechsel beeinträchtigt (Eliopoulos et al, 2003). Auch die Zytokinproduktion kann durch TPL2 beeinflusst werden. TPL2-Knockout T-Zellen zeigen nach einer anti-CD3-Stimulation niedrigere Level an INF γ und höhere Level an IL-4 (Watford et al, 2010).

TPL2 hat eine wichtige physiologische Rolle im ERK-Signalweg durch Stimulation verschiedener Rezeptoren wie TLRs, TNFR, CD40 und IL-1 (Das et al, 2005; Dumitru et al, 2000; Eliopoulos et al, 2003; Stafford et al, 2006). Zusätzlich zu einer Aktivierung von ERK wurde für TPL2 in TNF-stimulierten embryonalen Mausfibroblasten gezeigt, dass die Serin/Threonin-Kinase an der Aktivierung von JNK durch Phosphorylierung von SEK1 sowie der NF- κ B-Aktivierung über die Phosphorylierung von p65 beteiligt ist, wobei dies in einer zelltyp- und stimulusabhängigen Weise abläuft (Das et al, 2005). Die Aktivierung von TPL2 soll dabei über eine TRADD-TRAF2-RIP-Achse ablaufen (Das et al, 2005). Außerdem wird TPL2 durch den *Receptor Activator of Nuclear κ B* (RANK) in Makrophagen aktiviert, was zu einer durch ERK vermittelten c-Fos und NFATc1 Expression führt (Hirata et al, 2010). Auch der G-Protein gekoppelte Rezeptor PAR1 aktiviert über TPL2 Rac1 und die *focal adhesion kinase* (FAK), welche die Reorganisation des Zytoskeletts und die Zellmigration steuern und somit in Krebs eine Rolle spielen (Hatziapostolou et al, 2008). Das onkogene Potential von TPL2 konnte auch durch

die hohe Expression der Kinase in humanen Magen/Kolonkarzinomen, Brustkrebs, EBV-assoziierten Nasopharynxkarzinomen und der Hodgkin's Krankheit vermutet werden (Eliopoulos et al, 2002; Krcova et al, 2008; Ohara et al, 1995; Sourvinos et al, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde TPL2 als potenzieller Mediator der in dieser Arbeit beobachteten neuen Aktivierungsachse von JNK über IKK2 im LMP1-Signalweg getestet.

1.5 Der TGF β -Signalweg

1.5.1 Die TGF β -induzierte Signalkaskade

TGF β (*Transforming growth factor* β) stellt ein zu den Zytokinen gehörendes Signalmolekül dar. Es spielt dabei unter anderem in der Kontrolle der Embryogenese sowie der Gewebekomöostase eine Rolle. Kommt es zu einer unphysiologischen Aktivierung des TGF β -Signalweges kann dies zu verschiedenen Krankheiten wie auch der Entstehung von Tumoren führen. TGF β kann Kontext-abhängig als Inhibitor oder Promotor der Tumorigenese wirken. In fortgeschrittenen Tumorstadien zählt der TGF β /Smad-Signalweg zu den onkogenen Faktoren, welche die Tumorzellinvasion und Metastasierung fördern (Zhang et al, 2014c).

Um ein weites Spektrum an verschiedenen zellulären Funktionen zu regulieren, nutzt TGF β eine Vielzahl intrazellulärer Signalwege. Dazu zählen neben den Smad-abhängigen Signalwegen auch Signalwege ohne direkte Beteiligung von Smad-Proteinen, welche die MAPK-Signalwege ERK, p38 und JNK sowie kleine GTPasen wie die Rho-GTPasen umfassen (Horbelt et al, 2012; Moustakas & Heldin, 2013). Der heterodimere Rezeptorkomplex bestehend aus TGF Typ I- und TGF β Typ II-Rezeptor kann TRAF4 und Smad7 binden (Moustakas & Heldin, 2013). Die E3-Ubiquitinligase TRAF4 kann sich selbst und TAK1 ubiquitinieren, was zu einer Aktivierung von TAK1 beiträgt. Die Kinase TAK1 phosphoryliert anschließend abwärtsgelegene MAPK und IKK, was zu einer Aktivierung von NF- κ B führt (Abb. 9). Sowohl Smads, MAPK als auch NF- κ B können Prozesse wie EMT, Invasivität und Metastasierung der Zellen beeinflussen (Moustakas & Heldin, 2013).

Die Smad-abhängige TGF β -Signaltransduktion wird durch eine ligandeninduzierte Hetero-Tetramerisierung der Rezeptoren und einer nachfolgenden Phosphorylierung rezeptorassoziierter Smad-Signalmoleküle (R-Smads) induziert (Wrana et al, 1992). Im TGF β /Aktivin-Signalweg handelt es sich dabei um Smad2 und Smad3 und im BMP (*Bone Morphogenetic Protein*)-Signalweg um Smad1/5/9 (Meulmeester & Ten Dijke, 2011). Die Phosphorylierung der Smad-Moleküle durch einen aktivierten Rezeptor führt zu einer Interaktion mit dem gemeinsamen Mediator Smad4 (Co-Smad) (Meulmeester & Ten Dijke, 2011).

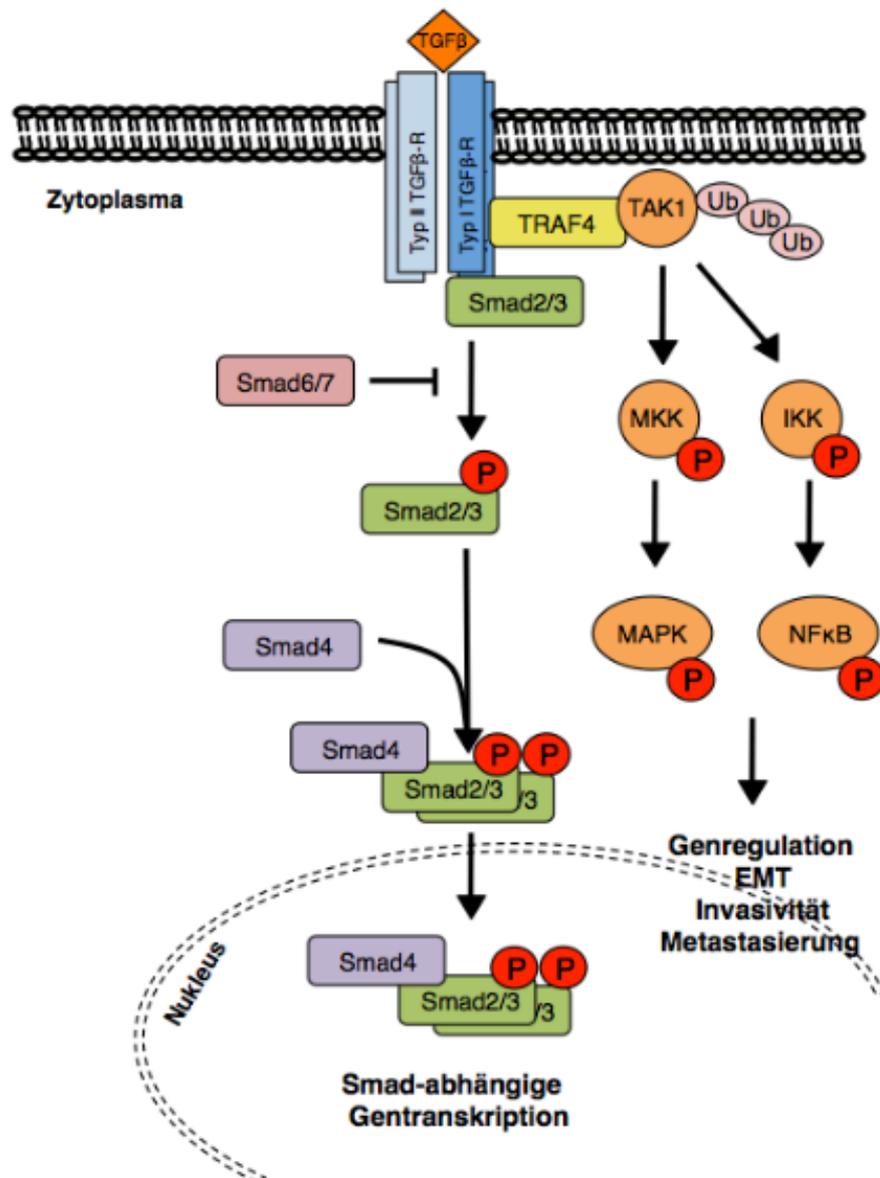


Abb. 9: Der TGF β -Signalweg. TGF β bindet an den TGF β RII-Rezeptor, welcher einen Komplex mit der Serin/Threoninkinase TGF β RI bildet. Der konstitutiv aktive TGF β RII phosphoryliert TGF β RI, welcher daraufhin Smad2/3 Transkriptionsfaktoren rekrutiert, phosphoryliert und aktiviert. Phosphoryliertes Smad2/3 bildet einen Komplex mit dem Ko-

Smad Smad4, transloziert in den Nukleus wo es einen Transkriptionskomplex mit weiteren Koaktivatoren und Korepressoren bildet. Insgesamt kann so die Expression einer Vielzahl von Genen reguliert werden. Smad6/7 stellt ein inhibitorisches Smad dar, welches durch Inhibition der Phosphorylierung von Smad2/3 weiteres *Signaling* blockiert. TGF β kann aber auch über TRAF4 die Kinase TAK1 aktivieren. TAK1 kann Smad-unabhängig MAPK und NF- κ B aktivieren, um die Genregulation zu steuern. Abbildung nach Meulmeester et al. 2011 und Moustaka et al. 2013 modifiziert (Meulmeester & Ten Dijke, 2011; Moustakas & Heldin, 2013).

Diese Interaktion erlaubt es dem Smad-Komplex, in den Zellkern zu translozieren und dort Genexpression zu regulieren. Durch eine negative Rückkopplungsschleife werden die inhibitorischen Smads (I-Smads), Smad6 und Smad7, in der Zelle exprimiert, welche die Rezeptor-Smads Smad2 und Smad3 inhibieren und damit die weitere TGF β -Signaltransduktion abschalten (Abb. 9) (Meulmeester & Ten Dijke, 2011).

1.5.2 Durch TGF β induzierte EMT in der Karzinogenese von Brustkrebs

Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) ist ein Schlüsselprozess während der embryonalen Entwicklung und ermöglicht die Differenzierung von verschiedenen Geweben und Organen. Unter EMT versteht man einen biologischen Zelltransformationsprozess, bei welchem ein Übergang von Epithelzellen zu Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften stattfindet. Außerdem ist EMT für die Wundheilung essenziell, weil es den Zellen ermöglicht, einen migratorischen Charakter einzunehmen und die Wundfläche zu bewandern und zu verschließen. Auch die Rolle von EMT in pathologischen Störungen und Tumoren ist nicht zu vernachlässigen. Beispielsweise ist die Entwicklung von invasiven, metastasierenden Brustkrebs mit dem Prozess der EMT assoziiert, in welchem epitheliale Zellen zu mesenchymalen Zellen mit migratorischen Charakter und Stammzeleigenschaften übergehen.

TGF β ist ein potenter Proliferationsinhibitor und induziert Apoptose in frühen Stadien von Brusttumoren. In späten Stadien hingegen fördert es die Aggressivität des Karzinoms, was die duale Rolle von TGF β in der Karzinogenese zeigt (Zhao et al, 2018). In verschiedenen Studien von Kolon-, Pankreas- und Magenkarzinomen konnte gezeigt werden, dass die Deletion des TGF β -Rezeptors oder der Smad-Signalmoleküle zu einer Inaktivierung oder Störung der Signaltransduktion und somit der Tumorprogression führt (Meulmeester & Ten Dijke, 2011). Wie bereits beschrieben, stellt TGF β einen Induktor der EMT während der

Brustkrebsentstehung dar. Im Plasma von Brustkrebspatienten und in invasiven humanen Brustkrebsgewebe konnten erhöhte Level an TGF β 1 identifiziert werden. Gleichzeitig korrelierten erhöhte TGF β 1-Spiegel mit dem Auftreten von Lymphknoten-Metastasen (Chod et al, 2008; Dalal et al, 1993). In Antwort auf TGF β durchlaufen Brustkrebszellen EMT, wodurch sie für eine gerichtete Migration durch das lymphatische System aktiviert werden. Dabei wurde gezeigt, dass EMT-Zellen bevorzugt durch das lymphatische System als durch Blutgefäße migrieren (Pang et al, 2016). TGF β fördert dabei die CCR7/CCL21-Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und lymphatischen Endothelzellen, wobei CCR7 über eine Aktivierung von p38 agiert (Pang et al, 2016). Sowohl eine Blockade von CCR7 als auch die Inhibition von p38 reduzierten die lymphatische Streuung von EMT-Zellen in Mäusen. Außerdem führte die durch TGF β induzierte CCL21 Expression zu einer chemotaktischen Migration von EMT-Zellen zu lymphatischen Endothelzellen (Pang et al, 2016). In einem Maus-Xenograft-Modell stellte sich aktives Smad-*Signaling* als essenziell für Knochenmetastasen in Folge von Brusttumoren heraus (Kang et al, 2005). Im Detail zeigten Deletionsexperimente, dass Smad4 für die Bildung von Knochenmetastasen und die Induktion von IL-11 notwendig ist, welches zusätzlich wichtig für die Metastasierung im Mausmodell zu sein scheint (Kang et al, 2005). In einem Zell-basierten Brustkrebsmodell zeigten Zellen, welche EMT durchlaufen haben, einen überaktiven TGF β -Signalweg und den Verlust der CDH1, CGN, CLDN4 und KLK10 Genexpression durch eine Hypermethylierung der dazugehörigen Promotorregion (Papageorgis et al, 2010). Somit konnte geschlossen werden, dass das aktivierte TGF β -*Signaling* eine Art epigenetisches Gedächtnis hervorruft, was das Stilllegen kritischer Gene aufrechterhält. Diese Hypothese wurde in mesenchymalen Brustkrebszellen bestätigt, da hier eine Störung des Smad-Signalweges zu einer DNA-Methylierung und Reexpression der identifizierten Gene führte (Papageorgis et al, 2010). Die Expression von TGF β ist außerdem positiv mit der EGF-Rezeptor (EGFR)-Expression in Brustkrebsgewebe korreliert und eine funktionelle Verbindung dieser beiden Signalwege liegt über eine Transaktivierung vor (Zhao et al, 2018). Weiterhin war der EGFR essenziell für die durch TGF β induzierte Migrations- und Invasionsfähigkeit der Brustkrebszellen. TGF β führt zu einer starken Induktion der MMP2- und MMP9-Expression in einer Smad3- und Smad4-abhängigen Weise,

Einleitung

was essenziell für die invasiven Eigenschaften der Brustkrebszellen ist (Wiercinska et al, 2011).

Insgesamt stellt der TGF β -Signalweg einen wichtigen Angriffspunkt in der Onkogenese verschiedener Tumorentitäten dar. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Rolle von TNIK in triple-negativen Brustkrebszelllinien identifiziert werden, weshalb ein möglicher Einfluss von TNIK auf die TGF β -Signaltransduktion getestet wurde.

1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollten sowohl molekulare Funktionen des IKK2/TAK1/TNIK-Signalkomplexes nach Induktion durch LMP1, als auch die Rolle einzelner Signalkomplexkomponenten, vor allem von TNIK, in der Signaltransduktion und Onkogenese von Tumorzellen aufgeklärt werden.

Trotz intensiver Studien am LMP1-Signalweg in den letzten 20 Jahren, konnte der genaue Mechanismus der Signaltransduktion von LMP1-CTAR2 nicht vollständig geklärt werden. Wie in den vorhergehenden Abschnitten umrissen, sind zum Teil kontroverse Ergebnisse zu den einzelnen Signalkomponenten von LMP1, wie IKK2, TAK1 oder TPL2, beschrieben. In der vorliegenden Arbeit war es deshalb das Ziel, mit Hilfe eines induzierbaren Zellsystems die Mechanismen des LMP1-Signalweges aufzuklären. Dabei sollte besonders die Rolle der Signalkomponente IKK2 in der Aktivierung von NF- κ B und JNK, sowie die Funktion der abwärts von IKK2 gelegenen Kinasen TAK1 und TPL2 untersucht werden. Die Serin/Threonin-Kinase TPL2 sollte weiterhin als potenzielles Onkogen auf die Fähigkeit der Zelltransformation unter LMP1 analysiert werden.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit hat die Keimzentrumskinase TNIK inne, welche sich auch im LMP1-Signalosom befindet. TNIK ist im LMP1- und CD40-Signalweg in der Aktivierung von JNK und NF- κ B, sowie an der Bildung des TNIK/TRAF6/TAK1/IKK-Signalkomplexes beteiligt (Shkoda et al, 2012). In der vorliegenden Arbeit war es das Ziel, weiterführend die Funktionen von TNIK in der Signaltransduktion und Zelltransformation durch LMP1 zu verstehen. Dabei sollten von TNIK abhängige Sekundärmodifikationen des Signalmoleküls TRAF6 im Vordergrund stehen.

Da TNIK bereits häufiger mit der Karzinogenese verschiedener Tumorentitäten in Verbindung gebracht wurde, sollte mit Hilfe eines *Screenings* in verschiedenen Tumorzelllinien eine Rolle von TNIK in Proliferation, Apoptose und Zellmigration untersucht werden. Mit Hilfe einer RNASeq-Analyse und qPCR-Experimenten sollten in einer ausgewählten Tumorentität Hinweise auf mögliche Mechanismen von TNIK in der Tumorigenese gewonnen und in ersten weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Insgesamt war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Rolle der Signalkomponenten des LMP1-CTAR2-Signalweges, IKK2, TAK1, TPL2 und TNIK,

Einleitung

weiter aufzuklären, um neue Ansatzpunkte für mögliche Therapieansätze von Tumorerkrankungen zu finden.

2 Material

2.1 Chemikalien, Reagenzien, Apparative Ausstattung

2.1.1 Inhibitoren

Tab. 1: Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller	Artikelnummer
Complete Mini Protease Inhibitor Mix	Roche	11 836 153 001
TPL2 Inhibitor TC-S 7006	TOCRIS	5240
TAK1 Inhibitor (5Z)-7-Oxozeaenol	TOCRIS	3604
IKK2 Inhibitor VIII ACHP	Calbiochem	401487
Calyculin A	Cell Signaling	99025
TNIK Inhibitor KY-05009	Sigma-Aldrich	SML 1506
NEM N-Ethylmaleimide	Sigma-Aldrich	E3876

2.1.2 Liganden

Tab. 2: Liganden

Ligand	Hersteller	Artikelnummer
CD40L Recombinant human soluble CD40 Ligand	Source BioScience	ABC 159
TNF α	Peprtech	300-01A
TGF β	Peprtech	100-21

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Medien

Alle Standard-Laborchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, über die Firmen Merk, Carl Roth, Applichem oder Sigma-Aldrich bezogen. Herzustellende Lösungen wurden mit destilliertem Wasser angesetzt und gegebenenfalls sterilfiltriert oder autoklaviert.

Alle in dieser Arbeit verwendeten speziellen Chemikalien, Reagenzien und Enzyme sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Die Tabelle 4 gibt Proteine an, die in *in vitro* Kinase-Versuchen als Substrate dienen.

Tab. 3: Chemikalien, Reagenzien, Medien

Produkt	Hersteller
GeneRuler DNA ladder mix	Fermentas Life Sciences
MyTaq Polymerase	Fermentas Life Sciences

Material

LightCycler® 480 SYBR Green I Master	ROCHE
Ampicillin/Kanamycin	Sigma
DMEM / RPMI 1640 Zellkulturmedium	Gibco®, Invitrogen
Fetales Kälberserum	Bio&Cell
Penicillin/Streptomycin für Zellkultur	Gibco®, Invitrogen
Trypsin-EDTA	Gibco®, Invitrogen
L-Glutamin für Zellkultur	Gibco®, Invitrogen
Hygromycin B Lösung	HIMEDIA
Puromycin	Thermo Fischer
DMSO	Roth
PolyFect® Transfektionsreagenz	Qiagen
NP-40 (igepal)	Sigma-Aldrich
Bradford Reagenz	BioRad
Soft Agar/ Agar noble	Sigma-Aldrich
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas Life Sciences
Tween-20	Applichem
Rotiphorese 30% Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
APS	Sigma-Aldrich
Temed	Sigma-Aldrich
Protein G Sepharose	GEHealthcare
Glutathion Sepharose	GEHealthcare
Dharmafect 1	Dharmacon
MTT	Sigma-Aldrich
PMSF	Sigma-Aldrich
Polybren	Merck Millipore
TurboFect Transfektionsreagenz	Thermo Fischer
Metafectene Transfektionsreagenz	Biontex

Tab. 4: Substrate

Substrat	Theoretisches MW (kDa)	Referenz/Hersteller
GST-IκBα (N-Terminus)	40	Shkoda et al., 2012
GST-c-Jun	45	Shkoda et al., 2012
His-TRAF6 ₃₁₀₋₅₂₂	25,9	Bereitgestellt von F. Giehler, HMGU
His-TRAF6 ₃₁₀₋₅₂₂ T463A	25,9	Bereitgestellt von F. Giehler, HMGU
His-TRAF6 ₃₁₀₋₅₂₂ S507A	25,9	Bereitgestellt von F. Giehler, HMGU
His-TRAF6 ₃₁₀₋₅₂₂ T463A/S507A	25,9	Bereitgestellt von F. Giehler, HMGU
GST-NEMO/IKBKG, human recombinant protin, full length	71,8	Abnova, H00008517-P01, ORF 1aa-419aa

GST-TAK1/MAP3K7, human recombinant protin, full length	89,4	Abnova, H00006885-P01, ORF 1aa-579aa
--	------	---

2.1.4 Apparative Ausstattung

Tab. 5: Apparative Ausstattung

Ausstattung	Hersteller
Perfect Blue agarose gel system	Peqlab
Robocycler Gradient 96	Stratagene
LightCycler® 480	Roche
FACS Calibur	Beckton Dickinson
FACS Cantoll	Beckton Dickinson
FACS Arialll	Beckton Dickinson
Floureszenzmikroskop Axiovert 200 Inverted Fluorescence Microscope	Zeiss
PerfectBlue Vertical Double Gel System	Peqlab
PerfectBlue Semi-dry Elektroblotter	Peqlab
Wet blot system	Hoefer
Optimax Entwicklermaschine	Typon Medical
Zentrifugen	Eppendorf, Heraeus
Phosphoimager Typhoon FLA 7000	GE Healthcare Life Sciences
Plattenleser Photometer: EL800 Universal Microplate Reader	Bio-Tek Instruments
Brutschränke Heraeus Thermo	Thermo Scientific
Luminometer: Orion Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems
Photometer: Biophotometer PLUS	Eppendorf
Rollenmischer CAT RM5	Hecht Assistent Sondheim/Rhön
Thermomixer 5436	Eppendorf
Zählkammer: Neubauer, Hecht- Assistent	Karl Hecht GmbH, Sondheim
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Alle Standard-Laborverbrauchsmaterialien wurden von Eppendorf (Hamburg), BD Biosciences (Heidelberg) und Nunc/Thermo Scientific (München) bezogen.

Tab. 6: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Reaktionsgefäße 0.5 / 1.5 / 2 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 15 / 50 ml (Falcon)	Beckton Dickinson
Einfriergefäße 1.8 ml	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturschalen, Multiwell-Platten	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturflaschen	Greiner

Material

Pipettenspitzen	Gilson
Sterile Pipettenspitzen gestopft	Kisker
Gelladespitzen	Kisker
PCR-Reaktionsgefäße	Life Technologies
96-Well qPCR Platten	4titude
Nitrozellulose-Membran (0.45 µm)	BioRad
X-ray films CEA Blue Sensitive	AGFA Healthcare
Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten	Merck
Corning Falcon Röhrchen mit Zellenfilterkappe 35µm	Fisher Scientific

2.2 Antikörper

2.2.1 Primäre Antikörper

Tab. 7: Primäre Antikörper

Spezifität	Klonnr.	Hersteller	Artikelnummer
TRAF6	H-274	Santa Cruz	Sc-7221
IKKα/β	H-470	Santa Cruz	Sc-7607
IKKα	M-280	Santa Cruz	Sc-7182
IKKγ	FL-419	Santa Cruz	Sc-8330
TAK1	M-579	Santa Cruz	Sc-7162
HA	3F10	Antibody facility HMGU	-
Flag	6F7	Antibody facility HMGU	-
LMP1	1G6-3	Antibody facility HMGU	-
TNIK		GeneTex	GTX13141
MINK1		Bethyl	A302-192A
IκBα	C-21	Santa Cruz	Sc-371
JNK1	C-17	Santa Cruz	Sc-474
Smad2 (D43B4)		Cell signaling	#5339
P-Smad2 (Ser465/467)	138D4	Cell signaling	#3108
P-TPL2 (Ser400)		Cell signaling	#4491
P-JNK/SAPK (Thr183/Tyr185)		Cell Signaling	#9251
P-JNK/SAPK (Thr183/Tyr185)	81E11	Cell Signaling	#4668
P-JNK 1/2/3 (Thr183/Thr183/Thr221)	EPR5693	abcam	ab124956
P-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)		Cell Signaling	#9101S
ERK 1/2		Cell Signaling	#9102S
Tubulin		Santa Cruz	sc-23948
p65		Cell Signaling	#4764
Sam68	C-20	Santa Cruz	sc-333
HA	12CA5	Antibody facility HMGU	-

Material

P-IKK α / β (Ser176/180)	16A6	Cell Signaling	#2697
TPL2 (Cot)	M-20	Santa Cruz	Sc-720
p105		Thermo Scientific	#PA5-17150
P-p65 (Ser536)	93H1	Cell Signaling	#3033
p50	C-19	Santa Cruz	Sc-1190
RELB	C-19	Santa Cruz	Sc-226
p100/p52		Cell Signaling	#4882
P-c-Jun (Ser73)	D47G9	Cell Signaling	#3270S
c-JUN		Santa Cruz	sc-1694
P-TRAF6 (Ser507)	3F10	Antibody facility HMGU	-
P-TRAF6 (Thr463)	8D7	Antibody facility HMGU	-

2.2.2 Sekundäre Antikörper

Tab. 8: Sekundäre Antikörper

anti-mouse HRP-linked	Cell Signaling	#7076
anti-rabbit HRP-linked	Cell Signaling	#7074
anti-rat HRP-linked	Jackson/Dianova	#112-035-167
anti-goat HRP-linked	Jackson/Dianova	#705-035-147

2.2.3 Quervernetzungsantikörper

Tab. 9: Quervernetzungsantikörper

NGFR	HMGU Antibody facility	HB8737
IgG/IgM (H+L) goat anti-mouse	Jackson/Dianova	115-005-068

2.3 Plasmide

Tab. 10: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz/Herkunft
SF91-IRES-GFP-WPRE-NGFR-LMP1wt	Retroviraler Expressionsvektor	PCR-Klonierung durch Sterz und Kieser aus pSV-NGFR-LMP1wt (Gires et al, 1997)
pcEF4C-3xFlag-IKK γ (NEMO)	NEMO WT mit drei Flag- <i>tags</i> in pcEF4C Vektor	(Daniel Krappmann)
HA-Ubiquitin K63 only	Ubiquitin in dem alle Lysin-Reste außer Lysine 63 zu Arginin mutiert sind mit N-terminalen HA- <i>tag</i> in pRK5 Expressionsvektor	Addgene, beschrieben in (Lim et al, 2005)

Material

pCMV-HA-LMP1wt	LMP1 Wildtyp (Aminosäuren 6-386) von EBV-Stamm B95.8 mit N-terminalen HA-tag in einem pHEBO Expressionsvektor unter Kontrolle von einem CMV Promoter	(Kieser et al, 1997)
pCMV-HA-LMP1 AAA/ Δ 371	LMP1 Mutante mit N-Terminalen HA-tag enthält mutiertes PxQxT Motiv innerhalb CTAR1 und Deletion von 16 C-terminalen Aminosäuren von der CTAR2 Domäne in einem pHEBO Expressionsvektor	(Schneider et al, 2008)
pCMV-HA-LMP1 AAA/Y384G	LMP1 Mutante mit N-terminalem HA-tag enthält mutiertes PxQxT Motiv innerhalb CTAR1 und eine Punktmutation in der CTAR2 Aktivierungsdomäne in einem pHEBO Expressionsvektor	(Schneider et al, 2008)
pSV-LMP1wt	LMP1 Wildtyp in pHEBO (Sugden et al, 1985) Vektor unter Kontrolle von einem SV40 Promoter/enhancer	(Kieser et al, 1997)
pSV-LMP1 Y384G	LMP1 Mutante mit Punktmutation in CTAR2 Domäne in pHEBO (Sugden et al, 1985) Vektor unter Kontrolle von einem SV40 Promoter/enhancer	(Schneider et al, 2008)
pRK5	Expressionsvektor für Säugerzellen mit einem humanen Cytomegalovirus (CMV) Promoter	(Schall et al, 1990)
pcDNA3-Flag-IKK β	IKK β mit einem N-terminalen Flag-tag in einem pcDNA3-Expressionsvektor	(Schneider et al, 2008)
pRK5-HA-JNK1	c-Jun-N-terminal Kinase mit einem N-terminalen HA-tag in einem pRK5 Vektor	(Kieser et al, 1999)

Material

pCMV5-TPL2wt.MT	TPL2 mit einem C-terminalen <i>myc-tag</i>	(Ceci et al, 1997)
pcDNA3-Flag-p105	p105 mit einem N-terminalen <i>Flag-tag</i> in einem pcDNA3-Expressionsvektor	(Heissmeyer et al, 1999)
pCMV-HA-TAK1	TAK1 mit einem N-Terminalen HA-tag mit pCMV Promotor	(N.Uemura)
pEFBOS-CD40	CD40-Wildtyp in einem pEFBOS-Expressionsvektor	(Kieser et al, 1997)
pRK5-HA-MINK1 FL	MINK1 mit N-terminalem HA- <i>tag</i> in einem pRK5-Expressionsvektor	H.Kutz, A.Kieser, unveröffentlicht
pRK5-HA-MINK1 KD	N-terminale MINK1 Kinasedomäne (AS 1-316) mit N-terminalem HA- <i>tag</i> in einem pRK5-Expressionsvektor	H.Kutz, A.Kieser, unveröffentlicht
pRK5-HA-TNIK	TNIK-Wildtyp (AS 1-1360) mit N-terminalem HA- <i>tag</i> in einem pRK5-Expressionsvektor	(Shkoda et al, 2012)
pRK5-HA-TNIK KM K54R	TNIK-Wildtyp(AS 1-1360) mit Aminosäureaustausch von Lysin 54 zu Arginin mit N-terminalem HA- <i>tag</i> in einem pRK5-Expressionsvektor, subkloniert von pYC1-TNIK (KM) (Fu et al.; 1999)	(Shkoda et al, 2012)
pRK5-HA-TNIK KD	N-terminale TNIK-Kinasedomäne (AS 1-289) mit N-terminalem HA- <i>tag</i> in einem pRK5-Expressionsvektor	(Shkoda et al, 2012)
pRK5-HA-TNIK KD/KM K54R	N-terminale TNIK-Kinasedomäne (AS 1-289) mit Aminosäureaustausch von Lysin 54 zu Arginin mit N-terminalem HA- <i>tag</i> in einem pRK5-Expressionsvektor	H.Kutz, A.Kieser, unveröffentlicht
pRK5-Flag-TRAF6	TRAF6-Wildtyp mit N-terminalem <i>Flag-tag</i> in einem pRK5-Expressionsvektor	(Shkoda et al, 2012)
pRK5-Flag-TRAF6 T463A	TRAF6-Mutante mit Aminosäureaustausch von Threonin 463 zu Alanin mit N-	H.Kutz, A.Kieser, unveröffentlicht

Material

	terminalem Flag- <i>tag</i> in einem pRK5-Expressionsvektor	
pRK5-Flag-TRAF6 S507A	TRAF6-Mutante mit Aminosäureaustausch von Serin 507 zu Alanin mit N-terminalem Flag- <i>tag</i> in einem pRK5-Expressionsvektor	H.Kutz, A.Kieser, unveröffentlicht
pRK5-Flag-TRAF6 T463A/S507A	TRAF6-Doppelmutante mit Aminosäureaustausch von Threonin 463 zu Alanin und Serin 507 zu Alanin mit N-terminalem Flag- <i>tag</i> in einem pRK5-Expressionsvektor	H.Kutz, A.Kieser, unveröffentlicht
pCDH-EF1 α -sh5-DsRed-miR30	TNIK <i>short hairpin</i> -enthaltendes Transferplasmid mit EF1 α -Promotor und dsRED-Sequenz	Unveröffentlicht, H. Hertlein, I. Jeremias
pCDH-EF1 α -sh15-DsRed-miR30	MINK1 <i>short hairpin</i> -enthaltendes Transferplasmid mit EF1 α -Promotor und dsRED-Sequenz	Unveröffentlicht, H. Hertlein, I. Jeremias
pCDH-EF1 α -sh144-DsRed-miR30	Kontroll <i>short hairpin</i> -enthaltendes Transferplasmid mit EF1 α -Promotor und dsRED-Sequenz	I. Jeremias
Rev-Plasmid (392)	Verpackungsplasmid	I. Jeremias
<i>gag-pol</i> -Plasmid (393)	Verpackungsplasmid	I. Jeremias
VSV-G (pMD2.G)	Hüllplasmid	I. Jeremias

Plasmide für die Etablierung von Knockouts mittels CRISPR/Cas9

Alle verwendeten Plasmide wurde von Sigma Aldrich bezogen. Die gRNA-Sequenzen befinden sich in einem U6gRNA-Cas9-2A-GFP-Vektor.

Tab. 11: CRISPR/Cas9-Plasmide

Gen	gRNA-Sequenz	Exon	Bestellnr.
TNIK (human)	CAATTCAAAGATCCCTGCGGGG	Exon 1	HS0000156281
MINK1 (human)	TGGTCGGCAATGGAACCTACGG	Exon 1	HS0000058293
TPL2 (human)	TTTTATGGGACAACGACCACAGG	Exon 2	HS0000206639
TPL2 (murin)	TCTGTCAGATATGGGACCGTGG	Exon 2	MM0000226028
TAK1 (human)	TTTGAAGAGATCGACTACAAGG	Exon 1	HS00000272768
NEMO (human)	AGGTGCCTATTCATCCAACAGG	Exon 3	HS0000099337
NEMO (murin)	TGGGTGAAGAATCTTCTCTGGG	Exon 3	MM0000125118

IKK1 (murin)	AGCCGTTCCCGCATCTCCCAGG	Exon 1	MM0000145296
--------------	------------------------	--------	--------------

2.4 siRNA Oligonukleotide

siRNA Oligonukleotide wurden von Thermo Fisher Scientific bestellt.

ON TARGET plus non-targeting control siRNA: Pool von siRNAs, welche kein Target in murinen Zellen haben.

ON TARGET plus SMART pool siRNA Map3k8 (TPL2) mouse Cat. #L-040630-00 Lot. # 150730: Pool von siRNAs gegen murines TPL2.

ON TARGET plus SMART pool siRNA Ikbkb (IKK2) mouse Cat. # L-040630-00 Lot. # 150522: Pool von siRNAs gegen murines IKK2.

2.5 Eukaryotische Zelllinien

Wildtyp MEF:NGFR-LMP1wt murine, embryonale Fibroblasten Zelllinie (Ermolaeva et al, 2008) mit stabiler Expression von NGFR-LMP1, von K. Sterz etabliert (Sterz, 2013)

IKK2^{-/-}MEF:NGFR-LMP1wt murine, embryonale Fibroblasten Zelllinie mit homozygotem IKK2 Knockout (Schmidt-Supprian et al, 2000), mit stabiler Expression von NGFR-LMP1, von K. Sterz etabliert (Sterz, 2013)

HEK293 humane, embryonale Nierenepithel Zelllinie, die durch das Adenovirus Typ5 transformiert ist (Graham et al, 1977), DSMZ

Wildtyp HEK293:NGFR-LMP1wt humane, embryonale Nierenepithel Zelllinie, die durch das Adenovirus Typ5 transformiert ist, stabil mit NGFR-LMP1 Plasmid transfiziert und unter Hygromycin-Selektion etabliert, von A. Kieser etabliert

BL41 EBV-negative Burkitt's Lymphomzelllinie (Marchini et al, 1992)

BL41:NGFR-LMP1wt EBV-negative Burkitt's Lymphomzelllinie (Marchini et al, 1992) stabil mit NGFR-LMP1 Plasmid transfiziert und unter Puromycin-Selektion etabliert (Nimmerjahn et al, 2004)

LCL (B2264-19/3):NGFR-LMP1wt EBV-positive Lymphomzelllinie stabil mit NGFR-LMP1 Plasmid transfiziert (Dudziak et al, 2003)

LCL721 EBV-positive Lymphomzelllinie (Kavathas et al, 1980)

- LCL GB 1C3** EBV-positive Lymphomzelllinie, durch Infektion von humanen B-Zellen mit EBV-Stamm B95.8 (J. Mautner, HMGU)
- 53.217** LMP1-Transgen negative murine Karzinomzelllinie (Hannigan & Wilson, 2010)
- 53.234a** LMP1-Transgen positive murine Karzinomzelllinie (Hannigan & Wilson, 2010)
- 117.1415** LMP1-Transgen negative murine Karzinomzelllinie (J. Wilson, unveröffentlicht)
- 117.1472** LMP1-Transgen positive murine Karzinomzelllinie (J. Wilson, unveröffentlicht)
- HEK293T** humane Zelllinie, stammen von HEK293 ab, exprimiert mutante Version des SV40 large T Antigens (I. Jeremias, HMGU)
- MDA-MB-231** humane, triple-negative Brustkrebszelllinie (R. Zeidler, HMGU), typisiert durch DSMZ
- MCF-7** humane Brustkrebszelllinie (R. Zeidler, HMGU)
- BT20** humane, triple-negative Brustkrebszelllinie (A. Ullrich, Max-Planck-Institut für Biochemie)
- T47D** humane Brustkrebszelllinie (R. Zeidler, HMGU)
- LOU NH91** humane Plattenepithelkarzinomzelllinie aus der Lunge (DSMZ)
- HCC-33** humane kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie (DSMZ)
- Colo 679** humanes Hautmelanoma (DSMZ)
- AsPC-1** humane Adenokarzinomzelllinie aus dem Pankreas (R. Zeidler, HMGU)
- Panc0813** humane Adenokarzinomzelllinie aus dem Pankreas (Wenwen Chien, *National University of Singapore*)
- Panc0203** humane Adenokarzinomzelllinie aus dem Pankreas (Wenwen Chien, *National University of Singapore*)
- Kyse270** Ösophaguskarzinomzelllinie (O. Gires)
- Du145** Prostatakarzinomzelllinie (R. Zeidler, HMGU)
- Capan-1** humane Adenokarzinomzelllinie aus dem Pankreas (R. Zeidler, HMGU)

2.6 Prokaryotische Zelllinien

DH5 α (Invitrogen, Life Technologies Corp.) K-12 F- ϕ 80lacZ Δ M15
 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) gal- phoA supE44 λ - thi-1
 gyrA96 relA1

2.7 Primer

2.7.1 Primer für PCR von CRISPR/Cas9-Knockout-Klonen und Sequenzierung

SV008	ATAGGAACCGCACGCACGAT	(IKK1 CRISPR human)
SV009	TCTAGTCCAGTCTCCAGTGG	(IKK1 CRISPR human)
SV010	GACTCTGCATGCGGAAGCTA	(IKK1 CRISPR human)
AK523	ACCTTCTCAGGATGATGAGT	(TNIK CRISPR human)
AK524	ATATGTGCCATCAGAATTCA	(TNIK CRISPR human)
AK525	ATGTTAACACATGAGAGC	(TNIK CRISPR human)
AK549	CACCACTATGCCTGGCTTGA	(NEMO CRISPR murin)
AK550	TCTGGATGGTTCTTGGGCAC	(NEMO CRISPR murin)
AK551	TGCTGTGAATGGAAGTCTAG	(NEMO CRISPR murin)
AK552	AGGCCCTTTGGTCTCCAATG	(TPL2 CRISPR murin)
AK553	TGGCAGCCATTCTTAAGCCA	(TPL2 CRISPR murin)
AK554	CAAACACATTATAGTGAAGG	(TPL2 CRISPR murin)
AK529	TCCTGTTGCCAATCCTTGTATG	(TPL2 CRISPR human)
AK530	TAATTGCTGACCTCAAGTGATC	(TPL2 CRISPR human)
AK531	ACGATGAGCGTTCTAAGTCTC	(TPL2 CRISPR human)
AK520	GTTAGCCAGCATGGTCTCGA	(MINK1 CRISPR human)
AK521	TGGCTCTGCACTCAGGTAGA	(MINK1 CRISPR human)
AK522	CATATCTTGACTGGATACCA	(MINK1 CRISPR human)
AK558	AGCACCTCCCTTTGGAATGG	(NEMO CRISPR human)
AK559	ACAGAGGCCTGGACATGTTG	(NEMO CRISPR human)
AK560	GCATCCTGATACACTAGGTG	(NEMO CRISPR human)
AK563	TAATACAGCTGATGTACATG	(TRAF6 CRISPR human)
AK564	AACTGGGATAAGAATCTAAC	(TRAF6 CRISPR human)

Material

AK565 CTACAGAGCAAGTGATAATC (TRAF6 CRISPR human)
AK575 TGCTTCTTAGCTTACTCCAC (TAK1 CRISPR human)
AK576 AGTTGAGCTCAGAGAGTAAC (TAK1 CRISPR human)
AK577 AAAACGCAGCGGAGCCAGAG (TAK1 CRISPR human)

2.7.2 Primer für qPCR

human HPRT fwd 5'-TGACCTTGATTTATTTTGCATACC

rev 5'-CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT

kommerziell erhältliche Primer QuantiTect® Primer Assay (Qiagen):

Hs_ICAM2_1_SG QuantiTect Primer Assay

Hs_CCL3L3_1_SG QuantiTect Primer Assay

Hs_MMP2_1_SG QuantiTect Primer Assay

Hs_CCL24_1_SG QuantiTect Primer Assay

Hs_CX3CL1_1_SG QuantiTect Primer Assay

Hs_ITGA2_1_SG QuantiTect Primer Assay

Hs_ICAM1_1_SG QuantiTect Primer Assay

Hs_NDP_1_SG QuantiTect Primer Assay

Hs_KLF8_1_SG QuantiTect Primer Assay

Hs_DACT2_1_SG QuantiTect Primer Assay

Hs_FLJ20315_1_SG QuantiTect Primer

Hs_CDH12_1_SG QuantiTect Primer Assay

Hs_LDB2_1_SG QuantiTect Primer Assay

Hs_HUNK_1_SG QuantiTect Primer Assay

Hs_SERPINA5_1_SG QuantiTect Primer Assay

Hs_FGFR2_1_SG QuantiTect Primer Assay

Hs-TNFK_1_SG QuantiTect Primer Assay

2.8 Kommerziell erhältliche Kits

Jetstar 2.0 Plasmid Maxi Prep Kit; Genomed/ Invitrogen

NucleoSpin® Extract II Kit; Machery-Nagel (#740609)

Dual-Luciferase® Reporter Assay System; Promega (#E1910)

QuantiTect® Reverse Transcription Kit; Qiagen (#205311)

QIAamp DNA Mini Kit; Qiagen (#51304)

RNeasy mini Kit; Qiagen (#74104)

Material

Caspase Kit, Colorimetric Substrate Set; Biovision (K132-7-25)

AnnexinV-Cy5 Apoptose Kit; Biovision (#K103)

QIAshredder; Qiagen (#79654)

LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Roche (04707516001)

RNase-Free DNase Set, Qiagen (#79254)

2.9 Software

MacOSX

Windows7

Microsoft Office 2011

Mac Vector 12.6.0

Flow Jo X10

GraphPad Prism6

EndNote X7

3 Methoden

3.1 Methoden der Zellbiologie

3.1.1 Zellkultur

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchte von 95% kultiviert. Als Wachstumsmedium diente entweder RPMI 1640, welches mit 1 mM L-Glutamin, 100µg/ml Streptomycin, 100IE/ml Penicillin/Streptomycin und 10% fötalem Kälberserum versetzt wurde oder DMEM mit den gleichen Zusätzen.

HEK293, BL41, LCLs, MDA-MB-231, MCF-7, BT20, T47D, LOU NH91, HCC-33, Colo 679, AsPC-1, Panc0813, Panc0203, Kyse270, Du145 wurden in RPMI-Vollmedium gehalten. Alle MEFs, sowie Capan-1 und die Zelllinien 53.217, 53.234a, 117.1451 und 117.1472 wurden in DMEM-Vollmedium kultiviert.

Alle adhärenenten Zelllinien wurden als Monolayerkultur in Zellkulturschalen gehalten und alle 2-3 Tage in verschiedenen Verdünnungen auf neue Kulturschalen ausgebracht. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA von den Platten gelöst und entsprechend der gewünschten Verdünnung in neuem Kulturmedium aufgenommen und auf neue Platten verteilt.

Alle Suspensionszelllinien wurden in Zellkulturflaschen gehalten und alle 2-3 Tage die gewünschte Menge Zellen in neue Kulturflaschen umgesetzt und frisches Kulturmedium dazugegeben.

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

Spezielle Zusätze zum Medium:

HEK293:NGFR-LMP1: 100 µg/ml Hygromycin B

BL41:NGFR-LMP1: 50 ng/ml Puromycin

3.1.2 Kryo-Konservierung von Zellen

Zur langfristigen Lagerung der Zellen, wurden für ein Kryo-Röhrchen etwa $1-2 \times 10^7$ Zellen bei $300 \times g$ für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Vollmedium aufgenommen und das gleiche Volumen Einfriermedium hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde in Kryo-Röhrchen überführt und für 24 h bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff gegeben.

Einfriermedium: 80% (v/v) fötales Kälberserum, 20% (v/v) DMSO

3.1.3 Transiente Transfektion

HEK293 Zellen wurden mit Hilfe des Polyfect-Reagenz transient transfiziert. Durch Polyfect bilden sich kompakte DNA-Polyfect-Komplexe mit negativer Ladung, was die Aufnahme der DNA in die Zelle erleichtert. Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen auf die entsprechenden Schalen in der gewünschten Zellzahl ausgebracht. Zum Transfektionszeitpunkt sollte dabei die Konfluenz der Zellen etwa 50-80% betragen. Das RPMI-Vollmedium wurde von den Zellen abgenommen und durch RPMI-Medium ohne Zusätze (Minimalmedium) ersetzt. Für 6-Loch-Platten wurde eine Gesamt-DNA-Menge von $2 \mu\text{g}$, für 10 cm Schalen von $8 \mu\text{g}$ und für 15 cm Schalen von $15 \mu\text{g}$ eingesetzt. Die DNA wurde mit RPMI-Minimalmedium auf $100 \mu\text{l}$ aufgefüllt. Dazu wurden $100 \mu\text{l}$ Minimalmedium mit der entsprechenden Menge Polyfect je Schalengröße gegeben ($2 \mu\text{l}$ Polyfect/ μg DNA). Um die Komplexbildung zu ermöglichen wurde das Gemisch bei RT für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionslösung mit RPMI-Minimalmedium auf 1 ml für 6-Loch Platten, auf 7 ml für 10 cm Schalen oder 10 ml bei 15 cm Schalen aufgefüllt und auf die vorbereiteten Zellen gegeben. Die Zellen wurden 4-5 h im Brutschrank inkubiert und anschließend die Transfektionlösung abgesaugt und durch RPMI-Vollmedium ersetzt.

Die Transfektion der MDA-MB-231 Zellen erfolgte mittels des Turbofect-Reagenz. Dazu wurden die Zellen (etwa 2×10^5) in 6-Loch-Platten am Vortag ausgebracht und in 4 ml Kulturmedium gehalten. Für die Transfektion wurden $4 \mu\text{g}$ Gesamt-DNA verwendet und auf $400 \mu\text{l}$ mit Kulturmedium aufgefüllt. Dazu wurden $6 \mu\text{l}$ Turbofect gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das DNA-Turbofect-Gemisch auf die Zellen getropft. Die Zellen wurden für 24 h im Brutschrank inkubiert.

3.1.4 Transfektion von embryonalen Mausfibroblasten mit siRNA

Die siRNA-Transfektion der MEFs erfolgte mittels Metafectene nach Herstellerangaben in 6 Well-Platten. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 50% mit 180 μ l siPuffer und 12 μ l Metafectene mit 9 μ l ON TARGET plus SMART Pool siRNA bzw. ON TARGET plus SMART Pool nicht-targetierender siRNA (20 μ M Stocklösung) transfiziert. Dazu wurden zunächst Puffer, Metafectene und siRNA vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Auf die Zellen wurde 2 ml RPMI-Vollmedium gegeben und der Metafectene-siRNA-Mix dazugetropft. Die Zellen wurden im Brutschrank über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die MEFs wurden zweimal mit siRNA transfiziert um eine gute Knockdown-Effizienz zu erreichen.

3.1.5 Herstellung lentiviraler infektiöser Partikel

Die Herstellung lentiviraler infektiöser Partikel für zelluläre Transduktionen erfolgte in HEK293T Zellen. Dazu wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen in T75-Flaschen ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 2,5 μ g *short-hairpin*-enthaltenden Transferplasmid (sh5 TNIK, sh15 MINK oder sh144 Ctrl) und 2,5 μ g Verpackungsplasmid Rev, 5 μ g gag-pol und 1,25 μ g VSV-G (pMD2.G) mittels Turbofect-Transfektion transfiziert (siehe Abschnitt 3.1.3). Nach 72 h wurden die Medienüberstände der Zellen 10 min bei 2000 x g zentrifugiert, um den Zell-Debris zu beseitigen. Der Überstand wurde über einen 0,45 μ m-Filter unter Vakuum gegeben und per Ultrazentrifugation in einem Amicon Ultra-15 Gefäß für 30 min bei 3400 x g aufkonzentriert. Das erhaltene Viruskonzentrat (ca. 200 μ l) wurde in 20 μ l aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.1.6 Lentivirale Transduktion von humanen Zelllinien

In HEK293, MDA-MB-231, BT20, MCF7, T47D, LOUHNH91, HCC-33, AsPC-1, Panc0203, Panc0813, Capan-1, Colo679, Kyse270 und Du145 Zellen wurde mittels lentiviraler Transduktion ein TNIK und/oder MINK1 sh-Knockdown (*short-hairpin-Knockdown*) generiert. Als Negativkontrolle wurde in allen Zelllinien auch das sh144 CTRL-Konstrukt transduziert, welches eine sh-Sequenz gegen GFP trägt. Dazu wurden 1×10^6 Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät und unter Zuhilfenahme von 6 μ g/ml Polybren mit 10 μ l der entsprechend aufkonzentrierten Viren (siehe Abschnitt 3.1.5) infiziert. Nach 48-72 h Inkubationszeit wurden die Zellen mit Vollmedium

gewaschen und in frischem Vollmedium weiter kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde über Durchflusszytometrie auf Expression der transduzierten Konstrukte getestet.

3.1.7 Durchflusszytometrische Analyse

Für die durchflusszytometrische Analyse von Zellen wurden diese im Fall von Suspensionszellen einmal mit kaltem FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 500 μ l FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen im FACS Cantoll vermessen. Im Falle von adhärenenten Zelllinien wurden die Zellen mittels Trypsin von den Zellkulturschalen gelöst, in FACS-Puffer gewaschen und wie die Suspensionszellen im FACS Cantoll vermessen.

FACS-Puffer: 1 x PBS, 2% FCS

3.1.8 Generierung von Knockout-Klonen mittels CRISPR/Cas9-Technologie

3.1.8.1 Generierung von Knockout-Klonen mittels Zellsortierung am Durchflusszytometer

Die entsprechenden Zelllinien wurden in 6-Well Platten in einer Zellzahl von etwa 2×10^5 ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit den von Sigma-Aldrich entwickelten CRISPR/Cas-Plasmiden. Die Mengen des Vektors und die gewählte Transfektionsmethode richteten sich nach der entsprechenden Zelllinie (siehe Abschnitt 3.1.3). 24 h nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen von den Zellkulturschalen abgelöst und bei 300 x g für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und über einen 35 μ m Filter in FACS-Röhrchen überführt, um ein Verklumpen der Zellen zu verhindern. Die Zellsortierung auf Einzelzellen pro Well einer 96-Loch Platte wurde mit Hilfe des FACS AriaIII durchgeführt. In der 96-Loch Platte wurde dazu je nach Zelllinie 150 μ l des entsprechenden Vollmediums pro Well vorgelegt. Nach etwa 14 Tagen wurden die ausgewachsenen Einzelzellklone in größere Zellkulturschalen überführt und der Knockout mittels Western Blot auf Proteinebene und Sequenzierung auf DNA-Ebene überprüft.

Diese Methode wurde für die Generierung von MDA-MB-231 Knockout Klonen verwendet.

3.1.8.2 Generierung von Knockout-Klonen durch Puromycin-Selektion

Die entsprechenden Zellen wurden in 6-Well Platten in einer Zellzahl von etwa 2×10^5 ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit 2,7 µg CRISPR/Cas9-Plasmid von Sigma-Aldrich und 0,3 µg Selektionsplasmid (2903), welches eine Puromycinresistenz trägt, transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen von den Zellkulturschalen abgelöst und in verschiedenen Verdünnungen (1:30, 1:40, 1:50, 1:70) auf 15 cm Schalen in Zellkulturmedium mit 1,5 µg/ml Puromycin ausplattiert. Da während der Transfektion das Puromycin-Selektionsplasmid 10-fach geringer als der CRISPR/Cas9-Vektor transfiziert wurde, ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine puromycinresistente Zelle auch den CRISPR/Cas9-Vektor exprimiert, sehr hoch. Nach 30 h bei 37 °C wurden die adhärenierten Zellen vorsichtig zweimal mit PBS gewaschen um das Puromycin zu entfernen und anschließend in Vollmedium ohne Puromycinselektion aufgenommen. Durch die Selektion befinden sich nun nur noch Zellen auf den Zellkulturschalen, die das Puromycinselektionsplasmid exprimieren und gleichzeitig mit hoher Wahrscheinlichkeit auch mit dem CRISPR/Cas9-Vektor kotransfiziert wurden. Nach etwa zwei Wochen konnten die ausgewachsenen Einzelzellklone von den Zellkulturschalen in separate Platten überführt werden. Der Knockout wurde mittels Western Blot auf Proteinebene und Sequenzierung auf DNA-Ebene überprüft.

Diese Methode wurde für die Generierung von HEK293 und MEF CRISPR/Cas9-Knockout Klonen verwendet.

3.1.9 Stimulation von Zellen

3.1.9.1 Aktivierung von NGFR-LMP1 durch Quervernetzung mit Antikörpern

Für die NGFR-Antikörperquervernetzung wurde die gewünschte Menge an Zellen in Zellkulturschalen (in 6 cm Schalen 5×10^5 Zellen, in 10 cm Schalen $1,5 \times 10^6$ Zellen) für jeden geplanten Stimulationszeitpunkt ausgesät und über Nacht in Minimalmedium ohne FCS kultiviert. Am Folgetag wurden die Zellen zunächst mit Minimalmedium, welches 1 µg/ml anti-NGFR Antikörper enthält, für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium von den Zellen abgenommen und frisches Mangelmedium, welches 10 µg/ml anti-fc IgG/IgM Quervernetzungsantikörper enthält, für die gewählten Zeitpunkte hinzugegeben.

Nach Ablauf des Zeitraums der Quervernetzung wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen und in NP40-Lysepuffer lysiert.

3.1.9.2 CD40L-Stimulation von B-Zellen

Etwa 1×10^7 BL41 Zellen pro Stimulationszeitpunkt wurden über Nacht in Mangelmedium bei 37 °C in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml verhungert. Bei Inhibitorexperimenten wurden die Zellen drei Stunden vor Stimulation mit den entsprechenden Inhibitoren vorinkubiert. Die Zellen wurden bei 300 x g für 5 min abzentrifugiert und in 1 ml Zellkulturmedium ohne FCS pro Stimulationszeitpunkt in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Stimulation fand unter Zugabe von 600 ng/ μ l CD40L statt. Die Inkubation der Zellen erfolgte für die angegebenen Zeitpunkte bei 37 °C auf dem Roller. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen in kaltem PBS gewaschen und lysiert.

3.1.9.3 TGF β -Stimulation von Brustkrebszelllinien

Die TGF β -Stimulationen fanden in 6 cm Zellkulturschalen statt, in welchen am Vortag etwa 1×10^6 Zellen der jeweiligen Brustkrebszelllinie ausgesät wurden. Die Zellen wurden über Nacht in Mangelmedium verhungert. Am Folgetag wurden die adhärenierten Zellen in Zellkulturmedium ohne FCS mit 5 ng/ml TGF β aufgenommen und bei 37 °C für die entsprechenden Zeitspannen inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen in normalem Zellkulturmedium ohne FCS und ohne TGF β inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen in kaltem PBS gewaschen und lysiert.

3.1.10 Bestimmung der Proliferationsrate durch Messung des MTT-Umsatzes

Zur Bestimmung der Viabilität von Zellkulturen wurde das MTT-Experiment verwendet. In LCL721, LCL GB1C3 und verschiedenen Tumorzelllinien wurde die Viabilität nach Knockdown von TNIK bzw. nach Inhibition mit den Inhibitoren TC-S7006 oder KY-05009 durch den Umsatz von MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch die Zellen bestimmt. Es wurden jeweils 10000 Zellen pro Loch einer 96-Loch Zellkulturplatte ausgesät und mit 10 μ M der angegebenen Inhibitoren oder der entsprechenden Menge DMSO als Negativkontrolle in 100 μ l Zellkulturmedium behandelt. Alle Ansätze wurden in Triplikaten hergestellt. Durch Zugabe von 10 μ l MTT-Lösung zu den angegebenen Zeitpunkten für 4 h wurde die Viabilität der Zellen bestimmt. MTT wird dabei in den

Mitochondrien lebender Zellen reduziert und die Menge an reduziertem Substrat kann durch Zugabe von 200 μl STOPP-Lösung (1 ml 1M HCL in 24 ml Isopropanol) in einem Photometer quantifiziert werden (Mosmann, 1983).

MTT-Lösung: MTT 5 mg/ml in PBS

3.1.11 Bestimmung der Apoptoserate

In lebenden Zellen befindet sich das Membranprotein Phosphatidylserin auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran. Durchlaufen die Zellen Apoptose, wird Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran exponiert, welches durch AnnexinV gebunden werden kann. Handelt es sich um tote Zellen wird die Zellmembran porös und durchlässig für Substanzen, wie z.B. Propidiumiodid. Für die Apoptosefärbung wurden ungefähr 5×10^5 Zellen in 200 μl AnnexinV-Bindepuffer resuspendiert und mit 5 μl AnnexinV-Färbelösung für 5 min im Dunkeln inkubiert (aus AnnexinV-Cy5 Apoptose Kit von Biovision). Anschließend wurden die Zellen mit 1 μl Propidiumiodid-Lösung gefärbt und direkt im Durchflusszytometer vermessen. Die AnnexinV-positiven und PI-negativen Zellen stellen dabei die Population der apoptotischen Zellen dar.

3.1.12 Soft-Agar-Experiment

Für das Soft-Agar Koloniebildungsexperiment wurde zunächst eine 5 %ige Soft-Agar Lösung in PBS hergestellt, autoklaviert und in der Mikrowelle langsam verflüssigt. Anschließend wurde die Soft-Agar-Lösung auf 42 °C abgekühlt. Für die untere Soft-Agar-Schicht wurde eine 0,55 %ige Soft-Agar-Lösung hergestellt, indem die 5 %ige Soft-Agar-Lösung mit erwärmtem RPMI-Vollmedium im entsprechenden Verhältnis gemischt wurde. 3 ml dieser unteren Soft-Agar Mischung wurde in 6-Loch-Platten gegeben und bei 37 °C verfestigt. Anschließend wurde für die obere Soft-Agar-Schicht eine 0,4 %ige Soft-Agar Lösung aus der 5 %igen Soft-Agar-Lösung und RPMI-Zellkulturmedium hergestellt, in welche 5000 Zellen der gewünschten Zelllinie pro ml gegeben wurden. Diese Suspension wurde für mindestens 10 Ansätze hergestellt und anschließend jeweils 1 ml der oberen Soft-Agar-Schicht mit den Zellen auf die untere Soft-Agar Schicht gegeben. Der Soft-Agar wurde mit etwa 500 μl RPMI-Medium überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 14-21 Tagen konnte ein

Auswachsen von Zellkolonien im Soft-Agar beobachtet werden. Die Anzahl der Kolonien wurden im Durchlichtmikroskop bei einer 5 oder 10 x Vergrößerung ausgezählt, wobei pro Loch der 6-Loch-Platte mindestens fünf Gesichtsfelder in die Auswertung einbezogen wurden.

3.1.13 Zellmigrationsassay (Wundheilungs-Experiment)

Für das Wundheilungs-Experiment („Scratch-Assay“) wurden $0,5-1 \times 10^6$ Zellen in 6-Loch Zellkulturschalen im entsprechenden Kulturmedium ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, um ein Adhärenzen der Zellen zu gewährleisten. Am Folgetag betrug die Konfluenz der Zellen in etwa 90 % mit einem nahezu geschlossenen Zellrasen. Mit einer sterilen 1000 μ l Pipettenspitze wurde in den Zellrasen durch Wegkratzen der Zellen eine Wunde mit definiertem Spaltmaß eingebracht. Das Zellkulturmedium mit den abgelösten Zellen wurde abgesaugt und die verbleibenden Zellen zweimal mit Zellkulturmedium gewaschen. Anschließend wurde frisches Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben. Im Falle von Inhibitorexperimenten enthielt dieses Zellkulturmedium die entsprechende Menge an angegebenen Inhibitor bzw. als Negativkontrolle die entsprechende Menge DMSO. Nach 0, 24 und 48 h wurde die Wunden im Durchlichtmikroskop fotografiert und mittels des Programms AxioVision 4.8.2 die Distanz in μ m vermessen.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Herstellung von Zelllysaten

Das Zellkulturmedium adhärenter Zellen wurde abgesaugt und die Zellen in kaltem PBS gewaschen. Je nach Zellkulturschalengröße wurden die Zellen unter Zugabe von der entsprechenden Menge NP40-Lysepuffer auf Eis lysiert (6-Well 70-400 μ l NP40-Lysepuffer, 10 cm Schale 1 ml NP40-Lysepuffer, 15 cm Schale 1,8 ml NP40-Lysepuffer). Das Ablösen der Zellen von der Kulturschale erfolgte mit einem Zellschaber. Die Zellsuspension wurde in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugation bei 4 °C für 10 min und 13000 x g. Das Zelllysate wurde als Überstand von dem entstandenen Zellpellet abgenommen, mit der entsprechenden Menge von 4-fach SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Das denaturierte Zelllysate wurde bei -

20°C eingefroren. Um die Proteinmenge des Zelllysates zu bestimmen, wurde dazu die Methode nach Bradford verwendet (siehe Abschnitt 3.2.2). Für Immunpräzipitationen wurde das Zelllysate mittels NP40-Lysepuffer auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt und direkt wie in Abschnitt 3.2.6 beschrieben eingesetzt.

NP40-Lysepuffer: 5mM EDTA, 0,1% (v/v) NP40, 50 mM HEPES, 150 mM Natriumchlorid, pH 7,5

Unmittelbar vor Gebrauch zugeben: 1% (v/v) Phosphatase-Inhibitormix, 10 µl/ml einer gesättigten PMSF-Lösung in Isopropanol, 0,5 mM Natrium-Orthovanadat (pH 9,0), 40 µl/ml 25-fach Complete-EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail

100-fach Phosphatase-Inhibitormix: 50 mM β-Glycerophosphat, 50 mM Natrium-Molybdat, 50 mM Natrium-Pyrophosphat, 50 mM Natrium-Fluorid

3.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mit Bradford

Die Bradford-Lösung wurde jedesmal frisch angesetzt indem 1 Volumen Bradfordreagenz mit vier Volumen H₂O gemischt wurden. 2 µl des Zelllysates zusammen mit 800 µl Bradfordlösung wurden für 5 min bei RT inkubiert, bevor die Absorption bei 595 nm in dem BioPhotometer vermessen wurde. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines BSA-Standards berechnet.

3.2.3 SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld erfolgte durch ein denaturierendes diskontinuierliches Elektrophoresesystem nach Laemmli (Laemmli, 1970). Die gewonnenen Proteinproben der Experimente wurden dazu mit Natriumlaurylsulfat (SDS) und Dithiothreitol (DTT) versetzt. Anschließend erfolgte eine Erwärmung der Proben auf 95 °C für 5 min um die Proteine zu denaturieren. SDS überlagert die Eigenladung der Proteine und DTT reduziert die Disulfidbrücken, weshalb negative geladene Protein-SDS-Komplexe entstehen, die ein konstantes Masse-Ladungsverhältnis besitzen und im elektrischen Feld wandern.

Für die Experimente wurden 12,5 %ige Trenngele und 4 %ige Sammelgele verwendet. Für einige Ubiquitin-Versuche wurde 10 %ige Trenngele verwendet und

Methoden

für Kinase-Versuche wurde ein 15 %iger Trenngel-Sockel gegossen, um die radioaktiven Proben abzubremsen und eine bessere Auftrennung zu gewährleisten. Alle Teile der Gelgießapparatur wurden mit 70 %igen Ethanol gereinigt. Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses mit 1 ml 100 %igen Isopropanol zur Glättung der Gelschicht übergossen. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm eingeführt. Nach kompletter Polymerisation wurde SDS-Laufpuffer in die Elektrophoreseapparatur gefüllt und der Probenkamm aus dem Gel entfernt. Die Probenaschen wurden mit SDS-Laufpuffer gespült. Anschließend wurde die entsprechende Menge an Proteinproben, die vorher mit 4-fach SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert wurden, in die Taschen geladen. Als Proteinstandard wurde der *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* verwendet. Im Sammelgel erfolgte der Lauf der Proteine bei 80 V bis zum Eintritt in das Trenngel. Im Trenngel wurde die Spannung auf 120-130 V erhöht. Nach Beenden des Laufes, wenn die Lauffront den Trenngelsockel erreicht hat, erfolgte der Proteintransfer auf eine Nitrozellulose-Membran mittels Elektrotransfer.

4-fach SDS-Probenpuffer: 100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 100 mM DTT (frisch dazugegeben), 0,2% (w/v) Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer: 0,1% (w/v) SDS, 192 mM Glycin, 25 mM Tris-HCl (pH6,8)

Sammelgel: 4% (w/v) 30%iger Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung, 0,1% (w/v) SDS, 3,5 mM EDTA in 125 mM Tris-HCl (pH 6,8)

Trenngel: 10%, 12,5% oder 15% (w/v) 30%iger Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung, 0,1% (w/v) SDS, 3,5 mM EDTA in 375 mM Tris-HCl (pH 8,9)

Unmittelbar vor Gebrauch dazugegeben: 10 µl 10%iges (w/v) Ammoniumpersulfat pro 1 ml Gel, 2 µl Tetramethyldiamin pro 1 ml Gel

10% Ammoniumpersulfat: 10% (w/v) Ammoniumpersulfat in ddH₂O

3.2.4 Immunoblot-Analysen

Nach der Auftrennung der Proteine im SDS-PA-Gel wurden diese auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert um gezielt spezifische Proteine nachzuweisen. Proteine mit sehr großem Molekulargewicht wie z.B. TNIK wurden hauptsächlich über das „Tank-Blot“ System transferiert während alle anderen Proteine im „Semi-Dry“ Verfahren geblottet wurden.

Im „semi-Dry“ Verfahren wurde die Nitrozellulosemembran und 4 Lagen Whatman Filterpapier in Transferpuffer inkubiert. Es wurde ein Sandwich bestehend aus zwei Whatman Filterpapieren, der Nitrozellulosemembran, dem Gel und weiteren zwei Whatman Filterpapieren auf die Anodenplatte gelegt und mit der Kathodenplatte abgedeckt. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Stromstärke von 0,66 mA pro cm² für 2 h bei RT.

Im „Tank-Blot“ Verfahren wurden in der selben Reihenfolge wie im „Semi-Dry“ Verfahren Whatman Filterpapiere, Nitrozellulosemembran und das SDS-PA-Gel bedeckt von Transferpuffer auf Schaumstoffschwämme in der Transferkassette aufgeschichtet. Die Transferkassette wurde in den mit Transferpuffer gefüllten Tank eingesetzt. Der Proteintransfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 450 mA für 1,5 h bei RT.

Transfer-Puffer: 25 mM Tris-HCl, 120 mM Glycin

Die immunologische Detektion von Proteinen erfolgte mittels primär und sekundär Antikörper. Bei den sekundär Antikörpern handelt es sich um Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelte, polyklonale Antikörper. HRP kann in einer chemischen Reaktion Luminol umsetzen, weshalb Proteine aufgrund auftretender Chemilumineszenz detektiert werden können. Der sekundär Antikörper bindet dabei an die konstante Region des primär Antikörpers, wobei der primär Antikörper spezifisch für das zu untersuchende Protein ist.

Nach Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran, wurde diese mindestens 1,5 h bei RT in Blocklösung inkubiert, um unspezifische Proteinbindestellen zu überdecken. Danach erfolgte eine Inkubation der Membran mit dem primär Antikörper, welcher in Blocklösung in entsprechender Verdünnung angefertigt wurde, über Nacht bei 4 °C unter ständigem Schwenken. Die Membran wurde

dreimal kurz mit ddH₂O gespült und 1,5 h bei RT im Sekundär Antikörper in Blocklösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 15 min in TBS-T gewaschen. Die Detektion der Proteine fand mit einer ECL-Lösung statt. Dazu wurde ECL-Lösung A mit ECL-Lösung B im Verhältnis 100/1 gemischt und auf die Membran gegeben. Nach etwa einer Minute Inkubationszeit wurde die Membran in die Entwicklerkassette gelegt und überschüssige ECL-Lösung entfernt. Mit einem Röntgenfilm, der je nach gewünschter Intensität verschieden lange Zeit auf der Membran verblieb, wurden die spezifischen Proteine sichtbar gemacht. Dabei detektierte der Film die durch HRP katalysierte Lichtentwicklung.

Alle in dieser Arbeit gezeigten Western Blots sind jeweils ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

TBS: 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4)

TBS-T (Tris-buffered saline-Tween®20): TBS + 0,1% (w/v) Tween®20

Blocklösung: 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T

ECL-Lösung A: 100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 200 mM p-Cumarinsäure, 1,25 mM Luminol

ECL-Lösung B: 3% (v/v) H₂O₂

3.2.5 Kovalente Koppelung von Antikörpern an Protein G-Sepharose

Zur kovalenten Kopplung von Antikörpern wurden ca. 1,5-2 ml einer 50 %igen Protein G beschichteten Sepharose-Kügelchen-Suspension 3-mal in jeweils 10 ml PBS durch Zentrifugation von 1 min bei 1000 x g gewaschen. Anschließend wurden 0,1 mg Antikörper bzw. 5 ml der Antikörper-Hybridomüberstände der *Antibody Facility* der HMGU zu der Kügelchen-Suspension gegeben und 1 h bei RT auf einem Roller inkubiert, um die Bindung des Antikörpers an die Kügelchen zu gewährleisten. Danach wurde die Suspension zweimal mit 5 ml Natriumborat für 2 min bei 500 x g bei RT gewaschen. Nach Abnehmen des Überstandes wurden 5 ml Kopplungsreagenz dazugegeben und die Kügelchen-Suspension für 30 min bei RT auf einem Roller inkubiert. Nach der kovalenten Kopplung des Antikörpers an die Kügelchen wurden diese 2 mal mit 5 ml 0,2 M Monoethanolamin (pH 8,0) gewaschen um die Kopplungsreaktion zu stoppen (2 min, 500 x g, RT). Nach dem

letzten Waschschrift wurden die Kügelchen in 5 ml 0,2 M Monoethanolamin für 2 h bei RT auf dem Roller inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. Die Kügelchen wurden mit PBS zu einer 50 %igen Suspension aufgefüllt und bei 4 °C gelagert.

Natriumborat: 0,2 M (pH 9,0)

Kopplungsreagenz: 0,2 M Natriumborat, unmittelbar vor Gebrauch zugeben: 20 mM Dimethyl-Pimelimidat-Dihydrochlorid (DMP)

3.2.6 Immunpräzipitation

Die unter 3.2.1 hergestellten Zelllysate wurden auf gleiche Proteinmengen für die Immunpräzipitation eingestellt und die entsprechende Menge an 50 %iger Protein G Sepharose-Kügelchen-Suspension dazugegeben. Bei Zelllysaten aus einer 15 cm Zellkulturschale wurden 40 μ l, bei einer 10 cm Zellkulturschale 30 μ l und bei einer 6-Loch Platte 20 μ l Kügelchen-Suspension hinzu gegeben. Die Proben wurden anschließend bei 4 °C für 3 h bei Ko-Immunpräzipitationen oder über Nacht auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation für 1 min bei 13000 x g und 4 °C. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet zwei-dreimal mit 700 μ l kaltem NP40-Lysepuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift konnte das Pellet in 30-45 μ l 4-fach SDS-Probenpuffer aufgenommen werden und 5 min bei 95 °C denaturiert werden. Bis zur weiteren Analyse wurden die Proben bei -20°C gelagert.

3.2.7 Subzelluläre Fraktionierung und Kerntranslokations-Analyse

Die angegebenen Zellen wurden in 10 cm Schalen ausgesät und mit den entsprechenden Plasmiden oder siRNAs transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in 1 ml kaltem PBS von der Zellkulturschale geschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden in 150 μ l Schwellungspuffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden etwa 10 μ l 10 %ige NP40 (v/v) Lösung dazugegeben und die Proben 5 min bei 4 °C stark gemischt. Danach erfolgte für 10 min eine Zentrifugation bei 13000 x g bei 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und stellt die zytosolische Fraktion dar. Das Pellet wurde in 700 μ l Schwellungspuffer gewaschen. Nach dem Waschschrift wurde das Pellet

in 40 μ l nukleären Extraktionspuffer resuspendiert und 30 min bei 4 °C unter starkem Schütteln gelöst. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 13000 x g bei 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und stellt die nukleäre Fraktion dar. Die Konzentration der zytosolischen und nukleären Fraktion wurde bestimmt und die Proben per SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

Schwellungspuffer: 10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Phenylmethylsulfonylfourid

Nukleärer Extraktionspuffer: 20 mM HEPES pH 7,9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Phenylmethylsulfonylfourid

3.2.8 *In vivo* Ubiquitinierung

Für die Analyse der *in vivo* Ubiquitinierung wurden HEK293 Zellen mit HA-Ubiquitin, Flag-TRAF6 bzw. Flag-NEMO und HA-LMP1wt oder HA-LMP1-Mutanten als Induktoren transient mit dem Polyfect-Reagenz transfiziert. Die Zellen wurden nach 24 h wie in 3.2.1 beschrieben lysiert, wobei dem NP40-Lysepuffer zusätzlich 10 mM N-Ethylmaleimid (NEM) zugesetzt wurde. NEM wirkt dabei als Inhibitor für Deubiquitinasen. Flag-TRAF6 oder Flag-NEMO wurde aus den Lysaten über Flag-gekoppelte Protein G beschichtete Sepharose-Kügelchen präzipitiert und die Ubiquitinierung über Western Blot mittels HA-Antikörper nachgewiesen.

3.2.9 Immunkomplex Kinaseassay

HEK293 Zellen wurden in 6-Loch Zellkulturschalen oder 15 cm Schalen mit den angegebenen Expressionsvektoren mittels Polyfect transfiziert. Nach erfolgter Zelllyse mit NP40-Lysepuffer wurde TNIK bzw. JNK1 über den HA-tag oder IKK2 über den Flag-tag über Nacht bei 4 °C mit Protein G Sepharose-Kügelchen präzipitiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 1 min bei 13000 x g 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet zweimal mit NP40-Lysepuffer gewaschen. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte in 700 μ l Kinasepuffer. Nach dem letzten Waschschrte wurde der Überstand entfernt und die Kügelchen auf ein Endvolumen von etwa 45 μ l mit Kinasepuffer eingestellt. Die Kinasereaktion erfolgte *in vitro* durch Zugabe von 10 μ l Kinasepuffer. Der Kinasepuffer beinhaltet dabei 1 μ g des spezifischen Substrates der präzipitierten Kinase (für TNIK His-

TRAF6₃₁₀₋₅₂₂, für JNK1 GST-c-Jun, für IKK2 GST-IκBα) und 10 μCi γ-³²P-ATP. Die Proben wurden bei 27 °C für 25 min inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Kinasereaktion durch Zugabe von 15-20 μl 4-fach SDS-Probenpuffer und dem Erhitzen für 5 min bei 95 °C abgestoppt. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Mittels eines Phosphoimagers konnten die Radioaktivsignale quantifiziert und über ein Autoradiogramm visualisiert werden.

Kinasepuffer: 20 mM Tris (pH 7,4), 10 mM Magnesiumchlorid, 20 mM Natriumchlorid, unmittelbar vor Gebrauch zugegeben: 2 μM DTT, 2 μM ATP
Wenn angegeben wurde unmittelbar vor Gebrauch 25 μM IKK2-Inhibitor VIII und 25 μM (5Z)-7-Oxozeanol (TAK1-Inhibitor) zugegeben.

3.3 DNA-Methoden

3.3.1 Polymerasekettenreaktion zur Überprüfung von Gtargetierung

In der vorliegenden Arbeit wurden zum Nachweis des erfolgreichen CRISPR/Cas9-Knockouts Polymerasekettenreaktionen (PCR) durchgeführt. Dazu wurde zunächst die genomische DNA laut Herstellerangaben mit Hilfe des „QIAamp DNA mini“ Kits isoliert.

Die anschließende PCR zur Amplifikation der genomischen DNA, die durch das Gtargeting manipuliert wurde, wurde in 50 μl Reaktionsvolumen mit ca. 300 ng DNA angesetzt. Es wurden 1 x MyTaq Reaktionspuffer, 0,5 μl des *rev* und *for* Primers sowie 0,25 μl der MyTaq Polymerase je Versuchsansatz dazu gegeben und mit Wasser aufgefüllt.

Die Reaktion wurde nach folgendem Standardprotokoll ausgeführt:

1 x Zyklus	initiale Denaturierung	5 min	95°C
40 x Zyklen	Denaturierung	45 sec	95°C
	Annealing	45 sec	57°C
	Elongation	1,5 min	72°C
1 x Zyklus	finale Elongation	10 min	72°C

3.3.2 Agarosegelelektrophorese und Extraktion von DNA-Fragmenten

Um die DNA-Fragmente der PCR nach ihrer Größe aufzutrennen, wurden die PCR-Ansätze auf ein 1 %iges Agarosegel geladen und in 1 x TBE Puffer bei 120 V für 2-6 h laufen gelassen. Das Agarosegel wurde mit Ethidiumbromid (6 μ l Ethidiumbromid auf 100 ml Gel) versetzt um die DNA-Banden unter UV-Licht im Gel sichtbar zu machen. Um die erhaltenen DNA-Fragmente aus der PCR sequenzieren zu können, wurden diese aus der Gelmatrix mit Hilfe eines sauberen Skalpell herausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend mit dem *NucleoSpin Extract II* Kit laut Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert.

TBE Puffer: 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA

3.3.3 Maxipreparation von Plasmid-DNA

Um große Mengen an Plasmid-DNA aus Bakterien herzustellen, wurde der JetStar Kit verwendet. Es wurden 400 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit Bakterien von Kulturplatten oder Gefrierkulturen angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Bakterieneschüttler inkubiert. Nach Zentrifugation der Kultur bei 3000 x g für 20 min bei RT wurde das Bakterienpellet in 10 ml E1 Puffer supplementiert mit RNase gelöst und in 50 ml Ultrazentrifugationsgefäße gegeben. 10 ml E2 Lysepuffer wurde dazu gegeben und die Suspension vorsichtig gemischt und 5 min inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 10 ml E3 Neutralisationspuffer gestoppt und alles bei 15000 x g für 15 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde über eine äquilibrierte Anionenaustauschsäule aus dem Kit gegeben und anschließend mit 60 ml E5 Waschpuffer gewaschen. Die DNA wurde durch Zugabe von 15 ml E6 Elutionspuffer in ein 50 ml Falcon-Gefäß mit 10,5 ml Isopropanol eluiert. Nach einer Zentrifugation bei 5000 x g für 1 h bei 4 °C wurde das DNA-Pellet einmal mit 80 %igen Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet, bevor es in 400-1000 μ l H₂O gelöst wurde.

3.3.4 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

3.3.4.1 RNA-Extraktion aus Zellen

Die RNA-Extraktion wurde mit Hilfe des „RNeasy mini“ Kits von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen und unter Vortexen in 350 μ l RLT Puffer lysiert und anschließend 350 μ l 70%iger Ethanol

zu den Lysaten gegeben. Um die Zellproben zu homogenisieren wurde das "Qiashreder"-System von Qiagen verwendet. Die Lysate wurden auf Säulen geladen und bei 8000 x g für 30 sec zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um die genomische DNA aus den Proben zu entfernen wurde das "RNase-Free DNase Set" von Qiagen verwendet. Dabei wurden die Säulen mit 350 μ l RW1 Puffer gewaschen. Anschließend wurden pro Ansatz 10 μ l DNase I Stocklösung mit 70 μ l RDD Puffer gemischt und diese DNase I Gebrauchslösung auf die Membran der Säulen gegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei RT für 15 min. 350 μ l RW1 Puffer wurde auf die Säulen pipettiert und diese 30 sec bei 8000 x g zentrifugiert. Anschließend fanden zwei Waschschriffe mit jeweils 500 μ l RPE Puffer statt. Die Eluation der RNA erfolgte mit 40 μ l RNase-freiem Wasser in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß. Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe des NanoDrop-Gerätes vermessen.

3.3.4.2 cDNA-Synthese

Die RNA wurde mit Hilfe des „QuantiTect Reverse Transcription“ Kit von Qiagen laut Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. 1 μ g RNA wurde pro Reaktion für 2 min bei 42 °C in einem Gesamtvolumen von 12 μ l mit 2 μ l genomischen DNA-*wipeout* Puffer inkubiert. Danach wurden 4 μ l RT Reaktionpuffer, 1 μ l Primer-Mix und 1 μ l Reverse Transkriptase dazu gegeben und 15 min bei 42 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine Inaktivierung bei 95 °C für 3 min gestoppt. Die cDNA-Proben wurden bei -20 °C gelagert.

3.3.4.3 qRT-PCR Reaktion

qRT-PCR Reaktionen wurden verwendet um relative Quantifikationen der mRNA-Level bestimmter Gene in Zellen durchzuführen. Die 20 μ l cDNA aus Abschnitt 3.3.4.2 wurden dazu mit 80 μ l H₂O auf ein Volumen von insgesamt 100 μ l verdünnt. Für die cDNA-Gebrauchslösung würde diese cDNA-Verdünnung nochmals 1:4 mit H₂O verdünnt, sodass man seine ursprüngliche cDNA aus Abschnitt 3.3.4.2 insgesamt 1:20 verdünnt in das qRT-Experiment einsetzt. Die Primer für das zu amplifizierende Gen (Qiagen QuantiTect Primer Assay) wurden von einer Stockkonzentration von 100x auf 10x vor dem Gebrauch verdünnt. Der *Forward* und der *Reverse* Primer für das Kontrollgen hprt mit einer Stock-Konzentration von 100 nmol wurde zunnächst 1:1 gemischt. Anschließend wurde diese *for/rev* hprt-

Methoden

Primermischung 1:10 mit H₂O verdünnt. Der qRT-PCR Reaktionsmix bestehend aus 4 μ l 1:20 verdünnter cDNA, 5 μ l SYBR Green I Master und 1 μ l 10x Primer-Mix wurde pro Well einer 96-Loch PCR-Platte pipettiert und mit einer Folie abgedeckt. Für das Kontrollgen hprt wurde ebenfalls 4 μ l 1:20 verdünnte cDNA und 5 μ l SYBR Green I Master eingesetzt, jedoch nur 0,5 μ l der *for/rev* hprt-Primermischung und 0,5 μ l H₂O verwendet. Die PCR-Reaktion wurde in einem Roche LightCycler 480 Gerät ausgeführt. Die C_T Werte wurden mit Hilfe der LightCycler Software berechnet und die relativen Induktionslevel mit Hilfe der 2^{- $\Delta\Delta$ C_T} Methode ermittelt (Livak & Schmittgen, 2001).

qRT-PCR Reaktionsmix: 4 μ l cDNA, 5 μ l SYBR Green I Master, 1 μ l 10x Primer-Mix (bzw. für hprt: 0,5 μ l *for/rev* Primer-Mix mit 0,5 μ l H₂O)

LightCycler Programm:

- | | | | | |
|--------------------|-----------|--------|---|-----------|
| 1) Pre-Inkubation: | 1 Zyklus | 15 min | 95°C ramp | rate 4.4 |
| 2) Amplifikation: | 45 Zyklen | 15 sec | 95°C ramp | rate 4.4 |
| | | 30 sec | 58°C ramp | rate 2.2 |
| | | 30 sec | 72°C ramp | rate 4.4 |
| | | | <i>single acquisition</i> nach jedem Zyklus | |
| 3) Schmelzkurve: | 1 Zyklus | 5 sec | 95°C ramp | rate 4.4 |
| | | 1 min | 65°C ramp | rate 2.2 |
| | | hold | 97°C ramp | rate 0.11 |
| | | | <i>continuous acquisition</i> per 5°C | |
| 4) Kühlung: | 1 Zyklus | 15 sec | 37°C ramp | rate 2.2 |

3.4 Statistik

Die Statistik in der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des Programms GraphpadPrism 6 berechnet und erstellt. Es wurde in den Experimenten ein zweiseitiger ANOVA-Test durchgeführt mit folgenden p-*Values*: * p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, *** p \leq 0.001, **** p \leq 0.0001. Ein zweiseitiger ANOVA ermöglicht es, die Signifikanz einer Antwort zu ermitteln, welche durch verschiedene Faktoren (z.B. verschiedene Knockouts und verschiedene Zeitpunkte) beeinflusst ist.

Außerdem wurde in einigen Experimenten ein zweiseitiger, ungepaarter t-Test mit den p-values: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$ verwendet.

3.5 Next-generation sequencing (NGS) und Bioinformatik

Für das NGS wurde die RNA aus den jeweiligen Zellen wie in Abschnitt 3.3.4.1 beschrieben isoliert und anschließend an die Firma IMG M Laboratories GmbH ausgehändigt. IMG M Laboratories hat das NGS unserer RNA-Proben durchgeführt und die bioinformatische Auswertung und Analyse der Daten vorgenommen. Zunächst wurde die RNA-Qualität über den 2100 Bioanalyzer bestimmt und anschließend die Bibliothek mittels *TruSeq Stranded mRNA HAT* Kit erstellt und gereinigt. Die Sequenzierung der Bibliothek fand mit 1% PhiX v3 control library spike-in auf dem NextSeq500 Sequenziersystem statt. Zur Analyse der Daten wurde das Programm CLC *Genomics Workbench* verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Die Rolle von IKK2, TAK1 und TPL2 bei der Aktivierung von JNK und NF- κ B durch LMP1

4.1.1 Die Rolle des IKK-Komplexes bei der Aktivierung von JNK und NF- κ B durch LMP1

4.1.1.1 Das experimentelle System für die systematische Analyse des LMP1-Signalweges

LMP1 ist ein Transmembranprotein, welches konstitutiv aktiv ist. Diese konstitutive Aktivität macht es unmöglich, die direkt und indirekt durch LMP1 induzierten Signalwege in der Zelle systematisch und zeitabhängig zu analysieren. Um die Funktionen der beiden Signaldomänen von LMP1 zu entschlüsseln und die Rolle zellulärer Signalmoleküle, wie z.B. der TRAFs und IKKs, aufzuklären, wurde von Kai Sterz in unserer Arbeitsgruppe ein experimentelles System etabliert. Dieses System ermöglicht es, die LMP1-Signaltransduktion in Stimulationsexperimenten zu untersuchen. Dazu wurde das NGFR-LMP1-Fusionskonstrukt, bestehend aus der extrazellulären Domäne und Transmembrandomäne des NGF-Rezeptors und der Signaldomäne von LMP1 (Gires et al, 1997), stabil in embryonale Mausfibroblasten (MEFs) transduziert. Außerdem wurden NGFR-LMP1-Konstrukte mit Mutationen in den Signaldomänen von LMP1 in den Zellen exprimiert, um die Rolle der einzelnen Domänen von LMP1 zu entschlüsseln. Dieses chimäre NGFR-LMP1-Konstrukt benötigt eine Antikörper-abhängige Oligomerisation auf der Zelloberfläche, um die von LMP1 abhängigen Signalwege anzuschalten. Dazu werden die NGFR-LMP1-Konstrukte über Antikörperquervernetzung (X-link) zeitabhängig induziert (Abb.10). MEFs stellen im Zusammenhang mit dem Onkogen LMP1 ein relevantes, experimentelles System dar, da gezeigt werden konnte, dass LMP1 in Mäusen Karzinome induzieren kann und außerdem verschiedene MEF-Zelllinien mit etablierten Genknockouts aus Mäusen in unserem Labor zur Verfügung stehen (Kulwichit et al, 1998; Zhang et al, 2012). Somit ist es möglich, in Abwesenheit verschiedener Proteine die LMP1-Signaltransduktion zu untersuchen.

Zunächst sollte mit diesem Zellsystem geklärt werden, welche Signalwege nach

Induktion von LMP1 in der Zelle direkt angeschaltet werden können. Die Aktivierung von NGFR-LMP1 in Stimulationsexperimenten mit einer Stimulationsdauer zwischen 0 und 180 min bestätigte, dass NGFR-LMP1wt die Phosphorylierung von JNK an Threonin 183 und Tyrosin 185, sowie die Degradation von I κ B α in Wildtyp-MEFs induzieren kann (Abb.11). LMP1 führt also zur direkten Aktivierung des JNK- und kanonischen NF- κ B-Signalweges. Kai Sterz zeigte, dass eine Aktivierung der NGFR-LMP1 Y₃₈₄G-Mutante keine Induktion von JNK und NF- κ B hervorruft. In der NGFR-LMP1 Y₃₈₄G-Mutante liegt eine Mutation des Tyrosinrestes an Position 384 zu Glycin vor, was zur Blockade der Signalaktivität an CTAR2 führt. Außerdem führt eine Aktivierung des NGFR-LMP1wt-Konstruktes in TRAF6-Knockout-Zellen zu keiner Aktivierung von JNK und NF- κ B, wie Kai Sterz zeigen konnte. Die beiden getesteten Signalwege, JNK und NF- κ B, werden also durch CTAR2 induziert und sind abhängig von TRAF6 (Sterz, 2013).

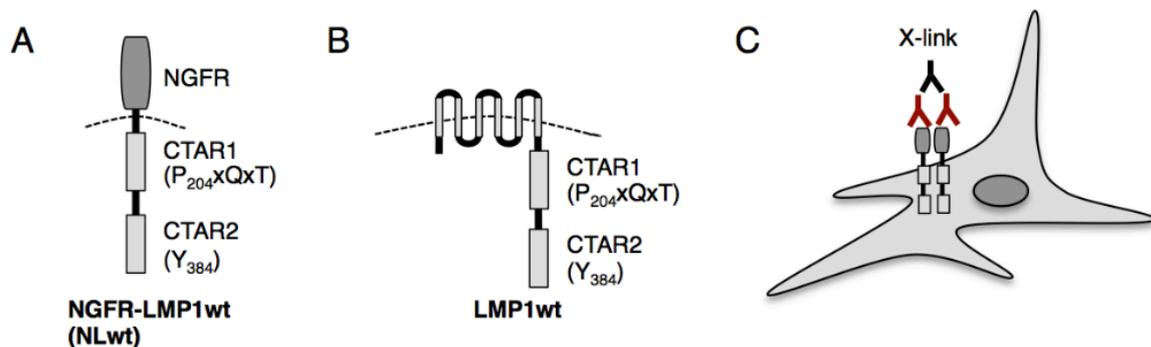


Abb. 10: Schematische Darstellung des chimären NGFR-LMP1-Fusionskonstruktes.

A) Der chimäre Rezeptor besteht aus der extrazellulären Domäne und der Transmembrandomäne des NGF-Rezeptors, sowie der intrazellulären Signaldomäne von LMP1. Die LMP1-Signaldomäne besteht dabei im Falle des NGFR-LMP1wt-Konstruktes aus CTAR1 und CTAR2 Domäne. B) Im Vergleich dazu das Schema des natürlich vorkommenden LMP1-Pseudorezeptors, bestehend aus kurzem C-terminalen intrazellulären Bereich, gefolgt von 6 Transmembrandomänen und der N-terminalen intrazellulären Signaldomäne bestehend aus CTAR1 und CTAR2. C) Die chimären NGFR-LMP1-Konstrukte wurden mittels lentiviraler Transduktion stabil in MEFs eingebracht und können über Antikörperquervernetzung (X-link) aktiviert werden. Abbildung modifiziert nach Kai Sterz (Sterz, 2013).

Insgesamt sind die molekularen Mechanismen des LMP1-CTAR2-Signalweges aber noch nicht komplett verstanden und teilweise kontrovers diskutiert, weshalb in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des NGFR-LMP1-Zellsystems der Prozess der Aktivierung von NF- κ B und JNK durch LMP1 aufgeklärt werden soll. Dabei wurde zunächst der Fokus auf die Rolle des IKK-Komplexes im LMP1-Signalweg gelegt.

Der IKK-Komplex setzt sich aus den Signalproteinen IKK1, IKK2 und der regulatorischen Untereinheit NEMO zusammen und ist als zentraler Mediator des NF- κ B-Signalweges bekannt (Vallabhapurapu & Karin, 2009). Im Folgenden sollen alle drei Komponenten auf ihre Funktion in der Aktivierung von NF- κ B und JNK durch LMP1 untersucht werden.

4.1.1.2 IKK2 ist essenziell für die Aktivierung von NF- κ B und JNK durch LMP1

Eine Inhibition und der Knockout von IKK2 blockieren die durch LMP1 induzierte Aktivität von NF- κ B, was eine essenzielle Rolle dieser Isoform im LMP1-Signalweg vermuten lässt (Boehm et al, 2010; Luftig et al, 2003). Auf der anderen Seite wurde mit Hilfe von Knockdown-Experimenten gezeigt, dass IKK1 und IKK2 teilweise redundante Funktionen in der Aktivierung von NF- κ B durch LMP1 einnehmen können (Gewurz et al, 2012; Saito et al, 2003). Um zu klären, welche Rolle IKK2 im LMP1 Signalnetzwerk spielt, wurde der Einfluss eines IKK2-Knockouts auf die Aktivierung von JNK und NF- κ B durch NGFR-LMP1 untersucht.

Für die Analyse des kanonischen NF- κ B-Signalweges wurde die Degradation von I κ B α mittels Western Blot Analyse zeitabhängig untersucht. Wie in Abbildung 11A zu sehen ist, führt ein Knockout von IKK2 zu einer kompletten Blockierung der Degradation von I κ B α , während in WT-Zellen beginnend ab 60 min nach Aktivierung von NGFR-LMP1 ein Abbau von I κ B α zu verzeichnen ist. Auch die Phosphorylierung von p65 und die Translokation von p65 in den Nukleus waren durch einen Knockout von IKK2 komplett blockiert, was bereits durch Kai Sterz in unserem Labor gezeigt werden konnte (nicht veröffentlichte Daten, Kai Sterz). Diese Daten bestätigen, dass IKK2 für die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalweges durch LMP1 notwendig ist.

Interessanterweise zeigt aber nicht nur der NF- κ B-Signalweg eine Abhängigkeit von IKK2, sondern auch die Aktivierung der MAPK JNK. Eine Aktivierung des NGFR-LMP1-Konstruktes in IKK2-Knockout-Zellen führt zu einer kompletten Blockierung der Phosphorylierung von JNK an Threonin 183 und Tyrosin 185 durch LMP1 im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (Abb. 11B).

Dieses Ergebnis wurde durch Kai Sterz in unserem Labor durch Behandlung der Zellen mit ACHP, einem spezifischen IKK-Inhibitor, weiter bestätigt. Auch hier führte

die Inhibition von IKK zu einem kompletten Block der Phosphorylierung von JNK nach Induktion durch LMP1 (nicht veröffentlichte Daten, Kai Sterz). Dass diese Beobachtung ein für LMP1 spezifischer Mechanismus ist, wurde außerdem von Kai Sterz durch eine IL-1- und TNF α -Stimulation in Wildtyp-MEFs und IKK2-Knockout-MEFs identifiziert. Die Induktion von JNK nach IL-1- und TNF α -Stimulation war in diesem Zellsystem trotz Abwesenheit von IKK2 nicht wesentlich beeinträchtigt (nicht veröffentlichte Daten, Kai Sterz).

Mit diesen Experimenten konnte erstmals gezeigt werden, dass IKK2 im LMP1-Signalweg nicht nur für eine Aktivierung von NF- κ B, sondern auch für die Induktion von JNK verantwortlich ist. Diese Beobachtung unterscheidet sich stark zwischen der Signaltransduktion von LMP1 und anderen zellulären Rezeptoren, wie dem IL-1- und TNF-Rezeptor.

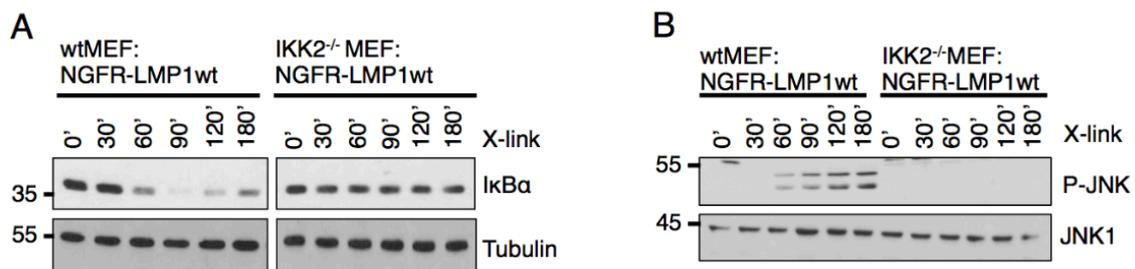


Abb. 11: IKK2 ist essenziell für die Aktivierung von JNK und NF- κ B durch LMP1 in MEFs. A) MEF:NGFR-LMP1wt Wildtyp-Zellen und IKK2^{-/-}MEF:NGFR-LMP1wt Zellen wurden mittels NGFR-Antikörperquervernetzung mit 1 μ g/ml α -NGFR für 45 min bei 37 °C und 10 μ g/ml Sekundärantikörper bei 37 °C für die angegebenen Zeitpunkte induziert. Die Induktion des NF- κ B-Signalweges wurde über Western Blot Analysen auf Degradation von IkB α hin untersucht. B) MEF:NGFR-LMP1wt Wildtyp-Zellen und IKK2^{-/-}MEF:NGFR-LMP1wt Zellen wurden mittels NGFR-Antikörperquervernetzung mit 1 μ g/ml α -NGFR für 45 min bei 37 °C und 10 μ g/ml Sekundärantikörper bei 37 °C für die angegebenen Zeitpunkte induziert. Die Induktion von JNK wurde über Western Blot Analyse auf die JNK-Phosphorylierung an Thr183 und Tyr185 hin untersucht. Tubulin diente als Ladekontrolle. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

4.1.1.3 IKK1 und NEMO in der Aktivierung von JNK durch LMP1

In vorangegangenen Publikationen wurde postuliert, dass IKK1 und IKK2 zum Teil redundante Funktionen in der Aktivierung von NF- κ B im LMP1-Signalweg innehaben können (Gewurz et al, 2012; Saito et al, 2003). Im Folgenden wurde analysiert, welche Rolle die verbleibenden IKK-Komplex-Komponenten IKK1 und NEMO in der Aktivierung von JNK durch LMP1 spielen. Dazu wurde IKK1 in Zusammenarbeit mit Helmut Kutz in unserem Labor durch die CRISPR/Cas9-

Ergebnisse

Technologie (siehe Abschnitt 3.1.8.2) in Wildtyp- und IKK2-Knockout-MEFs, welche beide das NGFR-LMP1-Konstrukt exprimieren, inaktiviert. Der Knockout von IKK1, einer essenziellen Komponente des nicht-kanonischen NF- κ B-Signalweges, zeigte nach Aktivierung von NGFR-LMP1 weder eine Beeinträchtigung der Degradation von I κ B α , noch der Phosphorylierung von JNK (Abb. 12A). Dieses Ergebnis konnte in Abbildung 12B mit verschiedenen, unabhängigen IKK1^{-/-}MEF:NGFR-LMP1wt-Einzelzellklonen bestätigt werden. Der Einzelknockout von IKK2 und der Doppelknockout beider IKK-Komponenten führte jedoch sowohl zu einer kompletten Blockierung der Degradation von I κ B α , als auch der Aktivierung von JNK. Für IKK2 konnte dies schon in Abschnitt 4.1.1.2 gezeigt werden. Diese Ergebnisse belegen, dass IKK1 für die Induktion des NF- κ B- und JNK-Signalweges durch LMP1 nicht essenziell ist. Außerdem wurde durch diese Experimente bestätigt, dass IKK2 den Mediator für die durch LMP1-CTAR2 induzierten Signalwege JNK und NF- κ B darstellt.

Die dritte Komponente des IKK-Komplexes, die regulatorische Untereinheit NEMO, ist in seiner Funktion in verschiedenen Signalwegen wie LMP1, TNF oder IL-1 in der Aktivierung von NF- κ B beschrieben (Boehm et al, 2010; Hinz & Scheidereit, 2014; Liu et al, 2012). Die Abwesenheit von NEMO beeinträchtigt die Aktivierung von IKK2 im LMP1-Weg, was die wichtige Funktion dieser Komponente des IKK-Komplexes in der Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Weges unterstreicht (Gewurz et al, 2012).

Ergebnisse

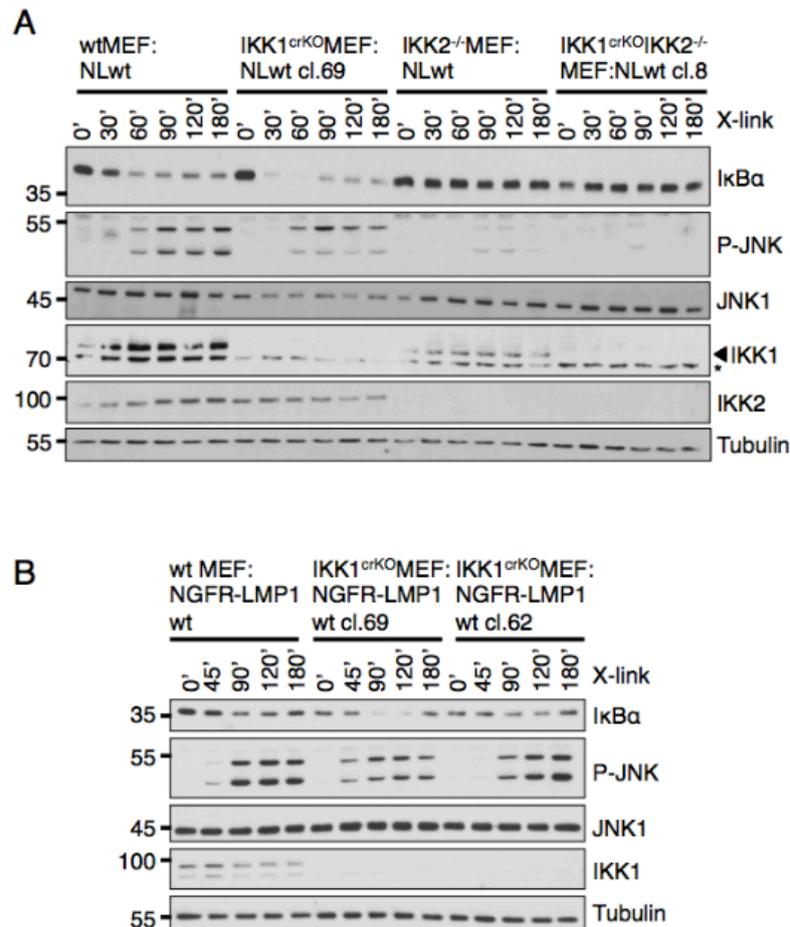


Abb. 12: LMP1 induziert JNK und NF- κ B durch IKK2, nicht aber durch IKK1. A) MEF:NGFR-LMP1wt Wildtyp, IKK1^{crKO}MEF:NGFR-LMP1wt cl.69, IKK2^{-/-}MEF:NGFR-LMP1wt und IKK1^{crKO}IKK2^{-/-}MEF:NGFR-LMP1wt cl.8 Zellen wurden mittels NGFR-Antikörperquervernetzung für die angegebenen Zeitpunkte induziert. Die Aktivierung des JNK- und NF- κ B-Signalweges wurden über Western Blot Analyse detektiert. Die Bestätigung des KO von IKK1 und/oder IKK2 erfolgte über die entsprechend angezeigten Antikörper. B) MEF:NGFR-LMP1wt Wildtyp-Zellen und zwei unabhängige IKK1^{crKO}MEF:NGFR-LMP1wt-Klone (cl.62 und cl.69) wurden durch NGFR-Antikörperquervernetzung für die angegebenen Zeitpunkte induziert und die Aktivierung des JNK- und NF- κ B-Signalweges über Western Blot Analyse detektiert. * unspezifische Banden

Nach Aktivierung von NGFR-LMP1 wurde in unabhängigen durch CRISPR/Cas9 generierten NEMO-Knockout-Klonen (siehe Abschnitt 3.1.8.2) die Fähigkeit zur Aktivierung von NF- κ B und JNK durch LMP1 in Abwesenheit von NEMO getestet. Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, führte der Knockout von NEMO zu einem vollständigen Verlust der Degradation von IkBa nach Aktivierung von NGFR-LMP1, was die bereits beschriebene Rolle von NEMO im NF- κ B-Weg bestätigt. Interessanterweise ist aber auch die Induktion von JNK durch NGFR-LMP1

abhängig von NEMO. Die Abwesenheit von NEMO führt zu einer fehlenden Phosphorylierung von JNK an Threonin 183 und Tyrosin 185 (Abb. 13).

Insgesamt zeigen die durchgeführten Experimente, dass die regulatorische Untereinheit NEMO und IKK2, nicht aber IKK1, als Komponenten des IKK-Komplexes im LMP1-CTAR2-Signalweg für die Aktivierung von NF- κ B und JNK notwendig sind.

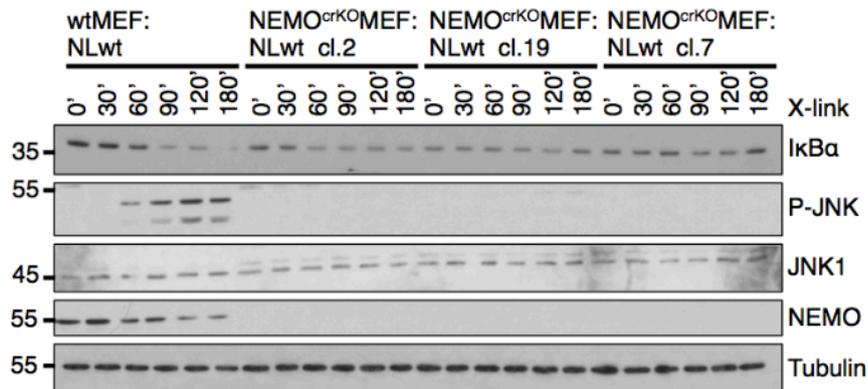


Abb. 13: Der Verlust von NEMO blockiert den NF- κ B- und JNK-Signalweg nach Induktion von LMP1. MEF:NGFR-LMP1wt Wildtyp-Zellen und drei unabhängige NEMO^{crKO}MEF:NGFR-LMP1wt-Klone (cl.2, cl.19 und cl.7) wurden durch NGFR-Antikörperquervernetzung für die angegebenen Zeitpunkte induziert und die Aktivierung des JNK- und NF- κ B-Signalweges über Western Blot Analyse detektiert. Der NEMO-KO wurde mittels entsprechender Antikörperdetektion nachgewiesen.

4.1.1.4 NEMO ist in der Bildung des LMP1/IKK2/TAK1-Komplexes involviert

Über CTAR2 werden, wie bereits beschrieben, der kanonische NF- κ B- und der JNK-Signalweg aktiviert (Eliopoulos & Young, 1998; Floettmann & Rowe, 1997; Huen et al, 1995; Kieser et al, 1997; Mitchell & Sugden, 1995; Schultheiss et al, 2001). Diese Aktivierung ist von TAK1, den beiden TAK-Bindeproteinen TAB1 und TAB2, sowie von TRAF6 und TNIK abhängig (Luftig et al, 2003; Schultheiss et al, 2001; Shkoda et al, 2012; Uemura et al, 2006; Wan et al, 2004; Wu et al, 2006a). LMP1 induziert die Bildung eines Signalkomplexes, welcher die Komponenten TAK1 und IKK2 beinhaltet (Shkoda et al, 2012). Inwieweit NEMO an der Bildung dieses Signalkomplexes beteiligt ist, wurde in Ko-Immünpräzipitationen nach Knockout von NEMO in der vorliegenden Arbeit aufgeklärt.

Um die Interaktion von LMP1, IKK2 und TAK1 in Abwesenheit von NEMO zu untersuchen, wurde NEMO mit Hilfe von CRISPR/Cas9 in HEK293 Zellen in

Ergebnisse

Zusammenarbeit mit Qinmei Yang in unserem Labor inaktiviert (siehe Abschnitt 3.1.8.2). Die Wildtyp- und die NEMO-Knockout-Zellen wurden durch Überexpression von LMP1-Expressionsplasmiden induziert und die Fähigkeit zur Interaktion der einzelnen Signalkomponenten in Immunpräzipitationen untersucht. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, führt ein Verlust von NEMO in den Zellen zu einer Blockade des LMP1-Signalkomplexes. Weder LMP1 und IKK2 (Abb. 14A), noch LMP1 und TAK1 (Abb. 14B) interagieren nach dem Knockout von NEMO miteinander. Auch die Interaktion von TAK1 mit IKK2 ist stark reduziert, wenn ein Knockout von NEMO vorliegt (Abb. 14C). Allerdings reicht eine Überexpression von TAK1 und IKK2 aus, um die Interaktion dieser beiden Signalkomponenten ohne weiteren Induktor zu induzieren. Findet eine zusätzliche Induktion der Zellen durch eine Überexpression von LMP1-Wildtyp statt, wird die induzierte Interaktion von TAK1 und IKK2 in Abwesenheit von NEMO auch deutlich reduziert (Abb. 14D). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass NEMO eine wichtige Signalkomponente in der Bildung des LMP1/TAK1/IKK2-Signalkomplexes ist. Ist NEMO in den Zellen abwesend, kann der Signalkomplex nicht gebildet werden, was die fehlende Aktivität von NF- κ B und JNK in NEMO-Knockout-Zellen in Abbildung 13 erklären könnte.

Ergebnisse

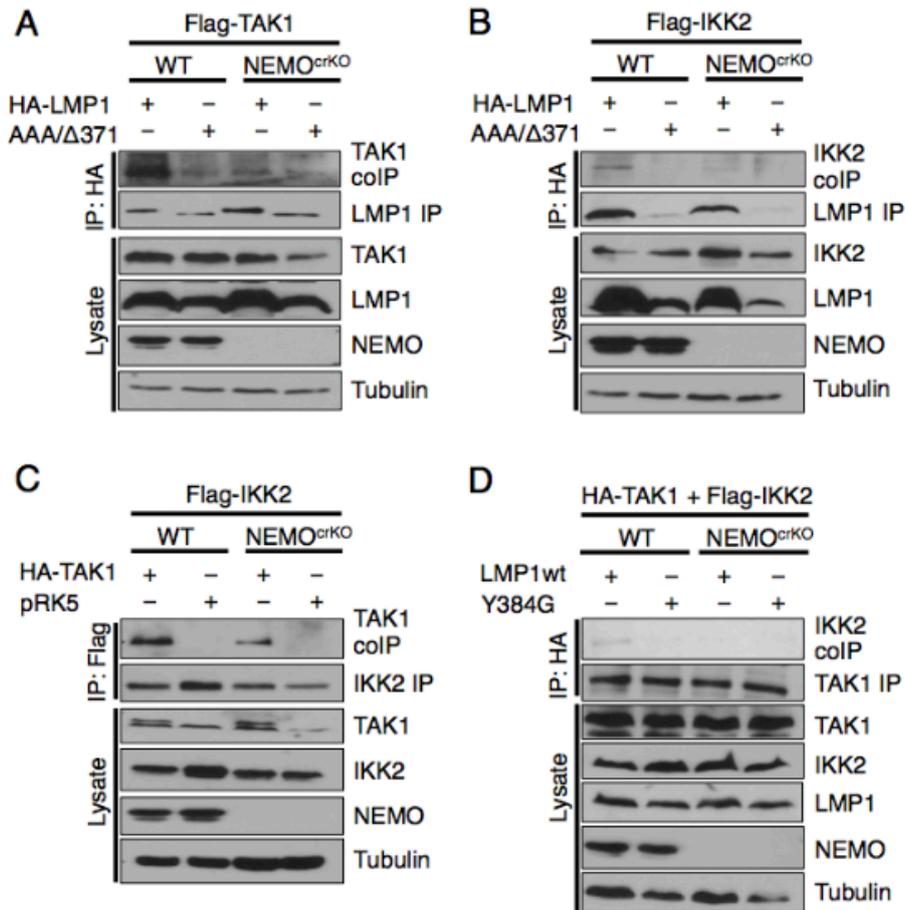


Abb. 14: NEMO ist für die Bildung des LMP1/IKK2/TAK1-Komplexes notwendig. A) HEK293 Wildtyp oder NEMO^{crKO}HEK293 cl.28 Zellen wurden mit 4 μ g pCMV-HA-LMP1wt bzw. pCMV-HA-LMP1AAA/Δ371 und 4 μ g pRK5-Flag-TAK1 in 15 cm Schalen transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen in NP40-Lysepuffer lysiert und HA-LMP1 mit HA(3F10) G-Sepharose-Beads für 3 h bei 4 °C immunpräzipitiert. Immunpräzipitationen und Zelllysate wurden mittels Western Blot Analyse und den angegebenen Antikörpern analysiert. B) HEK293 Wildtyp oder NEMO^{crKO}HEK293 cl.28 Zellen wurden mit 4 μ g pCMV-HA-LMP1wt bzw. pCMV-HA-LMP1AAA/Δ371 Plasmid und 4 μ g pcDNA3-Flag-IKK2 in 15 cm Schalen transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen in NP40-Lysepuffer lysiert und HA-LMP1 mit HA(3F10) G-Sepharose-Beads für 3 h bei 4 °C immunpräzipitiert. C) HEK293 Wildtyp oder NEMO^{crKO}HEK293 cl.28 Zellen wurden mit 4 μ g pcDNA3-Flag-IKK2 und 4 μ g pCMV-Flag-TAK1 in 15 cm Schalen transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen in NP40-Lysepuffer lysiert und Flag-IKK2 mit Flag (6F7) G-Sepharose-Beads für 3 h bei 4 °C immunpräzipitiert. D) HEK293 Wildtyp oder NEMO^{crKO}HEK293 cl.28 Zellen wurden mit 4 μ g pSV-LMP1wt bzw. pSV-LMP1 Y384G und 1,5 μ g pcDNA3-Flag-IKK2 und 1,5 μ g pCMV-HA-TAK1 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen in NP40-Lysepuffer lysiert und HA-TAK1 mit HA(3F10) G-Sepharose-Beads für 3 h bei 4 °C immunpräzipitiert.

4.1.2 Die Rolle von TAK1 bei der Aktivierung der durch LMP1 induzierten Signalwege

Wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, ist IKK2 in der Aktivierung von NF- κ B und JNK durch LMP1 involviert. Im Folgenden soll nun geklärt werden wie die Aufspaltung und Regulation der Aktivierung von NF- κ B und JNK auf Ebene des IKK-Komplexes

im LMP1-Signalweg abläuft. Auf der Suche nach einem möglichen Mediator aufwärts des IKK-Signalkomplexes in der LMP1-Signalkaskade gelegen, trat das Signalprotein TAK1 in den Vordergrund. Deshalb wird in den folgenden Abschnitten TAK1 in Bezug auf die Aktivierung von JNK und NF- κ B durch LMP1 untersucht.

4.1.2.1 Die Kinasefunktion von TAK1 ist essenziell für JNK, aber nicht für NF- κ B

Die Beteiligung von TAK1 an der Aktivierung von NF- κ B ist im LMP1-Feld noch nicht endgültig geklärt und wird kontrovers diskutiert. Uemura et al. zeigten nach einer Inhibition von TAK1 mit dem spezifischen TAK1-Inhibitor (5Z)-7-Oxozeaenol, dass TAK1 für eine Aktivierung von JNK notwendig ist. Die Induktion des NF- κ B-Signalweges läuft jedoch unabhängig von TAK1 ab (Uemura et al, 2006). Auf der anderen Seite wurde durch Wu et al. postuliert, dass ein durch siRNA generierter Knockdown von TAK1 die Aktivität von NF- κ B, welche durch CTAR2-LMP1 induziert wird, stark beeinflusst (Wu et al, 2006b).

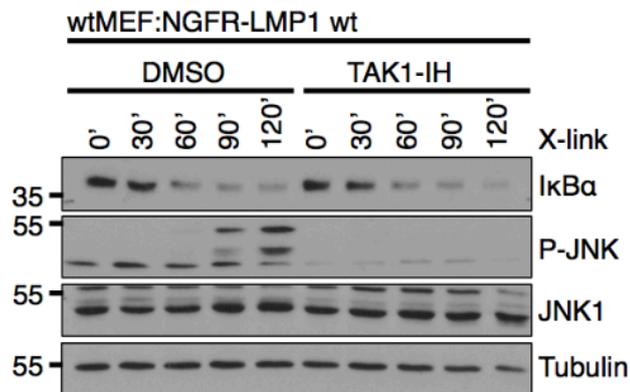


Abb. 15: Die Inhibition von TAK1 blockiert die Aktivierung von JNK, nicht aber die Degradation von I κ B α induziert durch LMP1. MEF:NGFR-LMP1wt Wildtyp-Zellen wurden mit 500 nM (5Z)-7-oxozeaenol (TAK1-IH) oder der entsprechenden Menge an DMSO behandelt. Die Zellen wurden durch NGFR-LMP1-Antikörperquervernetzung für die angegebenen Zeitpunkte induziert und die Aktivierung des JNK- und NF- κ B-Signalweges über Western Blot Analysen detektiert.

Um diese gegensätzlichen Meinungen in Bezug auf die Rolle von TAK1 in der Aktivierung von NF- κ B und JNK zu klären, wurden zunächst Wildtyp-MEFs, welche das NGFR-LMP1wt-Konstrukt exprimieren, mit dem TAK1-Inhibitor (5Z)-7-oxozeaenol behandelt. Anschließend wurde NGFR-LMP1 über Antikörper aktiviert, um die Induktion der durch LMP1 vermittelten Signalwege in Gegenwart des TAK1-Inhibitors zu beurteilen. Die Abbildung 15 zeigt dabei deutlich, dass eine Inhibition

von TAK1, die im Detail die Kinaseaktivität der TAK1-Kinase blockiert, zu einem kompletten Verlust der Phosphorylierung von JNK führt. Diese Beobachtungen decken sich mit den bereits im Jahr 2006 publizierten Versuchen von Uemura et al (Uemura et al, 2006).

Obwohl wir gezeigt haben, dass IKK2 sowohl für eine Aktivierung von NF- κ B als auch für JNK notwendig ist, beeinträchtigt die Inhibition von TAK1 die Degradation von I κ B α nicht. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob TAK1 eine Rolle in der Aktivierung von IKK2 durch LMP1 spielt. Um einen genaueren Einblick in die molekularen Funktionen des TAK1-Proteins im LMP1-Signalweg zu erhalten, wurde über *in vitro* Immunkomplex-Kinase-Experimente die Aktivität von IKK2 und JNK nach Induktion von LMP1 in WT-Zellen im Vergleich zu Zellen nach Inhibition der enzymatischen Aktivität von TAK1 und zu Zellen mit einem Knockout von TAK1 beurteilt. Dabei zeigte sich interessanterweise, dass eine Inhibition der Kinasefunktion von TAK1 keine Auswirkungen auf die durch LMP1 vermittelte Aktivität von IKK2 hat. Die Stärke der Phosphorylierung von GST-I κ B α durch IKK2 nach Expression von LMP1 in HEK293 Wildtyp-Zellen ist vergleichbar mit der Phosphorylierung in den Zellen, welche mit TAK1-Inhibitor behandelt wurden (Abb. 16A). Der Verlust des gesamten TAK1-Proteins durch einen Knockout von TAK1 hemmt jedoch die Aktivierung von IKK2 nach Induktion von LMP1 komplett (Abb. 16A). Betrachtet man vergleichend die Aktivierung von JNK durch LMP1, im Kinaseexperiment gezeigt als Phosphorylierung von c-Jun durch JNK1, zeigt sich ein anderes Bild. Die Aktivität von JNK ist sowohl nach Inhibition von TAK1, als auch bei kompletter Abwesenheit von TAK1 in den Zellen inhibiert (Abb. 16B).

Mit diesen Experimenten konnte erstmals gezeigt werden, dass der JNK-Signalweg unter LMP1 eine Abhängigkeit von der Kinaseaktivität von TAK1 besitzt, während für die Aktivierung von NF- κ B die Kinasefunktion von TAK1 keine Rolle spielt.

Unterstützend dazu, wurde im Kinaseexperiment neben der Aktivität von IKK2 die Phosphorylierung von IKK2 an Serin 177/181 in den präzipitierten Proben mittels Antikörper analysiert. Für eine vollständige Aktivierung von IKK2 sind die Phosphorylierungen von IKK2 an Serin 177 und Serin 181 als essenziell beschrieben (Shim et al, 2005; Zhang et al, 2014a). Die Phosphorylierung von IKK2 an S177/181 induziert durch LMP1 wies jedoch keine Beeinträchtigung nach Inhibition von TAK1 im Vergleich zu WT-Zellen auf. Der Verlust des gesamten

TAK1-Proteins blockierte allerdings die Phosphorylierung von IKK2 an S177/181 komplett (Abb. 16A). Dieses Experiment verdeutlicht, dass anders als in anderen Signalwegen, wie dem IL-1-, TNF- oder TLR-Signalweg, nach Induktion durch LMP1 das TAK1-Protein, nicht aber seine Kinaseaktivität, für eine Aktivierung und Phosphorylierung von IKK2 und somit das abwärts gelegene JNK- und NF- κ B-*Signaling* essenziell ist (Shim et al, 2005; Zhang et al, 2014a). TAK1 scheint also unter LMP1 nicht als Kinase für IKK2 zu funktionieren. Interessanterweise weist aber die Aktivierung von JNK nach Induktion von LMP1 eine Abhängigkeit von der Kinaseaktivität von TAK1 auf.

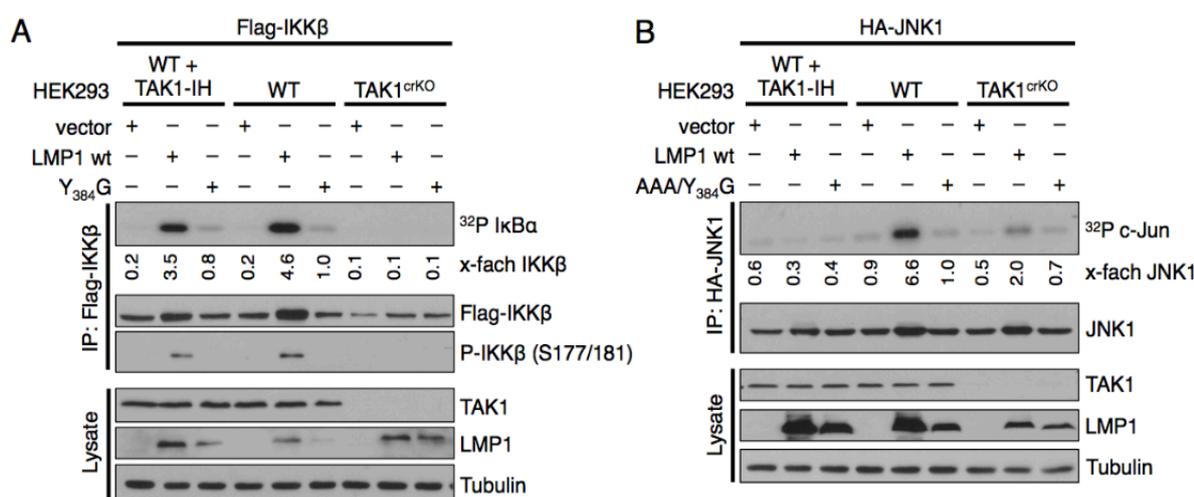


Abb. 16: Das TAK1-Protein ist im LMP1-Signalweg essenziell für die Aktivierung von NF- κ B und JNK, während die Kinaseaktivität von TAK1 nur für JNK notwendig ist. A) Das *in vitro* Immunokomplex-Kinase-Experiment wurden in HEK293 Wildtyp und TAK^{crKO}HEK293 cl.3 Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit 0,25 μ g Flag-IKK2 und 1 μ g pRK5 Leervektor, pSV-LMP1wt oder pSV-LMP1 Y₃₈₄G transfiziert. Die angezeigten Proben wurden mit 500 nM (5Z)-7-oxozeaenol (TAK1-IH) 5 h vor der Zellyse inkubiert. Flag-IKK2 wurde über Flag(6F7)-*Beads* immunpräzipitiert und die Kinasereaktion erfolgte bei 27 °C unter Zugabe von 1 μ g gereinigtem GST-I κ B α -Protein. Die IKK-Aktivität wurde durch Autoradiographie ermittelt. Die Phosphorylierung von IKK2 wurde durch den P-IKK α/β (S177/181) Antikörper detektiert. Die angegebene Quantifizierung gibt die x-fache Induktion zu WT-Zellen transfiziert mit Y₃₈₄G LMP1 verglichen zur IP-Kontrolle an. B) *In vitro* Immunokomplex-Kinase-Experimente wurden in HEK293 Wildtyp und TAK^{crKO}HEK293 cl.3 Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit 1 μ g HA-JNK1 und 1 μ g pRK5 Leervektor, pCMV-HA-LMP1wt oder pCMV-HA-LMP1 AAA/Y₃₈₄G transfiziert. Die angezeigten Proben wurden mit 500 nM (5Z)-7-oxozeaenol (TAK1-IH) 5h vor der Zellyse inkubiert. HA-JNK1 wurde über Flag(6F7)-*Beads* immunpräzipitiert und die Kinasereaktion erfolgte bei 27 °C unter Zugabe von 1 μ g gereinigtem GST-c-Jun-Protein. Die Aktivität von JNK wurde durch Autoradiographie ermittelt. Die Quantifizierung gibt die x-fache Induktion zu WT Zellen transfiziert mit AAA/ Y₃₈₄G LMP1 verglichen zur IP-Kontrolle an.

Ergebnisse

Im nächsten Schritt sollte die molekulare Funktion des TAK1-Proteins in der Aktivierung von IKK2 durch LMP1 analysiert werden. Es wurde in Abbildung 14 gezeigt, dass NEMO eine weitere kritische Komponente in der Aktivierung von JNK im LMP1-Signalweg ist. NEMO kann, wie bereits beschrieben, K63-verknüpfte Ubiquitinketten binden, was für eine Rekrutierung von IKK an verschiedene zelluläre Rezeptoren von Wichtigkeit ist (Hadian et al, 2011; Wu et al, 2006a). Die Aktivierung von IKK und NF- κ B wurden als abhängig von dieser Ubiquitinierung beschrieben (Hadian et al, 2011; Wu et al, 2006a).

Um zu klären, ob TAK1 in der K63-verknüpften Ubiquitinierung von NEMO beteiligt ist, wurden HEK293 Wildtyp-Zellen oder Zellen mit einem Knockout von TAK1 mit NEMO- und Ubiquitin K63-Plasmiden kotransfiziert. Durch das Ubiquitin K63-Plasmid kann eine Ubiquitinierung von Proteinen nur noch über das Lysin an Position 63 erfolgen, was es ermöglicht, gezielt die K63-verknüpfte Ubiquitinierung von Proteinen zu untersuchen. Die Induktion der Zellen erfolgte durch Überexpression eines LMP1-Expressionsvektors. Fand eine Induktion der HEK293 Wildtyp-Zellen durch LMP1 statt, war eine starke Erhöhung der K63-verknüpften Ubiquitinierung von NEMO im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle (w/o) zu verzeichnen (Abb. 17). Der Knockout von TAK1 hemmte diese spezifische Ubiquitinierung von NEMO induziert durch LMP1 komplett in den Zellen (Abb. 17). Um zu klären, ob für die K63-verknüpfte Ubiquitinierung von NEMO die Kinaseaktivität von TAK1 eine Rolle spielt, wurden außerdem HEK293 Wildtyp-Zellen mit einem TAK1-Inhibitor behandelt. Eine Inhibition von TAK1 führte jedoch zu keiner Beeinträchtigung der K63-verknüpften Ubiquitinierung von NEMO nach Induktion durch LMP1 (Abb. 17). Es wurden dabei Konzentrationen des TAK1-Inhibitors (5Z)-7-Oxozeaenol gewählt, welche eine effiziente Blockierung der Aktivität von JNK in vorhergehenden Experimenten zeigten.

Insgesamt gibt dieser Versuch einen weiteren Hinweis darauf, dass das TAK1-Protein eine wichtige Rolle in der Aktivierung des kanonischen IKK-Komplexes spielt, was allerdings unabhängig von der Kinaseaktivität von TAK1 abläuft.

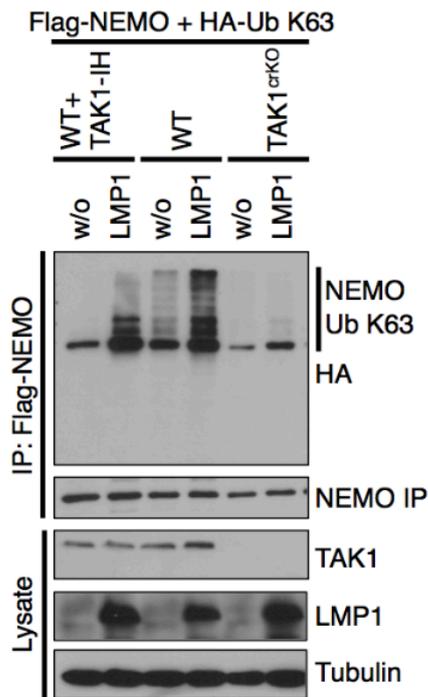


Abb. 17: Das TAK1-Protein ist essenziell für eine durch LMP1 induzierte NEMO-K63-Ubiquitinierung. HEK293 Wildtyp und TAK1^{crKO}HEK293 cl.3 Zellen wurden mit 0,5 μ g HA-Ubiquitin K63, 1 μ g Flag-NEMO und 4 μ g LMP1wt oder pRK5 Leervektor (w/o) transfiziert. Nach 24 h wurden die angegebenen Proben für 3 h mit 500 nM (5Z)-7-oxozeaenol (TAK1-IH) oder DMSO behandelt und in NP40-Lysepuffer mit NEM lysiert. Flag-NEMO wurde mittels Flag(6F7)-Beads immunopräzipitiert und die NEMO-Ubiquitinierung mittels Western Blot unter Zuhilfenahme des HA(3F10) Antikörpers bestimmt. Die Expression der transfizierten Konstrukte wurde in den Zelllysaten mittels der angegebenen Antikörper bestätigt.

4.1.2.2 Das TAK1-Protein wird für die Rekrutierung des IKK2/LMP1-Komplexes benötigt

Wie im Abschnitt 4.1.2.1 beschrieben, ist die Kinasefunktion von TAK1 für die Aktivierung von JNK durch LMP1 notwendig, für NF- κ B jedoch nicht relevant. Warum aber das TAK1-Protein insgesamt entscheidend für die Initiierung der beiden Signalwege NF- κ B und JNK ist, wurde über Ko-Immünpräzipitationen aufgeklärt. LMP1 bildet einen Signalkomplex in welchem IKK2 enthalten ist, was durch gleichzeitige Präzipitation beider Proteine in LCLs nachgewiesen werden kann (Schneider et al, 2008). Somit ist eine mögliche Funktion von TAK1 als Mediator dieser Komplexbildung in der Aktivierung von IKK2 durch LMP1 zu vermuten.

Die Interaktion von LMP1 und IKK2 wurde dazu in Anwesenheit und Abwesenheit von TAK1 über Ko-Immünpräzipitationen beurteilt. Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, kann in Wildtyp-Zellen eine Interaktion zwischen LMP1-Wildtyp und IKK2 detektiert werden. IKK2 und LMP1 interagieren jedoch nicht mehr miteinander, wenn TAK1 in den Zellen durch einen Knockout deaktiviert wurde (Abb. 18). Dieses Ergebnis zeigt, dass TAK1, als wichtiges Signalprotein, an der Bildung des initial notwendigen LMP1-Signalosoms zur Induktion der durch LMP1 vermittelten Signalwege essenziell ist.

Ergebnisse

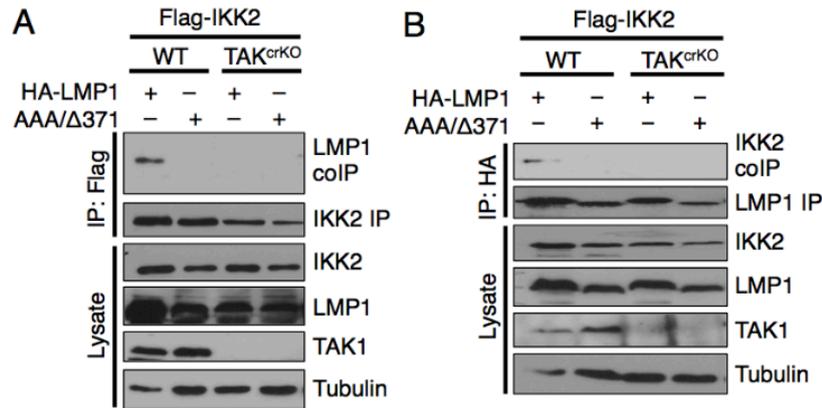


Abb. 18: Das TAK1-Protein ist für die Bildung des IKK2/LMP1-Signalkomplexes notwendig. A) HEK293 Wildtyp und TAK1^{crKO} HEK293 cl.3 Zellen wurden in 15 cm Schalen mit 4 µg Flag-IKK2 und 4 µg HA-LMP1wt oder HA-LMP1 AAA/Δ371 transfiziert. 24h nach Transfektion wurde Flag-IKK2 mit Flag(6F7)-Beads immunopräzipitiert und die Interaktion mit HA-LMP1 über Western Blot Analyse durch den HA (3F10) Antikörper detektiert. B) HEK293 Wildtyp und TAK1^{crKO} HEK293 cl.3 Zellen wurden in 15 cm Schalen mit 4 µg Flag-IKK2 und 4 µg HA-LMP1wt oder HA-LMP1 AAA/Δ371 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde HA-LMP1 mit HA (3F10) Beads immunopräzipitiert und die Interaktion mit Flag-IKK2 über Western Blot Analyse durch den IKKα/β Antikörper detektiert.

4.1.3 Tpl2 wird im LMP1-Signalweg aktiviert und aus dem TPL2/p105-Komplex freigesetzt

Nachdem in dieser Arbeit erstmals identifiziert werden konnte, dass IKK2 essenziell für eine Aktivierung von JNK durch LMP1 ist, sollte nun im Folgenden der genaue zugrundeliegende Mechanismus aufgeklärt werden. Dazu wurde die Serin/Threonin-Kinase TPL2 (*Tumor progression locus 2*) als potenzieller Mediator zwischen IKK2 und JNK im LMP1-CTAR2-Signaling getestet. Es wurde bereits gezeigt, dass TPL2 in verschiedenen Signalwegen über IKK2 aktiviert werden kann und die Überexpression von TPL2 JNK induziert. Bisher wurde jedoch noch keine Rolle von IKK2 im JNK-Signalweg aufwärts gelegen von TPL2 beschrieben (Gantke et al, 2012; Roget et al, 2012; Salmeron et al, 1996).

Für TPL2 wurde eine wichtige physiologische Rolle in verschiedenen Signalwegen wie TNF, IL-1, CD40 und TLR beschrieben (Vougioukalaki et al, 2011). Der Genlocus von TPL2 kodiert für zwei Isoformen des Proteins, die 58 kDa und die 52 kDa Variante, welche durch alternative translationale Startstellen generiert werden (Aoki et al, 1993; Vougioukalaki et al, 2011). Dabei ist bekannt, dass die 58 kDa Isoform von TPL2 weniger stabil als die 52 kDa Isoform ist, jedoch ein höheres

transformierendes Potential und eine gesteigerte Aktivität aufweist (Aoki et al, 1993).

In unstimulierten Zellen kommt TPL2 in einem Komplex mit dem NF- κ B-inhibitorischen Protein p105 vor, welches essenziell für die Proteinstabilität von TPL2 ist und den Zugang von TPL2 zu seinen Substraten blockiert (Gantke et al, 2012). Nach einer Agonisten-Stimulation phosphoryliert IKK2 p105 und führt damit zur proteolytischen Degradation von p105. TPL2 wird aus dem p105/TPL2-Komplex freigesetzt und agiert als MAP3K (Gantke et al, 2012; Heissmeyer et al, 1999; Roget et al, 2012). Für eine vollständige Aktivierung von TPL2 ist eine Phosphorylierung des Proteins an Serin 400 durch IKK2 notwendig (Gantke et al, 2012; Robinson et al, 2007; Roget et al, 2012).

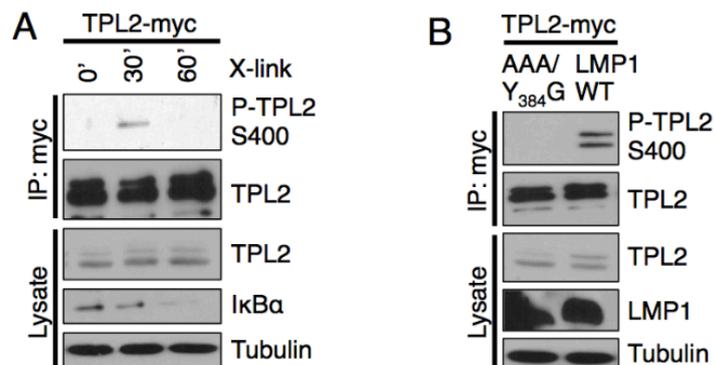


Abb. 19: LMP1 induziert die Phosphorylierung von TPL2 an Serin 400. A) HEK293:NGFR-LMP1wt Zellen wurden in 10 cm Schalen mit 1 μ g TPL2-myc Plasmid transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen durch NGFR-Antikörperquervernetzung für die angegebenen Zeitpunkte induziert. TPL2-myc wurde mittels G-Sepharose-Beads gekoppelt an myc (9E10) Antikörper immunpräzipitiert und die TPL2-Phosphorylierung an Serin 400 wurde über Western Blot Analyse unter Zuhilfenahme des phosphorylierungsstellenspezifischen Antikörpers TPL2 S400 detektiert. B) HEK293:NGFR-LMP1wt Zellen wurden mit 1 μ g TPL2-myc Plasmid und 1 μ g pCMV-HA-LMP1wt oder pCMV-HA-LMP1 AAA/Y384G Plasmid transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und TPL2-myc immunpräzipitiert. Die TPL2-Phosphorylierung an Serin 400 wurde über den angegebenen Antikörper mittels Western Blot Analyse detektiert.

Um festzustellen, ob auch im LMP1-Signalweg eine Aktivierung von TPL2 stattfindet, wurde untersucht, ob LMP1 die Phosphorylierung von TPL2 an Serin 400 induzieren kann. Dazu wurden HEK293 Zellen, welche das NGFR-LMP1-Konstrukt exprimieren, mit einem TPL2-Plasmid transfiziert und anschließend entweder durch Aktivierung von NGFR-LMP1 oder durch Überexpression von LMP1-WT induziert. Als Negativkontrolle wurde die LMP1 AAA/Y₃₈₄G-Mutante transfiziert, welche kein aktives CTAR2-Signaling mehr zeigt. Anschließend erfolgte

Ergebnisse

eine Immunpräzipitation von TPL2, um die Phosphorylierung an Serin 400 mittels Western Blot nachzuweisen. Ohne Immunpräzipitation von TPL2 war es mit dem verwendeten TPL2 S400-Antikörper technisch nicht möglich, spezifische Banden im Immunblot zu detektieren. Wie in Abb. 19A zu sehen ist, führt die Aktivierung von NGFR-LMP1 nach 30 min zu einer Phosphorylierung von TPL2 an S400. Bereits 60 min nach Aktivierung von NGFR-LMP1 kann die Phosphorylierung von TPL2 an Serin 400 nicht mehr detektiert werden. Die durch LMP1 induzierte Phosphorylierung von TPL2 an Serin 400 scheint also für eine Aktivierung des TPL2-Proteins notwendig zu sein und tritt demnach direkt beim Anschalten von Signalwegen auf. Auch eine Induktion von LMP1 durch Überexpression induziert die Phosphorylierung von TPL2 an Serin 400 (Abb. 19B). Die mitgeführte LMP1-Mutante AAA/Y₃₈₄G, welche als Negativkontrolle dient, kann die Phosphorylierung an S400 erwartungsgemäß nicht hervorrufen.

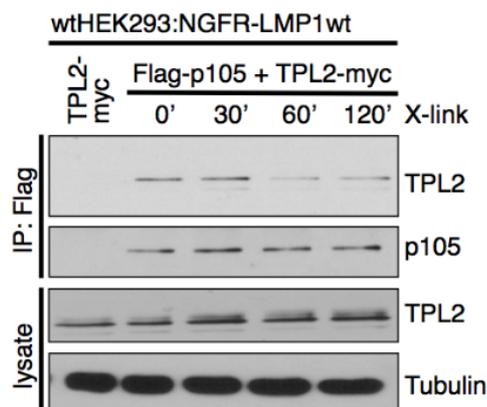


Abb. 20: Die Induktion von LMP1 führt zur Freisetzung von TPL2 aus dem p105/TPL2-Komplex. HEK293:NGFR-LMP1wt Zellen wurden in 10 cm Schalen mit 0,5 μ g Flag-p105 und 1 μ g TPL2-myc Plasmid transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Induktion der Zellen durch NGFR-Antikörperquervernetzung für die angegebenen Zeitpunkte. Flag-p105 wurde mittels Flag (6F7) G-Sepharose-Beads immunpräzipitiert und die Interaktion von p105 mit TPL2 über Western Blot analysiert.

Im nächsten Schritt wurde die Freisetzung von TPL2 aus dem p105/TPL2-Komplex untersucht, um einen weiteren Hinweis für eine Aktivierung von TPL2 durch LMP1 zu erhalten. Dazu wurden Ko-Immunpräzipitationen in HEK293:NGFR-LMP1wt Zellen nach Überexpression von TPL2 und p105 durchgeführt. Die Induktion der Zellen erfolgte über die Aktivierung von NGFR-LMP1 mit Hilfe von Antikörpern. Zu den in Abbildung 20 angegebenen Stimulationszeitpunkten wurde p105 präzipitiert und die Interaktion mit TPL2 beurteilt. Ohne Induktion der Zellen (0') kann nach

Präzipitation von p105 eine Interaktion mit TPL2 nachgewiesen werden (Abb. 20). Schon nach 60 und 120 min Aktivierung von NGFR-LMP1 interagiert deutlich weniger TPL2 mit p105 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 20). Diese Daten bestätigen, dass TPL2 nach Induktion durch LMP1 aus dem p105/TPL2-Komplex in HEK293 Zellen freigesetzt wird.

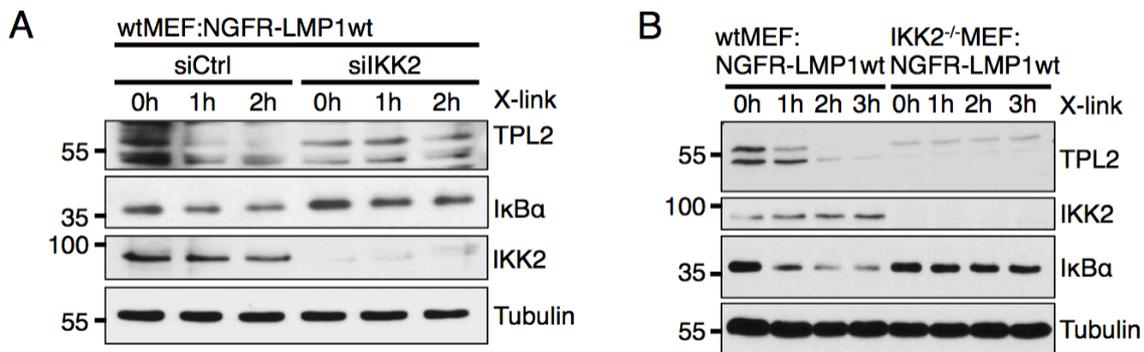


Abb. 21: TPL2 wird in Abhängigkeit von IKK2 in den Zellen nach Induktion durch LMP1 degradiert und aktiviert. A) MEF:NGFR-LMP1wt Wildtyp-Zellen wurden zweimal mit siRNA gegen murines TPL2 (siTPL2) oder Kontroll-siRNA (siCtrl) innerhalb von 48 h transfiziert. Anschließend wurden die Zellen über NGFR-Antikörperquervernetzung für die angegebenen Zeitpunkte induziert. Die TPL2-Degradation wurde über Western Blot Analyse mit dem TPL2 (M-20) Antikörper detektiert. B) IKK2^{-/-}MEF:NGFR-LMP1wt und MEF:NGFR-LMP1wt Wildtyp-Zellen wurden durch NGFR-Antikörperquervernetzung für die angegebenen Zeitpunkte induziert. Die Degradation von TPL2 wurde durch den entsprechenden Antikörper über Western Blot Analysen beurteilt.

Ein weiterer Hinweis auf eine Aktivierung von TPL2 durch LMP1 konnte durch die Degradation des TPL2-Proteins, aufgrund seiner Instabilität nach Aktivierung und Freisetzung aus dem TPL2/p105-Komplex, gewonnen werden. Dazu wurden Wildtyp-MEFs, welche das NGFR-LMP1-Konstrukt exprimieren, mittels Antikörper aktiviert und TPL2 im Western Blot nachgewiesen. Je länger die Induktion durch LMP1 in den Zellen stattfand, umso weniger TPL2 konnte im Western Blot detektiert werden (Abb. 21B, wtMEF:NGFR-LMP1wt). Bereits zwei Stunden nach Aktivierung von NGFR-LMP1 ist nahezu das gesamte TPL2-Protein degradiert worden. Interessanterweise wird aber die aktivere 58 kDa Form von TPL2 stärker abgebaut als die 52 kDa Isoform (Abb. 21A und B). Diese stimulationsabhängige Degradation von TPL2 gibt Hinweise darauf, dass TPL2 durch LMP1 in der Zelle aktiviert wird.

Um festzustellen, ob IKK2 auch im LMP1-Signalweg aufwärts gelegen von TPL2 agiert, wurde in Abwesenheit von IKK2 der Effekt auf die Aktivierung von TPL2

untersucht. Mittels Knockdown von IKK2 durch siRNA und Knockout von IKK2 konnte bestätigt werden, dass die Degradation und Aktivierung von TPL2 von IKK2 anhängig ist (Abb. 21A und B). Der Verlust von IKK2 führte zu einer Inhibition der Degradation von TPL2 nach Induktion der Zellen durch LMP1 (Abb. 21A und B). Um zu untersuchen, ob die Aktivierung von TPL2 eine Abhängigkeit von TAK1, einer weiteren wichtigen Kinase im LMP1-Signalweg zeigt, wurde TAK1 in MEF:NGFR-LMP1 Zellen durch den TAK1-Inhibitor (5Z)-7-Oxozeaenol gehemmt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit DMSO behandelt. Anschließend fand eine Aktivierung von NGFR-LMP1 durch Antikörper in den Zellen statt. Nach Aktivierung der Zellen konnte sowohl nach Inhibition von TAK1, als auch in den Kontrollzellen eine Degradation von TPL2 detektiert werden (Abb. 22). Lediglich eine leichte Verzögerung der Degradation von TPL2 ist nach Inhibition von TAK1 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach 2 h Aktivierung von NGFR-LMP1 zu verzeichnen (Abb.22). Die Kinaseaktivität von TAK1 scheint also für eine Aktivierung von TPL2 nicht essenziell zu sein.

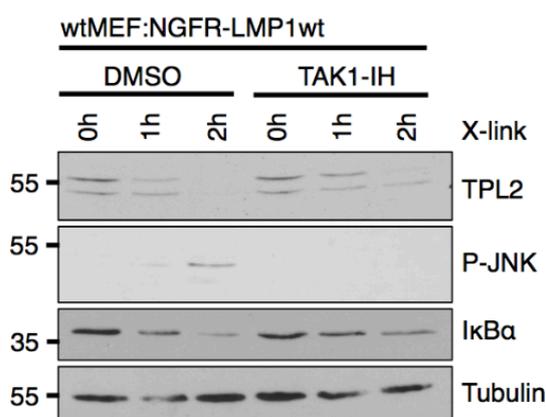


Abb. 22: Die Degradation und Aktivierung von TPL2 findet unabhängig von TAK1 statt. MEF:NGFR-LMP1wt Wildtyp-Zellen wurden für 3 h mit 500 nM (5Z)-7-oxozeaenol (TAK1-IH) oder DMSO vorinkubiert und anschließend über NGFR-Antikörperquervernetzung für die angegebenen Zeitpunkte induziert. Die Degradation von TPL2 wurde über Western Blot Analyse unter Zuhilfenahme des TPL2 (M-20) Antikörpers bestimmt.

Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse, dass auch in der LMP1-Signalkaskade IKK2 der Mediator in der Aktivierung von TPL2 ist. Diese Aktivierung von TPL2 konnte durch die Induktion der Phosphorylierung an Serin 400, die Freisetzung aus dem p105/TPL2-Komplex und die induzierte Degradation von TPL2 nach Aktivierung von NGFR-LMP1 nachgewiesen werden.

4.1.4 TPL2 aktiviert JNK im LMP1-Signalweg

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass TPL2 in Abhängigkeit von IKK2 im LMP1-Signalweg aktiviert wird. Ob TPL2 unter LMP1-CTAR2 auch in der Induktion von JNK involviert ist, soll im folgenden Abschnitt geklärt werden.

Dazu wurde ein durch siRNA vermittelter Knockdown von TPL2 in MEFs, welche das NGFR-LMP1-Konstrukt exprimieren, generiert. Durch Aktivierung von NGFR-LMP1 wurden die Zellen induziert und die Phosphorylierung von JNK in Zellen mit Knockdown von TPL2 und Kontrollzellen verglichen. Wie in Abbildung 23A zu erkennen ist, führt der Knockdown von TPL2 verglichen zu den siRNA-Kontrollansätzen zu einer starken Reduktion der durch LMP1 induzierten Phosphorylierung von JNK. Diese von TPL2 abhängige Aktivierung von JNK im LMP1-Signalweg konnte außerdem nach Inhibition von TPL2 und Knockout von TPL2 bestätigt werden. Auch hier führte die Behandlung der Zellen mit dem spezifischen TPL2-Inhibitor TC-S 7006, sowie die Aktivierung von NGFR-LMP1 in TPL2-Knockout-Zellen zu einer signifikant reduzierten Phosphorylierung von JNK im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen (Abb. 23B und C).

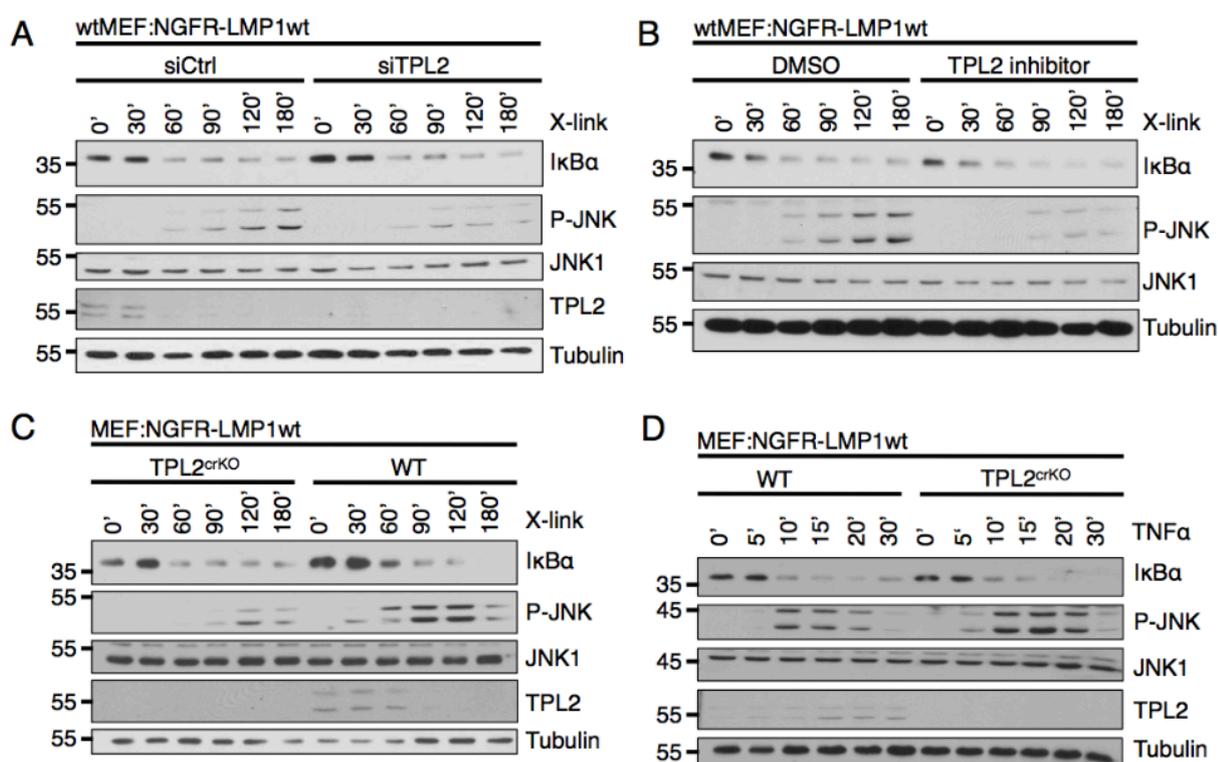


Abb. 23: TPL2 wird für eine vollständige Aktivierung von JNK im LMP1-Signalweg benötigt. A) MEF:NGFR-LMP1wt Wildtyp-Zellen wurden in 10 cm Schalen zweimal mit siRNA gegen murines TPL2 (siTPL2) bzw. Kontroll siRNA (siCtrl) innerhalb von 48 h transfiziert. Anschließend erfolgte eine Induktion von LMP1 mittels NGFR-Antikörperquervernetzung für die angegebenen Zeitpunkte. Die Aktivierung von JNK wurde durch den P-JNK Antikörper (ab124956) und die Aktivierung von NF-κB durch Detektion der Degradation von IκBα über Western Blot Analyse bestimmt (auch B, C und D). B) MEF:NGFR-LMP1wt Wildtyp-Zellen wurden für 3 h mit 10 μM TC-S 7006 (TPL2-IH) oder DMSO vorinkubiert und anschließend mit NGFR-Antikörperquervernetzung für die angegebenen Zeitpunkte induziert. C) MEF:NGFR-LMP1wt Wildtyp und TPL2^{crKO}MEF:NGFR-LMP1wt (cl.8) Zellen wurden mit NGFR-Antikörperquervernetzung für die angegebenen Zeitpunkte induziert. D) MEF:NGFR-LMP1wt Wildtyp und

Ergebnisse

TPL2^{crKO}MEF:NGFR-LMP1wt (cl.8) Zellen wurden mit 20 ng/ml TNF α für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert.

Bei dieser von IKK2 und TPL2 abhängigen Aktivierung von JNK handelt es sich um einen für den LMP1-Pseudorezeptor spezifischen Weg. Findet eine Stimulation mit TNF α in TPL2-Knockout-MEFs im Vergleich zu Wildtyp-MEFs statt, zeigt sich keine Reduktion der Phosphorylierung von JNK in Abwesenheit von TPL2 nach Induktion der Zellen (Abb. 23D). Zumindest im TNF-Signalweg verläuft die Aktivierung von JNK also unabhängig von der Serin/Threonin-Kinase TPL2.

Um die Beobachtung, dass TPL2 an der Aktivierung von JNK durch LMP1 beteiligt ist, zu bestätigen, wurden außerdem *in vitro* Immunokomplex-Kinase-Versuche durchgeführt. Dazu wurden HEK293 Wildtyp-Zellen und drei verschiedene TPL2-Knockout-Einzelzellklone mit einem JNK-Plasmid transfiziert und durch Koexpression von LMP1-Wildtyp induziert. Als Negativkontrolle fand eine Koexpression der LMP1-Mutante Y384G oder dem Leervektor (*vector*) statt. Nach Immunpräzipitation von JNK wurde mittels Autoradiographie die Fähigkeit von JNK, sein Substrat c-Jun in Anwesenheit oder Abwesenheit von TPL2 zu phosphorylieren, beurteilt. In Wildtyp-Zellen konnte nach Induktion von LMP1 eine starke Phosphorylierung von c-Jun und somit eine hohe Aktivität von JNK nachgewiesen werden. Diese durch LMP1 induzierte Aktivität von JNK ist jedoch in allen drei TPL2-KO-Einzelzellklonen sehr stark reduziert. Dies wird an einer Senkung der x-fachen Induktion der Phosphorylierung von c-Jun von 15,5 in WT Zellen auf 4,5-2,2 in den TPL2-KOs deutlich (Abb. 24). Die Negativkontrollen des Experimentes stellen die Versuchsansätze mit Kotransfektion von LMP1 Y384G sowie des Leervektors (*vector*) dar. Erwartungsgemäß konnte weder in WT-Zellen noch in den TPL2-Knockouts eine Phosphorylierung von c-Jun in den Negativkontrollen detektiert werden (Abb. 24).

Insgesamt bestätigen diese Versuche, dass TPL2 in der Aktivierung von JNK in der LMP1-Signalkaskade involviert ist.

Ergebnisse

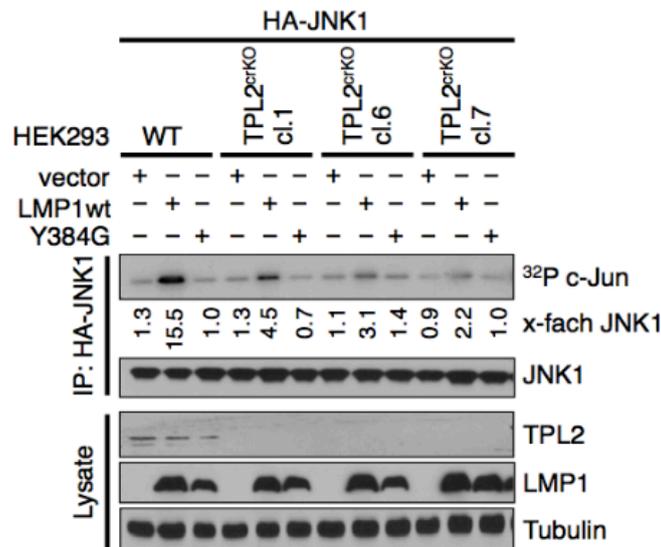


Abb. 24: Der Knockout von TPL2 senkt die Aktivität von JNK nach Induktion von LMP1. Drei unabhängige TPL2-Knockout-Zelllinien und HEK293 WT-Zellen wurden in 6-Well Platten mit 1 μ g HA-JNK1 zusammen mit 1 μ g pRK5 (vector) oder LMP1wt- bzw. LMP1 Y384G-Plasmid transfiziert. HA-JNK1 wurde mittels HA(3F10) G-Sepharose-Beads präzipitiert und die Kinaseraktion bei 27 °C für 25 min unter Zugabe von 1 μ g gereinigtem c-Jun-Protein durchgeführt. Die Aktivität von JNK wurde mittels Autoradiographie bestimmt. Die erfolgte Präzipitation von JNK1, die Expression der LMP1-Konstrukte und der Knockout von TPL2 wurden in den Zelllysaten mittels der angegebenen Antikörper in Western Blot Analysen bestätigt. Die Quantifizierung gibt die x-fache Induktion zu WT-Zellen transfiziert mit LMP1 Y384G verglichen zur IP-Kontrolle an.

4.1.5 TPL2 ist nicht notwendig um NF- κ B durch LMP1 zu aktivieren

Wie in Abschnitt 4.1.4 beschrieben, konnte eine Aktivierung von JNK in Abhängigkeit von TPL2 im LMP1-Signalweg nachgewiesen werden. Weiterhin wurde untersucht, inwieweit TPL2 auch in der Aktivierung von NF- κ B durch LMP1 involviert ist.

Im Jahr 2002 zeigte Eliopoulos et al., dass eine Überexpression einer katalytisch inaktiven Mutante von TPL2 das durch LMP1 induzierte NF- κ B-Signaling reduziert (Eliopoulos et al, 2002). Außerdem wird in einer Publikation von Gewurz et al. eine Rolle von TPL2 in der Aktivierung von NF- κ B vermutet (Gewurz et al, 2012).

Diese postulierte von TPL2-abhängige Aktivierung von NF- κ B, wurde in dem hier verwendeten induzierbaren Zellsystem untersucht. Dazu wurde die durch Aktivierung von NGFR-LMP1 induzierte Degradation von I κ B α nach Inhibition von TPL2, nach Knockdown von TPL2 und nach Knockout von TPL2 beurteilt.

Es zeigte sich keine Beeinträchtigung in der Degradation von I κ B α nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen eines spezifischen

TPL2-Inhibitors im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abb. 23B). Auch die Translokation von p65 in den Nukleus ist durch Inhibition von TPL2 nicht gestört (Abb. 25B). Allerdings konnte im gleichen Experiment eine verminderte Phosphorylierung von JNK nach TPL2-Inhibition festgestellt werden, wie schon in Abschnitt 4.1.4 gezeigt werden konnte (Abb. 25B). In Zellen mit einem Knockout von TPL2 durch CRISPR/Cas9, sowie in Zellen mit einem Knockdown von TPL2 durch siRNA konnte bestätigt werden, dass die Degradation von I κ B α nicht durch die Abwesenheit von TPL2 beeinträchtigt ist (Abb. 23 A und 23C, Abb. 25A).

Weiterhin wurden Kern-*shift*-Experimente in Zellen mit Knockdown und Knockout von TPL2 durchgeführt, um die Phosphorylierung und die Translokation von p65 nach Aktivierung von NGFR-LMP1 zu beurteilen. Dabei zeigte sich, dass der Knockdown von TPL2 durch siRNA, sowie der Knockout von TPL2 durch CRISPR/Cas9 keinen Einfluss auf die Translokation von p65 in den Nukleus und die Phosphorylierung von p65 hat (Abb. 25A und C). Das Level an p65 im Nukleus, sowie die Stärke der Phosphorylierung von p65 nach Aktivierung von NGFR-LMP1 unterscheiden sich in den Kontrollzellen im Vergleich zu TPL2-Knockdown- bzw. TPL2-Knockout-Zellen nicht (Abb. 25A und C).

Um genauer zu unterscheiden, ob TPL2 einen Einfluss auf den kanonischen oder nicht-kanonischen NF- κ B-Signalweg hat, wurden HEK293 Wildtyp-Zellen und HEK293 TPL2-Knockout-Zellen durch Überexpression von LMP1 induziert. Als Negativkontrolle fand eine Überexpression der LMP1-Mutante AAA/ Δ 371 oder der Leervektorkontrolle pRK5 statt. In Kern-*Shift*-Experimenten wurde anschließend die Translokation der kanonischen NF- κ B-Komponenten p65 und p50, sowie der nicht-kanonischen NF- κ B-Komponenten RelB und p52 untersucht. Wie in Abb. 25D zu sehen ist, führt ein Knockout von TPL2 zu keiner Beeinträchtigung der Translokation von den getesteten kanonischen und den nicht-kanonischen NF- κ B-Proteinen.

Zusammenfassend belegen diese verschiedenen Versuchsansätze, dass TPL2 für die Degradation von I κ B α nicht essenziell ist. Auch die Translokation und die Phosphorylierung von p65 finden unabhängig von TPL2 nach Aktivierung von LMP1 statt. Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass für die Aktivierung von NF- κ B TPL2 nicht notwendig ist. Dieses Ergebnis steht somit im Gegensatz zu der Aussage von Eliopoulos et al..

Ergebnisse

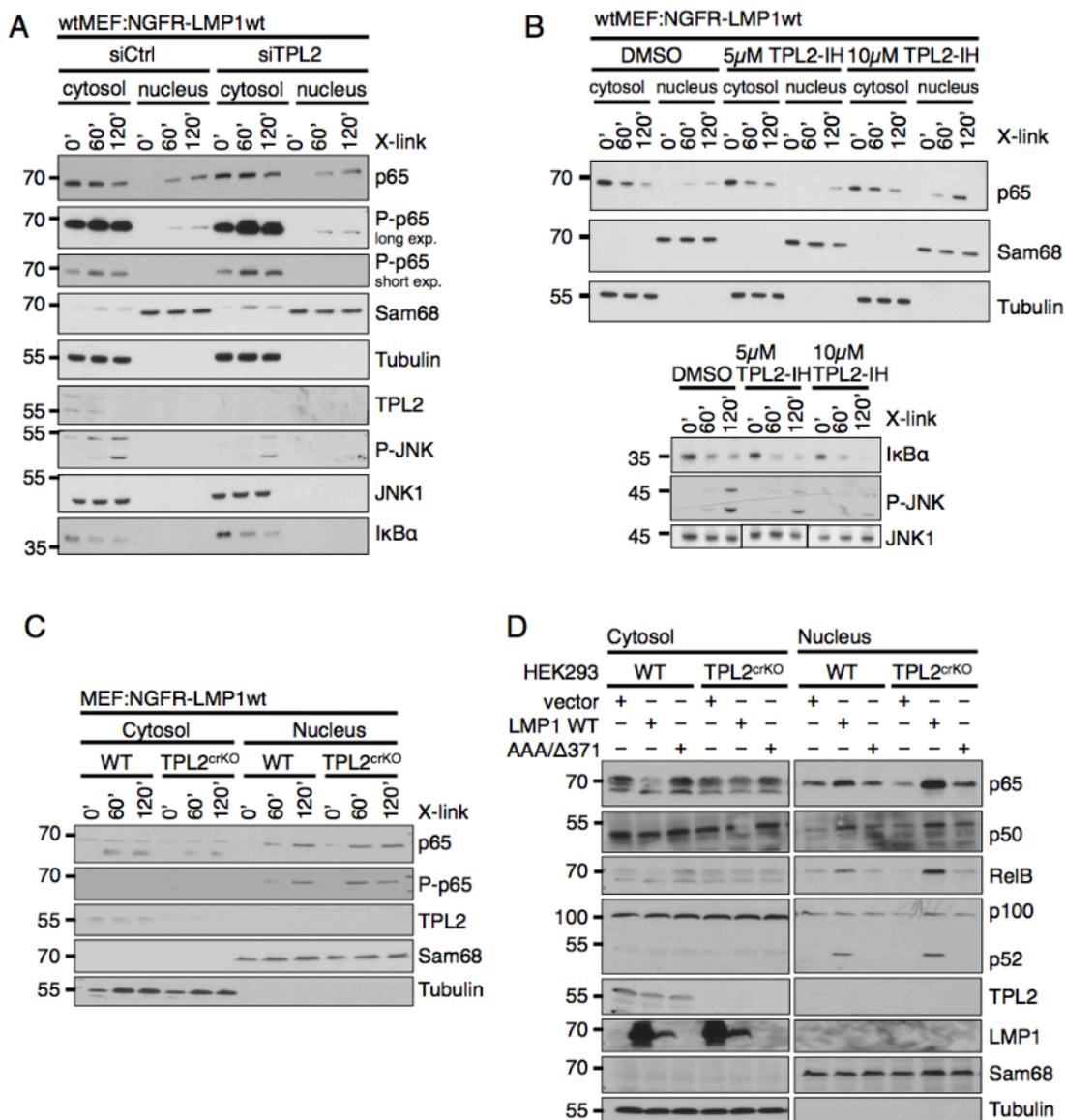


Abb. 25: Die Aktivierung von NF-κB durch LMP1 verläuft unabhängig von TPL2. A) MEF:NGFR-LMP1wt Wildtyp-Zellen wurden in 10 cm Schalen mit siRNA gegen murines TPL2 (siTPL2) oder Kontroll-siRNA (siCtrl) zweimal innerhalb 48 h transfiziert. Anschließend erfolgte eine Induktion der Zellen durch NGFR-Antikörperquervernetzung für die angegebenen Zeitpunkte. Zytoplasmatische und nukleäre Fraktionen wurden getrennt und durch Immunblot unter Zuhilfenahme der angegebenen Antikörper analysiert. Die JNK-Aktivierung und Degradation von IκBa wurde in der zytoplasmatischen Fraktion mit den angegebenen Antikörpern beurteilt. B) MEF:NGFR-LMP1wt Wildtyp-Zellen wurden für 3 h mit 10 μM TC-S 7006 (TPL2-IH) oder DMSO vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Induktion der Zellen durch NGFR-Antikörperquervernetzung für die angegebenen Zeitpunkte. Zytoplasmatische und nukleäre Fraktionen wurden getrennt und durch Immunblot unter Zuhilfenahme der angegebenen Antikörper analysiert. Die JNK-Aktivierung und Degradation von IκBa wurde in der zytoplasmatischen Fraktion mit den angegebenen Antikörpern beurteilt. C) MEF:NGFR-LMP1wt Wildtyp und TPL2^{crKO}MEF:NGFR-LMP1wt (cl.8) Zellen wurden durch NGFR-Antikörperquervernetzung für die angegebenen Zeitpunkte induziert und anschließend die zytoplasmatische und nukleäre Fraktion mittels Western Blot Analyse auf Translokation von p65 hin untersucht. Der TPL2 Knockout wurde mit Hilfe des TPL2 (M-20) Antikörpers bestätigt. D) HEK293 Wildtyp und TPL2^{crKO}HEK293 cl.1 Zellen wurden in 10 cm Schalen mit 4 μg pRK5

Leervektor oder pCMV-HA-LMP1wt- bzw. pCMV-HA-LMP1 AAA/ Δ 371-Plasmid transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die zytoplasmatische und nukleäre Fraktion separiert. Beide Fraktionen wurden mittels Immunoblot mit Antikörpern gegen p65, p50, p100/p52, RelB, Sam68 und Tubulin wie angegeben analysiert. Der Knockout von TPL2 und die Expression der entsprechenden LMP1-Konstrukte wurde in der zytoplasmatischen Fraktion mit den angegebenen Antikörpern bestätigt.

4.1.6 IKK2, TPL2 und TAK1 besitzen unterschiedliche Funktionen in der Aktivierung von JNK und NF- κ B durch LMP1 und CD40

EBV infiziert und transformiert hauptsächlich B-Zellen (Young & Rickinson, 2004). Die bisher im MEF- und HEK293-Zellsystem gezeigten Ergebnisse zur Funktion von IKK2, TAK1 und TPL2 in der LMP1-Signalkaskade sollten nun auch direkt in einer B-Zelllinie bestätigt werden. Dazu wurden BL41 Zellen, welche das NGFR-LMP1-Konstrukt exprimieren, in den folgenden Versuchen verwendet. Diese Zellen ermöglichen es, gleichzeitig den LMP1-Signalweg mit dem CD40-Signalweg, dem zellulären Mimik von LMP1, zu vergleichen. Bei den BL41:NGFR-LMP1 Zellen handelt es sich um eine EBV-negative B-Zelllinie, in welche stabil ein NGFR-LMP1-Konstrukt eingebracht wurde. Einerseits lässt sich dieses NGFR-LMP1-Konstrukt über NGFR-Antikörperquervernetzung induzieren und ermöglicht es somit, den LMP1-Signalweg zu untersuchen. Andererseits können über eine Stimulation mit CD40L die auf der Oberfläche der Zellen vorkommenden CD40-Rezeptoren stimuliert und somit der CD40-Signalweg analysiert werden. In den in diesem Abschnitt durchgeführten Experimenten wurde die Rolle von IKK2, TAK1 und TPL2 im LMP1- und CD40-Signalweg verglichen.

Die Inhibition von IKK2 durch die Behandlung der Zellen mit dem ACHP-Inhibitor blockierte die Degradation von I κ B α und die Aktivierung von JNK nach Induktion von LMP1 (Abb. 26A). Dieses Ergebnis konnte vorher bereits in MEFs gezeigt werden. Im Gegensatz dazu führte eine CD40L-Stimulation in Kombination mit der Inhibition von IKK zu keiner Beeinträchtigung von JNK (Abb. 26B). Die Aktivierung von NF- κ B ist im CD40-Signalweg jedoch abhängig von IKK2 (Abb. 26B). Dieser Vergleich zwischen LMP1 und CD40 macht deutlich, dass die Aktivierung von JNK in Abhängigkeit von IKK2 ein spezieller Mechanismus des LMP1-Signalweges ist und nicht im CD40-Signalweg zum Tragen kommt.

Im MEF:NGFR-LMP1-System wurde außerdem im Abschnitt 4.1.2 gezeigt, dass die

Ergebnisse

Kinaseaktivität von TAK1 für eine Phosphorylierung von JNK durch LMP1, nicht aber für eine Degradation von I κ B α , essenziell ist. Die gleichen Ergebnisse konnten in BL41:NGFR-LMP1 Zellen nach Aktivierung von NGFR-LMP1 und Inhibition von TAK1 mit dem Inhibitor (5Z)-7-Oxozeaenol erzielt werden. Es zeigte sich, dass eine Inhibition von TAK1 zur Blockierung der Phosphorylierung von JNK durch LMP1 führt, die Degradation von I κ B α jedoch nicht beeinträchtigt ist (Abb. 26C). Eine CD40L-Stimulation hingegen ergab, dass die Inhibition von TAK1 sowohl JNK, als auch den NF- κ B-Signalweg blockiert (Abb. 26D). Die Kinaseaktivität von TAK1 ist also für die Aktivierung von JNK durch LMP1 und CD40 unerlässlich, während die Aktivierung von NF- κ B nur im CD40-Signalweg eine Abhängigkeit von TAK1 zeigt. Auch die Rolle von TPL2 in der Aktivierung von JNK im LMP1-Signalweg konnte im BL41 Zellsystem bestätigend nachgewiesen werden. Auch in B-Zellen führte eine Inhibition von TPL2 zur Senkung der Phosphorylierung von JNK nach Induktion durch LMP1, während die Degradation von I κ B α keinerlei Beeinträchtigung zeigte (Abb. 26E). Im CD40-Signalweg hingegen ist weder die Aktivierung von JNK noch die Induktion von NF- κ B abhängig von TPL2 (Abb. 26F).

Auch die Aktivierung von ERK wurde in unterschiedlichen Signalwegen bereits als ein von TPL2 abhängiger Prozess beschrieben (Das et al, 2005; Eliopoulos et al, 2003). Auch im BL41-Zellsystem wurde deshalb die Aktivierung von ERK in Abhängigkeit von IKK2, TAK1 und TPL2 untersucht. Die Phosphorylierung von ERK erwies sich dabei sowohl unter LMP1 als auch CD40 als abhängig von IKK2, TAK1 und TPL2 (Abb. 26).

Ergebnisse

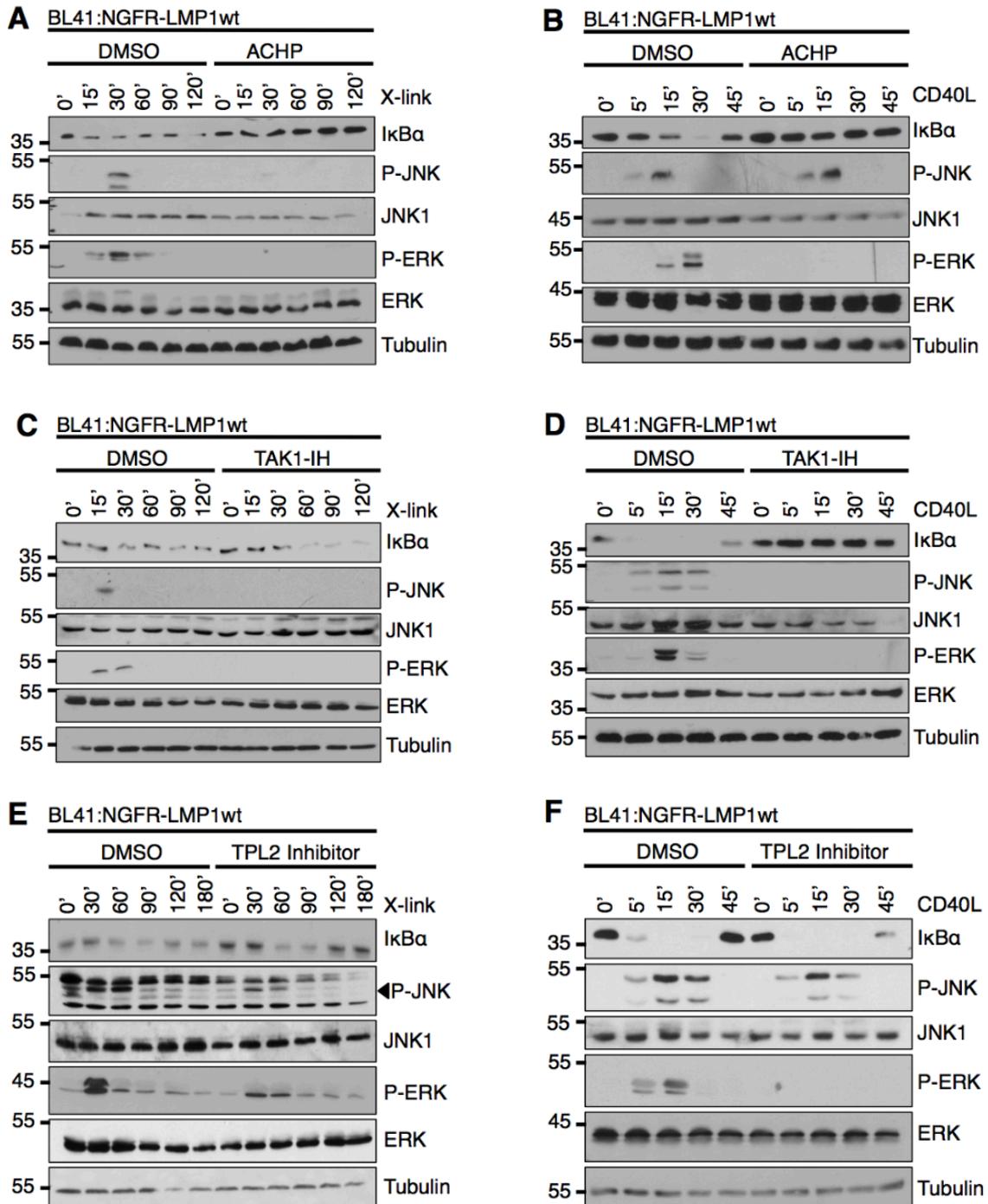


Abb. 26: LMP1 und CD40 unterscheiden sich in den Funktionen von IKK2, TAK1 und TPL2 in der Aktivierung von JNK und NF- κ B in B-Zellen. A) BL41:NGFR-LMP1wt Zellen wurden 30 min mit 5 μ M ACHP (IKK-IH) oder DMSO vorinkubiert und anschließend mittels NGFR-Antikörperquervernetzung für die angegebenen Zeitpunkte induziert. Die Aktivierung der Signalwege wurde in Immunoblot-Analysen unter Zuhilfenahme der entsprechenden Antikörper beurteilt. Die Phosphorylierung von JNK wurde mittels des P-JNK/SAPK #4668S Antikörpers detektiert. B) BL41:NGFR-LMP1wt Zellen wurden 30 min mit 5 μ M ACHP (IKK-IH) oder DMSO vorinkubiert und anschließend mittels 600 ng/ml CD40L für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Die Aktivierung der Signalwege wurde in Immunoblot-Analysen unter Zuhilfenahme der entsprechenden Antikörper beurteilt. Die Phosphorylierung von JNK wurde mittels des P-JNK/SAPK #9251 Antikörpers detektiert. C) BL41:NGFR-LMP1wt Zellen wurden 3 h mit 0,5 μ M (5Z)-7-oxozeaenol (TAK1-IH) oder DMSO vorinkubiert und anschließend mittels NGFR-Antikörperquervernetzung für die

Ergebnisse

angegebenen Zeitpunkte induziert. Die Aktivierung der Signalwege wurde in Immunoblot-Analysen unter Zuhilfenahme der entsprechenden Antikörper beurteilt. Die Phosphorylierung von JNK wurde mittels des P-JNK ab124956 Antikörpers detektiert. D) BL41:NGFR-LMP1wt Zellen wurden 3 h mit 0,5 μ M (5Z)-7-oxozeaenol (TAK1-IH) oder DMSO vorinkubiert und anschließend mittels 600 ng/ml CD40L für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Die Aktivierung der Signalwege wurde in Immunoblot-Analysen unter Zuhilfenahme der entsprechenden Antikörper beurteilt. Die Phosphorylierung von JNK wurde mittels des P-JNK/SAPK #9251 Antikörpers detektiert. E) BL41:NGFR-LMP1wt Zellen wurden 3 h mit 10 μ M TC-S 7006 (TPL2-IH) oder DMSO vorinkubiert und anschließend mittels NGFR-Antikörperquervernetzung für die angegebenen Zeitpunkte induziert. Die Aktivierung der Signalwege wurde in Immunoblot-Analysen unter Zuhilfenahme der entsprechenden Antikörper beurteilt. Die Phosphorylierung von JNK wurde mittels des P-JNK ab124956 Antikörpers detektiert. F) BL41:NGFR-LMP1wt Zellen wurden 3 h mit 10 μ M TC-S 7006 (TPL2-IH) oder DMSO vorinkubiert und anschließend mittels 600 ng/ml CD40L für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Die Aktivierung der Signalwege wurde in Immunoblot-Analysen unter Zuhilfenahme der entsprechenden Antikörper beurteilt. Die Phosphorylierung von JNK wurde mittels des P-JNK/SAPK #9251 Antikörpers detektiert.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass trotz der großen Ähnlichkeit des CD40-Signalweges und seinem viralen Mimik LMP1 deutliche Unterschiede in der Signaltransduktion vorliegen. So ist im Gegensatz zu CD40 im LMP1-Signalweg die Aktivierung von JNK abhängig von IKK2 und TPL2. Weiterhin zeigt nach Aktivierung von NGFR-LMP1 NF- κ B keine Abhängigkeit von der Kinasefunktion von TAK1, während jedoch nach CD40-Stimulation für eine Induktion von NF- κ B die Kinaseaktivität von TAK1 notwendig ist.

Um die neu entdeckte Rolle von TPL2 und IKK2 in der Aktivierung von JNK durch LMP1 in einem physiologischen Zellsystem abschließend zu bestätigen, wurde die LCL Zelllinie B2264-19/3 verwendet. Bei dieser lymphoblastoiden Zelllinie handelt es sich um eine EBV-transformierte Zelllinie, weshalb dieses Zellsystem dem biologischen Ereignis einer Infektion von B-Zellen mit EBV am nächsten kommt. LCL B2264-19/3 exprimieren stabil ein NGFR-LMP1-Konstrukt, welches es ermöglicht die Aktivierung von LMP1 zeitabhängig in der Zelle zu untersuchen.

In diesen Zellen wurde IKK durch ACPH bzw. TPL2 durch einen spezifischen TPL2-Inhibitor gehemmt und anschließend NGFR-LMP1 durch eine Antikörperquervernetzung induziert. Die Inhibition von IKK2 führte in den LCLs zu einer vollständigen Blockierung der Phosphorylierung von JNK (Abb. 27). Die Inhibition von TPL2 hemmte die Phosphorylierung von JNK hingegen nicht komplett, senkte sie aber signifikant im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollzellen (Abb. 27). Möglicherweise existiert also neben der neu entdeckten

IKK2-TPL2-JNK-Achse noch ein weiterer Weg, welcher unabhängig von TPL2 über IKK2 nach Induktion von NGFR-LMP1 JNK aktivieren kann. Der Mechanismus der von IKK2 und TPL2 abhängigen Aktivierung von JNK durch LMP1 konnte somit in den EBV-transformierten LCLs bestätigt werden.

Insgesamt wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle von TPL2, IKK2 und TAK1 im LMP1-Signalweg in drei verschiedenen Zellsystemen, dem MEF:NGFR-LMP1-, dem BL41:NGFR-LMP1- und dem LCL:NGFR-LMP1-System, aufgeklärt.

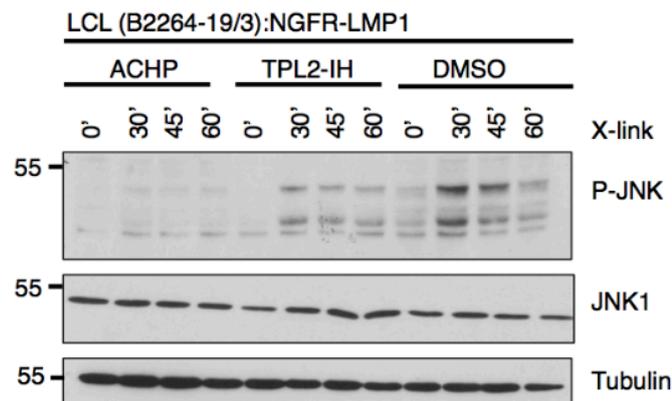


Abb. 27: Die Inhibition von IKK hemmt in EBV-transformierten humanen B-Zellen die Aktivierung von JNK durch LMP1. Die Inhibition von TPL2 reduziert die Phosphorylierung von JNK durch LMP1 signifikant. LCL (B2264-19/3):NGFR-LMP1 Zellen wurden 3 h mit 10 μ M TC-S 7006 (TPL2-IH), 30 min mit 5 μ M ACHP (IKK-IH) oder DMSO vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Induktion der Zellen durch eine NGFR-Antikörperquervernetzung für die angegebenen Zeitpunkte. Die Aktivität von JNK wurde in Immunoblot-Analysen durch Einsatz des P-JNK ab124956 Antikörpers beurteilt. Tubulin diente als Ladekontrolle. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

4.1.7 Die Inhibition von TPL2 senkt die Zellproliferation und induziert

Apoptose in humanen B-Zellen

Nachdem die molekulare Funktion von TPL2 in der Aktivierung von JNK im LMP1-Signalweg aufgeklärt werden konnte, wurden nun die biologischen Folgen einer Inhibition von TPL2 auf EBV-transformierte Zelllinien untersucht. Es ist bereits bekannt, dass LMP1 die Zellproliferation von LCLs unterstützt und gleichzeitig die Zellen vor Apoptose durch Induktion von JNK und NF- κ B schützt (Kieser & Sterz, 2015). Um zu untersuchen, ob die TPL2-Inhibition ausreicht, um die Viabilität und das Überleben von EBV-transformierten Zellen zu hemmen, wurde die Proliferation und die Apoptoserate in EBV-transformierten Zellen nach Inhibition von TPL2 analysiert.

Ergebnisse

In den durchgeführten Experimenten wurden zwei verschiedene lymphoblastoide Zelllinien, LCL721 und LCL GB1C3, verwendet. Bei beiden Linien handelt es sich um EBV-transformierte Zellen, welche das LMP1-Onkogen exprimieren. Die Zelllinien wurden für eine Gesamtdauer von bis zu 72 h mit dem TPL2-Inhibitor TC-S7006 oder als Negativkontrollen mit DMSO bzw. Kulturmedium behandelt. Nach 0, 1, 2 und 3 Tagen wurde die Proliferationsrate der Zellen mittels des MTT-Proliferationsexperimentes bestimmt. Die Inhibition von TPL2 senkte dabei die Proliferation und Viabilität beider LCL-Zelllinien signifikant im Vergleich zur DMSO-Kontrolle und Mediumkontrolle (Abb. 28A).

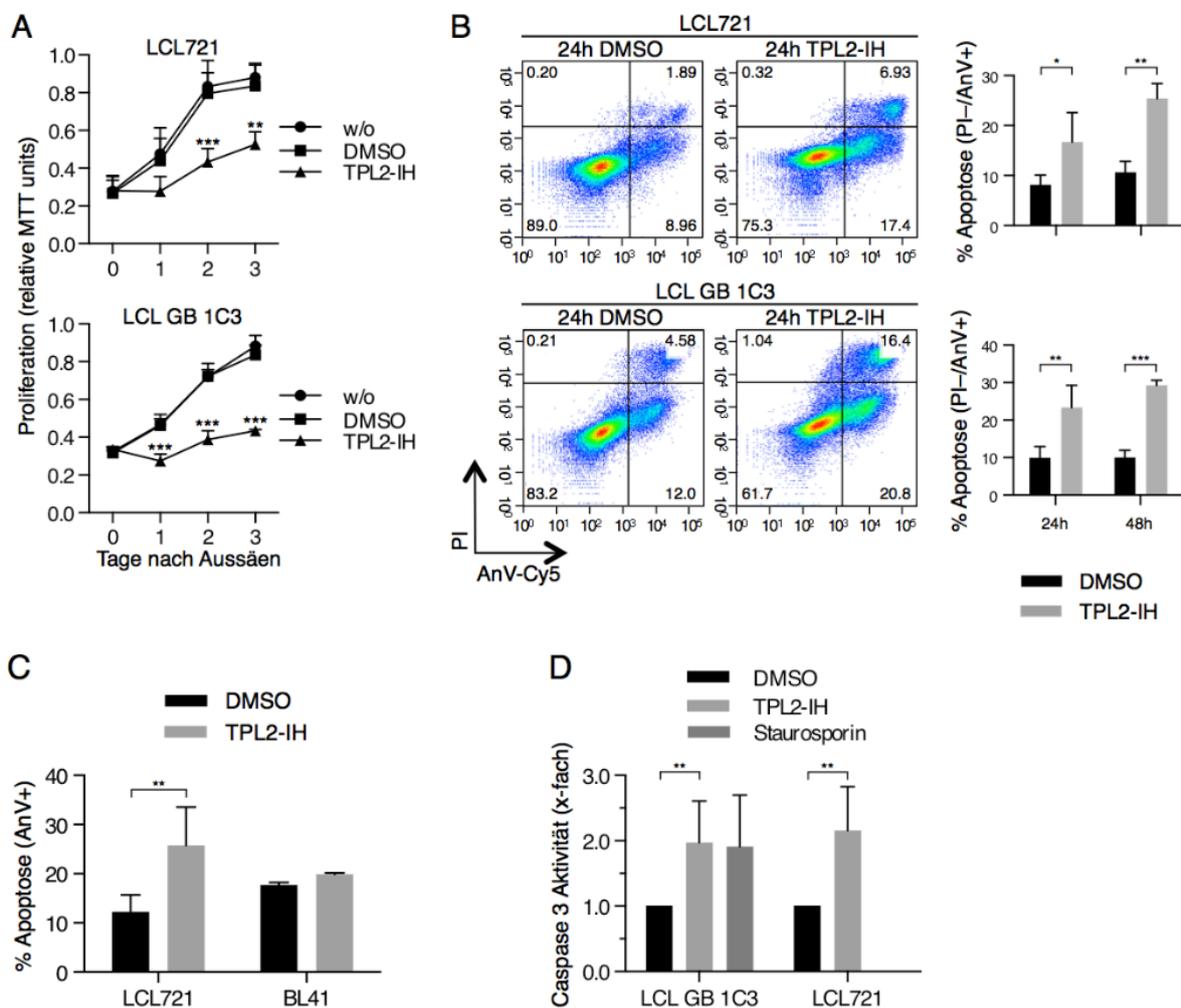


Abb. 28: Die Inhibition von TPL2 führt zu einer starken Reduktion in der Proliferation und einem Anstieg der Apoptose in EBV-transformierten humanen B-Zellen. A) LCL721 und LCL GB 1C3 Zellen wurden für 0, 1, 2 und 3 Tage mit 10 μ M TC-S7006 (TPL2-IH) oder DMSO behandelt und die Proliferation durch Umsatz von MTT gemessen. Die Daten sind Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. B) LCL721 und LCL GB 1C3 Zellen wurden für 0, 24 und 48 h mit 10 μ M TC-S7006 (TPL2-IH) oder DMSO behandelt und anschließend mit Propidiumiodid und Annexin-V-Cy5 gefärbt. Die Rate an Annexin-V-positiven und PI-negativen Zellen wurde

Ergebnisse

mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Apoptoserate ist mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten angegeben. Two-way ANOVA, p-values: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. C) EBV-transformierte LCL721 Zellen und EBV-negative BL41 Zellen wurden für 0 oder 24 h mit 10 μM TC- S7006 (TPL2-IH) oder DMSO behandelt. Die Zellen wurden mit Propidiumiodid und Annexin-V-Cy5 gefärbt und die Rate der AnnexinV-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Apoptoserate ist mit Standardabweichung aus drei verschiedenen Proben angegeben. Two-way ANOVA, p-values: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. D) Die Caspase-3-Aktivität wurde in LCL721 und LCL GB 1C3 Zellen nach 24 stündiger TPL2-Inhibition mit 10 μM TC- S7006 (TPL2-IH) bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt. Staurosporinbehandlung diente als Positivkontrolle für die Induktion von Apoptose in den Zellen. Die Daten sind als x-fache Induktion \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten angegeben. Two-way ANOVA, p-values: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Ob die Inhibition von TPL2 gleichzeitig zu einer Induktion der Apoptoserate führt, wurde über AnnexinV-Färbungen und eine anschließende durchflusszytometrische Auswertung analysiert. Dazu wurden beide LCL-Zelllinien für 24 und 48 h mit dem TPL2-Inhibitor behandelt und der Prozentsatz an AnnexinV-positiven und PI-negativen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dieser Wert gibt Aufschluss darüber, wie viele Zellen nach Behandlung mit dem Inhibitor im Vergleich zur Mediumkontrolle apoptotische Eigenschaften aufweisen. Dabei wird deutlich, dass eine Inhibition von TPL2 sowohl in LCL721 als auch in LCL GB1C3 die Apoptoserate signifikant erhöht. Die Kontrollzellen weisen in beiden LCL Zelllinien etwa 10% apoptotische Zellen auf, während eine Inhibition von TPL2 den Prozentsatz an apoptotischen Zellen auf 20-30% erhöht (Abb. 28B).

Um sicherzugehen, dass dieser Anstieg an apoptotischen Zellen tatsächlich auf die Wirkung des TPL2-Inhibitors im LMP1-Signalweg zurückzuführen ist, wurde ein Vergleich zwischen EBV-transformierten LCL721 Zellen und EBV-negativen BL41 Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Apoptoseraten der LCL721 und BL41 Zelllinie 24 h nach Inhibition von TPL2 durchflusszytometrisch bestimmt und mit der Anzahl apoptotischer Zellen ohne Inhibitorbehandlung verglichen. Interessanterweise zeigte sich, dass nur in der EBV-transformierten Zelllinie LCL721 eine signifikante Erhöhung der AnnexinV-positiven Zellen nach Inhibition von TPL2 stattfindet, während die Apoptoserate in der LMP1-unabhängigen BL41 Zelllinie mit der DMSO-Kontrolle vergleichbar ist (Abb. 28C).

Die Induktion der Apoptose kann außerdem über die Caspase-3-Aktivität analysiert werden. Liegt eine gesteigerte Aktivität der Caspase-3 in den Zellen vor, ist es ein weiterer Hinweis darauf, dass Apoptose in den zu testenden Zellen stattfindet.

Ergebnisse

Dabei wurde die Aktivität von Caspase-3 nach Behandlung der LCL Zelllinien mit dem TPL2-Inhibitor bzw. als Positivkontrolle mit der Apoptose-induzierenden Substanz Staurosporin beurteilt. Auch hier zeigte sich, dass eine Inhibition von TPL2 in beiden LCL Zelllinien zu einem signifikanten Anstieg in der Aktivität von Caspase-3 führt (Abb. 28D). Dabei fand die Steigerung der Aktivität von Caspase-3 nach 24 h Inhibition von TPL2 etwa in dem Maße einer vierstündigen Behandlung mit Staurosporin statt. Dieses Experiment bestätigt, dass eine Inhibition von TPL2 Apoptose in LCLs induzieren kann.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass TPL2 speziell in EBV-infizierten Zellen eine Rolle spielt und dort die Proliferation und Apoptoserate beeinflusst.

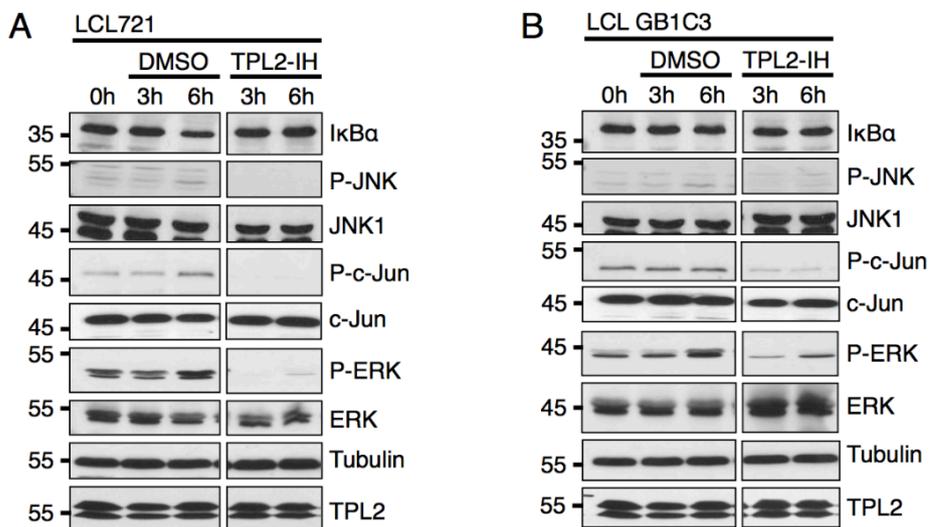


Abb. 29: Die Inhibition von TPL2 in EBV-transformierten B-Zellen blockiert die Induktion der MAPK-Signalwege. A) LCL721 Zellen wurden für 0, 3 oder 6 h mit 10 μ M TC- S7006 (TPL2-IH) oder DMSO behandelt. Die Aktivierung von ERK1/2, JNK und NF- κ B wurde in Immunoblot-Analysen durch die angegebenen Antikörper analysiert. B) LCL GB 1C3 Zellen wurden für 0, 3 oder 6 h mit 10 μ M TC- S7006 (TPL2-IH) oder DMSO behandelt. Die Aktivierung von ERK1/2, JNK und NF- κ B wurde in Immunoblot-Analysen durch die angegebenen Antikörper analysiert. Tubulin diente als Ladekontrolle. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

Außerdem wurde über Western Blot Analysen der Aktivierungszustand wichtiger Signalkomponenten des LMP1-Weges nach Inhibition von TPL2 in LCLs untersucht. Dazu wurde die Aktivierung von JNK, c-Jun und ERK nach drei- und sechsständiger Inhibition von TPL2 analysiert. Dabei zeigte sich sowohl in LCL721 als auch LCL GB1C3 Zellen, dass eine Inhibition von TPL2 zur Blockierung der MAPK-Signalwege führt, was in einer Reduktion von P-JNK, P-c-Jun und P-ERK deutlich wird. Das Level an IκBα wurde durch Inhibition von TPL2 hingegen nicht beeinflusst (Abb. 29A und B).

Insgesamt beweisen diese Daten, dass TPL2 speziell in EBV-transformierten Zelllinien eine entscheidende Rolle in der Proliferation und dem Überleben der Zellen spielt, wobei auf molekularer Ebene die Aktivierung der MAPK-Signalwege von TPL2 abhängig ist.

4.1.8 LMP1-abhängige, murine Lymphomzelllinien zeigen eine erhöhte Apoptoserate nach Inhibition von TPL2

LMP1 spielt außerdem in der Entwicklung von Nasopharynxkarzinomen im Menschen sowie als Pseudorezeptor mit onkogenem Potential in Fibroblasten von Nagetieren eine wichtige Rolle. In der Epidermis von Mäusen induziert LMP1 Hyperplasien (Wilson et al, 1990). Deshalb waren wir daran interessiert, ob eine Inhibition von TPL2 auch das Überleben von LMP1-positiven, murinen Lymphomzellen beeinflusst, welche aus Mäusen generiert wurden, die ein LMP1-Transgen (LMP1tg) in ihrer Epidermis exprimieren (Hannigan & Wilson, 2010; Wilson et al, 1990). Die Zelllinien wurden von Joanna Wilson zur Verfügung gestellt und im Jahr 2010 als von LMP1 abhängige (53.234a) bzw. von LMP1 unabhängige (53.217) Zelllinie beschrieben (Hannigan & Wilson, 2010). Die LMP1tg-positive Zelllinie 53.234a und die LMP1tg-negative Zelllinie 53.217 wurden für 24 h mit dem TPL2-Inhibitor behandelt und die Apoptoserate mittels AnnexinV-Färbung durchflusszytometrisch beurteilt. In Abbildung 29A und B wird deutlich, dass die von LMP1 unabhängige Zelllinie 53.217 keinen Anstieg in der Apoptoserate nach Inhibition von TPL2 im Vergleich zur DMSO Kontrolle zeigt. Die von LMP1 abhängige Zelllinie 53.234a weist hingegen nach Inhibition von TPL2 einen signifikanten Anstieg an AnnexinV-positiven Zellen auf (Abb. 30A und B).

Auch eine Inhibition von IKK durch den IKK-Inhibitor ACHP führte zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptoserate in der LMP1-abhängigen Zelllinie 53.234a, während die LMP1-unabhängige Zelllinie 53.217 keinerlei Veränderung in der Anzahl apoptotischer Zellen nach Behandlung mit dem Inhibitor zeigte (Abb. 30C).

Diese Beobachtungen konnten in einem weiteren Paar LMP1-abhängiger und LMP1-unabhängiger, muriner Lymphomzelllinien (Zelllinien noch nicht publiziert, von Joanna Wilson zur Verfügung gestellt) bestätigt werden. Auch hier weist die Inhibition von TPL2 in der von LMP1 abhängigen Zelllinie 117.1472 eine signifikante

Ergebnisse

Erhöhung der Apoptoserate auf, während die Anzahl apoptotischer Zellen in der von LMP1 unabhängigen Zelllinie 117.1415 unverändert bleibt (Abb. 30D).

Zusammenfassend bestätigen diese Experimente in einem murinen Zellsystem, dass TPL2 und IKK2 im LMP1-Signalweg eine entscheidende Rolle im Überleben von LMP1-abhängigen Zellen spielt.

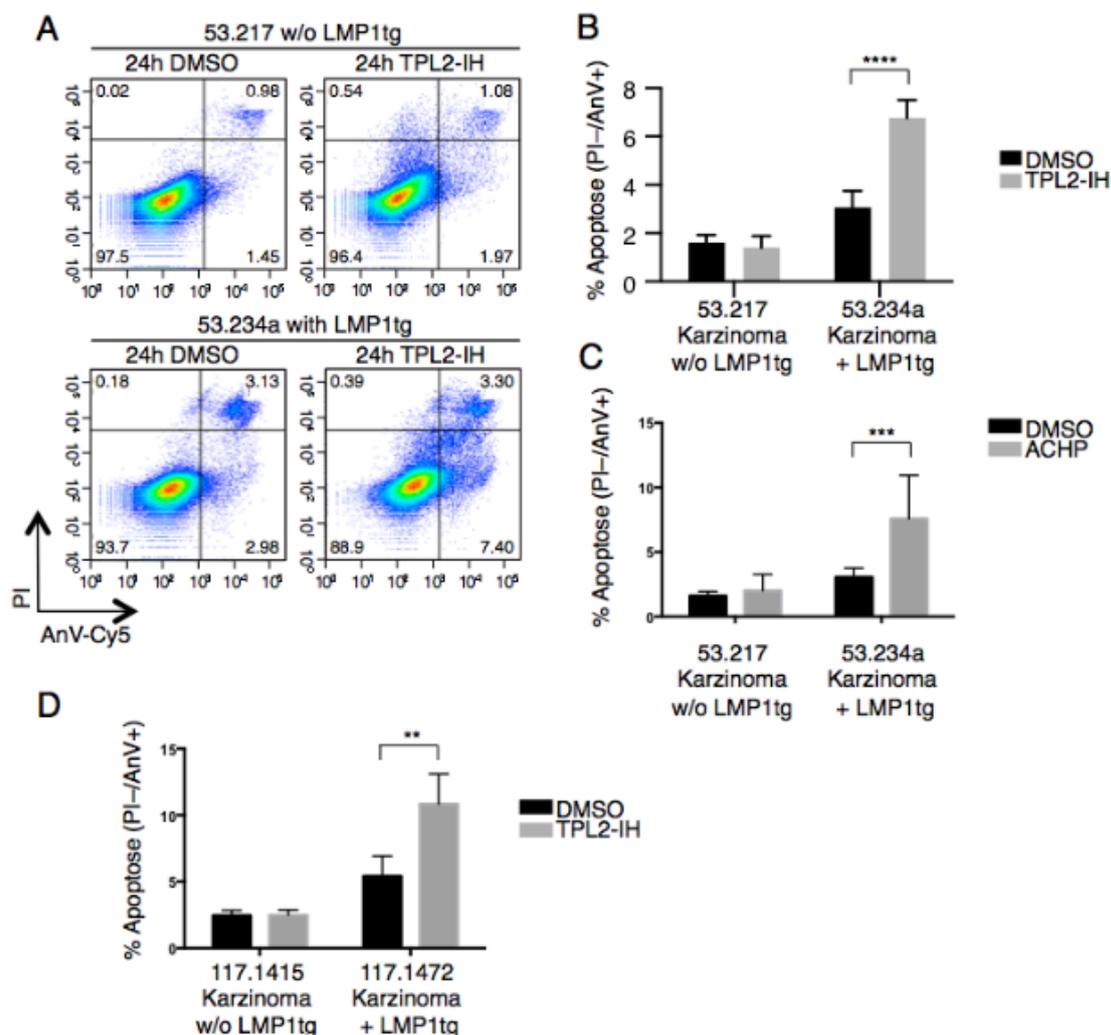


Abb. 30: Von LMP1 abhängige, murine Karzinomzellen zeigen eine signifikante Erhöhung in der Apoptoserate nach Inhibition von TPL2. A) Die LMP1-unabhängige Karzinom-Zelllinie 53.217 (w/o LMP1tg) und die LMP1-abhängige Zelllinie 53.234a (with LMP1tg) wurden für 24 h mit 10 μ M TC-S 7006 (TPL2-IH) oder DMSO behandelt. Die Zellen wurden mit Propidiumiodid und AnnexinV-Cy5 gefärbt und über Durchflusszytometrie analysiert. Repräsentative FACS-Blots sind in Abb. A dargestellt. B) Dargestellt ist die Rate an apoptotischen Zellen angegeben als AnnexinV-positive Propidiumiodid-negative Zellen wie in Abb.A) aus sechs unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Two-way ANOVA, p-values: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. C) Die LMP1-unabhängige Karzinom-Zelllinie 53.217 (w/o LMP1tg) und die LMP1-abhängige Zelllinie 53.234a (LMP1tg) wurden für 24 h mit 5 μ M ACHP (IKK2-IH) oder DMSO behandelt. Die Zellen wurden mit Propidiumiodid und AnnexinV-Cy5 gefärbt und über Durchflusszytometrie die Rate an apoptotischen Zellen analysiert. Das Diagramm zeigt die Prozentwerte der Anzahl AnnexinV-positiver, Propidiumiodid-negativer Zellen mit

Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Two-way ANOVA, p-values: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. D) Die LMP1-unabhängige Karzinom-Zelllinie 117.1415 (w/o LMP1tg) und die LMP1-abhängige Zelllinie 117.1472 (LMP1tg) wurden für 24 h mit 10 μM TC-S7006 (TPL2-IH) oder DMSO behandelt. Die Zellen wurden mit Propidiumiodid und AnnexinV-Cy5 gefärbt und über Durchflusszytometrie die Apoptoserate analysiert. Das Diagramm zeigt die Prozentwerte der AnnexinV-positiven Propidiumiodid-negativen Zellen mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Two-way ANOVA, p-values: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

4.2 Molekulare Funktionen der Keimzentrumskinase TNIK im LMP1-Signalweg

Die Rolle der Serin/Threonin-Kinase TPL2, sowie die Funktion von TAK1 und IKK2 im LMP1-Signalweg konnte im Abschnitt 4.1 geklärt werden. Um eine vollständige Aktivierung des LMP1-Signalweges zu gewährleisten, ist die Bildung des LMP1/IKK2/TAK1/NEMO-Komplexes essenziell. Eine weitere wichtige Komponente des LMP1-Signalsoms wurde 2012 durch Shkoda et al. beschrieben. Dabei handelt es sich um die Keimzentrumskinase TNIK (Shkoda et al, 2012). In dieser Studie wurde TNIK als Organisator und Mediator im LMP1-Signalweg postuliert, wobei die Keimzentrumskinase als Interaktionspartner wichtiger Signalkomplex-Komponenten wie TRAF6, TAK1, TAB2 und IKK2 identifiziert wurde (Shkoda et al, 2012). TNIK ist dabei für die Bildung, die Organisation und die Aktivierung des Holokomplexes und dessen Rekrutierung an LMP1 zuständig, indem es als Adapter- und Gerüstprotein fungiert (Shkoda et al, 2012). Außerdem konnte die Kinaseaktivität von TNIK als essenziell für die Aktivierung von IKK2 identifiziert werden (Shkoda et al, 2012). Weiterhin ist bekannt, dass die Überexpression von LMP1 ausreicht, um die Autophosphorylierung von TNIK zu induzieren (Shkoda et al, 2012). Somit ist anzunehmen, dass TNIK in der in Abschnitt 4.1 beschriebenen LMP1-Signalkaskade involviert ist. Die genauen molekularen Funktionen von TNIK in der Aktivierung dieser Signalkaskaden sind jedoch nicht bekannt. So ist unklar, was die Substrate der Kinaseaktivität von TNIK sind und welche Rolle TNIK bei den in diesen Signalwegen wichtigen Sekundärmodifikationen von Signalproteinen, wie z.B. der K63-verknüpften Ubiquitinierung oder der Phosphorylierung, spielt.

4.2.1 Die Interaktionspartner von TNIK und seinem Homolog MINK1 in der LMP1-Signaltransduktion

4.2.1.1 TNIK interagiert mit TRAF2 und TRAF6 nach Induktion durch LMP1

Wie bereits oben beschrieben, konnte gezeigt werden, dass TNIK an der Bildung des Signalkomplexes an LMP1-CTAR2 beteiligt ist. TNIK kann dabei mit TRAF6 interagieren (Shkoda et al, 2012). TRAF6 ist das einzige TRAF-Protein, welches an CTAR2 rekrutiert wird und welches als Adaptermolekül für die Aktivierung von JNK und NF- κ B dient (Luftig et al, 2003; Schultheiss et al, 2001; Shkoda et al, 2012; Wan et al, 2004). Außerdem konnte TNIK 1999 als ein mit TRAF2 interagierendes Protein identifiziert werden, was die Frage offen lässt, ob TNIK in der Lage ist, nach Induktion durch LMP1 auch mit den anderen Mitgliedern der TRAF-Familie neben TRAF6 zu interagieren (Fu et al, 1999).

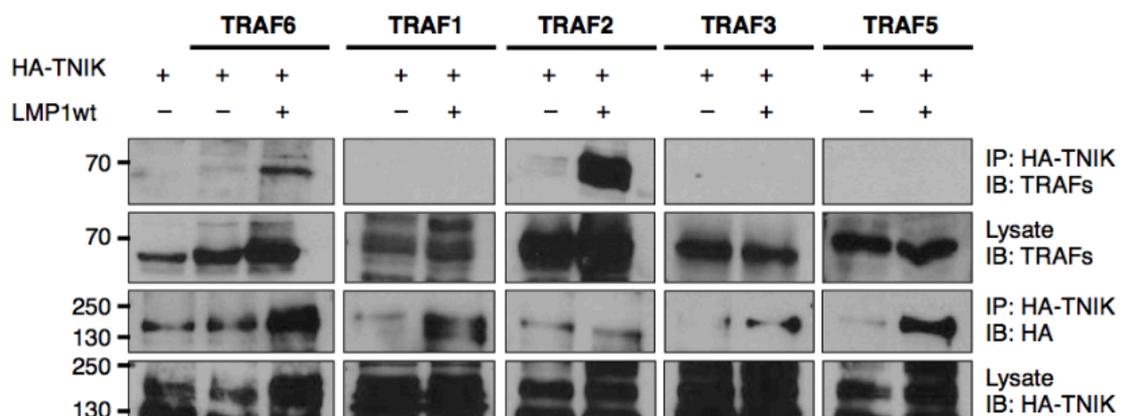


Abb. 31: TNIK interagiert mit TRAF2 und TRAF6 nach Induktion durch LMP1. HEK293 Wildtyp-Zellen wurden mit 1 μ g pRK5-HA-TNIKwt Plasmid und 1 μ g des jeweiligen TRAF-Konstruktes transfiziert. Die angezeigten Ansätze wurden durch Kotransfektion von 4 μ g pSV-LMP1wt 581 induziert. Nach 24 h wurde HA-TNIK mittels HA(3F10) G-Sepharose-Beads immunpräzipitiert und die Interaktion mit den angegebenen TRAF-Proteinen durch die entsprechenden Antikörper in Western Blot Analysen beurteilt.

Um zu klären und zu bestätigen, mit welchen TRAFs TNIK interagiert, wurden Ko-Immunpräzipitationen in HEK293 Zellen durchgeführt. HA-TNIK und die entsprechenden TRAF-Proteine wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von kotransfiziertem LMP1 exprimiert. Anschließend wurde HA-TNIK immunpräzipitiert. Immunoblot-Analysen der Proteinkomplexe zeigten vergleichbare Präzipitationen von HA-TNIK in den einzelnen Proben (Abb. 31). In den IP-Ansätzen konnte bestätigend nachgewiesen werden, dass TNIK mit TRAF6 und TRAF2 auf

niedrigem Level assoziiert, wenn keine Induktion durch LMP1 vorliegt. Jedoch führte eine Koexpression von LMP1 zu einer signifikanten Verstärkung der Assoziation von TNIK mit TRAF6 und TNIK mit TRAF2 (Abb. 31). TRAF1, 3 und 5 weisen hingegen keinerlei Interaktion mit TNIK auf. Dieses Experiment legt nahe, dass TRAF6 und TRAF2 wichtige Interaktionspartner von TNIK im LMP1-Signalweg sind.

4.2.1.2 MINK1 ist ebenfalls ein Interaktionspartner von TRAF6

TNIK gehört zusammen mit der Kinase MINK1 zur Unterfamilie IV der Keimzentrumskinasen. Dabei ist insbesondere in der Kinasedomäne der beiden Keimzentrumskinasen eine Sequenzhomologie auf Aminosäureebene von bis zu 95% zu verzeichnen. Diese katalytische Domäne umfasst die ATP- und die Substratbindestelle (Kemp & Pearson, 1990). Auch die GCKH-Domäne von TNIK und MINK1 ähneln sich sehr stark, während die Intermediärdomäne größere Unterschiede auf Aminosäureebene aufweist (Abb. 6). Durch die große Ähnlichkeit in der Kinasedomäne und der GCKH-Domäne ist anzunehmen, dass beide Keimzentrumskinasen in der abwärtsgelegenen Signaltransduktion ähnliche Funktionen innehaben könnten, während aufwärtsgelegen eventuell größere Unterschiede in der Aktivierung von TNIK und MINK1 vorliegen. Außerdem wurde in *Xenopus* bereits gezeigt, dass beide Keimzentrumskinasen für die Induktion des Wnt-Signalweges essenziell sind (Mikryukov & Moss, 2012). Aufgrund der hohen Sequenzhomologie und der gemeinsam beschriebenen Rolle im Wnt-Signalweg sollte untersucht werden, inwiefern MINK1 ähnliche oder redundante Funktionen zu TNIK in den Signalwegen der Zelle übernehmen kann.

Es wurde daher geprüft, ob MINK1 genau wie TNIK in der Lage ist, mit dem Adaptermolekül TRAF6 zu interagieren und welche Domäne von MINK1 für eine Interaktion erforderlich ist. HEK293 Zellen wurden dazu mit einem MINK1-Wildtyp (HA-MINK1 FL) oder einem Konstrukt, welches nur die Kinasedomäne von MINK1 (HA-MINK1 KD) exprimiert, zusammen mit TRAF6 transfiziert. LMP1 wurde zur Induktion der Zellen koexprimiert. Nach erfolgter Immunpräzipitation der MINK1-Konstrukte konnte in den IP-Proben eine Interaktion von MINK1-Wildtyp mit TRAF6 nach Induktion durch LMP1 nachgewiesen werden (Abb. 32).

Ergebnisse

Welche Domäne des MINK1-Proteins für diese Interaktion notwendig ist, wurde zusätzlich in diesem Experiment geklärt. Für TNIK konnte durch Shkoda et al. gezeigt werden, dass die GCKH-Domäne, nicht aber die Kinasedomäne des TNIK Proteins für die Interaktion mit TRAF6 verantwortlich ist (Shkoda et al, 2012). Auch für MINK1 konnte nur nach Präzipitation von MINK1-Wildtyp Protein (HA-MINK1 FL) eine Interaktion mit TRAF6 im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 32). Die Kinasedomäne von MINK1 ist nach Induktion durch LMP1 nicht in der Lage, mit TRAF6 zu interagieren (Abb. 32).

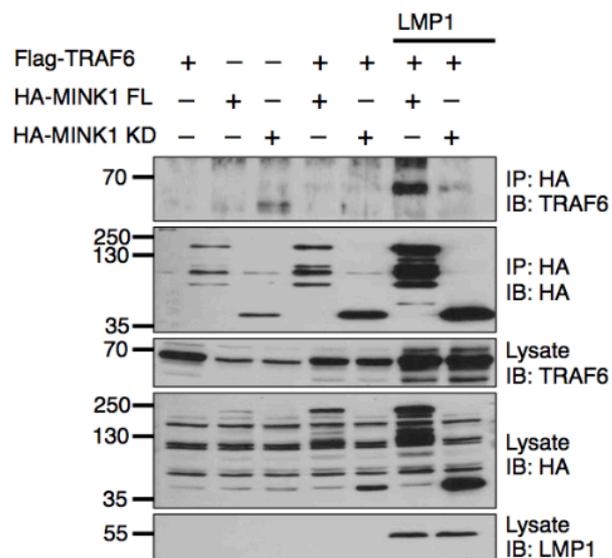


Abb. 32: MINK1 interagiert mit TRAF6 nach Induktion durch LMP1, wobei die Kinasedomäne von MINK1 nicht für die Interaktion verantwortlich ist. HEK293 Wildtyp Zellen wurden mit 0,5 μg pRK5-HA-MINK1-Wildtyp Plasmid (MINK1 FL) oder 0,5 μg pRK5-HA-MINK1-KD Plasmid (Kinasedomäne) und 0,5 μg pRK5-Flag-TRAF6 Plasmid transfiziert. Die Induktion der Zellen erfolgte durch Kotransfektion von 4 μg pSV-LMP1wt581 Plasmid. Nach 24 h wurde HA-MINK1 mittels HA(12CA5) G-Sepharose-Beads präzipitiert und die Interaktion mit TRAF6 durch den entsprechenden Antikörper in Western Blot Analysen nachgewiesen.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass durch LMP1 auch die Komplexbildung zwischen MINK1 und TRAF6 hervorgerufen wird und es sich dabei um einen Prozess handelt, welcher unabhängig von der Kinasedomäne von MINK1 stattfindet. Insgesamt geben diese Experimente erstmals einen Hinweis darauf, dass die beiden Keimzentrumskinasen TNIK und MINK1 gleiche Funktionen in der Zelle übernehmen könnten, da sie mit dem gleichen Signalmolekül in der Zelle interagieren. Ob TNIK und MINK1 zum Teil redundante Funktionen in der LMP1-Signalkaskade inne haben, wird in den folgenden Abschnitten dieser Arbeit wieder aufgegriffen.

4.2.2 TNIK und MINK1 phosphorylieren TRAF6

4.2.2.1 Humanes TRAF6 wird durch TNIK und MINK1 an Threonin 463 und Serin 507 phosphoryliert

Da wie oben erwähnt, gezeigt werden konnte, dass TNIK und MINK1 mit TRAF6 interagieren können, stellte sich nun die Frage, was die Rolle dieser Protein-Interaktion in der LMP1-Signalkaskade ist. Durch die räumliche Nähe während der induzierten Protein-Protein-Interaktion könnten beispielsweise posttranslationale Proteinmodifikationen erzeugt werden. Im folgenden Abschnitt wird deshalb eine mögliche Phosphorylierung von TRAF6 durch TNIK oder MINK1 analysiert.

Wie bereits beschrieben, konnte die C-terminale Domäne von TRAF6 als Substrat der Kinaseaktivität von TNIK identifiziert werden (Obermeier, 2012; Town, 2012). Über phosphoproteomische Analysen wurden zwei durch TNIK induzierte Phosphorylierungsstellen von TRAF6 an Threonin 463 und Serin 507 beschrieben (Obermeier, 2012; Town, 2012). In der vorliegenden Arbeit war es nun das Ziel, diese durch TNIK induzierte Phosphorylierung von TRAF6 in Zellen über Western Blot Analysen nachzuweisen, die Funktionen der Phosphorylierung zu analysieren und zu klären, ob auch MINK1 diese Sekundärmodifikation induzieren kann.

In *in vitro* Kinase-Versuchen wurden dazu die Kinasedomänen von TNIK oder MINK1 auf ihre Fähigkeit, verschiedene TRAF6-Proteine zu phosphorylieren, untersucht. Dazu wurden sowohl die Wildtyp-Kinasedomänen von TNIK und MINK1 getestet als auch eine Variante der Kinasedomäne von TNIK, welche eine Punktmutation (TNIK KD/KM) aufweist und somit keine Kinaseaktivität mehr besitzt. Eine weitere Negativkontrolle stellten die Ansätze ohne Expression einer Kinase dar (pRK5 Leervektorkontrolle). Nach Immunpräzipitation der TNIK- und MINK1-Konstrukte, erfolgte die *in vitro* Kinasereaktion unter Zugabe von gereinigten His-TRAF6 Proteinen als Substrate der Kinaseaktivitäten von MINK1 und TNIK. Dabei wurde sowohl Wildtyp-TRAF6 als Substrat als auch TRAF6-Varianten mit einem Aminosäureaustausch von S507 und T463 zu Alanin eingesetzt. Diese S507A- und T463A-Mutationen von TRAF6 haben zur Folge, dass TRAF6 nicht mehr an Position 507 bzw. 463 phosphoryliert werden kann. Wie in Abbildung 33 zu sehen ist, kann die Kinasedomäne von TNIK sowohl His-TRAF6 WT als auch die Einzelmutanten His-TRAF6 T463A bzw. His-TRAF6 S507A phosphorylieren. Dabei fällt auf, dass die TRAF6 S507A-Mutante, in welcher nur noch die T463-Stelle durch

Ergebnisse

TNIK phosphoryliert werden kann, viel schwächer phosphoryliert ist als die TRAF6 T463A-Mutante oder TRAF6 WT. Die Kinasemutante von TNIK (TNIK KD/KM) als Negativkontrolle kann keines der TRAF6-Proteine phosphorylieren, was die Funktionsfähigkeit des Experimentes bestätigt. Die His-TRAF6 T463A/S507A-Doppelmutante zeigt erwartungsgemäß keine Phosphorylierung durch die Kinasedomäne von TNIK, da beide Phosphorylierungsstellen mutiert vorliegen. Dieses Ergebnis beweist, dass die beiden Phosphorylierungsstellen T463 und S507 die Einzigen in TRAF6 sind, die durch TNIK modifiziert werden können (Abb. 33).

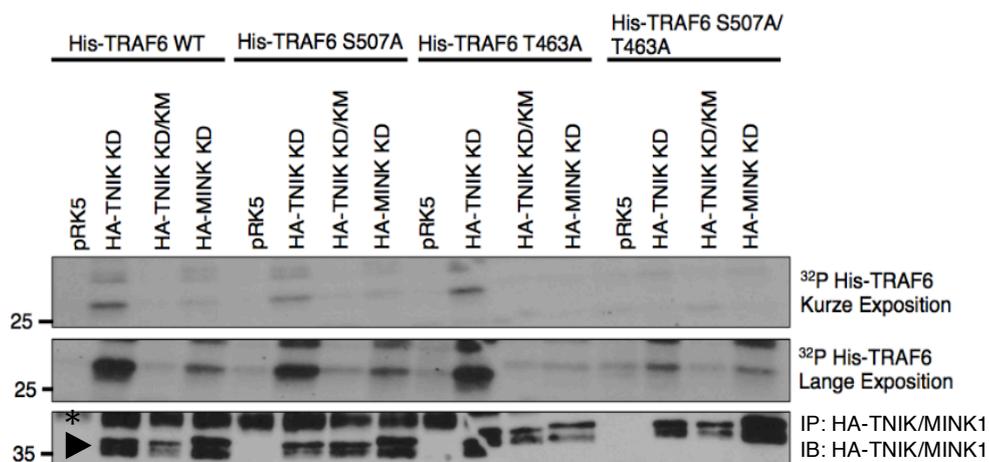


Abb. 33: TNIK und MINK1 phosphorylieren TRAF6 an den Phosphorylierungsstellen T463 und S507. HEK293 Wildtyp-Zellen wurden in 15 cm Schalen mit 8 μg HA-TNIK KD (Kinasedomäne), der Kinase-inaktiven HA-TNIK KD/KM-Mutante oder HA-MINK1 KD (Kinasedomäne) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und HA-TNIK/MINK1 mittels HA(12CA5) G-Sepharose-Beads aus dem Lysat immunpräzipitiert. Anschließend fand ein radioaktiver Immunkomplex-Kinase-Versuch unter Zugabe von 1 μg gereinigtem His-TRAF6 WT, His-TRAF6 T463A, His-TRAF6 S507A oder His-TRAF6 T463A/S507A-Protein statt. Die Phosphorylierung der einzelnen TRAF6-Proteine wurde nach Auftrennung über SDS-PA-Gele und Immunoblot mittels Autoradiographie visualisiert.

* unspezifische Banden, ▶ TNIK/MINK1.

Die mit TNIK verwandte Keimzentrumskinase MINK1 ist ebenfalls in der Lage, TRAF6 an T463 und S507 zu phosphorylieren. Wie in Abbildung 33 deutlich wird, führt auch eine Überexpression von MINK1 zu einer Phosphorylierung von TRAF6 an den beiden getesteten Phosphorylierungsstellen, welche jedoch deutlich schwächer als die durch TNIK induzierte Phosphorylierung ausfällt. Der durchgeführte Kinaseversuch gibt Hinweise darauf, dass die Kinaseaktivitäten von TNIK und MINK1 möglicherweise redundante Funktionen in der Zelle einnehmen,

da beide Keimzentrumskinasen das gemeinsame Substrat TRAF6 besitzen. Da TRAF6 jedoch laut Kinaseversuch stärker durch TNIK phosphoryliert wird, scheint TNIK die Hauptrolle im Phosphorylierungsprozess zu spielen. Dieser quantitative Unterschied in der Stärke der Phosphorylierung von TRAF6 S507 und T463 lässt sich möglicherweise darüber erklären, dass MINK1 und TNIK wie beschrieben nicht in allen Sequenzen homolog sind. Somit ist anzunehmen, dass beide Keimzentrumskinasen zwar ähnliche, aber nicht gleiche Funktionen in der Zelle übernehmen. Außerdem scheint die Phosphorylierungsstelle TRAF6 S507 die Hauptphosphorylierungsstelle durch TNIK in der Zelle zu sein, da TRAF6 T463 deutlich schwächer phosphoryliert werden kann.

Beide Keimzentrumskinasen haben also TRAF6 als gemeinsames Substrat, spielen aber eventuell in der Signaltransduktion, in welcher eine Phosphorylierung von TRAF6 notwendig sein könnte, unterschiedliche Rollen.

Die durch TNIK induzierte Phosphorylierung von TRAF6 wurde bisher ausschließlich in *in vitro* Kinase-Versuchen erfolgreich detektiert (Abb. 33). Im nächsten Schritt sollte diese Phosphorylierung allerdings auch *in vivo* nachgewiesen werden. Dazu wurden phosphorylierungsspezifische Antikörper verwendet, die in Zusammenarbeit mit der *Antibody Facility* am HMGU generiert wurden. Auf Funktionalität wurden die Antikörper in unserem Labor von Madlen Kunke mit Hilfe rekombinanter und *in vitro* phosphorylierter TRAF6-Proteine getestet. Dabei wurde ein spezifischer Antikörper, der die TRAF6 S507-Stelle detektiert (P-TRAF6 S507 (3F10)), und ein spezifischer Antikörper, der die TRAF6 T463-Stelle detektiert (P-TRAF6 T463 (8D7)), identifiziert (Kunke, 2014).

In der vorliegenden Arbeit sollte nun die Phosphorylierung von TRAF6 an T463 und S507 mit Hilfe der phosphorylierungsspezifischen Antikörper erstmals in Zelllinien nachgewiesen werden. Dazu wurden zunächst in HEK293 Zellen durch Überexpression von TNIK-WT zusammen mit TRAF6-WT bzw. den Phosphorylierungsmutanten von TRAF6 (T463A, S507A, T463A/S507A) im Western Blot mit Hilfe der spezifischen Antikörper mögliche Phosphorylierungen analysiert. Die Überexpression einer TNIK-Kinasevariante (TNIK KM) diente als Negativkontrolle, da diese Variante von TNIK nicht in der Lage ist Substrate zu phosphorylieren. Nach erfolgter Immunpräzipitation von TRAF6 wurde in den IP-Ansätzen die Phosphorylierung von TRAF6 an S507 und T463 mittels der jeweiligen

Ergebnisse

phosphorylierungsstellenspezifischen Antikörper nachgewiesen. Wie in Abbildung 34 deutlich wird, war es möglich eine Phosphorylierung von TRAF6 an S507 nach Überexpression von TNIK-Wildtyp zu detektieren. In der Leervektorkontrolle pRK5 und nach Überexpression der Kinasemutante von TNIK tritt diese Phosphorylierung von TRAF6 an Serin 507 nicht auf. Außerdem konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass die TRAF6 T463A-Mutante, in welcher nur die Threonin 463-Stelle zu einem Alanin mutiert wurde, weiterhin an S507 phosphoryliert werden kann, während die TRAF6 S507A-Variante und die Doppelmutante TRAF6 T463A/S507A keine spezifische Phosphorylierung an S507 aufweisen (Abb. 34). Dies unterstreicht nochmals die Spezifität und Funktionalität des verwendeten TRAF6 S507 (3F10) Antikörpers.

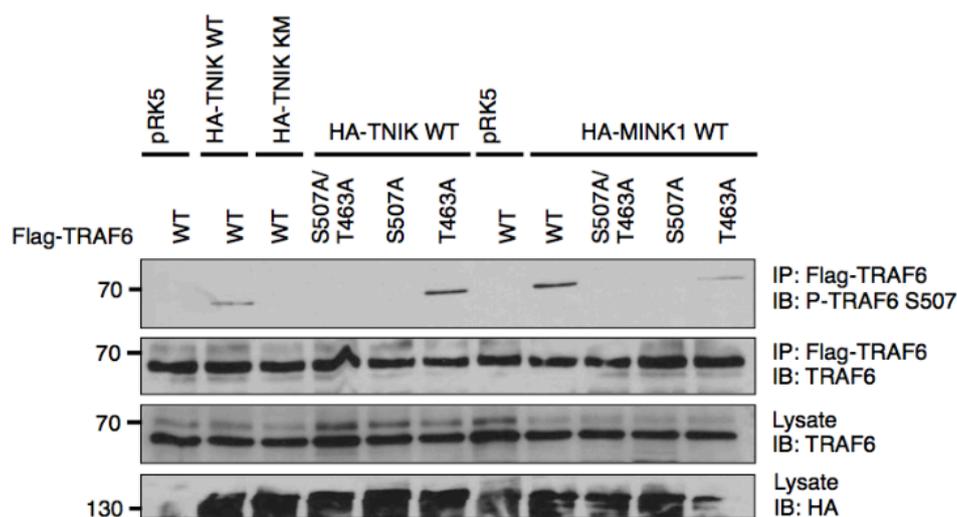


Abb. 34: Die Überexpression von TNIK und MINK1 induziert die Phosphorylierung von TRAF6 an Serin 507. HEK293 Wildtyp-Zellen wurden in 6-Well Platten mit 1 μg HA-TNIK WT, HA-TNIK KM oder HA-MINK1 transfiziert. Als Negativkontrolle diente die Transfektion des pRK5-Leervektors. Zusätzlich wurde entweder 0,5 μg von dem Flag-TRAF6 WT, Flag-TRAF6 T463A, Flag-TRAF6 S507A oder Flag-TRAF6 T463A/S507A Plasmids kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Flag-TRAF6-Konstrukte mittels Flag (6F7) G-Sepharose-Beads präzipitiert. Unter Verwendung des TRAF6 S507 (3F10) Antikörpers wurde die Phosphorylierung von TRAF6 an Serin 507 im Western Blot nachgewiesen. In den Zelllysaten wurde die Expression von TRAF6 sowie TNIK und MINK1 mittels der angegebenen Antikörper überprüft.

Mit dem P-TRAF6 T463 (8D7) Antikörper konnte jedoch in keinem der Versuchsansätze ein Signal im Western Blot erzielt werden. Dies war auch in allen weiteren Experimenten der folgenden Abschnitte dieser Arbeit der Fall, weshalb nachfolgend nur auf den Nachweis der Phosphorylierung von TRAF6 an S507 eingegangen werden kann. Möglicherweise könnte die schwächere

Phosphorylierung von TRAF6 an der Phosphorylierungsstelle T463 (siehe Abb. 33) die Ursache für die fehlende Detektion im Western Blot sein. Außerdem wird vermutet, dass die Qualität und das Detektionslimit des generierten Antikörpers 8D7 für den fehlenden Nachweis der Phosphorylierung verantwortlich sein könnte.

In weiteren Versuchsansätzen wurde getestet, ob auch eine Überexpression von MINK1 die Phosphorylierung von TRAF6 an S507 hervorruft. Die Abbildung 34 zeigt, dass auch MINK1 in der Lage ist, TRAF6 spezifisch an S507 zu phosphorylieren (Abb.34). Dabei fällt auf, dass eine Überexpression von MINK1 WT im Vergleich zur Überexpression von TNIK TRAF6 sogar etwas stärker in der Zelle phosphorylieren kann. Im Gegensatz dazu war im *in vitro* Kinaseversuch in Abbildung 33 TNIK in der Lage TRAF6 stärker als MINK1 zu phosphorylieren. Wahrscheinlich führt die starke Überexpression der Kinasen und des Substrates TRAF6 in diesem Experiment in Abbildung 34 dazu, dass keine Aussage zur tatsächlichen physiologischen Stärke der Phosphorylierung von TRAF6 getroffen werden kann.

Insgesamt zeigen diese Versuche, dass sowohl TNIK als auch sein Homolog MINK1 in der Lage sind, TRAF6 an Threonin 463 und Serin 507 zu phosphorylieren, wobei nur die Serin 507 Phosphorylierung mit dem neu etablierten phosphorylierungsstellenspezifischen Antikörper im Western Blot von Zelllysaten nachgewiesen werden kann.

Im nächsten Kapitel wird nun die Rolle und Funktion der neu identifizierten, durch TNIK und MINK1 induzierten Phosphorylierung von TRAF6 genauer untersucht.

4.2.2.2 Untersuchungen zur Rolle der durch TNIK und MINK1 induzierten Phosphorylierung von TRAF6 in der LMP1-Signaltransduktion

Um eine mögliche Rolle und Funktion der durch TNIK induzierten Phosphorylierung von TRAF6 in der Bildung eines Signalkomplexes zu identifizieren, wurde zunächst mit Hilfe von Interaktionsstudien getestet, ob die Phosphorylierungsmutanten von TRAF6 noch in der Lage sind, nach Induktion durch LMP1, eine Interaktion mit TNIK oder MINK1 einzugehen.

Dazu wurde in HEK293 Zellen TNIK zusammen mit TRAF6 WT, TRAF6 T463A, TRAF6 S507A oder TRAF6 T463A/S507A exprimiert und die Zellen durch Koexpression von LMP1 induziert. Nach erfolgter Immunpräzipitation von TNIK

wurde eine mögliche Interaktion mit den verschiedenen TRAF6-Konstrukten im Immunoblot getestet.

Dabei zeigte sich, dass alle verwendeten Varianten von TRAF6 in der Lage sind nach Induktion durch LMP1, in gleichem Maße mit TNIK zu interagieren (Abb. 35A). Die Phosphorylierungsstellen T463 und S507 von TRAF6 scheinen damit nicht für eine Interaktion von TNIK und TRAF6 notwendig zu sein.

Da TRAF6 auch durch MINK1 an T463 und S507 phosphoryliert werden kann (Abb. 34), wurde auch die MINK1/TRAF6-Interaktion in Ko-Immunpräzipitationen getestet. Auch MINK1 kann sowohl mit TRAF6 WT als auch mit den TRAF6 T463A- und S507A-Einzelmutanten, sowie der TRAF6 T463A/S507A-Doppelmutante interagieren (Abb. 35B). Interessanterweise zeigte sich bereits für die TRAF6 T463A/S507A-Doppelmutante ohne Induktion der Zellen durch LMP1 eine starke Interaktion mit MINK1 (Abb. 35B). Dies könnte darauf hinweisen, dass die Interaktion von MINK1 mit TRAF6 durch die Phosphorylierung von TRAF6 an T463 und S507 eher abgeschwächt wird. Möglicherweise spielen die Phosphorylierungsstellen S507 und T463 eine regulatorische Rolle, indem sie z.B. die Stärke der Interaktion mit verschiedenen Interaktionspartnern von TRAF6 beeinflussen.

Insgesamt zeigen diese Experimente aber, dass die Phosphorylierung von TRAF6 durch TNIK und MINK1 nicht für die Ausbildung des TNIK/MINK1/TRAF6-Komplexes notwendig ist.

Die durch TNIK und MINK1 induzierte Phosphorylierung von TRAF6 konnte durch Überexpression der Keimzentrumskinasen im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 34). Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Phosphorylierung von TRAF6 an S507 durch LMP1 in den Zellen induziert werden kann. Außerdem sollte analysiert werden, ob es sich bei der detektierten Phosphorylierung tatsächlich um eine Proteinmodifikation handelt, welche eine Abhängigkeit von TNIK und MINK1 zeigt.

Ergebnisse

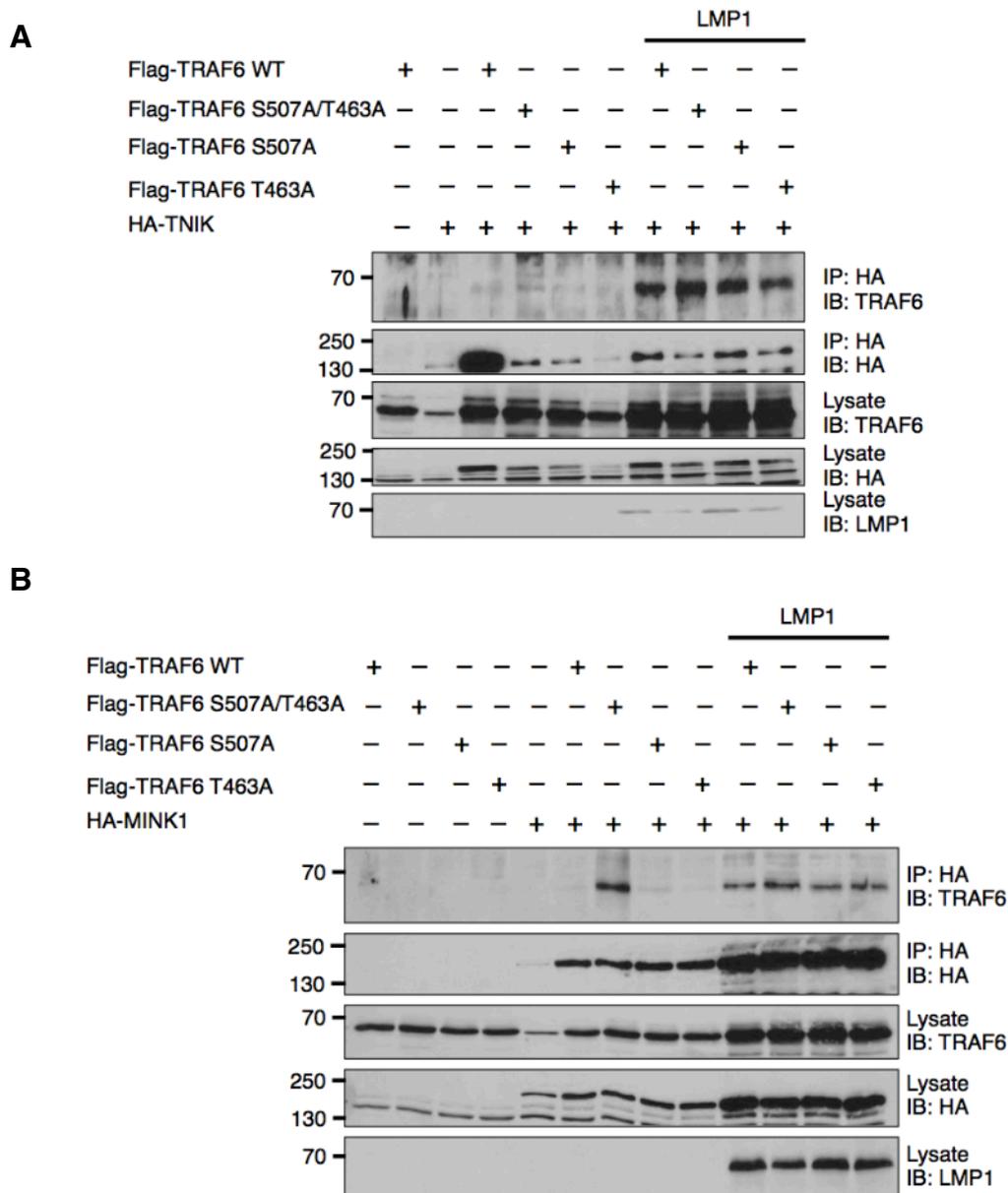


Abb. 35: Die TRAF6-Phosphorylierungsmutanten T463A und S507A können nach Induktion durch LMP1 mit TNIK und MINK1 interagieren. A) HEK293 Wildtyp-Zellen wurden in 10 cm Schalen mit 1 μ g pRK5-HA-TNIK Plasmid und 1 μ g pRK5-Flag-TRAF6 WT, Flag-TRAF6 T463A, Flag-TRAF6 S507A oder Flag-TRAF6 T463A/S507A Plasmid transfiziert. Die Induktion der Zellen erfolgte durch Kotransfektion von 4 μ g pSV-LMP1wt 581 Plasmid. Nach 24 h wurde HA-TNIK mittels HA(12CA5) G-Sepharose-Beads präzipitiert und die Interaktion mit TRAF6 durch den entsprechenden TRAF6 (H274)-Antikörper in Western Blot Analysen nachgewiesen. B) HEK293 Wildtyp-Zellen wurden in 10 cm Schalen mit 0,5 μ g pRK5-HA-MINK1 Plasmid und 0,5 μ g pRK5-Flag-TRAF6 WT, Flag-TRAF6 T463A, Flag-TRAF6 S507A oder Flag-TRAF6 T463A/S507A Plasmid transfiziert. Die Induktion der Zellen erfolgte durch Kotransfektion von 4 μ g pSV-LMP1wt 581 Plasmid. Nach 24 h wurde HA-MINK1 mittels HA(12CA5) G-Sepharose-Beads präzipitiert und die Interaktion mit TRAF6 durch den entsprechenden TRAF6 (H274)-Antikörper in Western Blot Analysen nachgewiesen.

Ergebnisse

Dazu wurde in HEK293 Zellen ein durch siRNA vermittelter Knockdown von TNIK und MINK1 generiert. Durch Koexpression von TRAF6-Wildtyp bzw. den Phosphorylierungsmutanten von TRAF6 und LMP1 in den Zellen sollte die Phosphorylierung von TRAF6 induziert werden. TRAF6 wurde immunpräzipitiert und die Phosphorylierung von TRAF6 mittels phosphorylierungsspezifischer Antikörper im Western Blot nachgewiesen. Wie in Abbildung 36A zu sehen ist, führte die Induktion durch LMP1 zu einer Verstärkung der Phosphorylierung von TRAF6-Wildtyp an S507 im Vergleich zur pRK5-Negativkontrolle, sowohl in Kontrollzellen (siCTR) als auch den Zellen mit Knockdown von TNIK und MINK1 (siTNIK/MINK1). Die TRAF6 T463A/S507A-Mutante kann in keinem der Versuchsansätze phosphoryliert werden, was die Funktionalität des verwendeten Antikörpers 3F10 nochmals bestätigt (Abb. 36A). Vergleicht man die Stärke der Phosphorylierung von TRAF6 in den Ansätzen mit Knockdown von TNIK und MINK1 (siTNIK/MINK1) und den Kontrollansätzen (siCTR), ist eine sehr leichte Reduktion der Phosphorylierung von TRAF6 an S507 in Abwesenheit von TNIK und MINK1 zu verzeichnen (Abb. 36A). Insgesamt zeigt dieses Experiment, dass die Phosphorylierung von TRAF6 an S507 durch eine Expression von LMP1 induziert werden kann und dass die Stärke der Phosphorylierung durch Senkung der Level von TNIK und MINK1 in der Zelle reduziert wird. TNIK und MINK1 scheinen also für die Phosphorylierung von TRAF6 an S507 verantwortlich zu sein. Dass diese Reduktion der Phosphorylierung von TRAF6 nach Knockdown von TNIK und MINK1 nur sehr gering ist, lässt sich eventuell über die Effizienz des Knockdowns erklären. Man sieht deutlich, dass nach Knockdown mit siRNA noch TNIK- und MINK1-Protein im Western Blot nachgewiesen werden kann (Abb. 36). Wahrscheinlich reichen diese Mengen an TNIK und MINK1 noch aus, um TRAF6 zu phosphorylieren, wenn auch leicht reduziert.

Alle Versuchsansätze in Abbildung 36 wurden außerdem 30 min vor der Zelllyse mit Calyculin A behandelt. Bei Calyculin A handelt es sich um einen potenten, selektiven und zelldurchgängigen Proteinphosphatase-Inhibitor, der die Proteinphosphatase 1 und Proteinphosphatase 2A in der Zelle blockiert und somit eine Akkumulation von Phosphorylierungen hervorruft (Ishihara et al, 1989). Dieser Inhibitor ermöglichte es, die durch endogenes TNIK und MINK1 induzierte Phosphorylierung von TRAF6 mit den phosphorylierungsspezifischen

Ergebnisse

Antikörper 3F10 zu detektieren. Ohne Behandlung mit Calyculin A war es in allen in dieser Arbeit durchgeführten Stimulationsexperimenten nicht möglich, die durch TNIK induzierte Phosphorylierung von TRAF6 im Western Blot nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise befindet sich ohne Behandlung der Zellen mit Calyculin A die Menge an phosphoryliertem TRAF6 unter dem Detektionslimit des verwendeten Antikörpers.

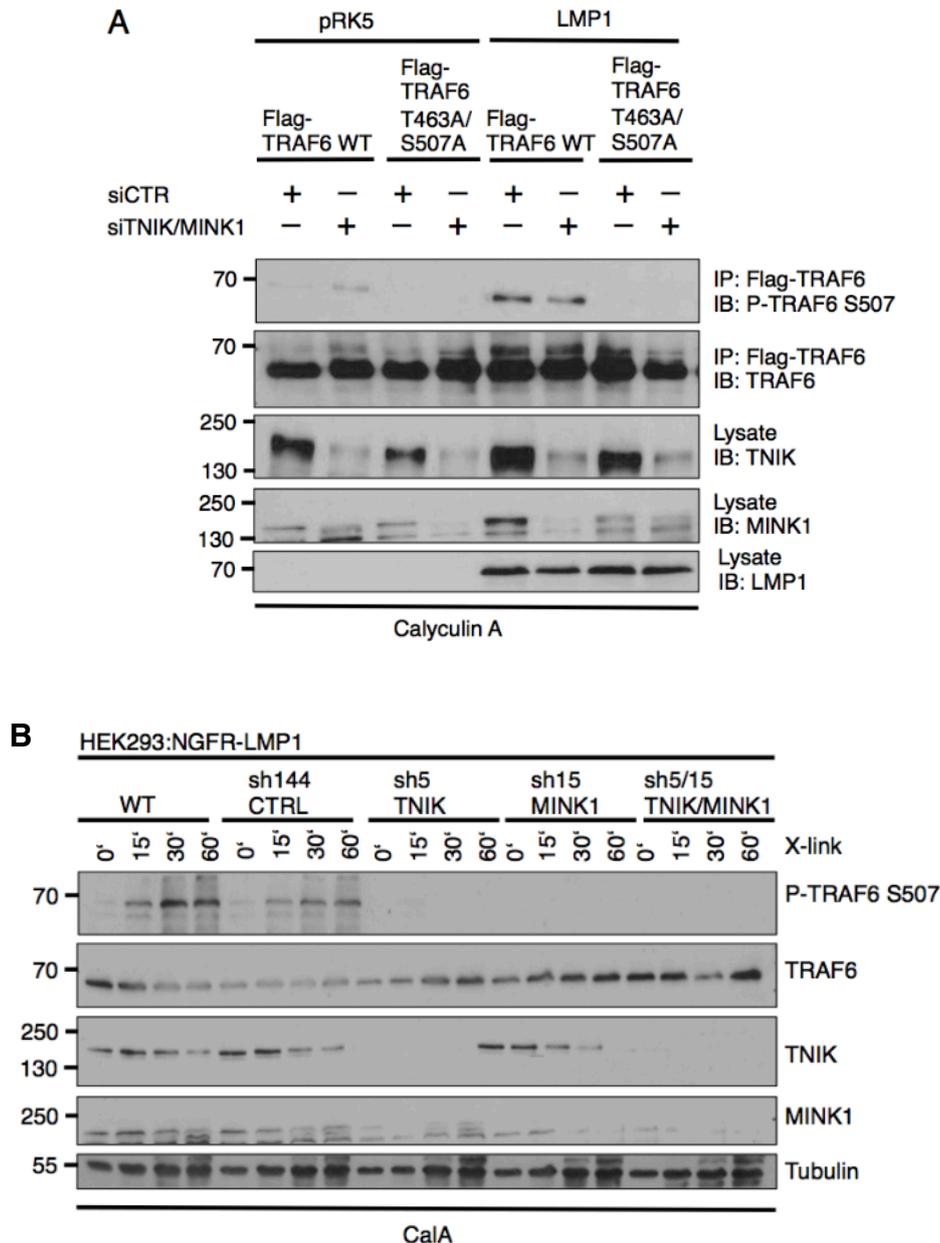


Abb. 36: TNIK und MINK1 sind essenziell für die Phosphorylierung von TRAF6 an Serin 507 durch LMP1. A) HEK293 Wildtyp-Zellen wurden zweimal innerhalb von 24 h mit siRNA gegen TNIK und MINK1 (siTNIK/MINK1) oder Kontroll-siRNA (siCTR) in 6-Well Platten transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 μ g pCMV-HA-LMP1 WT (15.2) oder als Negativkontrolle mit pRK5-Leervektors transfiziert. Zusätzlich wurde entweder 0,5 μ g von dem Flag-TRAF6 WT oder Flag-TRAF6 T463A/S507A Plasmid kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für 30 min mit 0,1 μ M Calyculin A behandelt und lysiert. Die Flag-

Ergebnisse

TRAF6-Konstrukte wurden mittels Flag (6F7) G-Sepharose-*Beads* präzipitiert. Unter Verwendung des TRAF6 S507 (3F10) Antikörpers wurde die Phosphorylierung von TRAF6 an Serin 507 im Western Blot nachgewiesen. In den Zelllysaten wurde die Expression von TRAF6 sowie LMP1 und der Knockdown von TNIK und MINK1 mittels der angegebenen Antikörper überprüft. B) HEK293:NGFR-LMP1 Wildtyp, HEK293:NGFR-LMP1 sh144 Ctrl, HEK293:NGFR-LMP1 sh5 TNIK, HEK293:NGFR-LMP1 sh15 MINK1 und HEK293:NGFR-LMP1 sh5/15 TNIK/MINK1 Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte durch eine NGFR-Antikörperquervernetzung stimuliert. 30 min vor der Zellyse erfolgte eine Zugabe von 0,1 μ M Calyculin A zu den Stimulationsansätzen. Die Lysate wurden über SDS-PAGEle aufgetrennt und die TRAF6 S507 Phosphorylierung über den TRAF6 S507 (3F10) Antikörper im Immunoblot nachgewiesen. Der Knockdown von TNIK und/oder MINK1 wurde mittels der angegebenen Antikörper überprüft.

Um zu klären, ob diese durch LMP1 induzierte Phosphorylierung von TRAF6 an S507 auch zeit- und stimulationsabhängig in der Zelle stattfindet, wurde mit einem über Antikörperquervernetzung induzierbaren Zellsystem untersucht. Dazu wurde in HEK293:NGFR-LMP1 Zellen, welche das NGFR-LMP1-Konstrukt exprimieren, ein stabiler *short hairpin*-Knockdown von TNIK und/oder MINK1 generiert. Anschließend wurde der LMP1-Signalweg über Aktivierung von NGFR-LMP1 induziert und die Phosphorylierung von TRAF6 an S507 per Western Blot Analyse untersucht. Die Zellen wurden auch in diesem Versuch, wie bereits oben erwähnt, vor der Zellyse mit Calyculin A behandelt, um die Phosphorylierung von TRAF6 zu akkumulieren und detektierbar zu machen.

Die Abbildung 36B zeigt, dass in Wildtyp-Zellen (WT) und Kontrollzellen (sh144 CTRL) bereits nach 15 min Induktion durch LMP1 durch Aktivierung von NGFR-LMP1 die Phosphorylierung von TRAF6 an S507 detektiert werden kann (Abb. 36B). Diese durch LMP1 induzierte Phosphorylierung wurde nach 30 und 60 min Aktivierung von NGFR-LMP1 zusätzlich verstärkt (Abb. 36B). Sind TNIK (sh5), MINK1 (sh15) oder TNIK und MINK1 (sh5/15) durch einen sh-Knockdown herunterreguliert, kann zu keinem Stimulationszeitpunkt eine Phosphorylierung von TRAF6 an Serin 507 im Western Blot detektiert werden (Abb. 36B). TNIK und MINK1 sind somit essenziell, um im LMP1-Signalweg die Phosphorylierung von TRAF6 zu induzieren. Dieses Experiment zeigt, dass es keine weiteren Kinasen, außer TNIK und MINK1, in diesem Zellsystem gibt, welche TRAF6 an der Position Serin 507 phosphorylieren können.

Insgesamt verdeutlichen diese zwei Experimente, dass die Phosphorylierung von TRAF6 an S507 in Zellen durch LMP1 induziert werden kann und dass diese induzierte Phosphorylierung eine Abhängigkeit von TNIK und MINK1 zeigt.

4.2.3 Der Einfluss von TNIK auf die Ubiquitinierung von TRAF6

Die RING-Domäne von TRAF6 agiert als E3-Ubiquitinligase und vermittelt sowohl die K63-verknüpfte Autoubiquitinierung von TRAF6, als auch die Ubiquitinierung anderer Proteine durch TRAF6 (Walsh et al, 2008). Es wurde bereits gezeigt, dass LMP1 die K63-verknüpfte Ubiquitinierung von TRAF6 induzieren kann, was einen essenziellen Schritt in der durch TRAF6 vermittelten Aktivierung von NF- κ B und JNK darstellt (Obermeier, 2012; Song et al, 2006). Da bereits bekannt ist, dass die beiden posttranslationalen Proteinmodifikationen, Ubiquitinierung und Phosphorylierung, voneinander abhängig sein können (Hunter, 2007), sollte untersucht werden, ob die durch TNIK und MINK1 vermittelte Phosphorylierung von TRAF6 an T463 und S507 einen Einfluss auf die Aktivität von TRAF6 hat, was durch die Stärke der Autoubiquitinierung von TRAF6 getestet wurde.

In HEK293 Wildtyp-Zellen und HEK293 TRAF6-Knockout-Zellen wurde dazu LMP1 als Induktor bzw. pRK5 als Negativkontrolle zusammen mit TRAF6-Wildtyp oder den Phosphorylierungsmutanten von TRAF6 (S507A, T463A, T463A/S507A) exprimiert. Außerdem wurden die Zellen mit einem Plasmid transfiziert, welches für Ubiquitin kodiert, das ausschließlich über Lysin 63 verknüpft werden kann (HA-Ubiquitin K63). Diese K63-verknüpfte Ubiquitinierung spielt in verschiedenen zellulären Prozessen, wie der Rezeptor-Internalisierung, Vesikelweiterleitung, DNA-Reparatur, Stressantwort und als Bindeplattform für verschiedene Signalmoleküle eine entscheidende Rolle (Walsh et al, 2008). Um nur diese Art der Ubiquitinierung und die damit zusammenhängenden Prozesse zu untersuchen, wurde die HA-Ubiquitin K63-Mutante in die Zellen eingebracht. Nach erfolgter Immunpräzipitation der TRAF6-Konstrukte konnte die K63-vermittelte Autoubiquitinierung von TRAF6 über Western Blot Analysen nachgewiesen werden.

Das Experiment wurde in HEK293 TRAF6-Knockout-Zellen durchgeführt, um eventuelle Effekte von in Wildtyp-Zellen exprimiertem endogenem TRAF6 auszuschließen. Das endogene TRAF6 in Wildtyp-Zellen könnte bereits an Serin 507 und Threonin 463 phosphoryliert in der Zelle vorliegen und somit die Versuchsansätze mit Koexpression der Phosphorylierungsmutanten von TRAF6 stören. In Zellen mit einem Knockout von endogenem TRAF6 und zusätzlicher Transfektion von den Phosphorylierungsmutanten von TRAF6 können diese Nebeneffekte ausgeschlossen werden.

Ergebnisse

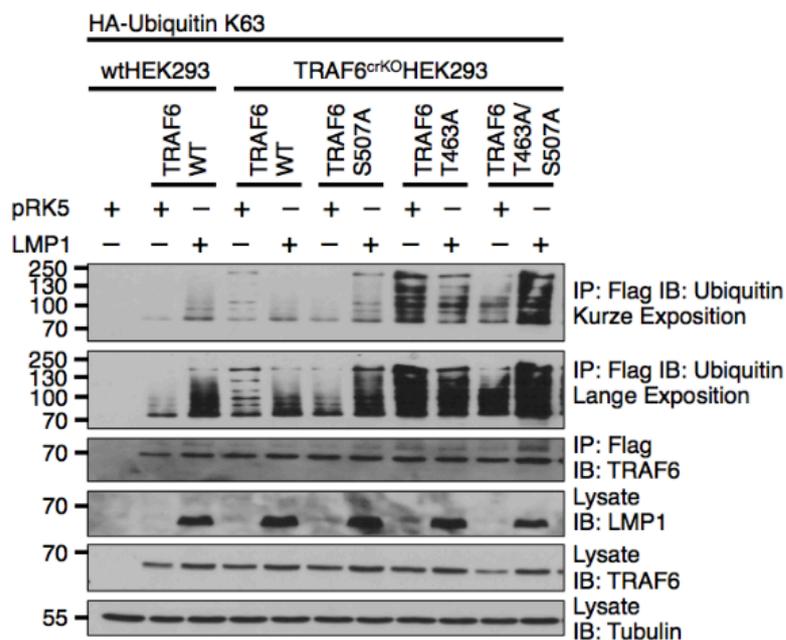


Abb. 37: Die Phosphorylierungsmutanten TRAF6 T463A, TRAF6 S507A und TRAF6 T463A/S507A zeigen eine verstärkte Ubiquitinierung an K63 nach Aktivierung durch LMP1. HEK293 Wildtyp und TRAF6^{crKO}HEK293 cl.4 Zellen wurden in 10 cm Schalen mit 0,5 μ g HA-Ubiquitin K63, 0,5 μ g Flag-TRAF6 WT, Flag-TRAF6 T463A, Flag-TRAF6 S507A oder Flag-TRAF6 T463A/S507A Plasmid und 1 μ g pSV-LMP1 581 Plasmid oder pRK5-Leervektor als Negativkontrolle transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen unter Zugabe von NEM zum Lysepuffer. Die Flag-TRAF6-Konstrukte wurden über Flag (6F7) G-Sepharose-Beads präzipitiert und die Ubiquitinierung der präzipitierten Proteine mittels HA(3F10) Antikörper im Immunoblot nachgewiesen. Die Expression von LMP1 und TRAF6 wurde in den Zelllysaten durch die angegebenen Antikörper bestätigt.

Nach Induktion durch LMP1 kann sowohl in HEK293 Wildtyp-Zellen als auch in HEK293 TRAF6-Knockout-Zellen mit rekonstituiertem exogenen TRAF6-Wildtyp-Konstrukten eine Autoubiquitinierung an K63 von TRAF6 nachgewiesen werden (Abb. 37). Interessanterweise, zeigte sich nach Rekonstitution mit den Phosphorylierungsmutanten T463A und T463A/S507A von TRAF6 sowohl unstimuliert als auch nach Induktion durch LMP1 eine erhöhte Autoubiquitinierung von TRAF6 im Vergleich zu den TRAF6-Wildtyp-Ansätzen (Abb. 37). Die Rekonstitution mit TRAF6 S507A führt nur zu einer leichten Verstärkung der Autoubiquitinierung im Vergleich zu TRAF6 WT in den TRAF6-Knockout-Zellen (Abb. 37).

Der Verlust der durch TNIK und MINK1 induzierten Phosphorylierung von TRAF6 scheint also zu einer verstärkten Autoubiquitinierung von TRAF6 zu führen, was auf eine eher negativ-regulatorische Rolle dieser Phosphorylierungsstellen im LMP1-

Signalweg hinweist. Dabei scheint die Phosphorylierungsstelle S507 eine stärkere regulatorische Rolle zu spielen als T463. In allen Versuchsansätzen mit mutierter Threonin 463-Position (T463A) ist eine gesteigerte Autoubiquitinierung zu verzeichnen, während eine Mutation an Position S507 (S507A) eher geringere Effekte auf die Ubiquitinierung zeigt.

Die K63-verknüpfte Autoubiquitinierung von TRAF6 spielt in der Signaltransduktion in der Aktivierung von JNK und NF- κ B eine entscheidende Rolle. So wird TAK1 beispielsweise durch Autophosphorylierung und K63-verknüpfte Polyubiquitinierung durch TRAF6 aktiviert (Fan et al, 2010; Hamidi et al, 2012). Außerdem können von TRAF6 stammende nicht verankerte Ubiquitinketten an TAB2 binden und zur Aktivierung von TAK1 beitragen (Xia et al, 2009). Die Autoubiquitinierung von TRAF6 besitzt also eine Rolle in der Rekrutierung des TAK1/TAB-Komplexes in der Zelle und der Aktivierung von JNK und NF- κ B (Lamothe et al, 2007; Megas et al, 2011; Walsh et al, 2008).

Um festzustellen, ob die K63-vermittelte Ubiquitinierung von TRAF6 von der Anwesenheit von TNIK und MINK1 abhängig ist, wurden mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Technologie TNIK- und MINK1-Knockout-Zellen generiert (siehe Abschnitt 3.1.8.2). In den Wildtyp- und Knockout-Zellen wurde Ubiquitin K63 zusammen mit TRAF6 oder als Negativkontrolle ohne TRAF6 exprimiert. Die Induktion der Zellen fand durch die Überexpression von LMP1 statt. Die Expression von LMP1 und der Knockout von TNIK und MINK1 konnten über Immunoblots nachgewiesen werden (Abb. 38). Nach Präzipitation von TRAF6 wurde über eine Western Blot Analyse die K63-verknüpfte Ubiquitinierung des Proteins detektiert.

Ergebnisse

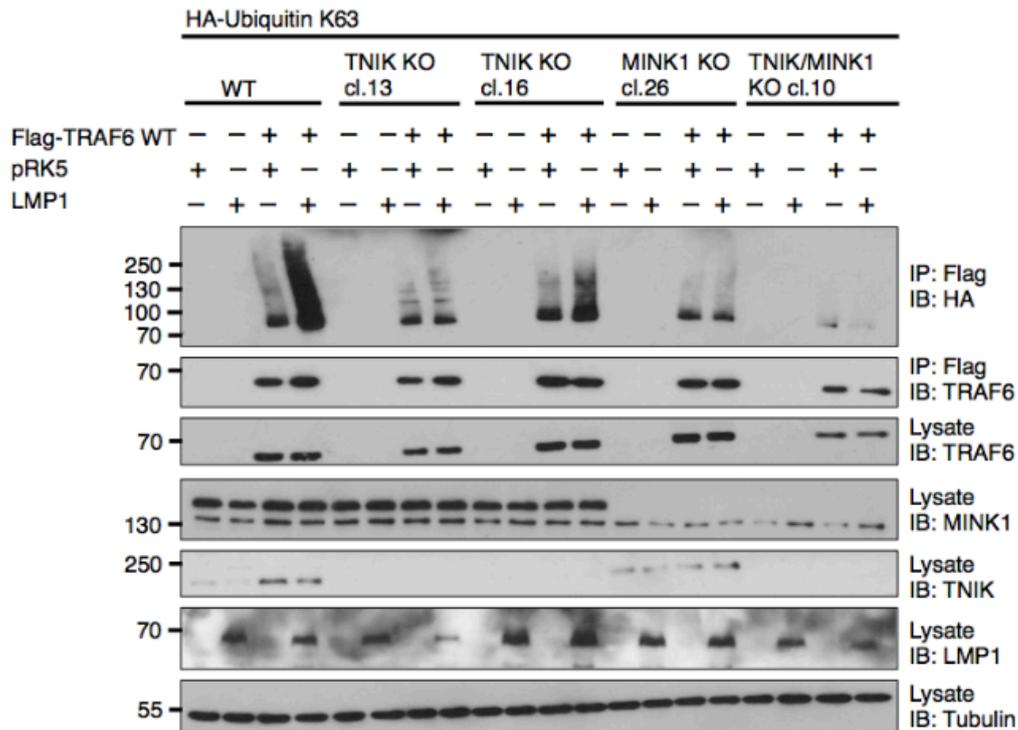


Abb. 38: Der Knockout von TNIK und/oder MINK1 reduziert die durch LMP1 induzierte K63-verknüpfte Ubiquitinierung von TRAF6. HEK293 Wildtyp, TNIK^{crKO}HEK293 cl.13 und cl.16, MINK1^{crKO}HEK293 cl.26 und TNIK/MINK1^{crKO}HEK293 cl.10 wurden in 10 cm Schalen mit 0,5 µg HA-Ubiquitin K63, 0,5 µg Flag-TRAF6 WT und 1 µg pSV-LMP1 581 Plasmid bzw. pRK5 Leervektor als Negativkontrolle transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen unter Zugabe von NEM zum Lysepuffer. Flag-TRAF6 wurde über Flag (6F7) G-Sepharose-Beads präzipitiert und die Ubiquitinierung der präzipitierten Proteine mittels HA(3F10) Antikörper im Immunoblot nachgewiesen. Die Expression von LMP1 und TRAF6 sowie der Knockout von TNIK und MINK1 wurde in den Zelllysaten durch die angegebenen Antikörper bestätigt.

In WT Zellen führte die Induktion durch LMP1 zu einer signifikanten Erhöhung der K63-vermittelten Autoubiquitinierung von TRAF6, was man im Western Blot an der Detektion von HA-Ubiquitinketten als Schmier von hochmolekularen Banden erkennen kann (Abb. 38). Wie in Abbildung 38 zu sehen ist, kann die Autoubiquitinierung von TRAF6 durch einen Knockout von TNIK (gezeigt für zwei unabhängige TNIK-Knockout Zellklone) oder MINK1 gesenkt werden. Der Doppelknockout von TNIK und MINK1 führte jedoch noch zu einer Verstärkung der Hemmung der Autoubiquitinierung von TRAF6. Diese Daten zeigen, dass die beiden Kinasen TNIK und MINK1 an einer Aktivierung von TRAF6 beteiligt sind und somit in den durch TRAF6 vermittelten Signalwegen eine Rolle spielen. Ähnliche Ergebnisse konnten für die Phosphorylierung von TRAF6 erzielt werden, wie in Abschnitt 4.2.2.2 beschrieben wurde. Auch bei der Phosphorylierung von TRAF6 an T463 und S507 handelt es sich um einen Prozess, welcher von TNIK und MINK1

abhängig ist. Möglicherweise stehen die Phosphorylierung und Ubiquitinierung von TRAF6 durch TNIK und MINK1 also in einem Zusammenhang in der Zelle während der LMP1-Signalkaskade. Nur in Anwesenheit von TNIK und MINK1 findet eine vollständige Autoubiquitinierung und Aktivierung von TRAF6 statt. Gleichzeitig wird aber auch die Phosphorylierung von TRAF6 an T463 und S507 durch TNIK und MINK1 induziert, welche wiederum eher negativ-regulatorisch auf die Ubiquitinierung von TRAF6 wirkt (Abb. 37). TNIK und MINK scheinen somit eine modulatorische Rolle in der durch TRAF6 vermittelten Signalweiterleitung im LMP1-Weg einzunehmen. Inwieweit diese Beobachtung auch in weiteren Signalwegen zutrifft, gilt es in zukünftigen Experimenten zu klären.

4.2.4 Für die Bildung des LMP1/IKK2/TAK1-Signalkomplexes sind TNIK und MINK1 nicht essenziell

In Kapitel 4.2.1.1 wurde nachgewiesen, dass TNIK und MINK1 in der Lage sind, mit TRAF6 im LMP1-Signalweg zu interagieren. Außerdem wurden durch Shkoda et al. Signalkomponenten wie TAB2, TAK1 und IKK2 als Interaktionspartner von TNIK identifiziert (Shkoda et al, 2012). Unter Verwendung von HEK293 Zellen mit einem Knockout von TNIK und MINK1, welche mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Technologie generiert wurden, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob TNIK und MINK1 in der Bildung des LMP1/TAK1/IKK2-Komplexes beteiligt sind.

In HEK293 WT-Zellen und HEK293 Zellen mit einem Doppelknockout von TNIK und MINK1 wurde LMP1-Wildtyp zusammen mit IKK2 oder TAK1 überexprimiert. Als Negativkontrolle diente die Expression einer LMP1-Mutante, welche sowohl in der CTAR1 als auch der CTAR2 Domäne mutiert ist und kein aktives LMP1 *Signaling* mehr aufweist (AAA/ Δ 371). Nach Immunpräzipitation von IKK2 wurde in Abbildung 39A die Interaktion mit LMP1 in An- und Abwesenheit von TNIK und MINK1 untersucht. In Wildtyp-Zellen kann IKK2 mit LMP1-Wildtyp interagieren, während mit der LMP1-Mutante keine Komplexbildung nachgewiesen werden kann. Liegt ein Knockout von TNIK und MINK1 vor, wird die Interaktion von IKK2 mit Wildtyp-LMP1 nicht beeinflusst (Abb. 39A). In Abbildung 39B wurde LMP1 immunpräzipitiert und die Interaktion mit TAK1 analysiert. Auch hier zeigt sich, dass TAK1 sowohl in den Wildtyp-Zellen als auch den Zellen mit Knockout von TNIK und MINK1 mit Wildtyp-LMP1 einen Komplex bilden kann (Abb. 39B).

Diese Experimente verdeutlichen, dass zwar TNIK und MINK1 mit wichtigen Signalkomponenten wie TRAF6 im LMP1-Signalweg interagieren können, allerdings sind die beiden Keimzentrumskinasen für eine Signalkomplexbildung von LMP1 mit TAK1 und IKK2 zumindest in Überexpressionsexperimenten nicht essenziell.

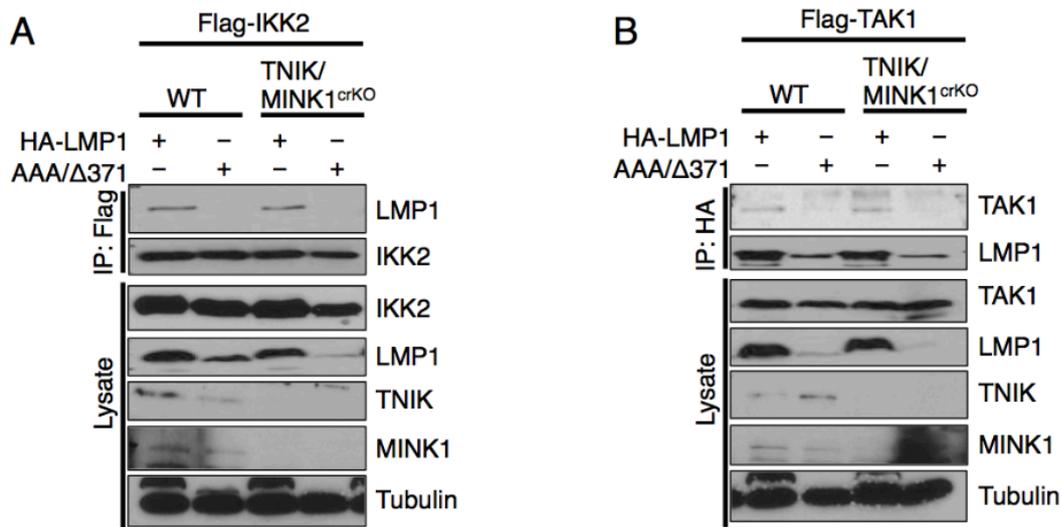


Abb. 39: Die Interaktion von LMP1 mit IKK2 und die Interaktion von LMP1 mit TAK1 ist unabhängig von TNIK und MINK1. A) TNIK/MINK1^{crKO}HEK293 cl.10 und wtHEK293 Zellen wurden in 15 cm Schalen mit 4 μ g Flag-IKK2 und 4 μ g pCMV-HA-LMP1wt bzw. pCMV-HA-LMP1wt AAA/Δ371 Plasmid transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen und Flag-IKK2 wurde mittels Flag (6F7) G-Sepharose-Beads präzipitiert. Die Interaktion zwischen IKK2 und LMP1 wurde in Immunoblots über den LMP1 1G6-3 Antikörper detektiert. Der TNIK und MINK1 Knockout, sowie die Expression der überexprimierten Konstrukte wurde in den Zelllysaten mit Hilfe der angegebenen Antikörper überprüft. B) TNIK/MINK1^{crKO}HEK293 cl.10 und wtHEK293 Zellen wurden in 15 cm Schalen mit 4 μ g Flag-TAK1 und 4 μ g pCMV-HA-LMP1wt bzw. pCMV-HA-LMP1wt AAA/Δ371 Plasmid transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen und HA-LMP1 wurde mittels HA (3F10) G-Sepharose-Beads präzipitiert. Die Interaktion zwischen TAK1 und LMP1 wurde in Immunoblots über den TAK1 Antikörper detektiert. Der TNIK und MINK1 Knockout, sowie die Expression der überexprimierten Konstrukte wurde in den Zelllysaten mit Hilfe der angegebenen Antikörper überprüft.

4.2.5 TAK1, nicht aber NEMO, kann durch TNIK phosphoryliert werden

Wie bereits in vorherigen Abschnitten erwähnt, weist das Multidomänenprotein TNIK eine Kinaseaktivität auf. Neben der Fähigkeit zur Autophosphorylierung von TNIK (Fu et al, 1999), konnte die Phosphorylierung des C-terminalen Teils von TRAF6 (AS 310-522) und von TRAF4 durch TNIK in unserem Labor in Vorarbeiten gezeigt werden (Kunke, 2014; Obermeier, 2012; Town, 2012). Da TNIK als

Interaktionspartner wichtiger Komponenten des LMP1-Signalkomplexes identifiziert werden konnte (Shkoda et al, 2012), wurde in weiterführenden Experimenten getestet, ob einige dieser Komponenten wie z.B. TAK1 und NEMO, ebenfalls Substrate der Kinaseaktivität von TNIK darstellen.

Um zu testen, ob TAK1 und NEMO durch TNIK phosphoryliert werden können, wurde ein *in vitro* Immunkomplex-Kinase-Versuch durchgeführt. Dazu wurde in HEK293 Zellen die Kinasedomäne von TNIK (HA-TNIK KD) oder eine TNIK-Kinase mutante (HA-TNIK KD/KM), welche nicht mehr in der Lage ist Substrate zu phosphorylieren, transfiziert. Nach Immunpräzipitation der TNIK-Varianten wurde der Kinaseversuch *in vitro* unter Zugabe von kommerziell erhältlichem GST-TAK1-Protein und GST-NEMO-Protein als Substrat durchgeführt. Die Kinasereaktion wurde in Gegenwart von Inhibitoren (+IH), welche gegen IKK2 (AICHP) und TAK1 ((5Z)-7-oxozeaenol) gerichtet sind, ausgeführt. Somit soll verhindert werden, dass endogenes TAK1 oder IKK2, welches mit dem präzipitierten TNIK interagieren kann, unspezifische Phosphorylierungen im Kinase-Versuch verursacht. Gleiche Immunpräzipitationen der TNIK-Proteine je Ansatz, sowie gleiche Mengen an zugegebenem Substrat wurden mittels Immunoblot-Analyse nachgewiesen (Abb. 40). Als Negativkontrollen wurden Ansätze ohne Expression von TNIK-Konstrukten, in welchen nur der pRK5 Leervektor exprimiert wurde, mitgeführt. Auch die Ansätze ohne Substratzugabe stellten eine Negativkontrolle des Versuches dar.

Als Positivkontrolle des Versuches wurden die Zellen mit IKK2 und LMP1 transfiziert und anschließend die Fähigkeit von IKK2 getestet I κ B α als Substrat in Ab- oder Anwesenheit des IKK2- und TAK1-Inhibitors zu phosphorylieren (Abb. 40 Spur 12 und 13). Dabei zeigte sich eindeutig, dass eine Phosphorylierung von I κ B α nur beobachtet werden konnte, wenn keine Inhibition von IKK und TAK1 stattfand (Abb. 40 Spur 12). Diese Kontrolle bestätigt, dass einerseits eine *in vitro* Phosphorylierung mit den verwendeten Bedingungen stattfinden kann und andererseits, dass die zugegebenen Inhibitoren die gewünschte Inhibition von IKK2 und TAK1 hervorrufen.

Die autoradiographische Analyse der Gele ergab weiterhin, dass NEMO weder durch die Wildtyp-Kinasedomäne von TNIK noch durch die Kinase mutante von TNIK phosphoryliert werden kann (erwartete Bande bei etwa 70kDa) (Abb. 40 Spur 7 und 8). Die Autophosphorylierung der Kinasedomäne von TNIK-Wildtyp kann

Ergebnisse

deutlich im Bereich von 40 kDa nachgewiesen werden (Abb. 40 Spur 3, 7 und 10). Diese Autophosphorylierung von TNIK tritt nicht in der Kinasemutante TNIK KD/KM auf, was die Inaktivität dieser Mutante bestätigt (Abb. 40 Spur 4, 8 und 11).

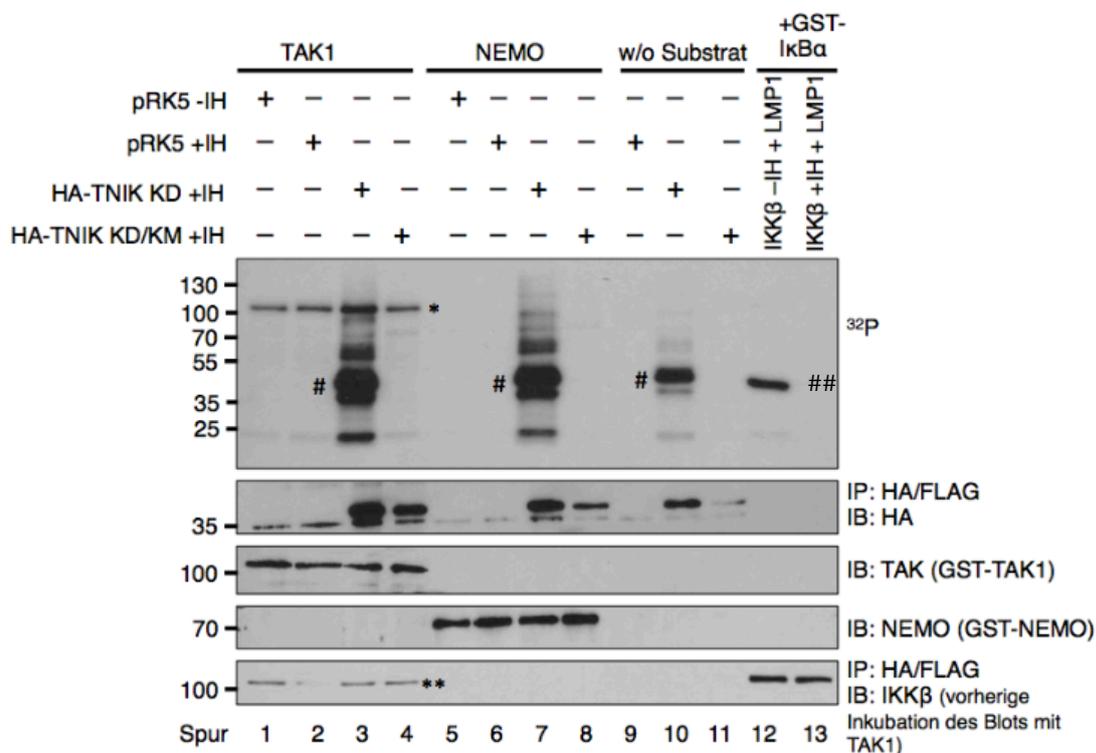


Abb. 40: TAK1, nicht aber NEMO, wird durch TNIK *in vitro* phosphoryliert. HEK293 Wildtyp-Zellen wurden in 15 cm Schalen mit 8 μ g pRK5 Leervektor als Negativkontrolle oder 8 μ g HA-TNIK KD oder der Kinase-inaktiven HA-TNIK KD/KM transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und HA-TNIK mittels HA(12CA5) G-Sepharose-Beads aus dem Lysat immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden zweimal in Kinasepuffer, versetzt mit 25 μ M TAK1- und 25 μ M IKK-Inhibitor (+IH), gewaschen. Proben ohne Inhibitor (-IH) wurden in Kinasepuffer mit adäquatem Volumen an DMSO gewaschen. Anschließend fand ein radioaktiver Immunkomplex-Kinase-Versuch unter Zugabe von 1 μ g GST-TAK1- oder GST-NEMO-Substrat statt. Nach der Kinasereaktion wurden die Proben über SDS-PA-Gele aufgetrennt und mittels Immunoblot unter Verwendung der angegebenen Antikörper analysiert. Die Phosphorylierungen wurden durch ein Autoradiogramm visualisiert. Als Positivkontrolle für die Funktionalität des Experimentes wurden wtHEK293 Zellen mit 4 μ g pSV-LMP1wt 581 und 4 μ g Flag-IKKβ transfiziert. Die Kinasereaktion erfolgte mit 1 μ g GST-IkBa Protein mit und ohne Zugabe des TAK1- und IKK-Inhibitors (-/+ IH). * Phosphorylierung von GST-TAK1, ** Banden aus vorheriger Inkubation des Blots mit TAK1, # HA-TNIK KD Autophosphorylierung, ## Phosphorylierung von GST-IkBa.

Für TAK1 als mögliches, getestetes Substrat von TNIK sind in allen Proben des Kinaseexperimentes Radioaktivitätssignale auf der Höhe von 120 kDa zu verzeichnen (Abb. 40 Spur 1-4). Dieses Radioaktivitätssignal könnte der Phosphorylierung von TAK1 entsprechen. Da diese Phosphorylierungssignale auch in den Ansätzen der transfizierten Kinasemutante von TNIK und dem pRK5-Leervektor auftreten, kann auf eine Autophosphorylierung des TAK1-Proteins in

diesem Experiment geschlossen werden (Abb. 40). Nach Expression der aktiven Kinasedomäne von TNIK (TNIK KD) tritt jedoch ein deutlicher Anstieg an phosphoryliertem TAK1 auf (Abb. 40 Spur 3). TAK1 konnte somit als Substrat der Kinaseaktivität von TNIK identifiziert werden.

Insgesamt wurden TNIK und sein Homolog MINK1 als wichtige Modulatoren in der LMP1-Signaltransduktion identifiziert. TRAF6 und TAK1 wurden als Substrate der Kinaseaktivität von TNIK nachgewiesen. TRAF6 wird dabei nach Induktion durch LMP1 an T463 und S507 in Abhängigkeit von TNIK und MINK1 phosphoryliert. Diese Phosphorylierungen von TRAF6 zeigten eine negativ-regulatorische Rolle in Bezug auf die Aktivität von TRAF6, gemessen an der Autoubiquitinierung des Signalmoleküls. Inwiefern diese Sekundärmodifikationen von TRAF6 in abwärts gelegenen Signalkaskaden involviert sind, gilt es in zukünftigen Studien zu klären.

4.3 Die Rolle von TNIK in der Karzinogenese

Im Abschnitt 4.2 wurden bereits molekulare Funktionen der Keimzentrumskinase TNIK im LMP1-Signalweg analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass TNIK mit dem Signalprotein TRAF6 interagieren kann und für dessen Sekundärmodifikationen, wie Phosphorylierung und Ubiquitinierung, eine wichtige Rolle spielt. Da es sich bei LMP1 um ein virales Onkogen handelt, welches oft mit verschiedenen Tumoren in Verbindung gebracht wird, stellte sich die Frage, ob die im LMP1-Signalweg involvierte Keimzentrumskinase TNIK auch Funktionen in der Karzinogenese hat.

Vor allem in den letzten Jahren wurde mehrfach eine Rolle von TNIK in verschiedenen Tumorentitäten postuliert. Beispielsweise wurde eine prognostische Signifikanz von TNIK in kolorektalen Karzinomen beschrieben. Eine hohe Expression von TNIK wurde weiterhin als Biomarker für eine schlechte Prognose in Patienten mit Pankreaskarzinomen, Magenkarzinomen und Leberzellkarzinomen vorgeschlagen (Jin et al, 2014; Takahashi et al, 2015; Yu et al, 2014; Zhang et al, 2016).

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von TNIK in der Tumorentstehung und Tumorprogression genauer zu untersuchen. Deshalb wurden verschiedene Zelllinien unterschiedlicher Tumorentitäten ausgewählt und in einem *Screening* analysiert. Dieses *Screening* umfasste dabei Parameter wie Proliferation,

Überleben und Viabilität, Soft-Agar-Wachstum und Wundheilungskapazität der Tumorzellen. Es wurden dazu in den Versuchen Zellen mit einem stabilen Knockdown von TNIK im Vergleich zu Kontrollzellen mit endogener Expression von TNIK verglichen.

4.3.1 Die Expression von TNIK in verschiedenen Tumorentitäten

Die Expression von TNIK unterscheidet sich zwischen verschiedenen Tumorentitäten, als auch zwischen unterschiedlichen etablierten Zelllinien einer Tumorentität teilweise sehr stark. Aufgrund von Datenbank-Analysen wurden für die vorliegende Arbeit 13 verschiedene Zelllinien aus den Tumorentitäten Brust, Lunge, Pankreas, Haut, Ösophagus und Prostata ausgewählt. Dabei wurden Zelllinien herangezogen, welche laut Datenbank eine hohe Genexpression von TNIK aufweisen (Quelle: broadinstitute.org). Außerdem wurden zu den Genexpressionsdaten auch Ergebnisse von histologischen Färbungen von Gewebeschnitten, die in den angegebenen Datenbanken eingesehen werden können, als Auswahlkriterium mit einbezogen. Die Wahl fiel dabei auf Tumorentitäten, die im karzinogenen Gewebe eine sehr starke Expression von TNIK im Vergleich zum nicht-karzinogenem Gewebe aufweisen (Quelle: Proteinatlas.org). Die zu Grunde liegende Hypothese zur Auswahl der Tumorzelllinien besteht darin, dass eine stark erhöhte Expression von TNIK im Tumorgewebe auf eine Rolle der Keimzentrumskinase in der Tumorigenese hinweisen könnte.

In den 13 anhand dieser Kriterien ausgewählten Zelllinien wurde zunächst die Expression von TNIK verglichen. Dazu wurden die Zellen lysiert und die Expression von TNIK unter Verwendung des entsprechenden TNIK-Antikörpers im Immunoblot nachgewiesen und über Quantifizierung durch Odyssey beurteilt. Wie in Abbildung 41 zu sehen ist, weisen die verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Expressionen von TNIK auf. Dabei fällt auf, dass der TNIK-Antikörper das TNIK-Wildtypprotein bei etwa 155 kDa wie erwartet detektiert, aber auch kürzere Varianten des Proteins auftreten. Von den verkürzten Formen von TNIK erscheint die 85 kDa-Variante als die dominante Form. Bei dieser verkürzten Form von TNIK könnte es sich um eine Spaltvariante handeln. In *Xenopus* wurde bereits beschrieben, dass TNIK proteolytisch gespalten werden kann und dabei ein Fragment der Kinasedomäne

Ergebnisse

entsteht, welches als aktiv in der Signaltransduktion postuliert wird (Mikryukov & Moss, 2012). Möglicherweise findet in den getesteten Tumorzelllinien diese aktivierende Spaltung des Wildtyp-Proteins von TNIK statt, weshalb im Western Blot dieses Bandenmuster auftritt.

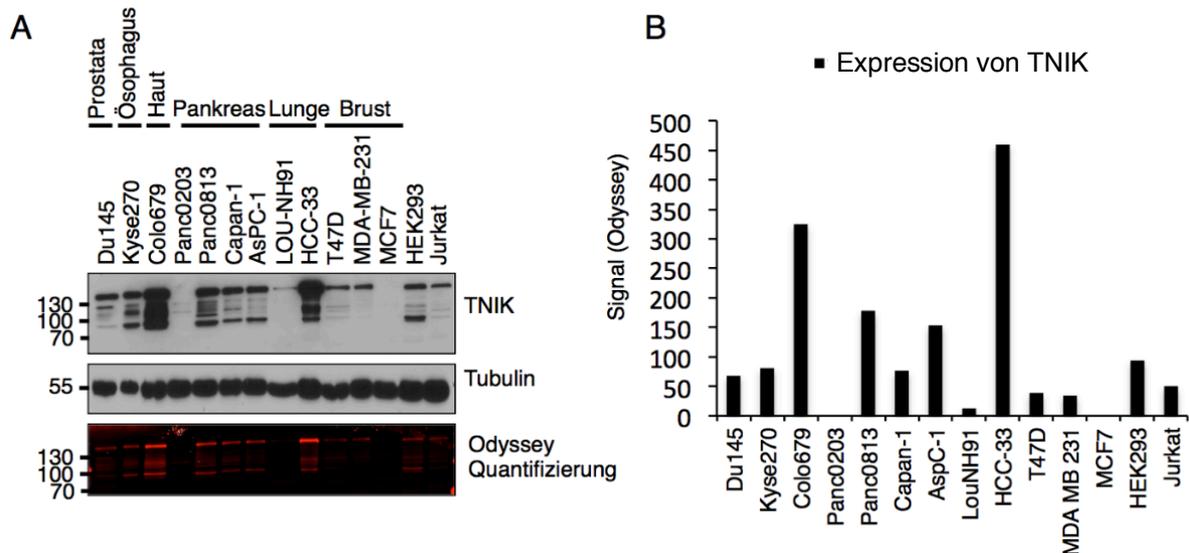


Abb. 41: Die Expression von TNIK unterscheidet sich stark in verschiedenen Tumorzelllinien aus unterschiedlichen Tumorentitäten. A) Western Blot Analyse der angegebenen Tumorzelllinien auf die Expression von TNIK. Tubulin diente als Ladekontrolle. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. B) Odyssey-Quantifizierung des Western Blots aus Abb. A.

Insgesamt zeigt die Auswertung der Proteinexpression über Odyssey weitestgehend übereinstimmende Ergebnisse mit den Genexpressionsdaten der Datenbankanalyse. Als Kontrollzellen wurden Jurkat und HEK293 Zellen herangezogen, welche eher geringere TNIK-Expressionen aufweisen. Die Lungenkarzinomzelllinie HCC-33 und die Hautkarzinomzelllinie Colo 679 zeigen die höchsten Expressionen von TNIK, während beispielsweise die Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 und die Pankreaszelllinie AsPC-1 eher intermediäre Expressionslevel aufweisen (Abb. 41). Außerdem gibt es Zelllinien, in welchen die Proteinexpression von TNIK am Detektionslimit des TNIK-Antikörpers liegt. So kann in der Pankreaskarzinomzelllinie Panc0203 oder der Brustkrebszelllinie MCF7 zumindest über Western Blot Analysen keine Proteinexpression von TNIK nachgewiesen werden (Abb. 41).

Die für die Analyse ausgewählten Zelllinien erwiesen sich aufgrund ihrer diversen, unterschiedlichen Expressionslevel von TNIK als guter Ansatzpunkt für weitere Studien zur möglichen Funktion von TNIK in der Tumorigenese.

4.3.2 Herstellung von TNIK-Knockdown Zelllinien über ein *short hairpin*-System

Um die Rolle von TNIK in der Karzinogenese in einem primären *Screening* genauer untersuchen zu können, wurde in den 13 ausgewählten Karzinomzelllinien ein stabiler Knockdown von TNIK mittels lentiviralem Vektorsystem generiert. Dazu wurden bereits in unserem Labor im Rahmen einer Masterarbeit von Heidi Hertlein zehn verschiedene Vektoren mit der entsprechenden miR30-basierten shRNA gegen TNIK kloniert und diese in Vorexperimenten in verschiedenen Zelllinien auf ihre Funktionalität und die Effizienz des Knockdowns im Western Blot getestet. Dabei erwies sich pCDH-EF1 α -DsRed-sh5 als der Vektor, der nach lentiviraler Transduktion den besten Knockdown von TNIK generierte (Abb. 42A). Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit Lentiviren hergestellt, welche die sh5-Sequenz (sh5 TNIK) tragen. Die 13 Tumorzelllinien wurden mit diesen sh5-Lentiviren transduziert, um einen Knockdown von TNIK zu erzielen. Außerdem wurden Lentiviren, welche ein sh-Kontrollkonstrukt (sh144 CTRL) tragen, was für die GFP-Sequenz kodiert, in alle Zelllinien eingebracht. Diese sh144 CTRL Zellen weisen physiologische Level an TNIK auf und stellen somit die Negativkontrolle in den folgenden Experimenten dar. Zwei Tage nach erfolgter lentiviraler Transduktion wurden die Zelllinien im Durchflusszytometer vermessen, um den Anteil an positiv transduzierten Zellen, welcher sich von der Anzahl dsRED-positiver Zellen ableiten lässt, zu ermitteln. Dabei ergaben sich unterschiedliche Transduktionseffizienzen zwischen 1 % und 20 % je nach Zelllinie. Abbildung 42B zeigt beispielhaft die Transduktionseffizienz von MDA-MB-231 Zellen, welche etwa 17% gegenüber der nicht transduzierten Kontrolle beträgt. Eine Woche nach erfolgter Transduktion wurden die Zellen mittels Zellsortierung am Durchflusszytometer nach dsRed-exprimierenden Zellen sortiert. Die nachfolgende Kontrolle am Durchflusszytometer zeigte dabei, dass nahezu alle sortierten Zellen der sh5 TNIK-Ansätze als auch der sh144 CTRL-Ansätze nach der Zellsortierung ein positives dsRed-Signal zeigen. Somit ist davon auszugehen, dass diese dsRED-exprimierenden Zellen die entsprechende shRNA stabil exprimieren, hier am Beispiel für MDA-MB-231 Zellen gezeigt (Abb. 42B).

Ergebnisse

Um direkt überprüfen zu können, ob die sortierten, dsRED-positiven sh5 TNIK-Zellen auch tatsächlich einen Knockdown von TNIK zeigen, wurden Zelllysate der etablierten Zelllinien hergestellt und in Western Blot Analysen auf Expression von TNIK untersucht. Als Kontrollen wurden die Proteinlevel von TNIK in untransduzierten WT Zellen (WT) und mit der Kontroll-shRNA transduzierten Zellen (sh144 CTRL) im Immunoblot analysiert. Wie in Abbildung 42C zu sehen ist, konnte in allen getesteten Zelllinien eine Reduktion der Expression von TNIK in den sh5 TNIK-Knockdown-Ansätzen im Vergleich zu WT-Zellen und sh144 CTRL-Zellen nachgewiesen werden. Die MCF7 Zelllinie konnte im Western Blot nicht auf die Effizienz des Knockdowns von TNIK untersucht werden, da aufgrund der sehr geringen Expression von TNIK schon in WT-Zellen das TNIK-Protein nicht durch den verwendeten Antikörper im Western Blot detektiert werden konnte. Somit kann in den MCF7 Zellen nur das positive Signal für dsRED im Durchflusszytometer als Hinweis für einen erfolgten Knockdown herangezogen werden. Weiterhin konnte in den Panc0203 Zellen kein Knockdown von TNIK generiert werden, da die Zellen nach Transduktion mit den sh-Konstrukten und Zellsortierung nicht ausgewachsen sind. Die Panc0203 Zellen konnten deshalb im weiteren *Screening* nicht eingesetzt werden.

Insgesamt konnte in 12 verschiedenen Karzinomzelllinien ein erfolgreicher Knockdown von TNIK durch das stabile shRNA-Vektorsystem erzielt werden. Alle generierten Kontrollzelllinien (sh144 CTRL) und Zelllinien mit Knockdown von TNIK (sh5 TNIK) wurden in dem nachfolgenden *Screening* auf Proliferation, Apoptose, Soft-Agar-Wachstum und Wundheilungskapazität untersucht.

Ergebnisse

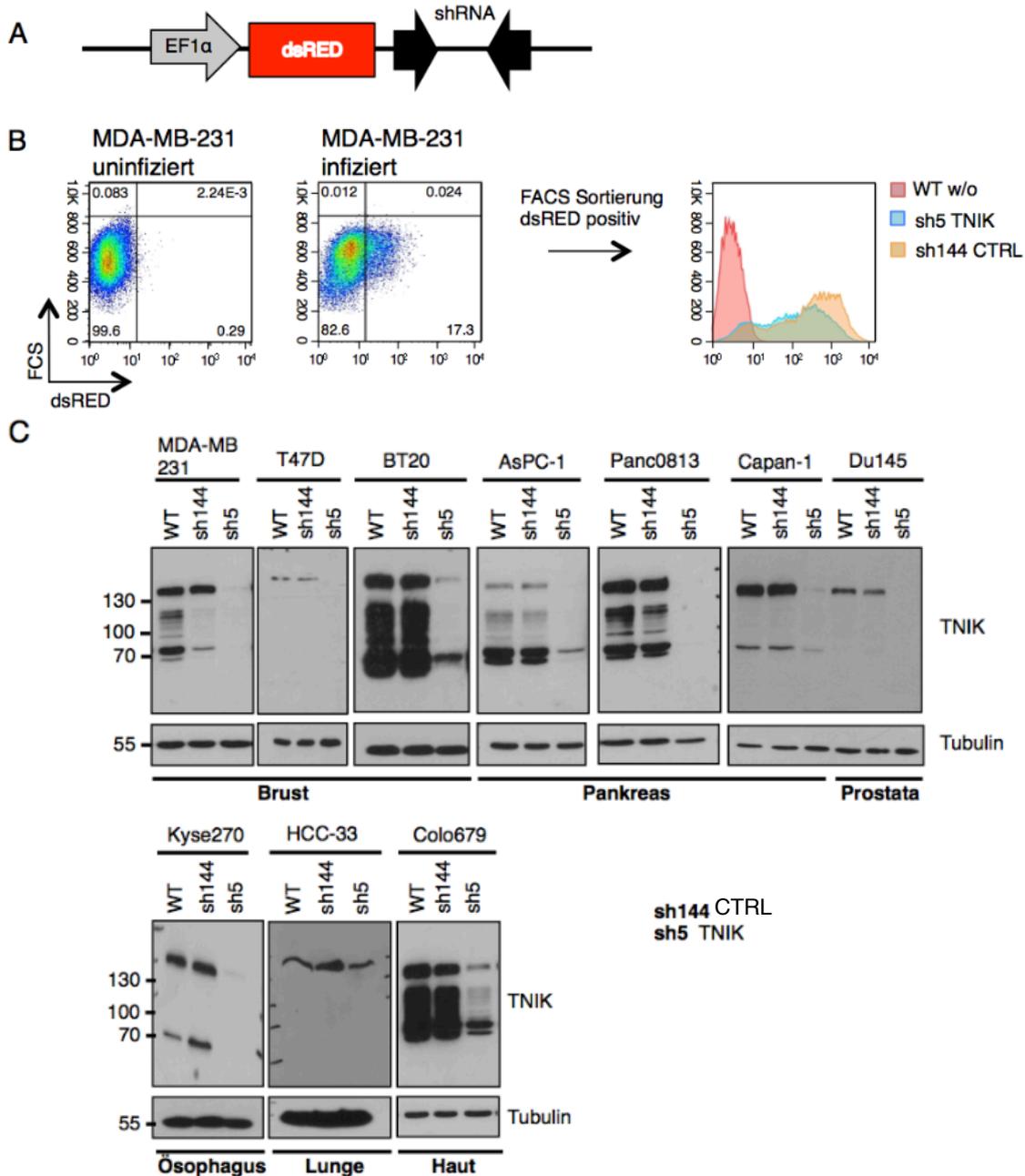


Abb. 42: Die Generierung und Überprüfung des *short hairpin*-Knockdowns von TNIK in den ausgewählten Tumorzelllinien. A) Schematische Darstellung des pCDH-EF1 α -DsRed-miR30-Konstruktes, welches die shTNIK-Sequenz enthält und zur lentiviralen Transduktion der Zelllinien genutzt wurde. B) Representative durchflusszytometrische Blots von untransduzierten MDA-MB-231 Zellen, mit dem pCDH-EF1 α -DsRed-sh5-miR30 TNIK-Konstrukt transduzierten, nicht sortierten MDA-MB-231 Zellen, und den mit pCDH-EF1 α -DsRed-sh5-miR30 TNIK und pCDH-EF1 α -DsRed-sh144-miR30 CTRL transduzierten und auf dsRED-exprimierende Zellen sortierten MDA-MB-231 Zellen. C) Western Blot Analyse auf die Expression von TNIK in WT Zellen, mit pCDH-EF1 α -DsRed-sh144-miR30 CTRL (sh144 CTRL) transduzierten und mit pCDH-EF1 α -DsRed-sh5-miR30 TNIK (sh5 TNIK) transduzierten, sortierten Tumorzelllinien.

4.3.3 Der Einfluss von TNIK auf die Proliferation und Apoptose

Zunächst sollte in den verschiedenen Tumorentitäten geklärt werden, inwiefern TNIK einen Einfluss auf die Induktion von Apoptose und die Proliferation der Zellen hat. In humanen multiplen Myelomzellen konnte diesbezüglich nach einer erfolgten Inhibition von TNIK eine gesenkte Proliferation und erhöhte Apoptoserate beobachtet werden (Chon et al, 2016; Lee et al, 2017). Außerdem zeigte ein siRNA-basierter Knockdown von TNIK in EBV-transformierten B-Zellen, eine Reduktion der Proliferation, sowie einen signifikanten Anstieg an apoptotischen Zellen (Shkoda et al, 2012).

Die etablierten Zellen mit Knockdown von TNIK (sh5 TNIK) und die Kontrollzellen (sh144 CTRL) wurden mit AnnexinV und Propidiumiodid gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer der Anteil an AnnexinV-positiven und PI-negativen Zellen gemessen. Dieser gemessene Prozentsatz steht für die Anzahl apoptotischer Zellen in der jeweiligen Zelllinie. In allen in dieser Arbeit getesteten Tumorzelllinien konnte nach Knockdown von TNIK keine signifikante Veränderung der Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt werden (Abb. 43). Dabei schwankten die Apoptoseraten der verschiedenen Zelllinien zwischen 3% bei Du145 und über 30% bei HCC-33 (Abb. 42).

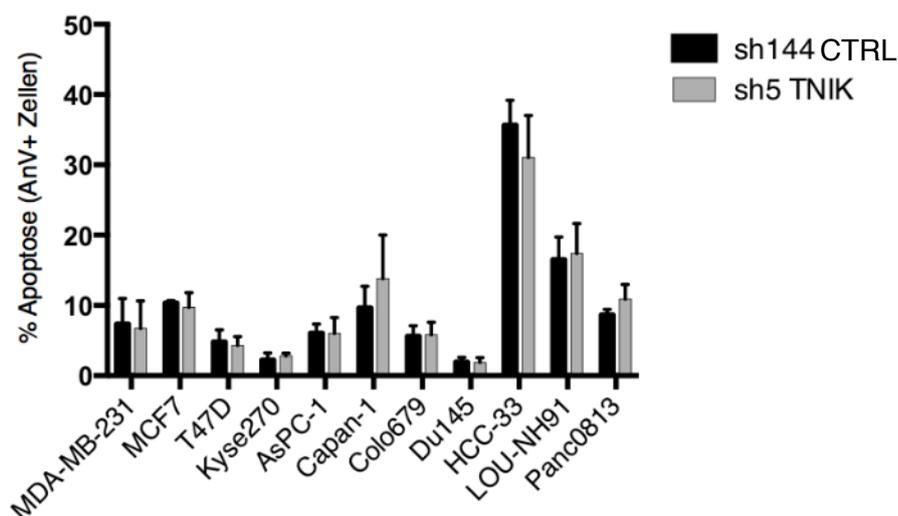


Abb. 43: Der Knockdown von TNIK führt zu keiner signifikanten Erhöhung der Apoptoserate. Die angegebenen Tumorzelllinien mit Knockdown von TNIK (sh5 TNIK) und die Kontrollzelllinien (sh144 CTRL) wurden mit Propidiumiodid (PI) und AnnexinV-Cy5 (AnV) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie die Apoptoserate bestimmt. Dargestellt ist zusammengefasst der Prozentsatz an AnnexinV-positiven, PI-negativen Zellen aus Triplikaten mit Standardabweichung.

Ergebnisse

Die Proliferation der Zellen wurde anhand der Umsetzung von MTT ein, zwei und drei Tage nach Aussäen der Zelllinien in 96-Loch-Platten beurteilt. Auch die Proliferation zeigte in keiner der getesteten Tumorzelllinien mit Knockdown von TNIK (sh5 TNIK) einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollzellen (sh144 CTRL) (Abb. 44). Im Anhang Abbildung 1 sind die Proliferationsdaten aller getesteten Tumorzelllinien zu sehen, während Abbildung 44 beispielhaft die Ergebnisse der getesteten Brustkrebszelllinien zusammenfasst. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass TNIK die Viabilität der Zellen nicht beeinflusst.

Insgesamt zeigen diese Versuche, dass die Keimzentrumskinasen TNIK in den getesteten Tumorzelllinien keinen Einfluss auf die Induktion der Apoptose und die Proliferation der Zellen hat.

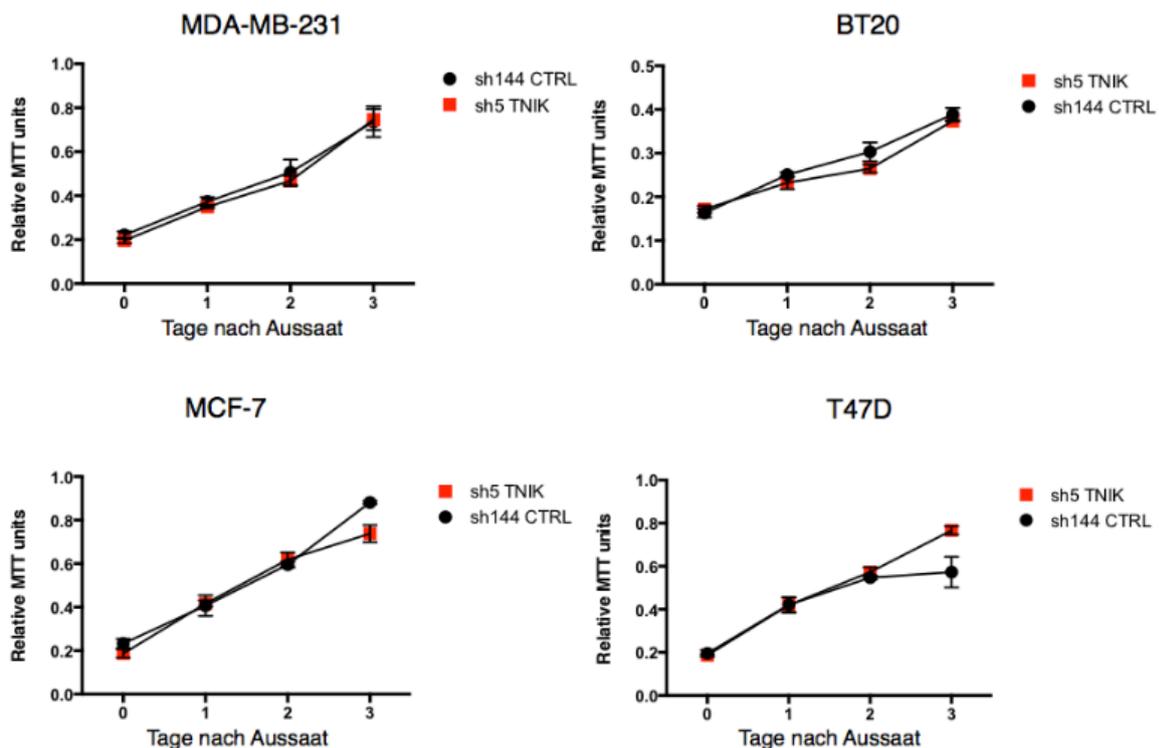


Abb. 44: Der Knockdown von TNIK führt nicht zur Beeinträchtigung der Proliferation und der Viabilität der angegebenen Brustkrebszelllinien. Die verschiedenen Tumorzelllinien mit Knockdown von TNIK (sh5 TNIK) und die jeweilige Kontrollzelllinie (sh144 Ctrl) wurden in 96-Loch-Platten kultiviert und nach 0, 1, 2 und 3 Tagen der Umsatz an MTT als Maß für die Viabilität der Zellen gemessen. Dargestellt sind pro Zeitpunkt Triplikate zusammengefasst aus einem Experiment mit Standardabweichung.

4.3.4 Der Einfluss von TNIK auf das Soft-Agar-Wachstum und die Wundheilungskapazität

Das Soft-Agar-Wachstum beschreibt die Fähigkeit von transformierten Zellen unabhängig von einer festen Oberfläche zu wachsen. Dabei stellt es ein Kennzeichen der Karzinogenese dar (Borowicz et al, 2014).

In dieser Arbeit sollten alle ausgewählten Tumorzelllinien nach Knockdown von TNIK im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen auf die Fähigkeit der Koloniebildung im Soft-Agar-Experiment getestet werden. Dieses Experiment ermöglicht es somit, vom Wachstumsverhalten im Soft-Agar auf die Notwendigkeit von TNIK in der Transformation von Zellen zu schließen.

Dazu wurden die TNIK-Knockdown-Zellen oder die Kontrollzellen in Soft-Agar ausgebracht und die Koloniebildung nach 14 bis 21 Tagen im Durchlichtmikroskop untersucht. Dabei zeigte sich, dass einige Zelllinien, wie die triple-negativen Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und BT20, aber auch T47D und die Pankreaskarzinom Zelllinie AsPC-1, eine signifikante Reduktion der Koloniezahl nach Knockdown von TNIK im Soft-Agar-Experiment aufweisen (Abb. 54A und Anhang Abb. 2). Auch die Karzinomzelllinien Colo679, Kyse270 und Du145 sind durch einen Knockdown von TNIK im Auswachsen im Soft-Agar beeinträchtigt (Anhang Abb. 2). Alle anderen getesteten Zelllinien zeigen jedoch keine Beeinträchtigung im Soft-Agar-Wachstum in Abwesenheit von TNIK. In Abbildung 45B sind beispielhaft mikroskopische Bilder der im Soft-Agar-Experiment ausgewachsenen Kolonien drei verschiedener Brustkrebszelllinien zu sehen. Dabei zeigt sich deutlich, dass die MDA-MB-231 Zellen nach Knockdown von TNIK (sh5 TNIK) eine starke Reduktion der Koloniezahl im Vergleich zu der Kontrollzelllinie (sh144 CTRL) aufweisen. Die T47D Zellen zeigen auch ein deutlich verschlechtertes Soft-Agar-Wachstum in Abwesenheit von TNIK, während die MCF7 Zellen keine signifikante Beeinträchtigung zeigen (Abb. 45B).

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass TNIK in etwa der Hälfte der getesteten Zelllinien an einem Auswachsen im Soft-Agar beteiligt ist und somit möglicherweise in der Tumorigenese der Zellen involviert sein könnte.

Ergebnisse

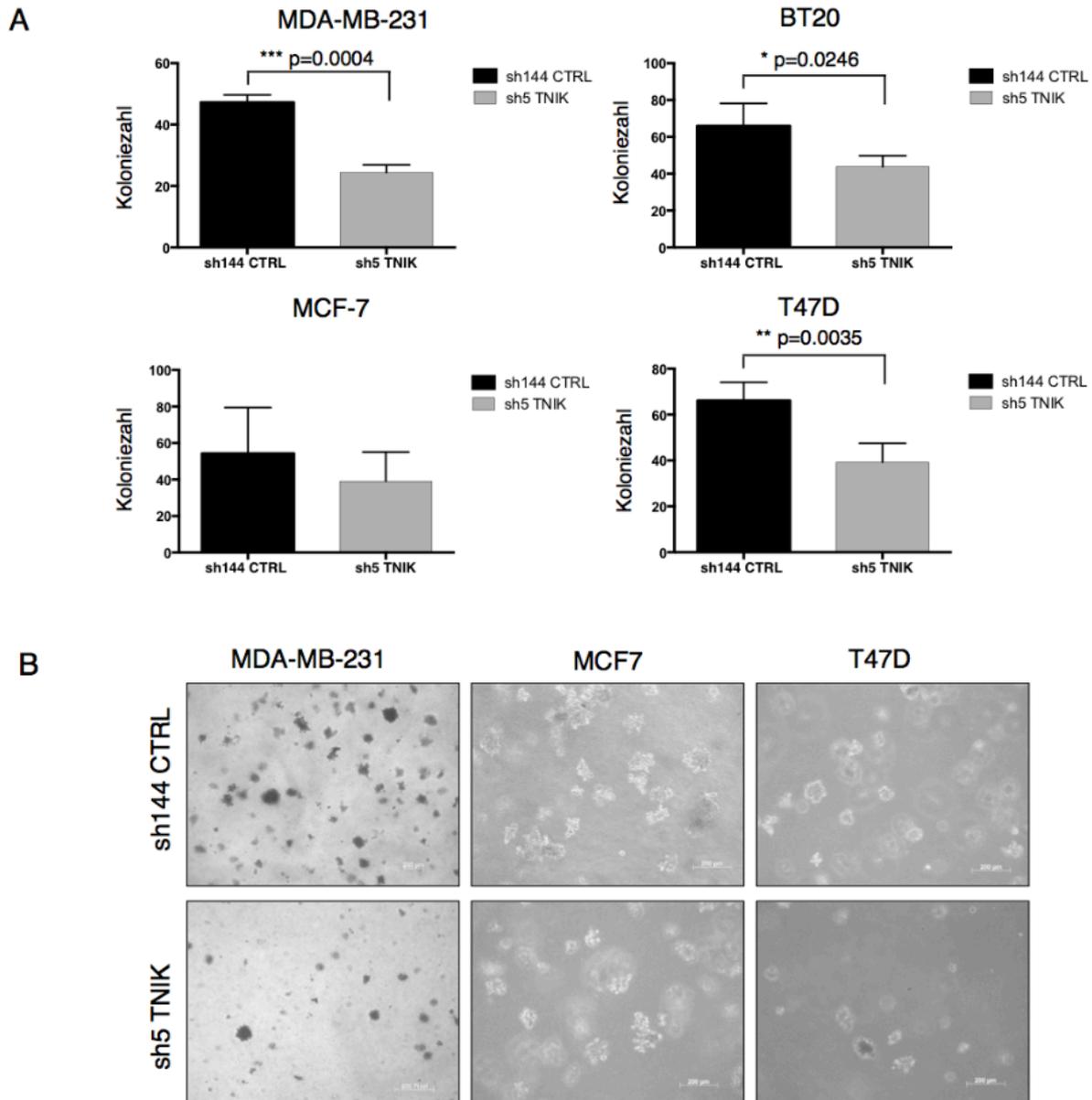


Abb. 45: Der Einfluss des Knockdowns von TNIK auf die Koloniebildung der verschiedenen Tumorzelllinien im Soft-Agar-Experiment. A) Dargestellt ist die Koloniezahl nach 14-21 Tagen Wachstum der verschiedenen Zelllinien mit TNIK-Knockdown (sh5 TNIK) oder der Kontrollzelllinie (sh144 CTRL) im Soft-Agar. Dargestellt sind jeweils fünf verschiedene, ausgezählte Gesichtsfelder pro Experiment mit Standardabweichung. Anzahl der ausgewerteten Experimente pro Graph: MCF7 n=3, MDA-MB-231 n=3, BT20 n=3, T47D n=4. Zweiseitiger, ungepaarter t-Test p-values: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. B) Repräsentative Durchlichtbilder der Koloniebildung im Soft-Agar von sh144 CTRL Zellen und sh5 TNIK Zellen der Brustkrebszelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und T47D.

Ein weiteres Kennzeichen der Karzinogenese ist die Migration der Tumorzellen, um eine Invasion in neues Gewebe zu gewährleisten. Um den Einfluss von TNIK auf das Migrationsverhalten der ausgewählten Tumorzelllinien zu untersuchen, wurden Wundheilungsexperimente durchgeführt. Dabei wurden die Zellen in

Zellkulturschalen ausgesät und nach dem Adhärenzieren der Zellen eine Wunde in den Zellrasen eingebracht. 16, 24 und 48 h nach Generierung der Wunde, wurde die Breite der entstandenen Fronten (Distanz) im Zellrasen mittels Durchlichtmikroskopie gemessen, um so die Fähigkeit der Wundheilung zu beurteilen.

Dabei fiel zunächst auf, dass einige der getesteten Zelllinien im Wundheilungsexperiment ein sehr geringes Migrationsverhalten aufwiesen. Dazu gehören z.B. BT20, T47D und AsPC-1 Zellen, da sich hier die gemessene Distanz der Wunde nach erfolgter Inkubation der Zellen für 16, 24 und 48 h in allen Versuchsansätzen kaum verändert (Abb. 46A und Anhang Abb. 3). Außerdem, zeigte der Großteil der Zellen nach Knockdown von TNIK keinen Effekt auf das Migrationsverhalten im Vergleich zur Kontrollzelllinie. Eine geringfügige Reduktion der Migration nach Knockdown von TNIK, gemessen an einer größeren Distanz der Wunde im Vergleich zu den Kontrollzellen, konnte nach 48 h in Kyse270, MCF7 und T47D Zellen beobachtet werden. Die stärkste Verminderung der Migration im Wundheilungsexperiment trat jedoch in den triple-negativen MDA-MB-231 Zellen nach einem Knockdown von TNIK auf (Abb. 46A). Die Wundheilungskapazität der vier getesteten Brustkrebszelllinien ist exemplarisch in mikroskopischen Bildern in Abbildung 46B veranschaulicht. Auch durch die mikroskopischen Bilder wird bestätigt, dass die MDA-MB-231 Zellen mit Knockdown von TNIK bereits nach 24 h Wachstum eine starke Reduktion in der Migrationsfähigkeit aufzeigen.

In Tabelle 12 sind die Ergebnisse des Soft-Agar-Wachstumsexperiments und des Wundheilungsexperiments aller getesteter Zelllinien zusammengefasst dargestellt. Für die Suspensionszelllinie HCC-33 konnte das Soft-Agar-Wachstum und die Wundheilungskapazität nicht bestimmt werden. Auffallend ist, dass insgesamt die ausgewählten Brustkrebszelllinien die stärkste Beeinflussung durch einen Knockdown von TNIK auf die getesteten Parameter zeigen, während alle anderen Tumorentitäten eher geringfügig bis gar nicht durch einen Knockdown von TNIK beeinflusst sind.

Ergebnisse

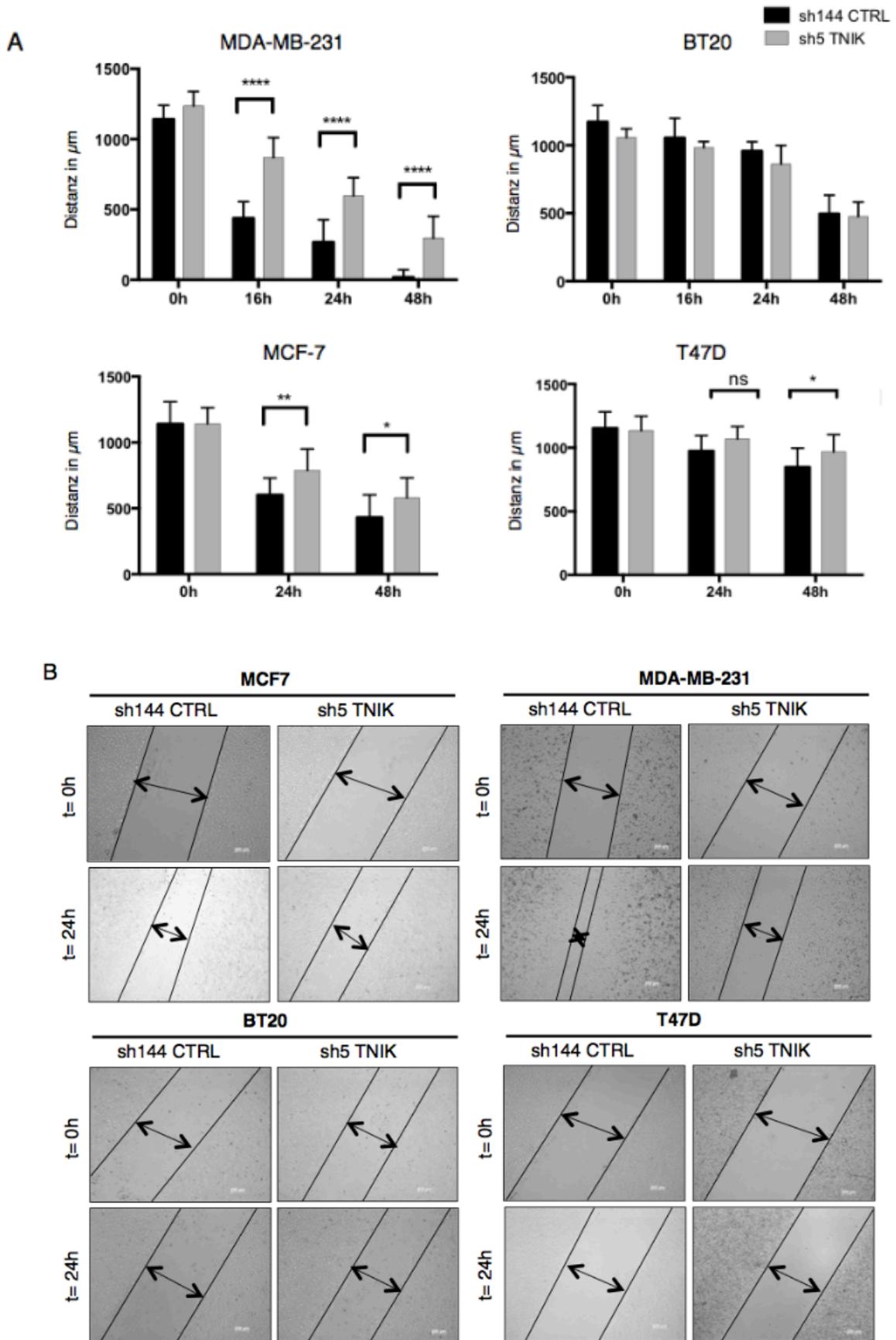


Abb. 46: Der Einfluss des Knockdowns von TNIK auf die Migrationsfähigkeit der getesteten Brustkrebszelllinien. A) Die Wundheilungskapazität der verschiedenen Zelllinien mit TNIK-Knockdown (sh5 TNIK, grau) oder der Kontrollzelllinien (sh144 CTRL,

Ergebnisse

schwarz) ist als Distanz der Wunde in μm für die Zeitpunkte 0, 16, 24 und 48 h angegeben. Dargestellt sind jeweils fünf verschiedene, ausgewertete Gesichtsfelder pro Experiment mit Standardabweichung. Anzahl der ausgewerteten Experimente pro Graph: MCF-7 n=4, MDA-MB-231 n=4, BT20 n=1, T47D n=4. Two-way ANOVA, p-values: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. B) Repräsentative Durchlichtbilder der Wunde nach 0 h und 24 h von sh5 TNIK-Knockdown-Zellen und sh144 CTRL Kontrollzellen der Brustkrebszelllinien MCF7, MDA-MB-231, BT20 und T47D.

Tab. 12: Zusammenfassung des Wachstumsverhaltens in Soft-Agar und der Wundheilungskapazität der Kontrollzellen im Vergleich zu den Zellen mit Knockdown von TNIK. n.d. nicht gemessen, 0 kein Unterschied zwischen Kontrollzellen und TNIK-Knockdown-Zellen, - TNIK-Knockdown-Zellen zeigen im Vergleich zu Kontrollzellen ein/e verringerte/s Wachstum/Wundheilungskapazität.

Zelllinie	Soft-Agar-Wachstum	Wundheilungskapazität
MCF7	-/0	-
MDA-MB-231	- - -	- - -
T47D	- -	-/0, schlechte Migration
BT20	- - -	schlechte Migration
HCC-33	n.d.	n.d.
LOU-NH91	0	0
AsPC-1	-	0
Capan-1	0	0
Panc0813	0	0
Colo 679	- -	0
Kyse270	-	-
Du145	- -	0

Die Brustkrebszelllinien lassen sich aufgrund ihrer Oberflächenmarker in bestimmte Gruppen einteilen. Dabei unterscheidet man die Zelllinien nach ihrer Expression des Östrogenrezeptors (ER), Progesteronrezeptors (PR) und des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors HER2 (Subik et al, 2010). Nach dieser Klassifizierung zählen MDA-MB-231 und BT20 Zellen zu basalen, triple-negativen Brustkrebszellen (ER-, PR-, HER2-) während MCF7 und T47D Zellen zu luminalen, ER+, PR+/-, HER2- Brustkrebszellen gehören (Holliday & Speirs, 2011). In den durchgeführten Experimenten konnten dabei klare Unterschiede in der Abhängigkeit von TNIK der getesteten Parameter Wundheilungskapazität und Soft-Agar-Wachstum der beiden Klassen an Brustkrebszellen beobachtet werden. Es zeigte sich, dass die triple-negativen Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und BT20 die stärkste Abhängigkeit von TNIK im Migrationsverhalten und Soft-Agar-Wachstum haben (Tab. 12). Die luminalen Brustkrebszelllinien MCF7 und T47D zeigen hingegen nur einen geringeren Effekt nach Abwesenheit von TNIK in den durchgeführten

Ergebnisse

Experimenten. Dieser starke Effekt von TNIK auf die hoch invasiven, triple-negativen MDA-MB-231 Zellen im durchgeführten *Screening* wurde in den folgenden Abschnitten zum Anlass genommen, weitere Untersuchungen zur Rolle von TNIK in der Tumorigenese in diesen Zellen durchzuführen.

Um sicherzugehen, dass tatsächlich der Knockdown von TNIK für das verminderte Migrationsverhalten der MDA-MB-231 Zellen verantwortlich ist, wurden Rekonstitutionsexperimente durchgeführt. Dazu wurde in MDA-MB-231 sh5 TNIK-Knockdown-Zellen über eine Rekonstitution mit einem TNIK-Plasmid versucht den Effekt auf die Wundheilungskapazität wieder aufzuheben. Die TNIK-Knockdown-Zellen und die Kontrollzellen der MDA-MB-231 Zelllinie wurden deshalb mit einem HA-TNIK-Plasmid oder als Negativkontrolle mit einem pRK5-Leervektor transient transfiziert. Die Zellen wurden anschließend in Wundheilungsexperimenten auf ihre Migrationsfähigkeit getestet.

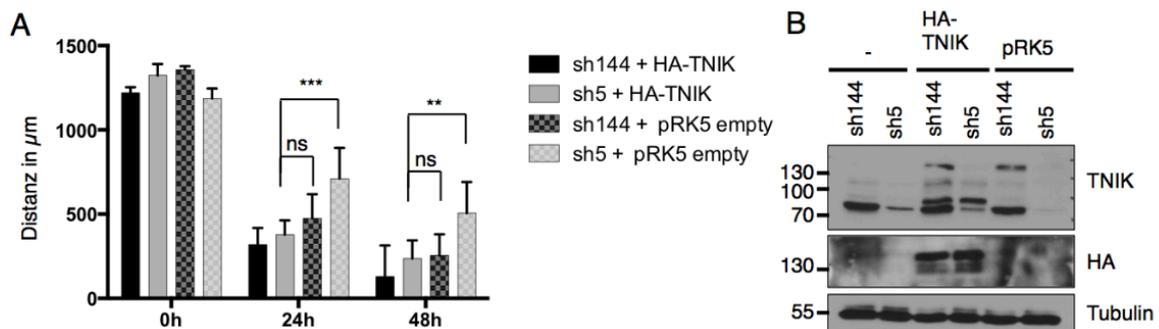


Abb. 47: Die Rekonstitution von HA-TNIK in den MDA-MB-231 sh5 TNIK-Knockdown-Zellen führt zur Aufhebung des Migrationsdefektes im Wundheilungsexperiment. A) MDA-MB-231 sh144 CTRL und sh5 TNIK Zellen wurden in 6-Loch-Platten mit 4 μ g HA-TNIK oder pRK5-Leervektor mittels Turbofect transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte das Einbringen der Wunde in den Zellrasen. Anschließend wurde nach 0, 24 und 48 h die Distanz der Wunde mittels Durchlichtmikroskopie vermessen. Dargestellt sind die gemessenen Distanzen aus jeweils fünf verschiedenen Gesichtsfeldern mit Standardabweichung. Two-way ANOVA, p-values: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. B) Western Blot zur Überprüfung der Expression von TNIK nach Transfektion in den verschiedenen Ansätzen aus Abb. A.

Dabei zeigte sich, dass eine Rekonstitution von TNIK in den sh5 TNIK-Knockdown-Zellen (sh5 + HA-TNIK) zu einer signifikanten Reduktion der Distanz der Wunde nach 24 und 48 h im Vergleich zu Zellen mit Knockdown von TNIK (sh5 + pRK5 empty) führt (Abb. 47A). Dabei ist das Migrationsverhalten nach Rekonstitution von TNIK (sh5 + HA-TNIK), dem der MDA-MB-231 Kontrollzellen (sh144 + pRK5

empty), welche mit dem Leervektor pRK5 transfiziert wurden und endogene Expressionslevel von TNIK aufweisen, vergleichbar (Abb. 47A). Die Expression der transfizierten Konstrukte wurde mittels Western Blot Analyse unter Zuhilfenahme des HA-Antikörpers bestätigt (Abb. 47B). Dieses Experiment unterstützt die Hypothese, dass die Keimzentrumskinasen TNIK an der Migration der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 beteiligt ist, da nach Rekonstitution von TNIK in TNIK-Knockdown-Zellen der Migrationsdefekt wieder aufgehoben werden kann.

4.3.5 Der Einfluss des Knockouts von TNIK auf MDA-MB-231 Zellen

Um die bereits gewonnenen Erkenntnisse zur Rolle von TNIK in der Migration und dem Soft-Agar-Wachstum von MDA-MB-231 Zellen zu bestätigen, wurde in dieser Zelllinie ein vollständiger Knockout von TNIK mittels der CRISPR/Cas9-Technologie generiert (siehe Abschnitt 3.1.8.1). Die Herstellung der CRISPR/Cas9 TNIK-Knockout-Einzelzellklone wurde über Sequenzierung auf DNA-Ebene (Anhang Abb. 4) und über Western Blot auf Proteinebene bestätigt (Abb. 48A).

In der vorliegenden Arbeit wird weiterhin ein Einzelzellklon mit vollständigem Knockout von TNIK (MDA-MB-231 TNIK KO cl.5), sowie der MDA-MB-231 Einzelzellklon TNIK KO cl.1, welcher laut DNA-Sequenzierung keinen kompletten Knockout aufweist, in den Experimenten verwendet (siehe Anhang Abb. 4). Der TNIK KO cl.1 weist auf einem Allel eine Deletion mit Leserasterverschiebung und somit einen Knockout von TNIK auf. Allerdings befindet sich auf dem zweiten Allel eine Deletion von 24 Nukleotiden innerhalb der Kinasedomäne von TNIK, was zum Verlust von 8 Aminosäuren ohne Leserasterverschiebung führt. Allerdings konnte in allen durchgeführten Western Blots in diesem Klon bisher keine Expression von TNIK nachgewiesen werden. Deshalb wird davon ausgegangen, dass es sich, falls TNIK durch das zweite Allel in diesem Klon noch exprimiert werden kann, um ein nicht funktionelles Protein handelt. Entweder liegt dieses mutierte Gen nicht als Protein vor oder aber in so geringen Mengen, dass es unter dem Detektionslimit des verwendeten Antikörpers liegt und somit nicht nachgewiesen werden kann. Da in beiden verwendeten Klonen kein TNIK-Protein nachweisbar ist, wird im weiteren Verlauf der Arbeit von zwei MDA-MB-231 TNIK-Knockout Klonen (KO cl.1 und cl. 5) gesprochen, auch wenn auf DNA-Ebene nur der Klon 5 einen kompletten Knockout von TNIK besitzt.

Wie schon in den TNIK-Knockdown-Zellen, wurde ein *Screening* bestehend aus Experimenten zu Apoptose, Proliferation, Wundheilungskapazität und Soft-Agar-Wachstum in den Knockout-Zellen durchgeführt, um einen Einfluss von TNIK auf diese zellulären Prozesse zu untersuchen.

Dabei zeigte sich im AnnexinV-Apoptose-Experiment, dass die beiden TNIK-Knockout-Zellklone ähnliche Apoptoseraten wie Wildtyp-Zellen von 2% bis 4% aufweisen (Abb. 48B). Somit beeinflusst auch der Knockout von TNIK in MDA-MB-231 Zellen die Anzahl der apoptotischen Zellen nicht. Auch die Proliferation der Zellen zeigt im MTT-Experiment keinerlei Beeinflussung durch den Knockout von TNIK (Abb. 48C). Betrachtet man jedoch die Wundheilungskapazität der beiden TNIK-Knockout-Zellklone im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen fällt in den repräsentativen, mikroskopischen Bildern (Abb. 48E), sowie in den aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefassten vermessen Distanzen der Wunden (Abb. 48D), die stark verringerte Migrationsfähigkeit auf. Dieses Ergebnis bestätigt die Daten aus den Wundheilungsexperimenten der TNIK-Knockdown-Zellen. Ist TNIK in den MDA-MB-231 Zellen abwesend, ist die Migrationsfähigkeit beeinträchtigt.

Auch die Koloniezahl in den Soft-Agar-Experimenten ist in den beiden TNIK-Knockout-Zellklonen signifikant gegenüber den WT-Zellen reduziert, was aus drei unabhängigen, zusammengefassten Experimenten (Abb. 48F) und aus den repräsentativen mikroskopischen Bildern (Abb. 48G) hervorgeht.

Insgesamt konnte somit in den MDA-MB-231 TNIK-Knockout-Zellen bestätigt werden, dass die Migration der Zellen im Wundheilungsexperiment als auch das Auswachsen im Soft-Agar eine Abhängigkeit von TNIK zeigt.

Ergebnisse

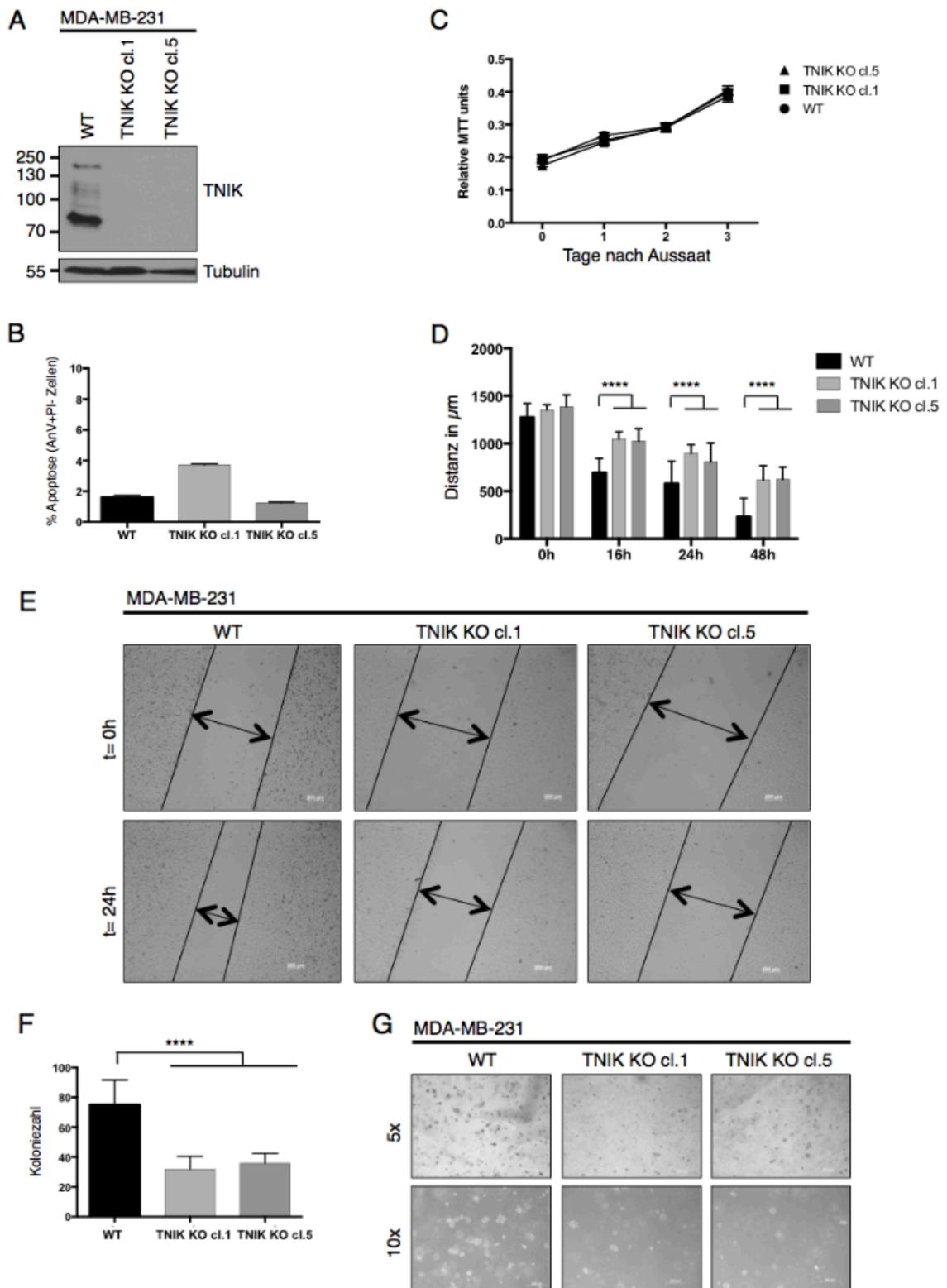


Abb. 48: Der durch CRISPR/Cas9 vermittelte Knockout von TNIK führt in MDA-MB-231 Zellen zu keiner Beeinträchtigung der Apoptoserate und der Proliferation der Zellen. Die Koloniebildung im Soft-Agar und die Wundheilungskapazität sind jedoch von TNIK abhängig. A) Nachweis des TNIK-Knockouts in zwei unabhängigen durch CRISPR/Cas9 generierten MDA-MB-231 TNIK-Knockout-Klonen (cl.1 und cl.5) im Vergleich zu WT-Zellen. B) MDA-MB-231 WT, MDA-MB-231 TNIK KO cl.1 und MDA-MB-231 TNIK KO cl.5 Zellen wurden mit Propidiumiodid (PI) und AnnexinV-Cy5 (AnV) gefärbt

und mittels Durchflusszytometrie die Apoptoserate bestimmt. Dargestellt sind zusammengefasst aus Triplikaten der Prozentsatz an AnnexinV-positiven, PI-negativen Zellen mit Standardabweichung. C) MDA-MB-231 WT, MDA-MB-231 TNIK KO cl.1 und MDA-MB-231 TNIK KO cl.5 Zellen wurden in 96-Loch-Platten kultiviert und nach 0, 1, 2 und 3 Tagen der Umsatz an MTT als Maß für die Viabilität der Zellen gemessen. Dargestellt sind pro Zeitpunkt Triplikate zusammengefasst aus einem Experiment mit Standardabweichungen. D) MDA-MB-231 WT, MDA-MB-231 TNIK KO cl.1 und MDA-MB-231 TNIK KO cl.5 Zellen wurden in 6-Well Platten kultiviert und die Wundheilungskapazität nach 0, 16, 24 und 48 h mittels Durchlichtmikroskopie beurteilt. Dargestellt ist die Distanz der Wunde in μm zusammengefasst aus fünf verschiedenen Gesichtsfeldern pro Experiment aus drei verschiedenen Experimenten. Two-way ANOVA, p-values: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. E) Repräsentative Durchlichtbilder aus den Wundheilungsexperimenten aus Abb. D. F) Die Koloniezahl von MDA-MB-231 WT, MDA-MB-231 TNIK KO cl.1 und MDA-MB-231 TNIK KO cl.5 Zellen in Soft-Agar aus fünf verschiedenen Gesichtsfeldern in Durchlichtmikroskopie ist dargestellt. Dabei wurden drei unabhängige Experimente ausgewertet. Two-way ANOVA, p-values: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. G) Repräsentative Durchlichtbilder in 5x und 10x Vergrößerung aus den Soft-Agar-Koloniebildungsexperimenten aus Abb. F.

4.3.6 Die Wirkung des TNIK-Inhibitors KY-05009 auf MDA-MB-231 Zellen

Neben der Auswirkung des Knockdowns bzw. Knockouts von TNIK in Brustkrebszellen, wurden auch die Effekte einer Inhibition von TNIK in diesem System untersucht. Die Verwendung eines TNIK-Inhibitors ermöglicht es herauszufinden, ob die Kinaseaktivität von TNIK für die aufgetretenen Defekte in der Migrationsfähigkeit der Zellen essenziell ist. Dazu wurde der kommerziell erhältliche TNIK-Inhibitor KY-05009 verwendet, welcher schon in Zusammenhang mit verschiedenen Krebszellen beschrieben wurde. Es konnte in multiplen Myelomzellen gezeigt werden, dass KY-05009 die Zellproliferation, welche durch Interleukin-6 induziert wird, hemmt und Apoptose induziert (Lee et al, 2017). Außerdem wurde in Lungenkarzinomzellen eine starke inhibitorische Wirkung von KY-05009 auf die durch TGF β aktivierte Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) durch eine Abschwächung von Smad- und nicht-Smad-Signalwegen in der Zelle beschrieben (Kim et al, 2014). Da der TNIK-Inhibitor KY-05009 die Kinaseaktivität der Keimzentrumskinase TNIK blockiert, kann durch Verwendung des Inhibitors untersucht werden, ob das Migrationsverhalten der Brustkrebszellen speziell von der Kinaseaktivität von TNIK abhängig ist.

In Abschnitt 4.3.5 konnte bereits gezeigt werden, dass der MDA-MB-231 TNIK KO cl.1, mit einer acht Aminosäuren umfassenden Deletionsmutation in der Kinasedomäne, gleiche Effekte auf das Migrationsverhalten und die Invasivität wie

der vollständige TNIK-KO Klon 5 aufweist. Da der TNIK-Inhibitor KY-05009 eine Inhibition der Kinaseaktivität von TNIK hervorruft, wird vermutet, dass auch die Behandlung mit KY-05009 ähnliche Effekte auf die Zellmigration wie die beiden TNIK-KO-Klone zeigt.

Um die Effekte des TNIK-Inhibitors KY-05009 auf MDA-MB-231 Zellen zu untersuchen, wurden die Brustkrebszellen mit 10 μ M KY-05009 behandelt und anschließend die Morphologie der Zellen im Durchlichtmikroskop mit den Kontrollzellen, welche nur mit DMSO behandelt wurden, verglichen. Eine Inhibition von TNIK induzierte in den MDA-MB-231 Zellen eine Morphologieänderung des zunächst mesenchymalen Phänotyps (Zellen mit Behandlung durch DMSO) mit spindelförmigen, langgestreckten Zellen zu einem eher epithelialen Phänotyp mit kompakten Zellen und engen Zell-Zell-Kontakten (Abb. 49A). Diese Veränderung der Morphologie der Zellen könnte ein erster Hinweis auf eine Rolle von TNIK im Prozess der EMT und somit der Tumorigenese darstellen.

Außerdem wurde die Proliferation der Zellen anhand des MTT-Umsatzes nach 1, 2 und 3 Tagen beurteilt. Dabei konnten keine Unterschiede in der Proliferation der MDA-MB-231 Wildtyp-Zellen im Vergleich zu den Zellen mit Knockout von TNIK und den Zellen, die mit TNIK-Inhibitor behandelt wurden, festgestellt werden (Abb. 49B). Diese Daten zeigen, dass eine Inhibition von TNIK, wie auch die komplette Abwesenheit des TNIK-Proteins, für die Viabilität und Proliferation der MDA-MB-231 Zellen nicht essenziell ist.

Weiterhin sollte ein möglicher Effekt der Inhibition von TNIK auf die Wundheilungskapazität untersucht werden. Dazu wurde nach Aussäen und Adhärenzen von MDA-MB-231 Zellen eine Wunde in den Zellrasen eingebracht. Ein Teil der Zellen wurde als Negativkontrolle mit DMSO behandelt, während die anderen Ansätze mit 10 μ M KY-05009 inkubiert wurden. Nach 16, 24 und 48 h wurde anschließend die Wundheilungskapazität der Ansätze anhand der Distanz der verbleibenden Wunde im Durchlichtmikroskop bestimmt. Dabei wurde deutlich, dass eine Inhibition von TNIK zu einer starken Reduktion der Migration und Wundheilungskapazität in den MDA-MB-231 Zellen führt (Abb. 49C). Repräsentativ sind in Abbildung 49D mikroskopische Bilder der Wunde der mit DMSO behandelten Kontrollzellen (WT) und mit TNIK-Inhibitor behandelten Zellen nach 0 und 24 h dargestellt. Dabei zeigt sich, dass eine Inhibition von TNIK zu nahezu keiner

Ergebnisse

Wundheilung nach 24 h geführt hat, während in den mit DMSO behandelten Zellen ein großer Teil der Wunde bereits verschlossen ist (Abb. 49D).

Insgesamt zeigen diese Daten, dass eine Inhibition von TNIK ausreicht, um die Migrationsfähigkeit der MDA-MB-231 Zellen signifikant zu reduzieren. Dies lässt darauf schließen, dass vor allem die Kinaseaktivität, welche durch den verwendeten Inhibitor blockiert wird, für die Migration der Brustkrebszelllinie notwendig ist. Diese Verschlechterung der Wundheilungskapazität läuft dabei komplett unabhängig von der Proliferation der Zellen ab. Die durchgeführten Experimente mit dem TNIK-Inhibitor KY-05009 können somit die aufgestellte Hypothese aus den vorherigen Versuchen, dass eine Deletionsmutation in der Kinasedomäne von TNIK ausreicht, um einen Defekt in der Migration der Zellen hervorzurufen, bestätigen.

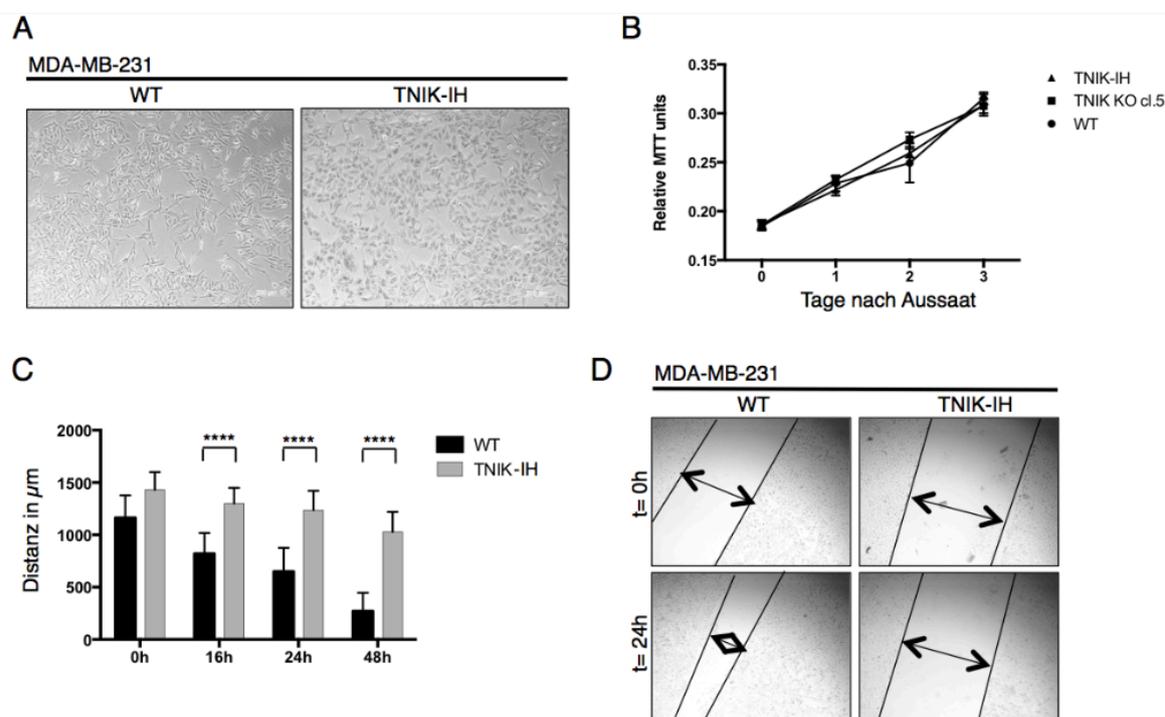


Abb. 49: Die Behandlung von MDA-MB-231 mit dem TNIK-Inhibitor KY-05009 ruft eine Morphologieänderung der Zellen hervor und reduziert die Wundheilungskapazität. A) Durchlichtbilder der MDA-MB-231 Zellen behandelt mit $10 \mu\text{M}$ KY-05009 (TNIK-IH) oder der gleichen Menge an DMSO (WT). B) MDA-MB-231 WT, MDA-MB-231 TNIK KO cl.5 und MDA-MB-231 Zellen, welche mit $10 \mu\text{M}$ KY-05009 (TNIK-IH) behandelt wurden, wurden in 96-Loch-Platten kultiviert und nach 0, 1, 2 und 3 Tagen der Umsatz an MTT als Maß für die Viabilität der Zellen gemessen. Dargestellt sind pro Zeitpunkt Triplikate zusammengefasst aus einem Experiment mit Standardabweichungen. C) Dargestellt ist die Wundheilungskapazität der MDA-MB-231 Zellen behandelt mit $10\text{-}\mu\text{M}$ KY-05009 (TNIK-IH) oder der gleichen Menge an DMSO (WT) 0, 16, 24 und 48 h nach Generierung der Wunde. Dargestellt ist die Distanz in μm aus fünf verschiedenen Gesichtsfeldern mit Standardabweichung. Two-way ANOVA, p-values: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. D) Repräsentative Durchlichtbilder aus den Wundheilungsexperimenten aus Abb. C.

4.3.7 Die Phosphorylierung von Smad2 nach TGF β -Stimulation wird in triple-negativen Brustkrebszellen von TNIK beeinflusst

Das Zytokin TGF β (*Transforming Growth Factor β*) ist ein wichtiges Signalmolekül, welches einerseits als Inhibitor in frühen Tumorstadien agieren kann, andererseits aber in späten Tumorstadien eine wichtige Rolle in Wundheilungsprozessen und der Zellmigration von Tumorzellen innehat (Zhao et al, 2018). In verschiedenen Studien wurde bereits gezeigt, dass eine TGF β -Stimulation in Brustkrebszellen zu einer Steigerung der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition, sowie der Zellmigration und Metastasierung führt (Ganapathy et al, 2010; Romagnoli et al, 2012).

Im Smad-abhängigen TGF β -Signalweg induziert das Molekül TGF β auf der Zelloberfläche befindliche Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren, welche wiederum intrazelluläre Smad-Proteine aktivieren und phosphorylieren können. Die Smad-Proteine akkumulieren anschließend im Nukleus und können dort die Genexpression regulieren (Weiss & Attisano, 2013). Neben der Smad-abhängigen, ist auch eine Smad-unabhängige TGF β -Signaltransduktion bekannt. Dieser Smad-unabhängige Weg beinhaltet verschiedene MAPK-Wege, Rho-like GTPase-Signalwege und den PI3K/Akt-Signalweg (Zhang, 2009). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird nur der Smad-abhängige TGF β -Signalweg eine Rolle spielen, da vor allem dieser Weg häufig im Zusammenhang mit der Migration und Invasivität von Brustkrebszellen beschrieben wurde. Beispielweise wurde eine Rolle von Smad2 und Smad3 in der Knochenmetastasierung von Brusttumoren postuliert, wodurch die Tumorangio-genese beeinflusst wird. Außerdem wurde gezeigt, dass die Inaktivierung von Smad2 zu einer Verminderung der Migration und Invasivität von Brustkrebszellen führt (Lu et al, 2017; Petersen et al, 2010).

Um zu klären, ob TNIK im Smad-abhängigen TGF β -Signalweg beteiligt ist, wurden verschiedene Brustkrebszelllinien mit und ohne Knockdown von TNIK mit TGF β stimuliert und die Aktivierung von Smad2 durch die Phosphorylierung des Proteins im Western Blot beurteilt. Die triple-negativen Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und BT20 zeigten nach einer TGF β -Stimulation in der Aktivierung von Smad2 eine deutliche Abhängigkeit von TNIK. Sobald ein stabiler sh5 TNIK-Knockdown in diesen Zellen vorliegt, ist die durch TGF β induzierte Phosphorylierung von Smad2 im Vergleich zu Wildtyp-Zellen oder den Kontrollzellen sh144 Ctrl stark reduziert

Ergebnisse

(Abb. 50A und C). Die Brustkrebszelllinie MCF-7, in welcher auch schon im initialen *Screening* (Abschnitt 4.3.4) ein Knockdown von TNIK keine Beeinflussung der Migration und des Soft-Agar-Wachstums zeigte, weist auch nach TGF β -Stimulation keine Reduktion der Phosphorylierung von Smad2 in Abwesenheit von TNIK auf (Abb. 50B).

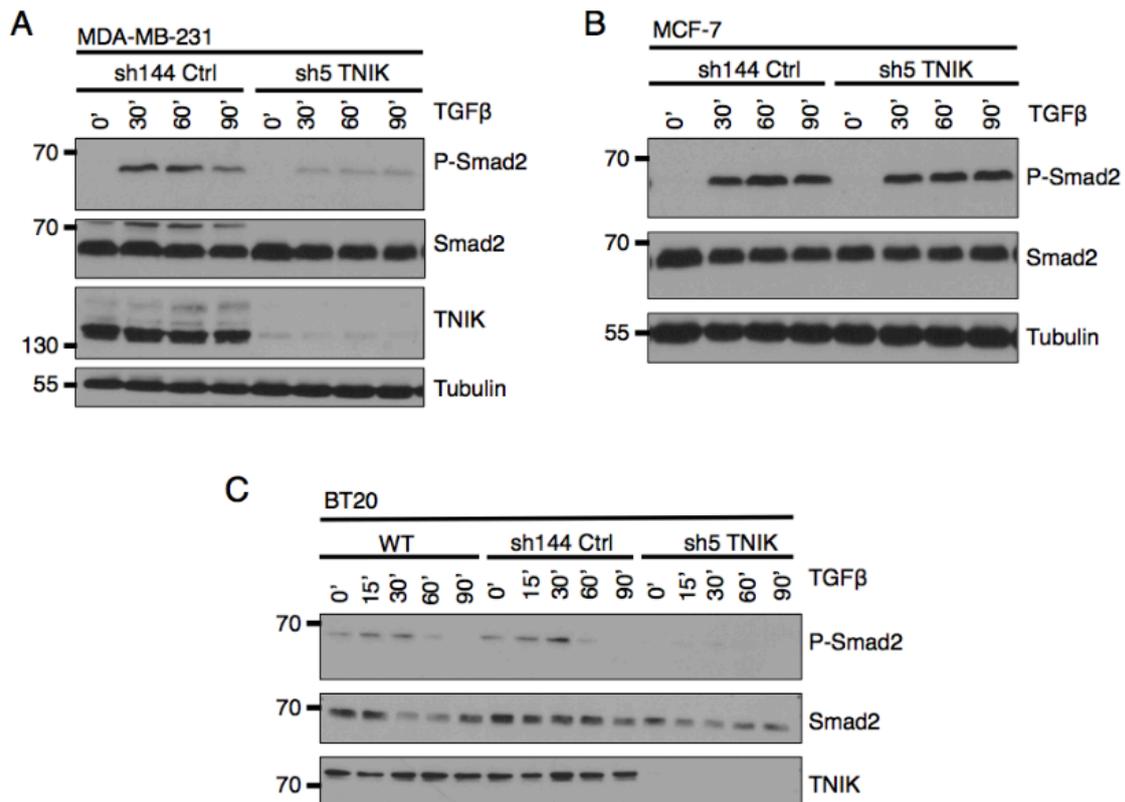


Abb. 50: Der Knockdown von TNIK reduziert die durch TGF β induzierte Phosphorylierung von Smad2 in den triple-negativen Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und BT20. A) MDA-MB-231 sh144 Ctrl und MDA-MB-231 sh5 TNIK Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 5 ng/ml TGF β stimuliert. Die Lysate wurden in SDS-PA-Gelen aufgetrennt und die Smad2-Phosphorylierung mittels der angegebenen Antikörper in Immunoblots analysiert. B) MCF-7 sh144 Ctrl und MCF-7 sh5 TNIK Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 5 ng/ml TGF β stimuliert. Die Lysate wurden in SDS-PA-Gelen aufgetrennt und die Smad2-Phosphorylierung mittels der angegebenen Antikörper in Immunoblots analysiert. C) BT20 WT, BT20 sh144 Ctrl und BT20 sh5 TNIK Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 5 ng/ml TGF β stimuliert. Die Lysate wurden in SDS-PA-Gelen aufgetrennt und die Smad2-Phosphorylierung mittels der angegebenen Antikörper in Immunoblots analysiert.

Die in den TNIK-Knockdown-Zellen beobachtete Abhängigkeit der Phosphorylierung von Smad2 von TNIK, wurde außerdem in Zellen mit einem Knockout von TNIK bestätigt. Auch in zwei unabhängigen TNIK-Knockout-Einzelzellklonen zeigte sich nach TGF β -Stimulation eine deutlich reduzierte

Ergebnisse

Phosphorylierung von Smad2 in Abwesenheit von TNIK im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (Abb. 51A). Außerdem wurde gezeigt, dass eine Inhibition von TNIK durch den TNIK-Inhibitor KY-05009 in MDA-MB-231 Zellen ausreicht, um die Phosphorylierung von Smad2 zu senken. Dabei wurden die MDA-MB-231 Zellen für 3 oder 24 h mit 10 μ M KY-05009 behandelt und anschließend für die angegebenen Zeitpunkte mit TGF β stimuliert. Nach dreistündiger Inhibition von TNIK fand bereits eine leichte Reduktion der Phosphorylierung von Smad2 nach Stimulation der Zellen statt, während eine 24-stündige Inhibition von TNIK eine noch stärkere Senkung des P-Smad2-Levels hervorruft (Abb. 51 B).

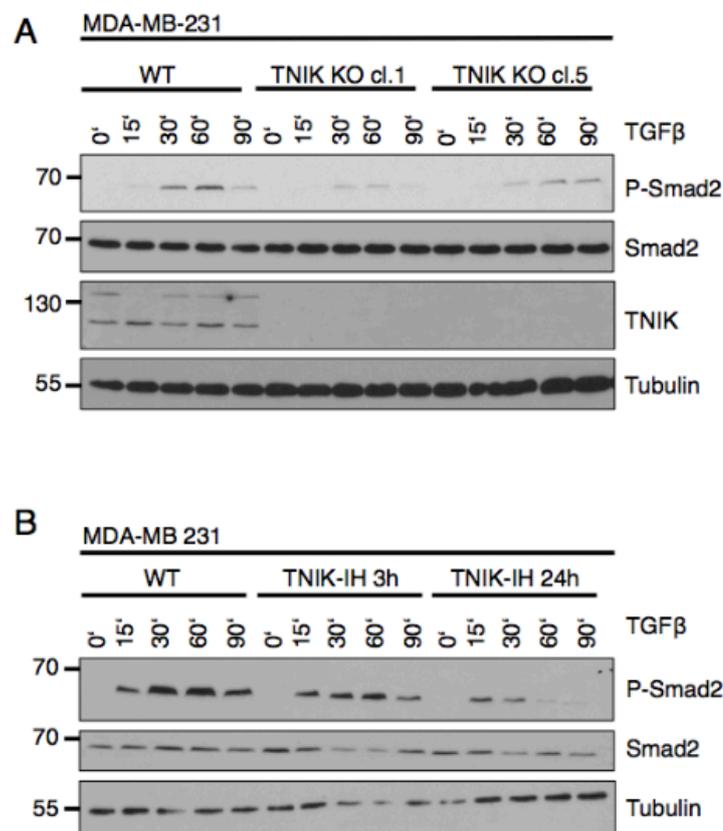


Abb. 51: Der Knockout von TNIK in MDA-MB231 Zellen sowie die Inhibition von TNIK durch KY-05009 senkt die Phosphorylierung von Smad2 nach TGF β -Stimulation. A) MDA-MB-231WT, MDA-MB-241 TNIK KO cl.1 und MDA-MB-231 TNIK KO cl.5 Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 5 ng/ml TGF β stimuliert. Die Lysate wurden in SDS-PA-Gelen aufgetrennt und die Smad2-Phosphorylierung mittels der angegebenen Antikörper in Immunoblots analysiert. B) MDA-MB-231 Zellen wurden für 3 oder 24 h mit 10 μ M Ky-05009 (TNIK-IH) vorinkubiert und anschließend für die angegebenen Zeitpunkte mit 5 ng/ml TGF β stimuliert. Die Lysate wurden in SDS-PA-Gelen aufgetrennt und die Smad2-Phosphorylierung mittels der angegebenen Antikörper in Immunoblots analysiert.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass in den aggressiven, hoch invasiven Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und BT20 die Phosphorylierung von Smad2 eine

Abhängigkeit von TNIK zeigt. In der weniger aggressiven MCF7 Zelllinie ist die Phosphorylierung von Smad2 jedoch nicht durch TNIK beeinflusst. Außerdem reicht eine Inhibition von TNIK aus, um die Aktivierung von Smad2 zu senken, was darauf hinweist, dass die Kinaseaktivität von TNIK an der Phosphorylierung von Smad2 beteiligt ist.

4.3.8 Die Genexpression in MDA-MB-231 Zellen nach Knockout von TNIK

In den vorherigen Abschnitten wurde bereits gezeigt, dass TNIK in der Migration, Invasivität und der durch TGF β induzierten Signalweiterleitung von Brustkarzinomzellen beteiligt ist. Um genauere Informationen darüber zu erhalten, in welchen weiteren Bereichen und Signalwegen TNIK in Tumorzellen eine Rolle spielt und worin sich Wildtyp-Zellen und Zellen mit Knockout von TNIK unterscheiden, wurden RNASeq-Analysen in den MDA-MB-231 Wildtyp- und den TNIK-Knockout-Zellen durchgeführt. Außerdem sollte der Versuchsansatz die bereits in dieser Arbeit beschriebene Rolle von TNIK in der Migration von Brustkrebszellen bestätigen. Im Anschluss an die RNASeq-Analyse wurden ausgewählte regulierte Gene über qRT-PCR-Experimente überprüft und bestätigt.

4.3.8.1 RNASeq-Analyse

Für die RNASeq-Analyse wurde die RNA aus drei biologischen Replikaten der MDA-MB-231 Wildtyp-Zellen und aus zwei unabhängigen MDA-MB-231 TNIK-Knockout-Klonen (cl.1 und cl.5) isoliert. Die RNA-Proben wurden anschließend von der Firma IMG M Laboratories in RNASeq-Analysen eingesetzt und mittels *Ingenuity Pathway* Analyse ausgewertet. Für die Auswertung der differentiell exprimierten Gene wurde die Software *CLC Genomics Workbench* 9.5.3 verwendet. Die Gene oder Transkripte, die als hochreguliert durch den Knockout von TNIK identifiziert wurden, besitzen einen FDR-korrigierten *p-Value* von $\leq 0,05$ und eine x-fache Veränderung in der Expression gegenüber Wildtyp-Zellen von ≥ 2 . Die Gene oder Transkripte, die als reprimiert durch den Knockout von TNIK identifiziert wurden, besitzen einen FDR-korrigierten *p-Value* von $\leq 0,05$ und eine x-fache Veränderung in der Expression gegenüber Wildtyp-Zellen von ≤ -2 . Im Anhang Abb. 5 sind die 157 Gene, die durch den Knockout von TNIK hochreguliert wurden, und die 200 am stärksten durch einen TNIK-Knockout herunterregulierten Gene in Heatmaps dargestellt. Insgesamt wurden in der RNASeq-Analyse mit Hilfe dieser oben

Ergebnisse

erwähnten stringenten Filter 157 hochregulierte und 458 reprimierte Gene durch einen Knockout von TNIK in MDA-MB-231 Zellen identifiziert.

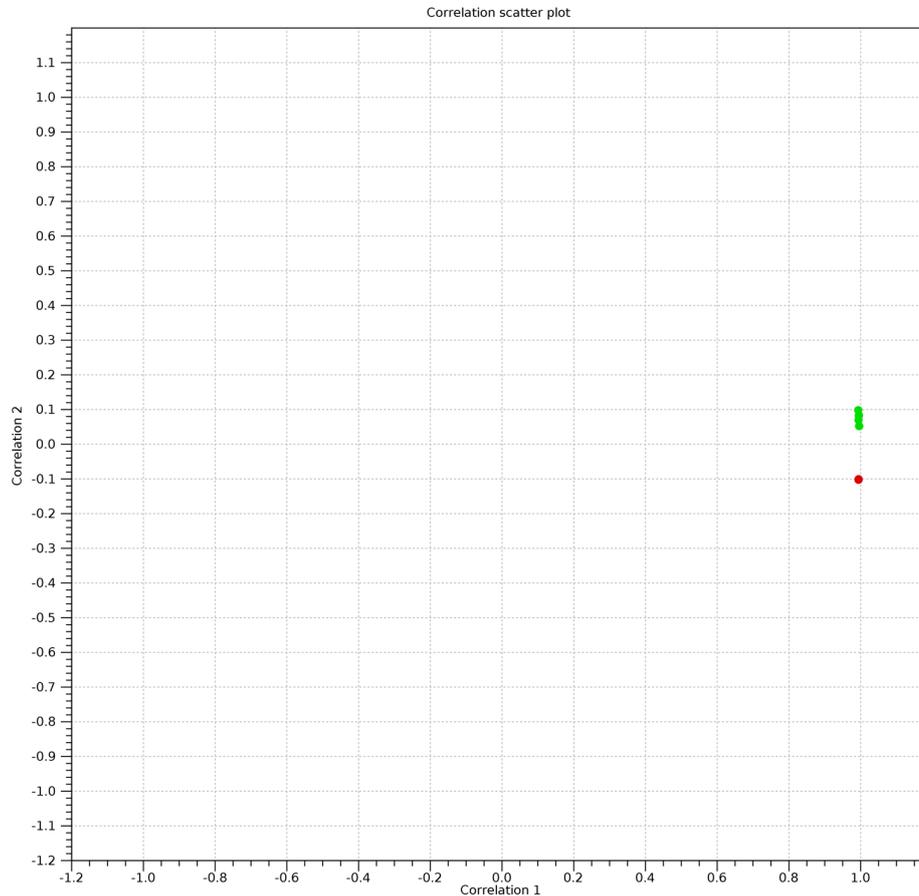


Abb. 52: PCA Blot der Rohdaten der Expressionswerte für WT-Zellen (rot) aufgetragen gegen TNIK-KO-Zellen (grün). Dargestellt ist die Korrelation der Expressionswerte von MDA-MB-231 WT-Zellen und den beiden getesteten TNIK-Knockout-Zellklonen. Abbildung von IMG M Laboratories.

Um Korrelationen zwischen den beiden zu testenden Gruppen, WT-Zellen und TNIK-KO-Zellen, festzustellen, wurden PCA (*Principle Component Analysis*)-Blots generiert. Diese PCA-Blots zeigen im Wesentlichen sehr hohe Korrelationen der Expressionswerte innerhalb der Gruppen des durchzuführenden Vergleichs. Zwischen den zwei zu testenden Gruppen WT und KO, ist die Korrelation wesentlich geringer. Wie in Abbildung 52 zu sehen ist, bilden die drei WT-Proben (rot) eine von den TNIK-KO-Proben (grün) abgegrenzte Gruppe im PCA-Blot. Dies weist darauf hin, dass der Knockout von TNIK zu einer Veränderung der Genexpression im Vergleich zu den WT-Proben in MDA-MB-231 Zellen führen muss.

In Tabelle 13 sind die am stärksten durch einen Knockout von TNIK betroffenen kanonischen Signalwege und die im jeweiligen Signalweg regulierten Gene

dargestellt. Dabei ist der am stärksten betroffene Weg „*Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation*“, gefolgt von „*Granulocyte Adhesion and Diapedesis*“ sowie „*Agranulocyte Adhesion and Diapedesis*“ und „*TREM1 Signaling*“. Alle diese betroffenen Signalwege weisen dabei hohe Signifikanzen auf, wie aus den *p-Values* aus Tabelle 13 entnommen werden kann. Die aus den vorhergehenden Experimenten formulierte Hypothese, dass TNIK in MDA-MB-231 Zellen in der Migration und Metastasierung beteiligt ist, wird von dieser Analyse weiter unterstützt. Vor allem, dass zwei der am stärksten regulierten Signalwege zum Mechanismus der Diapedese gehören, bestätigt unsere Hypothese. Diapedese stellt einen wichtigen Teil im Prozess der Metastasierung von Tumoren dar, in welchem Tumorzellen an das Endothel andocken und hindurch wandern, um in den Blutkreislauf zu gelangen (Woodward, 2008). Dabei leiten spezifische Adhäsionsmoleküle, die durch den Tumor und die Endothelzellen gebildet werden, den Prozess der Diapedese (Woodward, 2008).

Von den regulierten Genen aus diesen Signalwegen in Tabelle 13 wurden diejenigen rot markiert, welche aufgrund ihrer bereits beschriebenen Funktion in Tumoren für weitere Analysen ausgewählt wurden. Die gesamte Liste der ausgewählten Gene aus der RNASeq-Analyse und ihrer bereits in Bezug auf Krebs, Metastasierung und Migration beschriebene Funktion, ist in Tabelle 14 zu finden.

Außerdem sind in Abbildung 53 die am meisten regulierten Treffer der *Ingenuity pathway* Analyse für die Kategorie „*diseases and function*“ dargestellt. Auch hier wird die Hypothese unterstützt, dass TNIK an der Migration und Metastasierung von Tumorzellen beteiligt ist. Die Treffer der Analyse mit der höchsten Signifikanz sind dabei unter anderen zelluläre Bewegung (*cellular movement*), Krebs (*cancer*), zelluläres Wachstum und Proliferation (*cellular growth and proliferation*) und Zell-Zell-Signalwege und Interaktionen (*cell-to-cell signaling and interactions*). Alle diese hoch signifikanten Ergebnisse können in Zusammenhang mit Karzinogenese gesehen werden. Für die Kategorien "molekulare Mechanismen von Krebs" („*molecular mechanisms of cancer*“) und "TGF β -Signalweg" („*TGF β Signaling*“) sind in Abb. 54 beispielhaft Heatmaps der durch TNIK regulierten Gene zu finden. Die Heatmaps zeigen deutlich, dass sich die dargestellten Gene in allen Ansätzen der TNIK-KOs signifikant von den WT-Ansätzen unterscheiden. Auch, dass das TGF β -*Signaling* durch einen Knockout von TNIK signifikant reguliert ist, unterstützt

Ergebnisse

unsere aufgestellte Hypothese. Wie in Abschnitt 4.3.7 beschrieben, konnten wir bereits zeigen, dass die vollständige Aktivierung von Smad2 durch TGFβ von TNIK abhängig ist.

Tab. 13: Kanonische Signalwege, die am stärksten durch den Knockout von TNIK in der triple-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 beeinflusst werden. Ergebnisse aus der RNASeq-Analyse durch *Ingenuity Pathway Analysis* Software vorhergesagt. Dabei wurden die Proben WT gegen TNIK KO cl.1 und TNIK KO cl. 5 verglichen. X-fache Veränderung (*fold change*) ≥ 2 . In rot markiert sind ausgewählte Gene, die in Abb.57 in qPCR-Analysen bestätigt wurden.

Ingenuity kanonische Signalwege	-log (p-value)	Ratio	Gene
<i>Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation</i>	1,31E01	1,8E-01	IGFBP4,COL8A2,IL1A, ICAM1 ,COL4A6,COL8A1, CCL5,IL6,PGF,VEGFA, COL6A1,EDN1,CCL2, TIMP1,NGFR,SERPINE1, IL1RAP,TNFRSF11B,FLT1, MYH13,COL12A1,IL6R, FGFR2,MMP2 ,GFBP5, FGF1,COL6A3,CD40, CSF1,TGFA,IL1B,PDGFD, COL7A1
<i>Granulocyte Adhesion and Diapedesis</i>	1,12E01	1,69E-01	IL1A, ICAM1 ,MMP14, CCL24 ,CCL20,CCL5, CCL4L1/CCL4L2,CXCL10, ICAM2 ,CCL2,CCL3L1, CCL3L3 ,NGFR,MMP11, IL1RAP,TNFRSF11B, ITGA2 ,FPR2,ITGA5, MMP2 , FPR1,CXCL16,IL18, MMP23B,CLDN1,PECAM1, IL1B,CLDN2,CCL26, CX3CL1
<i>Agranulocyte Adhesion and Diapedesis</i>	7,84E00	1,38E-01	IL1A, ICAM1 ,MYH13, MMP14, ITGA2 ,ITGA5, CCL20, CCL24 , MMP2 ,CCL5, ,CCL4L1/CCL4L2,CXCL10, CXCL16,IL18,MMP23B, ICAM2 ,CCL3L1,CCL2, CLDN1, CCL3L3 ,IL1B, PECAM1,CLDN2,MMP11, CCL26, CX3CL1
<i>TREM1 Signaling</i>	6,11E00	1,87E-01	ICAM1 ,NLRP3,NLRP10, CIITA,ITGA5,IL6,IL18, CCL2,CD40,NLRC3,IL1B, CSF2,NLRP2,NLRC4

Ergebnisse

Tab. 14: Ausgewählte Gene aus der RNASeq-Analyse, die über qPCR-Experimente bestätigt wurden. Die x-fache Regulation der Gene nach TNIK-Knockout ist angegeben, sowie beispielhaft beschriebene Funktionen der jeweiligen Gene und dazugehörigen Proteine in der Tumorigenese.

Gen aus RNASeq-Analyse	Regulation durch TNIK-Knockout (WT vs. KO)	Beispiele für beschriebene Funktionen in der Tumorigenese
ICAM1	-2,2	- signifikant niedrigere Serumlevel an ICAM1 in Patienten mit frühen Brustkrebsstadien (Kostler et al, 2001) - ICAM1 ist an der Invasion metastasierender, humaner Brustkrebszelllinien beteiligt (Rosette et al, 2005)
ICAM2	-37,3	- siRNA-vermittelte Herunterregulation von ICAM2 erhöht Radiosensitivität von OSCC (<i>oral squamous cell carcinoma</i>) Zellen (Ishigami et al, 2008)
MMP2	-8,7	- Blockierung der Sekretion und der Aktivierung von MMP2 in Brustkrebszellen könnte die Metastasierung senken (Jezierska & Motyl, 2009) - das Level an aktiven MMP2 ist erhöht in malignen Brustgewebe (Shah et al, 2009)
ITGA2	-2,7	- epigenetisches Ruhigstellen von ITGA2 durch miR-373 stimuliert Migration von Brustkrebszellen (Ding et al, 2015) - funktionaler Polymorphismus im ITGA2 Gen beeinflusst die Entwicklung und Progression von Brustkrebs (Langsenlehner et al, 2006)
CCL3L3	-17,5	- eines der am stärksten herunterregulierten Gene in Patienten, die auf Therapie bei kutanen T-Zell-Lymphomen reagieren (Ying et al, 2015)
CX3CL1	-7,2	- CX3CL1-Expression ist mit schlechter Prognose von Brustkrebspatienten assoziiert (Tsang et al, 2013) - CX3CL1 fördert Brustkrebs über die Transaktivierung des EGF-Signalweges (Tardaguila et al, 2013)
CCL24	-7,6	- Expression von CCL24 in glandulären Zellen sinkt während des Fortschreitens des Tumors bei kolorektalen, neoplastischen Läsionen (Cho et al, 2016)
NDP	-251	- am stärksten reguliertes Gen in der in dieser Arbeit durchgeführten RNASeq-Analyse
DACT2	-47,8	- Methylierung von DACT2 fördert die Entwicklung von Brustkrebs durch <i>Wnt</i> -Aktivierung (Li et al, 2017) - DACT2 wirkt als Tumorsuppressor in Brustkrebszellen (Xiang et al, 2016)
KLF8	-34	- KLF8 ist für die Proliferation und Migration in Blasentumoren notwendig (Liang et al, 2015)

Ergebnisse

		<ul style="list-style-type: none"> - KLF8 fördert die Tumorigenese, Invasion und Metastasierung von kolorektale Tumoren (Yan et al, 2015) - KLF8 fördert die Invasion und Metastasierung von humanen Brustkrebszellen (Wang et al, 2011)
RNF43	-36,6	- RNF43 ist häufig in kolorektal und endometrial Tumoren mutiert (Giannakis et al, 2014)
SERPINA5	-17,6	- SERPINA5 inhibiert die Tumorzellmigration in hepatozellulären Karzinomen (Jing et al, 2014)
FGFR2	-11,7	<ul style="list-style-type: none"> - FGFR2-Lokus ist Risikolokus in Brustkrebs (Campbell et al, 2016) - der FGFR2-Signalweg spielt wichtige Rolle bei Risiko für Brustkrebs (Fletcher et al, 2013)
HUNK1	-24,9	-HUNK1/BRD4 reguliert die Ausbreitung von triple-negativen Brustkrebs(Andrieu et al, 2016)

Ergebnisse

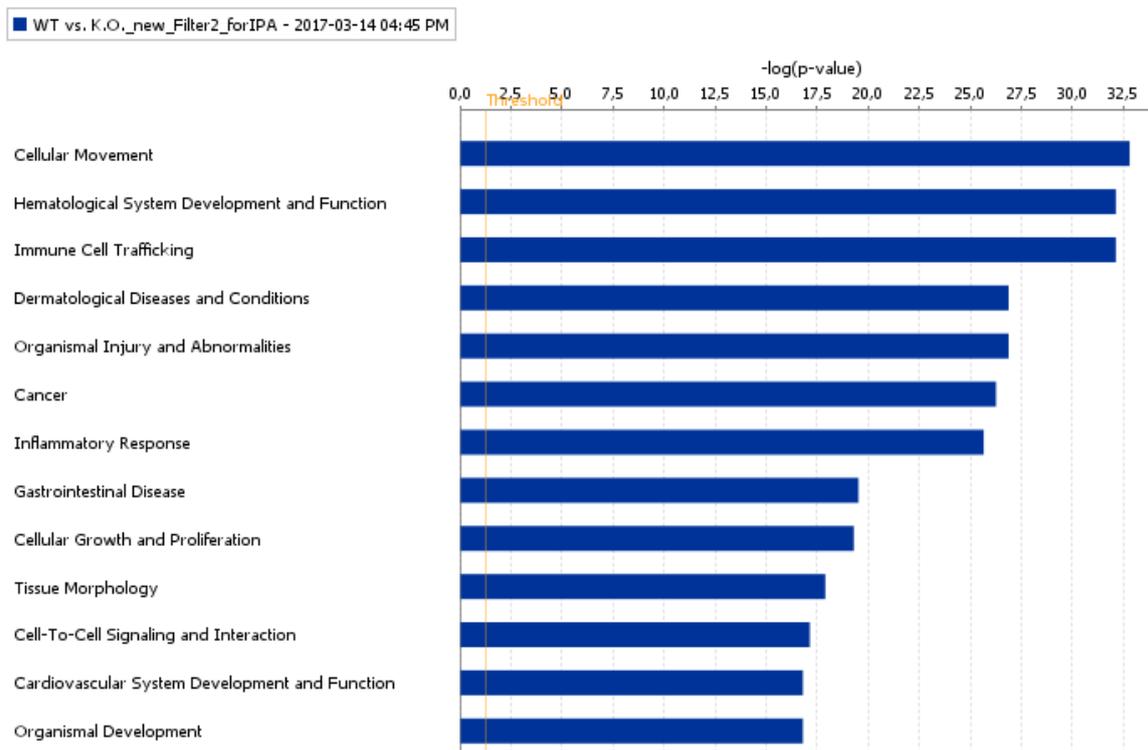


Abb. 53 : Die am stärksten signifikanten IPA-Ergebnisse für die Kategorie “Krankheit und Funktion” der RNASeq-Analyse der MDA-MB-231 WT-Zellen im Vergleich zu den MDA-MB-231 TNIK KO cl.1 und cl.5 Zellen. Dargestellt sind die $-\log(p\text{-value})$ Werte von WT gegen Knockout mit einem verwendeten Filter von 2. Abbildung von IMGM Laboratories.

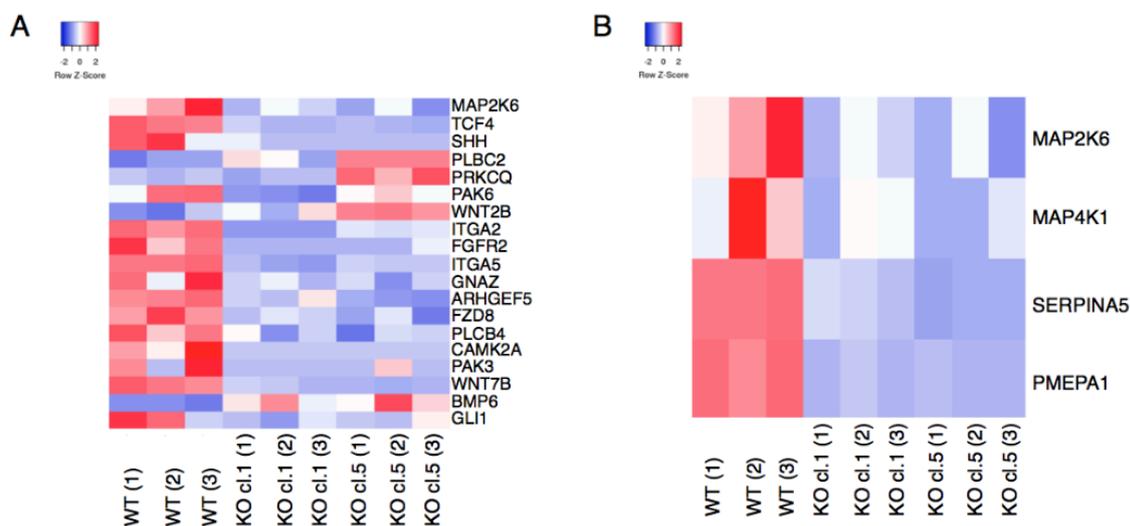


Abb. 54: Heatmaps zu den Ergebnissen der IPA-Analyse in der Kategorie „Krankheit und Funktion“. A) Die in den TNIK-KOs im Vergleich zu WT am stärksten regulierten Gene in der Kategorie „*molecular mechanisms of cancer*“ sind jeweils als biologische Triplikate der einzelnen Versuchsansätze dargestellt. Blau: niedrige Expression, Rot: hohe Expression. B) Die in den TNIK-KOs im Vergleich zu WT am stärksten regulierten Gene in der Kategorie „*TGFβ signaling*“ sind jeweils als biologische Triplikate der einzelnen Versuchsansätze dargestellt. Blau: niedrige Genexpression, Rot: hohe Genexpression.

Ergebnisse

Betrachtet man sich die errechneten Schemata der IPA, sieht man deutlich, hier gezeigt am Beispiel für die Gruppe „*Granulocyte Adhesion and Diapedesis*“, dass eine Vielzahl von Molekülen durch einen Knockout von TNIK betroffen ist. Dies wird an den farblich unterlegten Signalmolekülen und Faktoren im Schema deutlich (Abb. 56). Ein ähnliches Bild ergibt sich in den anderen stark durch den TNIK-KO betroffenen Gruppen der IPA, was man beispielhaft für „*TREM1-Signaling*“ und „*Agranulocyte adhesion and diapedesis*“ in den Schemata im Anhang Abb. 6 und 7 sehen kann. Auch die Darstellung der regulierten Gene durch einen Knockout von TNIK in der Gruppe „*Granulocyte Adhesion and Diapedesis*“ in Heatmaps zeigt, dass sich alle TNIK-KO-Ansätze signifikant von den WT-Ansätzen unterscheiden (Abb. 55). Insgesamt unterstützt die durchgeführte RNASeq-Analyse die Hypothese, dass TNIK in der Metastasierung und Migration von Brustkrebszellen beteiligt ist. Die Analyse bestätigt, dass ein Knockout von TNIK starke Effekte auf die Expression von Genen in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 hat.

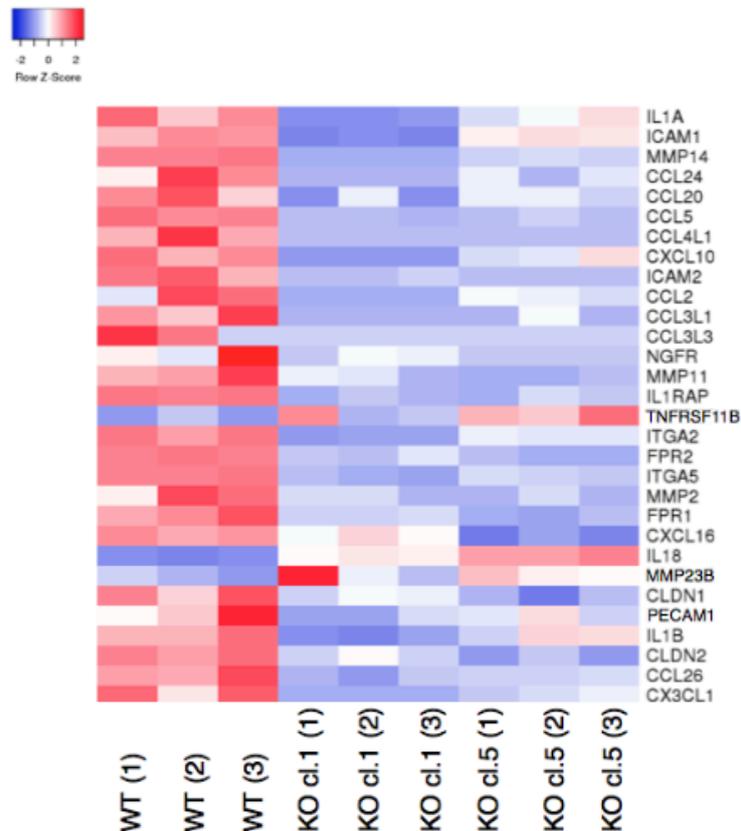
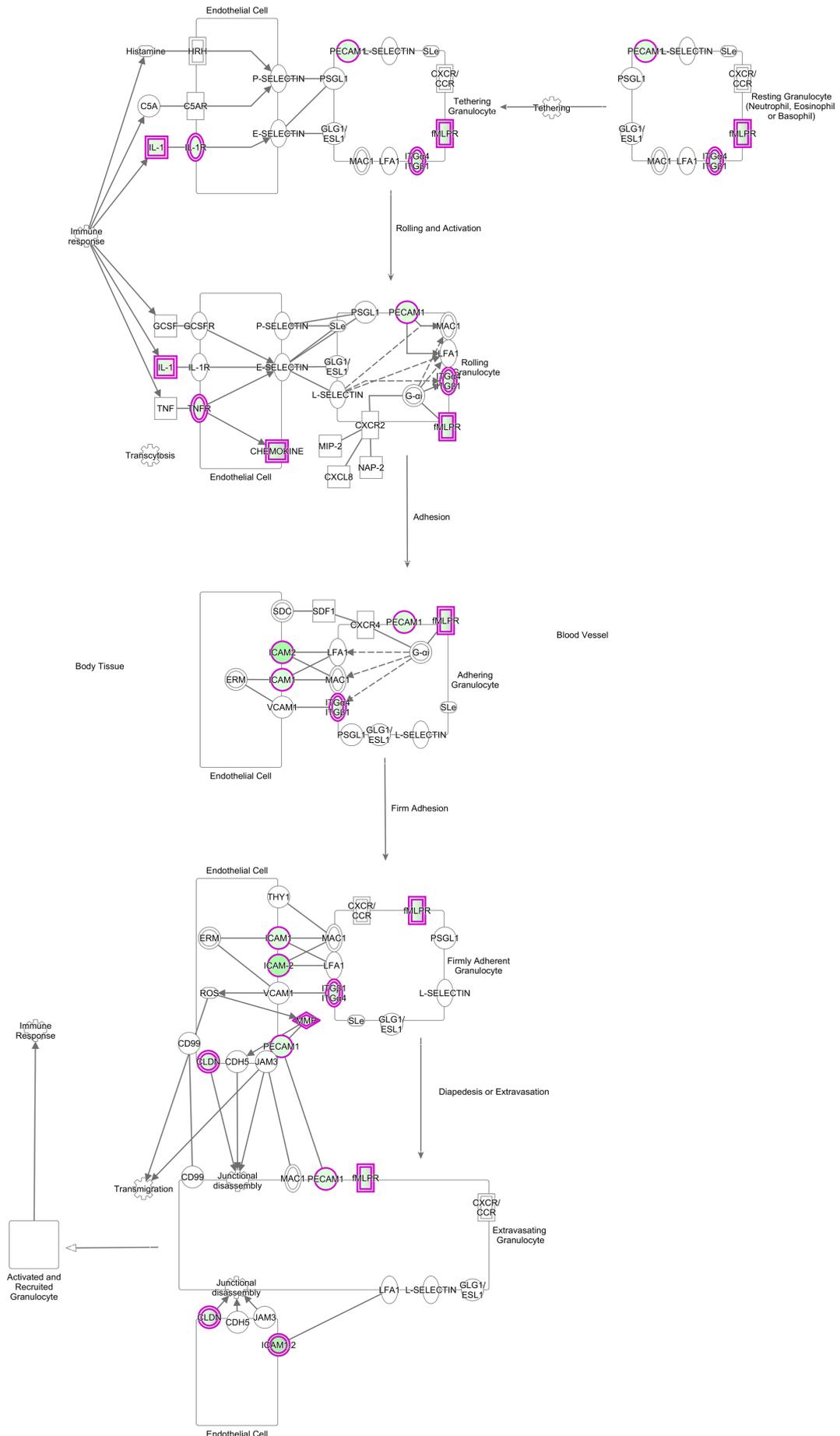


Abb. 55: Heatmap zu den Ergebnissen der IPA-Analyse in der Kategorie „*Granulocyte adhesion and diapedesis*“. Die in den TNIK-KOs im Vergleich zu WT am stärksten regulierten Gene in der Kategorie sind jeweils in biologische Triplikate der einzelnen Versuchsansätze dargestellt. Blau: niedrige Expression, Rot: hohe Expression.

Ergebnisse

Granulocyte Adhesion and Diapedesis : WT vs. K.O_new_Filter2_forIPA : Expr Fold Change



© 2000-2017 QIAGEN. All rights reserved.

Abb. 56: Grafik zu „Granulocyte Adhesion and Diapedesis“ generiert aus IPA. Die

farblich markierten Gene sind durch TNIK-KO betroffen. Quadrate: Cytokine, Rechtecke: G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Ellipsen: Transmembran-Rezeptoren, Kreise: andere. Abbildung von IMG M Laboratories.

4.3.8.2 qPCR-Analyse ausgewählter Zielgene aus der RNASeq-Analyse

Wie bereits in Abschnitt 4.3.8.1 erwähnt, wurden 14 verschiedenen Gene, welche durch einen Knockout von TNIK stark in den Zellen herunterreguliert wurden, aus der RNASeq-Analyse ausgewählt, um in qPCR-Experimenten bestätigt zu werden. Dazu wurden zwei verschiedene Ansätze der qPCR-Analyse durchgeführt. Zum einen wurden die gleichen RNAs, die auch in der RNASeq-Analyse eingesetzt wurde, für die qPCR-Analyse verwendet. Außerdem wurden davon unabhängig neue RNA-Proben aus biologischen Triplikaten der WT-Zellen und der TNIK-KO-Zellen isoliert und eingesetzt. Alle RNAs wurden für die qPCR-Analysen zunächst in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde anschließend jeweils in Duplikaten pro Ansatz in einem *LightCycler* unter Verwendung der SYBR*green*-Technologie analysiert.

In Abbildung 57A sind die relativen Transkriptionslevel der 14 ausgewählten Gene der RNA-Proben zu sehen, welche unabhängig von den Proben der RNASeq-Analyse generiert wurden. Dabei zeigte sich im qPCR-Experiment, dass alle ausgewählten Gene bis auf FGFR2 eine Reduktion im Transkriptlevel in beiden getesteten TNIK-KOs im Vergleich zu der WT-Kontrolle zeigen. Insgesamt zeigen davon 10 Gene eine signifikante Reduktion in den TNIK-KO-Proben. In Abbildung 57B sind im Vergleich dazu die RNAs per qPCR analysiert dargestellt, die direkt in der RNASeq-Analyse eingesetzt wurden. Die erhaltenen Transkriptlevel dieser Analyse sind vergleichbar mit den Ergebnissen der RNAs aus Abbildung 57A. Auch hier zeigt FGFR2 keine signifikante Beeinflussung durch den TNIK-KO, während alle anderen Gene wie erwartet eine signifikante Reduktion in den zwei getesteten TNIK-KO-Klonen im Vergleich zu den WT-Ansätzen zeigen. Interessanterweise zeigten RNA-Proben, in denen die Zellen mit dem TNIK-Inhibitor KY-05009 behandelt wurden, ebenfalls für alle getesteten Gene ähnliche Ergebnisse wie die TNIK-Knockout-Proben (Abb. 57B). Die Inhibition der Kinasedomäne von TNIK ist somit ausreichend, um die Herunterregulation der Gene zu initiieren. Insgesamt konnte somit durch die qPCR-Analyse die durch einen Knockout von TNIK vermittelte Herunterregulation von 13 der 14 ausgewählten Gene bestätigt werden.

Ergebnisse

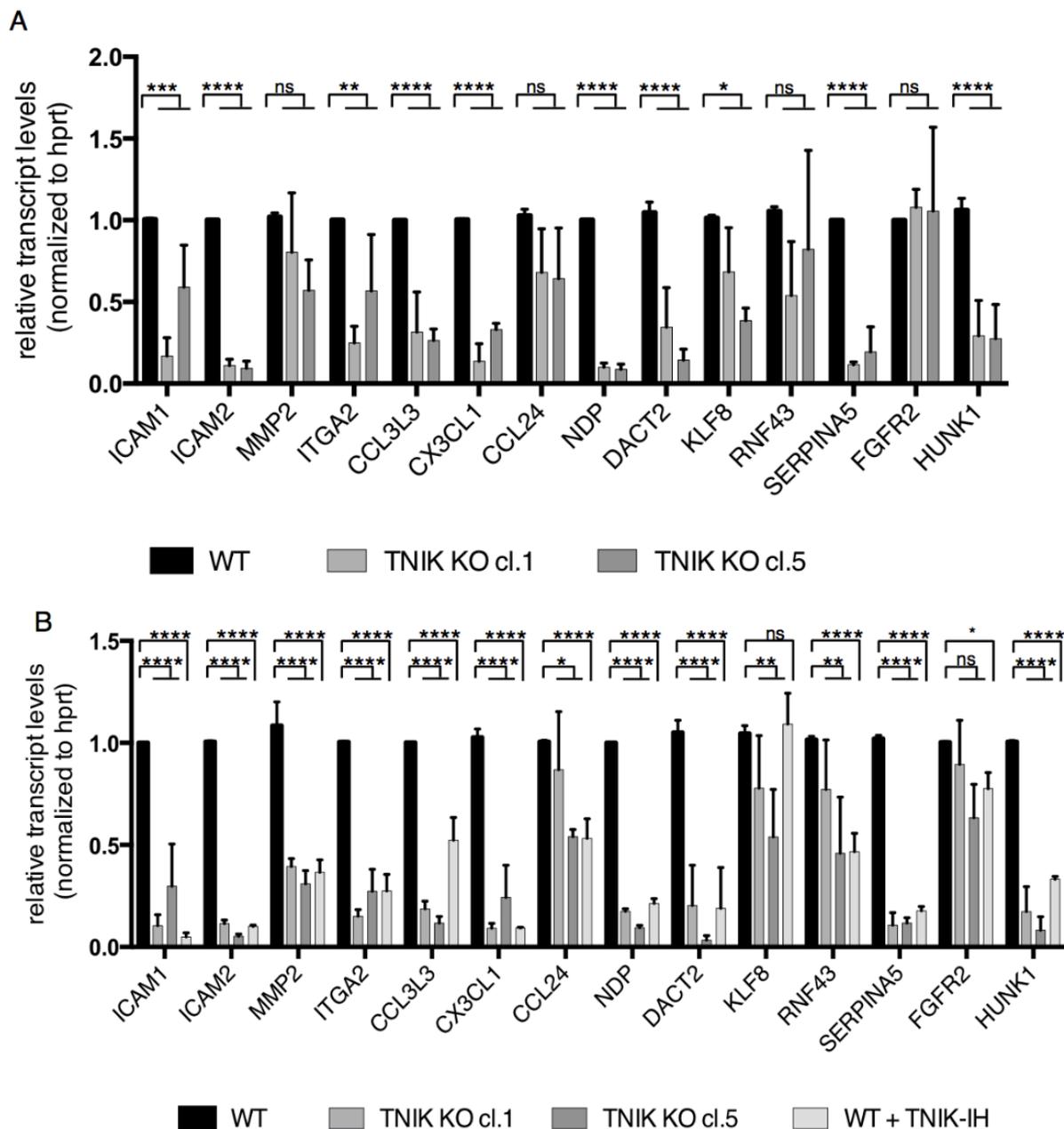


Abb. 57: qPCR-Analyse ausgewählter stark regulierter Gene aus der RNASeq-Analyse von MDA-MB-231 WT-Zellen gegen MDA-MB-231 TNIK-Knockout-Zellen. A) Um die Ergebnisse aus der vorangegangenen RNASeq-Analyse zu bestätigen und zu reproduzieren, wurden ausgewählte Gene in qRT-PCR-Experimenten getestet. Dazu wurde die RNA aus MDA-MB-231 WT und MDA-MB-231 TNIK KO cl.1 und cl.5 Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde für qRT-PCR-Experimente mit Primern für die angegebenen Gene verwendet. Die relative x-fachen Induktionslevel der verschiedenen Gene ist im Vergleich zu WT-Zellen und normalisiert auf hprt angegeben. Es wurden Triplikate von drei unabhängigen biologischen Proben pro Zelllinie ausgewertet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Two-way ANOVA, p-values: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. Die in diesem Experiment verwendete RNA entspricht der RNA, welche auch in den RNASeq-Experimenten eingesetzt wurde. B) Es wurde die RNA aus MDA-MB-231 WT und MDA-MB-231 TNIK KO cl.1 und cl.5 Zellen bzw. aus MDA-MB-231 WT-Zellen, welche für 3 h mit $10 \mu\text{M}$ Ky-05009 (TNIK-IH) behandelt wurden, isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde für qRT-PCR-Experimente mit Primern für die angegebenen Gene verwendet. Die relative x-fachen Induktionslevel der verschiedenen Gene ist im Vergleich zu WT Zellen und normalisiert auf hprt angegeben.

Ergebnisse

Es wurden Triplikate von drei unabhängigen biologischen Proben pro Zelllinie ausgewertet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Two-way ANOVA, p-values: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. Die in diesem Experiment verwendete RNA ist unabhängig von der RNA, welche in den RNASeq-Experimenten verwendet wurde, isoliert worden.

Somit konnten die qPCR-Analysen der RNA-Proben der TNIK-KO-Zellen im Vergleich zu den MDA-MB-231 WT-Zellen eindeutig die Ergebnisse der RNASeq-Analyse der ausgewählten Gene bestätigen.

Insgesamt konnten die Versuche in Abschnitt 4.3 eine Rolle von TNIK in der Migration und Metastasierung von aggressiven, triple-negativen Brustkrebszellen identifizieren. Diese Erkenntnisse stellen einen neuen Ansatzpunkt für die Forschung an Therapieansätzen für die Behandlung von Brusttumoren dar.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte der LMP1-Signalkomplex und seine Komponenten IKK2, TAK1, TPL2 und TNIK, sowie die damit zusammenhängende Induktion von JNK und NF- κ B untersucht und noch unbekannte molekulare Funktionen der einzelnen Signalproteine beschrieben werden. IKK2 und NEMO konnten als unerlässlich für eine Aktivierung von JNK im LMP1-Signalweg identifiziert werden, was für IKK2 eine bisher noch unbekannte Funktion in der LMP1-Signalkaskade darstellt. Als Mediator zwischen IKK2 und JNK in der LMP1-Signalkaskade konnte TPL2 identifiziert werden. TPL2 ist dabei für das Überleben und die Proliferation von EBV-transformierten B-Zellen notwendig und stellt somit einen wichtigen therapeutischen Ansatzpunkt gegen EBV-assoziierte Tumore dar. TAK1 als weitere Signalkomponente des LMP1-Signalsoms ist außerdem maßgeblich an einer Aufspaltung von NF- κ B und JNK unter LMP1 beteiligt. In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass die Kinaseaktivität von TAK1 nur für eine Induktion von JNK, nicht aber für eine Aktivierung von NF- κ B essenziell ist. Das TAK1-Protein wird aber für eine korrekte Bildung des Signalkomplexes an LMP1 benötigt. Eine weitere Komponente des LMP1-Signalsoms, die schon von Shkoda et al. 2012 als wichtiger Mediator des JNK- und NF- κ B-Signalweges identifiziert werden konnte, ist die Keimzentrumskinase TNIK (Shkoda et al, 2012). In weiterführenden Studien konnte das wichtige Signalmolekül TRAF6 als ein Substrat der Kinaseaktivität von TNIK bestätigt werden. Die durch TNIK induzierte Phosphorylierung von TRAF6 an Serin 507 konnte erstmals in dieser Arbeit durch LMP1 in der Zelle induziert und mittels phosphorylierungsspezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Bei der K63-verknüpften Ubiquitinierung von TRAF6 handelt es sich um einen von TNIK abhängigen Prozess. Für die Keimzentrumskinase TNIK konnte allerdings neben der Aufklärung molekularer Funktionen im LMP1-Signalweg auch eine Rolle in der Tumorigenese von triple-negativen Brustkrebszellen nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich TNIK als ein potenziell wichtiges Molekül für die Prozesse der Migration und Metastasierung in der getesteten Brustkrebszelllinie MDA-MB-231.

5.1 Die Rolle von IKK2 jenseits der Aktivierung von NF- κ B

In der Literatur ist die Hauptrolle von IKK2 als Aktivator des NF- κ B-Signalweges beschrieben (Israel, 2010). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass ein Knockout von IKK2 die durch LMP1 induzierte Degradation von I κ B α blockiert und somit ein Anschalten des kanonischen NF- κ B-Signalweges verhindert. Neben der Aktivierung von NF- κ B sind aber auch Funktionen von IKK2 in der Tumorigenese bekannt. So wurde beispielsweise gezeigt, dass IKK2 für die Regulation der Stabilität von p53 durch direkte Phosphorylierung verantwortlich ist (Liu et al, 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte eine weitere bisher unbekannte Funktion von IKK2 in dem onkogenen Signalweg des LMP1-Pseudorezeptors beschrieben werden. IKK2 ist dabei für die Aktivierung von JNK durch LMP1 verantwortlich. Bei dieser IKK2-abhängigen Aktivierung von JNK handelt es sich um einen für LMP1 spezifischen Mechanismus, da in unserem Labor in Experimenten von Kai Sterz die Phosphorylierung von JNK nach Stimulation durch TNF oder IL-1 keine Abhängigkeit von IKK2 zeigte (Daten nicht veröffentlicht).

Für eine vollständige Aktivierung von IKK2 sind zwei Phosphorylierungsstellen beschrieben. Dabei ist TAK1 in vielen Signalwegen, wie dem TNF- oder IL-1-Signalweg, die Kinase, die die aktivierende Phosphorylierung von Serin 177 und die nachfolgende Phosphorylierung von Serin 181 an IKK2 hervorruft (Hinz & Scheidereit, 2014; Israel, 2010; Liu et al, 2012). Es wurde für IL-1, TNF α oder für durch Liganden induziertes TLR-*Signaling* gezeigt, dass zwei verschiedene Phosphorylierungsereignisse auftreten müssen, um IKK2 zu aktivieren. Zuerst findet eine durch TAK1 katalysierte Phosphorylierung an Serin 177 von IKK2 statt, welche von einer durch IKK2 katalysierten Autophosphorylierung an Serin 181 gefolgt wird (Zhang et al, 2014a). Weiterhin scheint die durch LUBAC (*linear ubiquitin chain assembly complex*) katalysierte Bildung von linearen Ubiquitinketten und deren Interaktion mit der regulatorischen Untereinheit NEMO wichtig für die durch TAK1 vermittelte Phosphorylierung von IKK2 an Serin 177 zu sein (Zhang et al, 2014a). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch in *in vitro* Kinaseversuchen gezeigt werden, dass eine Inhibition von TAK1, welche zu einer Blockierung der Kinaseaktivität von TAK1 führt, keine Beeinträchtigung der durch LMP1 induzierten S177/S181-Phosphorylierung von IKK2 hervorruft. Gleichzeitig stellte sich die

Aktivierung von IKK2 komplett unabhängig von der Kinaseaktivität von TAK1 dar, während sie jedoch für JNK essenziell ist. TAK1 ist somit im LMP1-Signalweg anscheinend nicht die Kinase, die für die Phosphorylierung und Aktivierung von IKK2 verantwortlich ist. Der LMP1-Signalweg unterscheidet sich damit stark von zellulären Signalwegen wie dem IL-1- oder TNF α -Signalweg.

NEMO hingegen könnte aufgrund seiner Fähigkeit zur Bindung an lineare Ubiquitinketten und seiner möglichen Interaktion mit der für die Aktivierung von IKK2 notwendigen Kinase tatsächlich auch im LMP1-Signalweg für eine Aktivierung von IKK2 und die gefolgte Induktion von JNK notwendig sein. In Stimulationsexperimenten konnte in der vorliegenden Arbeit zumindest gezeigt werden, dass ein Knockout von NEMO die Degradation von I κ B α , sowie die Aktivierung von JNK blockiert und für die Signalkomplexbildung an LMP1 essenziell ist. Es ist vorstellbar, dass auch im LMP1-Signalweg NEMO durch die Bindung an durch LUBAC katalysierte lineare Ubiquitinketten nicht nur für eine Aktivierung von NF- κ B und IRF7, wie bereits in Publikationen postuliert, verantwortlich ist, sondern auch der JNK-Signalweg über diesen Mechanismus abläuft (Wang et al, 2017).

Doch wie ist es unabhängig von TAK1 möglich, IKK2 im LMP1-Signalweg zu aktivieren? Prinzipiell kommen noch andere Kinasen für die aktivierende Phosphorylierung von IKK2 in Frage. Es ist bekannt, dass die MAP3Ks MEKK1, ASK1, GCK und MEKK3 neben TAK1 für die Phosphorylierung und Aktivierung von IKK2 zuständig sein können (Wu et al, 2006b). Allerdings konnte für MEKK1, ASK1 und GCK gezeigt werden, dass die jeweiligen murinen Knockout-Zellen keine Beeinträchtigung in der Aktivität von IKK2 zeigen (Wu et al, 2006b). In Studien mit MEKK3-Knockout Zellen führte zumindest eine Stimulation mit IL-1 und TNF zu einer reduzierten Aktivierung von IKK und NF- κ B in Abwesenheit von MEKK3 (Huang et al, 2004; Yang et al, 2001). Somit bleibt es zu klären, ob auch unter LMP1 eventuell MEKK3 die Rolle der Aktivierung von IKK2 übernehmen könnte. Eine weitere Möglichkeit einer Kinase-unabhängigen Aktivierung von IKK2 könnte die Interaktion von IKK2 mit ubiquitiniertem NEMO darstellen. Diese Bindung von IKK2 an ubiquitiniertes NEMO könnte zu Konformationsänderungen in IKK2 führen, was eine *trans*-Autophosphorylierung von IKK2 hervorrufen könnte (Hinz & Scheidereit, 2014; Israel, 2010). Um zu klären, ob im LMP1-Signalweg eine *trans*-Autophosphorylierung von IKK2 stattfindet, könnte in zukünftigen Experimenten

nach Induktion von LMP1 und gleichzeitiger Inhibition von IKK2 durch den Inhibitor ACHP die Phosphorylierung von IKK2 an S177/181 mittels Antikörper analysiert werden. Führt eine Inhibition der Kinaseaktivität von IKK2 zu einer Blockierung der Phosphorylierung an S177/181, ist davon auszugehen, dass es sich bei dieser aktivierenden Phosphorylierung von IKK2 um eine Autophosphorylierung durch die Kinase selbst handelt.

Insgesamt konnten durch die vorliegende Arbeit die in der Literatur kontrovers diskutierten Funktionen von TAK1 im LMP1-Weg aufgeklärt werden. Die Kinaseaktivität von TAK1 erwies sich nur für die Aktivierung von JNK, nicht aber die NF- κ B-Aktivierung als notwendig. Das TAK1-Protein an sich ist jedoch für beide Signalwege unerlässlich, was in TAK1-Knockout-Zellen gezeigt werden konnte. Das TAK1-Protein stellt einen wichtigen Interaktionspartner im LMP1-Signalosom dar. Deshalb führt die Abwesenheit von TAK1 zu einer Blockade der Interaktion von IKK2 mit LMP1 und somit wahrscheinlich zur Inhibition von JNK und NF- κ B.

Welches Molekül dirigiert aber nun das für LMP1 spezifische *IKK2-Signaling*? Einerseits konnte von Schneider et al. 2008 gezeigt werden, dass TRADD ein Interaktionspartner von LMP1 ist und eine Rolle in der Aktivierung von IKK2 spielt (Schneider et al, 2008). TRADD ist dabei unerlässlich, um die Bildung des LMP1-Signalnetzwerkes zu gewährleisten (Schneider et al, 2008). Somit könnte TRADD der wichtige Mediator im LMP1-Signalweg sein. Andererseits kommt aber auch die Keimzentrumskinasen TNIK in Frage. Für TNIK wurde bereits gezeigt, dass die Serin/Threonin-Kinase für eine vollständige Aktivierung des JNK- und NF- κ B-Signalweges essenziell ist und als eine Art Organisator des LMP1-Signalosoms fungiert (Shkoda et al, 2012).

Der CD40-Rezeptor-Signalweg, welcher das zelluläre Mimik zum LMP1-Signalweg darstellt, benötigt TRAFs um eine Assoziation von TPL2 mit dem CD40-Signalkomplex hervorzurufen und Signalkaskaden einzuleiten (Chan & Reed, 2005). Wie in dieser Arbeit gezeigt und im folgenden Abschnitt diskutiert wird, ist TPL2 tatsächlich für die Aktivierung von JNK durch LMP1 notwendig. Da sich der CD40- und LMP1-Signalweg sehr ähneln, wäre es somit möglich, dass auch unter LMP1 TRAFs das *IKK-Signaling* dirigieren.

5.2 TPL2 als Mediator der durch LMP1 induzierten IKK2-abhängigen Aktivierung von JNK

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals für den LMP1-Signalweg gezeigt werden, dass die JNK-Aktivierung von TPL2 abhängig ist. Dabei wurde beobachtet, dass auch unter LMP1 die Kinase IKK2 für eine Phosphorylierung von TPL2 an Serin 400, die Freisetzung von TPL2 aus dem p105/TPL2-Komplex, sowie für die Aktivierung und nachfolgende Degradation von TPL2 verantwortlich ist. Da, wie bereits erwähnt, TAK1 als absolut essenziell für die Aktivierung von JNK beschrieben wurde, muss es somit zwei parallele Wege für eine Aktivierung von JNK durch LMP1 geben. Beide Wege laufen über IKK2 und spalten sich dann in eine TAK1-abhängige Achse und eine TPL2-abhängige Achse auf. Auf welcher Ebene die beiden Wege allerdings wieder zusammenlaufen, um ihr gemeinsames Substrat JNK zu aktivieren, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Es ist bekannt, dass sowohl TPL2 als auch TAK1 MKKs aktivieren können (Hirata et al, 2017; Salmeron et al, 1996). Eine Möglichkeit wäre, dass TAK1 und TPL2 auf Ebene von MKK4 und MKK7 zusammenlaufen und so eine Aktivierung von JNK stattfinden kann (Fleming et al, 2000). Auch MKK6 könnte die Kinase sein, welche die TAK1- und die TPL2-Achse vereinigt. Für MKK6 wurde bereits gezeigt, dass es ein Substrat von TAK1 und für eine Aktivierung von JNK notwendig ist (Wang et al, 2001). In zukünftigen Experimenten bleibt es zu klären, an welcher Stelle sich die beiden Aktivierungsachsen von LMP1 treffen. Interessanterweise führt aber ein Verlust von TPL2 im Gegensatz zu TAK1 nicht zu einer kompletten Inhibition der Phosphorylierung von JNK. Die Phosphorylierung des JNK-Proteins ist in Abwesenheit von TPL2 lediglich stark reduziert. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass TAK1 neben der Aktivierung von JNK, für welche die Kinasedomäne des TAK1-Proteins unerlässlich ist, auch für aufwärtsgelegene Prozesse essenziell ist. Diese Tatsache konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da das TAK1-Protein auch für die Signalkomplexbildung und eine Aktivierung von IKK2 notwendig ist. Somit scheint TAK1 sowohl in der Aktivierung von JNK als auch in der Initialisierung des LMP1-Signalweges eine Rolle zu spielen.

Insgesamt konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass im LMP1-Signalweg TPL2 und IKK2 in der Aktivierung von JNK unerlässlich sind und TAK1 als Organisator von NF- κ B und JNK auf Höhe des IKK-Komplexes agiert (Abb.58).

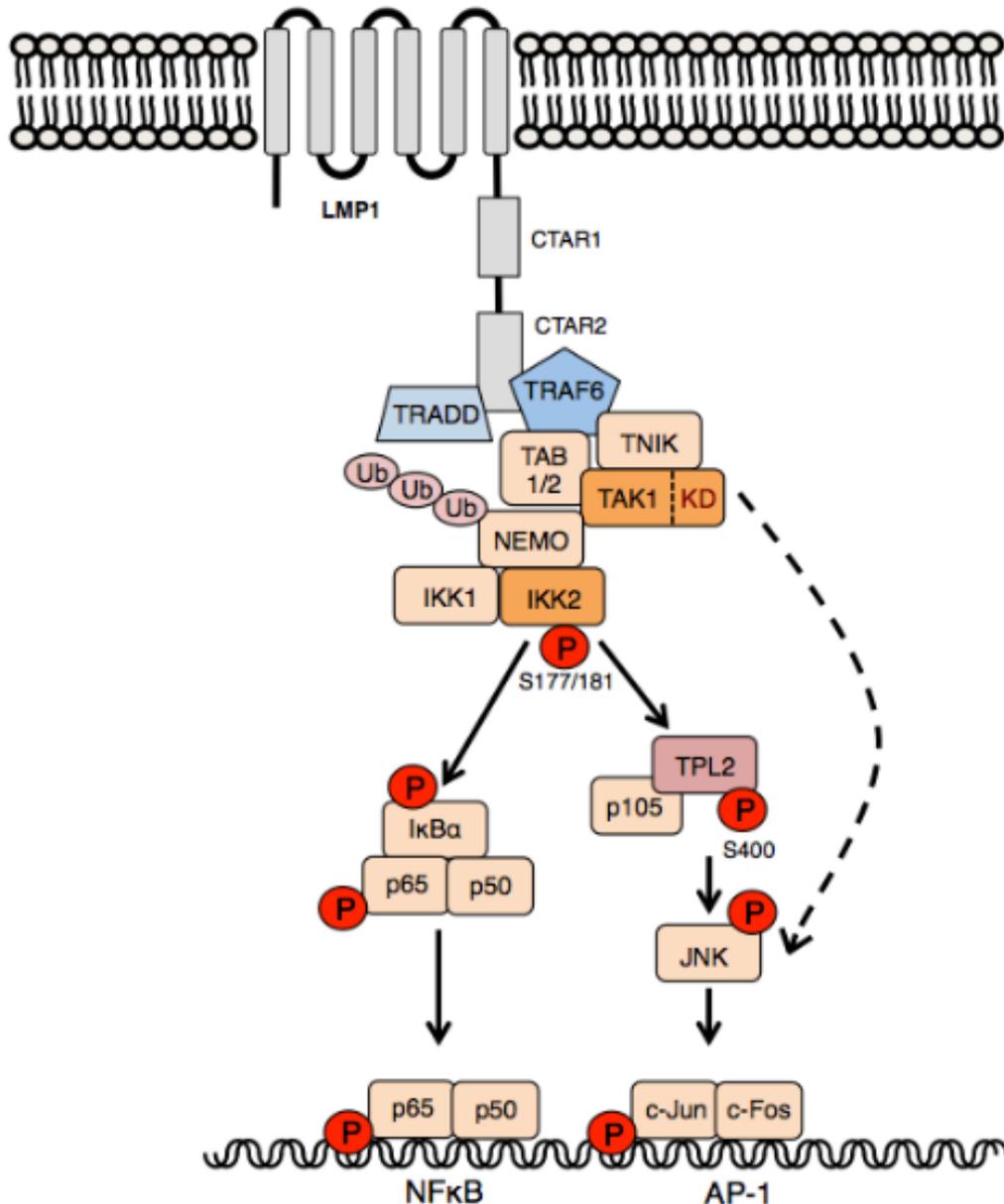


Abb. 58: Überblick über das LMP1-CTAR2-Signaling. Im CTAR2-Signalweg agiert IKK2 als Mediator von JNK und NF- κ B. Dabei ist TPL2 abwärts von IKK2 gelegen und für eine Aktivierung von JNK notwendig. NEMO und das TAK1-Protein sind für die Rekrutierung von IKK2 an den LMP1-Pseudorezeptor notwendig, um die Aktivierung von IKK2 und der abwärtsgelegenen JNK- und NF- κ B-Signalkaskade zu gewährleisten. Die Kinaseaktivität von TAK1 ist für eine vollständige Aktivierung von JNK unumgänglich, aber spielt keine Rolle für IKK2 und die Aktivierung von NF- κ B. KD steht für die TAK1-Kinasedomäne.

Die Beobachtung, dass die Aktivierung von JNK im LMP1-Signalweg über IKK2 und TPL2 läuft, konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals nachgewiesen werden. Nach Stimulation des TNFR1 in MEFs konnte bereits eine TPL2-abhängige Aktivierung

von JNK beobachtet werden, welche jedoch unabhängig von IKK2 abläuft (Das et al, 2005). Da der TNFR1 unabhängig von IKK2 arbeitet, benötigt er RIP1 und TRAF2, um TPL2 und JNK zu aktivieren (Das et al, 2005). Auch für CD40, das zelluläre Mimik von LMP1, konnte eine IKK2-unabhängige Aktivierung von JNK beschrieben werden, welche TRAF2 benötigt (Hostager et al, 2003). Der in dieser Arbeit identifizierte Unterschied zwischen LMP1, CD40 und TNFR1 in der Signalkaskade der Aktivierung von JNK lässt sich möglicherweise über die Rekrutierung der unterschiedlichen TRAF-Proteine erklären.

Während CD40 und TNFR1 hauptsächlich TRAF2 für die Aktivierung von JNK rekrutieren, ist bei LMP1 TRAF6 entscheidend. Aufgrund der unterschiedlichen TRAFs könnte es zu verschiedenen Ubiquitinierungsprozessen in der Zelle kommen, was wiederum zur Bindung anderer Gerüstproteine und Signalproteine wie TRADD oder TNIK führen könnte. Diese sich unterscheidende Proteinzusammensetzung des Signalosoms führt dann zur Induktion unterschiedlicher abwärts gelegener Signalkaskaden. Über diese Hypothese lässt sich erklären, warum sich der LMP1-Signalweg von anderen zellulären Signalwegen unterscheidet.

5.3 TPL2 ist für eine Aktivierung von NF- κ B im LMP1-Weg nicht essenziell

Neben JNK wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Aktivierung von NF- κ B durch LMP1 auf eine mögliche Abhängigkeit von TPL2 untersucht. Dabei zeigte sich deutlich, dass sowohl nach Inhibition von TPL2 als auch nach Knockdown sowie Knockout von TPL2 keine Beeinträchtigung der Degradation von I κ B α oder der p65-Translokation in den Zellkern statt gefunden hat. Diese Beobachtung konnte außerdem in zwei verschiedenen Zellsystemen, dem MEF- und HEK293-Zellsystem, bestätigt werden.

In bereits publizierter Literatur zeigen zwei Arbeiten jedoch andere Beobachtungen. Eliopoulos et al. konnten in Überexpressionsstudien beobachten, dass eine katalytisch-inaktive Mutante von TPL2 den durch LMP1 induzierten NF- κ B-Signalweg hemmt (Eliopoulos et al, 2002). Dabei soll eine Modulation der Funktion von I κ B α und p105 auftreten (Eliopoulos et al, 2002). In einer weiteren Studie zeigte

ein Knockdown von TPL2 Effekte auf die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B, was allerdings unabhängig von I κ B α stattfindet (Gewurz et al, 2012). Deshalb wird angenommen, dass TPL2 abwärts gelegen von I κ B α in den NF- κ B-Signalweg eingreift (Gewurz et al, 2012).

Was könnte aber erklären, warum in der vorliegenden Arbeit keine Effekte von TPL2 auf NF- κ B auf Ebene von I κ B α oder abwärts gelegen auf Ebene von p65 verzeichnet werden konnten? In der Studie von Eliopoulos et al. wurde eine Überexpression von TPL2 vorgenommen. Diese Überexpression könnte dazu führen, dass TPL2 mit anderen Signalmolekülen wie z.B. den TRAFs um Bindung verschiedener Kinasen wie IKKs konkurriert und somit unphysiologische Effekte auf I κ B α auftreten. Es wurde gezeigt, dass TPL2 direkt oder indirekt mit TRAF2 und TRAF6 interagieren kann, was die Vermutung bestätigt, dass in Überexpressionsexperimenten die physiologischen Gleichgewichte der wichtigen Signalkomponenten gestört werden und somit die Effekte auf NF- κ B zu erklären sind (Chan & Reed, 2005). Ausschließen können wir aufgrund unserer Experimente, dass durch LMP1 induziertes TPL2 abwärts gelegen von I κ B α die Phosphorylierung von p65 an S536 beeinflusst.

Ein weiterer Punkt ist, dass eine Überexpression der katalytisch inaktiven Mutante von TPL2 in der induzierten Degradation von p105 und der Aktivierung von NF- κ B in den Zellen beteiligt zu sein scheint, was die beobachteten Effekte von Eliopoulos et al. erklären könnte (Beinke et al, 2003).

Welche Möglichkeit in Bezug auf eine TPL2-abhängige Aktivierung von NF- κ B allerdings nicht komplett ausgeschlossen werden kann, ist die, dass TPL2 durch sekundäre Modifikationen an NF- κ B-Proteinen, wie z.B. durch Phosphorylierungen, modulierend wirkt und somit den NF- κ B-Signalweg beeinflussen könnte. Eine andere Möglichkeit wäre eine Regulation von NF- κ B durch TPL2 auf Chromatinebene.

Insgesamt konnten wir allerdings über verschiedene Versuchsansätze sowohl für den kanonischen als auch ansatzweise für den nicht-kanonischen NF- κ B-Signalweg zeigen, dass TPL2 keine essenzielle Rolle in der Aktivierung dieser Signalwege besitzt.

5.4 TPL2 als potenzieller Ansatzpunkt für Krebstherapien

In EBV-transformierten lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) wurde bereits gezeigt, dass eine Inhibition von NF- κ B zum Zelltod führt (Cahir-McFarland et al, 2004). Dementsprechend verursacht eine Inhibition der Aktivität von IKK auch Apoptose in LCLs. Da wir allerdings zeigen konnten, dass IKK nicht nur den NF- κ B-Signalweg initiiert, welcher essenziell für das Überleben und die Proliferation von Zelllinien ist, sondern auch eine Aktivierung von JNK hervorruft, würde eine Inhibition von IKK sehr breit in der Zelle wirken. Für eine alleinige Inhibition von JNK konnte bereits gezeigt werden, dass diese ausreicht, um die Proliferation von LCLs zu senken (Kutz et al, 2008). Der NF- κ B-Signalweg stellt aber innerhalb der Zelle nicht nur einen Ansatzpunkt für EBV-transformierte Tumorzellen und Lymphome dar, sondern spielt hauptsächlich in verschiedensten biologischen Prozessen wie Immunantworten, Entzündungen, Zellwachstum und Überleben eine entscheidende Rolle (Park & Hong, 2016). Blockiert man also in einem therapeutischen Ansatz IKK2 ist mit weitreichenden Nebenwirkungen zu rechnen, da eine Vielzahl biologischer Prozesse blockiert wird. Setzt man allerdings die Inhibition von TPL2 in der Behandlung EBV-assoziiierter Tumore ein, würde man spezifisch den JNK-Signalweg hemmen und NF- κ B unbeeinflusst lassen. Somit wäre bei dieser Behandlungsmethode mit weniger unerwünschten Nebenwirkungen zu rechnen. Dass eine Inhibition von TPL2 im Organismus prinzipiell keine schwerwiegenden Folgen hat, konnte bereits in Mausexperimenten bestätigt werden. TPL2-defiziente Mäuse waren lebensfähig, entwickelten sich normal und ihre Lebensspanne war vergleichbar mit Wildtyp-Mäusen unter keimfreien Bedingungen (Dumitru et al, 2000).

Allerdings führte die pharmakologische Inhibition von TPL2 in humanen zytotoxischen T-Lymphozyten zu einer Blockierung der Zytokinsekretion und der lytische Aktivität (Chowdhury et al, 2014). Deshalb müsste in klinischen Studien auch der TPL2-Inhibitor auf mögliche Nebenwirkungen z.B. in T-Lymphozyten untersucht werden.

Eine Expression von LMP1 in der Epidermis von Mäusen führt zur Hyperplasie (Wilson et al, 1990). In der vorliegenden Arbeit wurden LMP1-abhängige, murine Karzinomzelllinien verwendet, welche aus Mäusen generiert wurden, die das LMP1-

Transgen in ihrer Epidermis exprimieren (hergestellt von Hannigan et al.) (Hannigan & Wilson, 2010; Wilson et al, 1990). Diese LMP1-exprimierenden Zelllinien zeigten im Vergleich zu LMP1-negativen Kontrollzellen einen starken Anstieg in der Apoptoserate nach Inhibition von TPL2. Auch dieser Versuchsansatz mit murinen Karzinomzelllinien zeigt, dass TPL2 als therapeutisches Ziel für Krebstherapien in Frage kommen könnte.

TPL2 stellt ein attraktives Ziel für die Entwicklung von Medikamenten gegen EBV-induzierte Krebserkrankungen dar, da gezeigt werden konnte, dass in EBV-transformierten Zellsystemen die Inhibition von TPL2 zu einer Beeinträchtigung der Proliferation und zur Induktion von Apoptose führt. TPL2 steuert außerdem den onkogenen JNK-Signalweg, welcher durch LMP1 aktiviert wird.

5.5 Die Rolle der Keimzentrumsinkinase TNIK im LMP1-Signalkomplex

Um neue Interaktionspartner von LMP1 zu identifizieren, wurde von Shkoda et al. eine funktionelle Proteomanalyse durchgeführt. Dabei wurde TNIK als neuer Interaktionspartner von LMP1 identifiziert (Shkoda et al, 2012). TNIK gliedert sich dabei als Mediator des LMP1-CTAR2-Signalweges ein (Shkoda et al, 2012). Neben bekannten Funktionen von TNIK im Neuritenwachstum im Gehirn, in der Organisation des Zytoskeletts in Epithelzellen, sowie der Aktivierung von Wnt-Zielgenen, konnte erstmals gezeigt werden, dass TNIK für die Aktivierung von NF- κ B und JNK durch LMP1 notwendig ist (Fu et al, 1999; Kawabe et al, 2010; Mahmoudi et al, 2009; Shkoda et al, 2012; Taira et al, 2004). Außerdem konnte eine Interaktion von TNIK mit dem Signalmolekül TRAF6 und weiteren Signalkomponenten wie TAK1, TAB2 und IKK2 nachgewiesen werden (Shkoda et al, 2012). In ersten Experimenten in unserem Labor konnten weiterhin erste Hinweise auf durch TNIK induzierte sekundäre Proteinmodifikationen an TRAF6 gewonnen werden. Es wurden durch phosphoproteomische Analysen zwei Phosphorylierungsstellen von TRAF6 identifiziert, welche durch TNIK phosphoryliert werden können. Dabei handelt es sich um Serin 507 und Threonin 463. Die genauen molekularen Mechanismen und Funktionen der neu entdeckten Phosphorylierungsstellen von TRAF6 sind jedoch noch unbekannt. In der vorliegenden Arbeit war es deshalb das Ziel, die durch TNIK induzierten

Phosphorylierungen von TRAF6 direkt in Zellen nachzuweisen und eine mögliche Funktion dieser Modifikationen aufzuklären. Zur Gruppe der Keimzentrumskinasen zählt außerdem auch MINK1. MINK1 zeigt vor allem in der Kinasedomäne und GCKH-Domäne eine Sequenzhomologie zu TNIK von über 90%. Deshalb galt es die Hypothese zu klären, ob beide Keimzentrumskinasen redundante Funktionen in der Signaltransduktion inne haben könnten.

5.5.1 Der TNIK-Interaktionspartner TRAF6

Wie schon von Shkoda et al. und in der Doktorarbeit von Jennifer Town beschrieben, konnte auch in der vorliegenden Arbeit die Interaktion von TRAF6 und TNIK bestätigend nachgewiesen werden (Shkoda et al, 2012; Town, 2012). Die TNIK/TRAF6-Interaktion lässt sich durch LMP1 induzieren.

In den durchgeführten Interaktionsstudien konnte außerdem MINK1 als weiterer Interaktionspartner von TRAF6 identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass auch die MINK1/TRAF6-Interaktion durch LMP1 induziert werden kann und dass diese Interaktion unabhängig von der Kinasedomäne von MINK1 stattfindet. Für TNIK wurde bereits die GCKH-Domäne als notwendige Domäne für eine Interaktion mit TRAF6 identifiziert (Town, 2012), weshalb vermutet wird, dass auch für MINK1 die Interaktion über den gleichen Mechanismus abläuft. Die Interaktionsstudien geben somit erste Hinweise darauf, dass TNIK und MINK1 redundante Funktionen in der Zelle übernehmen könnten, da sie den gemeinsamen Interaktionspartner TRAF6 besitzen.

Die Rolle von TNIK und MINK1 wurde bereits in zwei Publikationen in verschiedenen zellulären Systemen untersucht. Beispielsweise wurde gezeigt, dass TNIK und MINK1 Komponenten des kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweges in *Xenopus* sind (Mikryukov & Moss, 2012). TNIK und MINK1 können im Wnt-Signalweg interagieren, wobei eine proteolytische Spaltung in Kinasedomänenfragmente während der Signaltransduktion stattfindet. Die katalytisch aktiven Kinasedomänenfragmente von TNIK und MINK1 sind dabei beide am nicht-kanonischen Signalweg beteiligt. Im kanonischen Signalweg hingegen wirkt nur das Kinasedomänenfragment von TNIK aktivierend, während das MINK1-Fragment stark antagonistisch auf den Signalweg wirkt (Mikryukov & Moss, 2012). Es wird postuliert, dass die beiden Kinasen TNIK und MINK1 wichtige

Faktoren darstellen, um die Balance zwischen dem kanonischen und dem nicht-kanonischen *Wnt-Signaling* zu steuern (Mikryukov & Moss, 2012).

In einer anderen Studie wurden MINK1 und TNIK als Interaktionspartner von Rap2 in Neuronen untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Expression einer trunkierten MINK1-Mutante, welche nicht mehr mit Rap2 interagieren kann, zu einer reduzierten Dendridenverzweigung führt. Dieser durch MINK1 vermittelte Effekt auf die neuronale Morphologie wird als abhängig von Rap2 beschrieben (Hussain et al, 2010). Eine trunkierte Variante von TNIK konnte zwar auch die neuronale Komplexität senken, allerdings war dieser Effekt nicht abhängig von Rap2 (Hussain et al, 2010). Es wurde somit postuliert, dass zwar beide Kinasen mit Rap2 interagieren können, aber unterschiedliche Signalmechanismen stattfinden, um die durch Rap2 vermittelten Signalwege zu modulieren (Hussain et al, 2010). Hussain et al. zeigen hier, dass TNIK und MINK1 ähnliche Funktionen im Gehirn aufweisen, jedoch über unterschiedliche Signalwege agieren, was auch in Bezug auf den LMP1-Signalweg denkbar wäre.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte über verschiedene Experimente gezeigt werden, dass TNIK und MINK1 ähnliche Funktionen in der Zelle inne haben. So können beide Kinasen mit TRAF6 interagieren, TRAF6 phosphorylieren und spielen eine Rolle in der Ubiquitinierung von TRAF6. Allerdings gibt es auch hier Hinweise, dass einige Unterschiede in der Funktion der Kinasen im LMP1-Weg vorherrschen. Es konnte beispielsweise in *in vitro* Kinaseversuchen eine unterschiedlich starke Phosphorylierung von TRAF6 durch TNIK und MINK1 beobachtet werden. Die Phosphorylierung von TRAF6 an S507 wurde durch TNIK wesentlich stärker induziert als durch MINK1. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass TRAF6 zwar für TNIK, nicht aber für MINK1 das Hauptsubstrat darstellt. Eventuell kann MINK1 zusätzlich andere Proteine in der Zelle phosphorylieren, welche wiederum keine Substrate von TNIK sind.

Da beide Keimzentrumskinasen molekulare Funktionen in Bezug auf das Signalmolekül TRAF6 aufweisen, ist anzunehmen, dass TNIK und MINK1 eine Rolle in dieser Signalweiterleitung einnehmen. In der vorliegenden Arbeit wurde getestet, ob die Kinasen für eine vollständige Signalkomplexbildung verantwortlich sind. Allerdings führte zumindest im LMP1-Signalweg ein Knockout von TNIK und MINK1 zu keiner Beeinträchtigung der TAK1/LMP1- und IKK2/LMP1-Interaktion.

Möglicherweise sind TNIK und MINK1 zwar als eine Art Bindeplattform für die beteiligten Proteine der jeweiligen Signalkomplexe notwendig, allerdings nicht essenziell. Eventuell wird durch TNIK und MINK1 modulierend in die Komplexbildung und damit in die ablaufenden Signalkaskaden eingegriffen und somit eine effiziente Signalweiterleitung ermöglicht. In Abwesenheit von TNIK und MINK1 können zwar die einzelnen Signalkomponenten Interaktionen eingehen, allerdings könnten die Interaktionen weniger stabil sein und dadurch das *Signaling* möglicherweise weniger effizient ablaufen. Dies erklärt auch, warum ein Knockdown von TNIK bei Shkoda et al. zwar den JNK- und NF- κ B-Signalweg beeinträchtigt, aber nicht komplett blockiert (Shkoda et al, 2012).

5.5.2 TRAF6 als Substrat der TNIK-Kinaseaktivität

Als direktes Substrat der Kinaseaktivität von TNIK wurde TRAF6 über einen phosphoproteomischen *Screen* identifiziert und über *in vitro* Kinaseversuche bestätigt (Obermeier, 2012; Town, 2012). Dabei wurden die Aminosäurereste Serin 507 und Threonin 463, welche sich innerhalb der TRAF-Domäne befinden, als durch TNIK induzierte Phosphorylierungen von TRAF6 identifiziert. Madlen Kunke konnte während ihrer Masterarbeit in Zusammenarbeit mit der *Antibody Facility* des HMGU phosphorylierungssellenspezifische TRAF6-Antikörper entwickeln, welche in der vorliegenden Arbeit erfolgreich in Western Blots eingesetzt werden konnten. Eine Überexpression des TNIK-Proteins in HEK293 Zellen reichte dabei aus, um die Phosphorylierung von TRAF6 an S507 zu induzieren und per Western Blot nachzuweisen. Allerdings konnte in keinem der durchgeführten Experimente eine Phosphorylierung von TRAF6 an Threonin 463 mit dem spezifischen Antikörper detektiert werden. Erklären lässt sich diese fehlende Detektion der Phosphorylierung an T463 über eine insgesamt schwächere durch TNIK induzierte Phosphorylierung von TRAF6 an Threonin 463 im Vergleich zur Phosphorylierung an S507. In *in vitro* Kinaseexperimenten konnte die präzipitierte Kinase TNIK die TRAF6 S507A-Mutante, welche nur noch eine intakte T463-Phosphorylierungsstelle beinhaltet, deutlich geringer phosphorylieren als die TRAF6 T463A-Mutante. Deshalb wird angenommen, dass auch innerhalb der Zelle ein Ungleichgewicht in der Stärke der Phosphorylierungen an den beiden Aminosäureresten bestehen könnte. Die Serin 507-Phosphorylierungsstelle von

TRAF6 könnte die Hauptphosphorylierungsstelle sein, während Threonin 463 nur modulierende Funktionen in der Signaltransduktion einnimmt und deshalb nur schwach phosphoryliert wird. Möglicherweise ist die durch TNIK induzierte Phosphorylierung von TRAF6 an T463 so gering, dass sie unter dem Detektionslimit des verwendeten Antikörpers liegt.

Abgesehen von der Überexpression der Keimzentrumskinasen TNIK war es nicht möglich, die Phosphorylierung von TRAF6 an S507 durch eine Rezeptorstimulation der Zellen, beispielsweise durch Antikörperquervernetzung von NGFR-LMP1, zu induzieren und im Western Blot nachzuweisen. Deshalb wurden die Zellen der jeweiligen Stimulationsexperimente kurz vor der Zellyse mit dem Phosphatase-Inhibitor Calyculin A behandelt. Da dieser Inhibitor zu einer Akkumulation aller Phosphorylierungen in der Zelle führt, war es möglich, die Serin 507-Phosphorylierung von TRAF6 auch nach Aktivierung von NGFR-LMP1 in der Zelle mittels phosphorylierungsspezifischer Antikörper zu detektieren. Die Behandlung mit Calyculin A ermöglichte es erstmals, die TRAF6 S507-Phosphorylierung in Abhängigkeit von TNIK nach Induktion von LMP1 nachzuweisen. Da die durch TNIK induzierte Phosphorylierung von TRAF6 nicht ohne Calyculin A-Behandlung oder Überexpression der Keimzentrumskinasen nachgewiesen werden konnte, besteht die Phosphorylierung innerhalb der Zelle vermutlich nur für sehr kurze Zeit auf niedrigem Level. Diese Hypothese einer modulatorischen und regulatorischen Rolle der Phosphorylierungsstellen S507 und T463 von TRAF6 in der Zelle gilt es in weiteren Studien zu untersuchen.

Außerdem soll in zukünftigen Experimenten geklärt werden, ob auch Stimulationen endogener Rezeptoren, wie z.B. des T-Zellrezeptors oder der Toll-like Rezeptoren, die neu entdeckte Phosphorylierung von TRAF6 an Serin 507 initiieren, um Hinweise auf eine mögliche endogene Funktion der Proteinmodifikation zu erlangen. Erstrebenswert ist es außerdem einen Induktor der S507-Phosphorylierung von TRAF6 zu identifizieren, welcher keine Akkumulation der Phosphorylierungen durch Calyculin A benötigt um die Proteinmodifikation im Western Blot nachweisbar zu machen. Die Behandlung mit Calyculin A greift mit Sicherheit stark in die Proteingleichgewichte der Zelle ein und verhindert es somit die Signaltransduktion auf physiologischem Level zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurden erste Experimente durchgeführt, um eine Rolle der Phosphorylierungen von TRAF6 zu entschlüsseln. Es wurde dabei aufgeklärt, dass die Phosphorylierungen nicht in der Bildung des Signalkomplexes aus TNIK und TRAF6 involviert sind. In weiterführenden Experimenten könnten weitere Signalkomponenten, wie TAK1 oder TAB2, in Ko-Immunpräzipitationen auf die Fähigkeit zur Interaktion mit TRAF6 in Abhängigkeit der S507 und T463 Phosphorylierung getestet werden. Möglicherweise ist die Interaktion oder Aktivität einiger Signalkomplexkomponenten von LMP1 von der Phosphorylierung von TRAF6 an S507 und T463 abhängig. Außerdem sollten Experimente angeschlossen werden, welche klären, inwieweit die Phosphorylierungsstellen in der Induktion oder dem Abschalten von Signalkaskaden in verschiedenen Signalwegen involviert sind.

Einige der Experimente wurden auch für MINK1 durchgeführt, um zu klären, inwieweit sich die molekularen Funktionen von MINK1 und TNIK ähneln. Auch MINK1 war in der Lage, TRAF6 an Serin 507 und Threonin 463 zu phosphorylieren, auch wenn die durch MINK1 induzierte Phosphorylierung im *in vitro* Kinaseexperiment wesentlich schwächer ausfiel. Die Überexpression von MINK1 in HEK293 Zellen hingegen konnte in vergleichbarem Maße wie TNIK die Phosphorylierung von TRAF6 an S507 induzieren. Außerdem war ein Knockdown von MINK1 ebenfalls ausreichend, um die Phosphorylierung von S507 an TRAF6 nach Induktion von LMP1 signifikant zu senken. Insgesamt war es möglich, für MINK1 und TNIK eine gemeinsame Funktion in Bezug auf die posttranslationale Modifikation von TRAF6 zu identifizieren.

Neben der Phosphorylierung stellt die Ubiquitinierung eine weitere posttranslationale Proteinmodifikation dar. JNK und NF- κ B sind von der Autoubiquitinierung von TRAF6 mit K63-verknüpften Ubiquitinketten abhängig. Diese Ubiquitinketten dienen dabei als Gerüst für die Bindung und Aktivierung des abwärts gelegenen TAK1/TAB-Komplexes (Kanayama et al, 2004; Skaug et al, 2009; Wang et al, 2001). Die Ubiquitinierung von TRAF6 stellt also einen initialen Schritt in der Aktivierung der Signaltransduktion dar. Für LMP1 konnte gezeigt werden, dass es die Ubiquitinierung von TRAF6 induzieren kann, jedoch wurde die Rolle der durch LMP1 induzierten Ubiquitinierung von TRAF6 bisher nicht vollständig untersucht (Song et al, 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von HEK293 TNIK- und MINK1-Knockout Zellen gezeigt werden, dass die durch LMP1 induzierte Autoubiquitinierung von TRAF6 eine Abhängigkeit von TNIK und MINK1 aufweist. Damit konnten die Ergebnisse aus sh-Knockdown-Experimenten von Jennifer Town bestätigt werden (Town, 2012). Wie genau TNIK an der Autoubiquitinierung von TRAF6 beteiligt ist, bleibt jedoch für den LMP1-Signalweg weiter unbekannt. Für den IL-1R-induzierten Signalweg wurde gezeigt, dass TIFA (*TRAF-interaction protein with a forkhead-associated domain*) IKK durch die Induktion der Oligomerisation und Ubiquitinierung von TRAF6 aktiviert (Ea et al, 2004; Takatsuna et al, 2003). Auch in T-Zellen wurde ein ähnlicher Mechanismus der Aktivierung von TRAF6 gefunden. Hier führt eine Oligomerisation von MALT1 (*mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1*) zur Bindung von TRAF6 und Aktivierung der Ubiquitin-Ligase-Aktivität (Sun et al, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden in Experimenten mit TNIK- und MINK1-Knockout-Zellen beide Keimzentrumskinasen als Induktoren der Ubiquitin-Ligase-Aktivität von TRAF6 identifiziert. Ob diese Aktivierung allerdings auch über einen ähnlichen Mechanismus wie bereits für TIFA und MALT1 beschrieben funktioniert, bleibt noch zu klären. Eine mögliche Hypothese wäre, dass die Interaktion von TRAF6 und TNIK zur Oligomerisierung und Autoubiquitinierung führt. Ein ähnlicher Mechanismus kann auch für die homologe Keimzentrumskinase MINK1 angenommen werden.

Prinzipiell können posttranslationale Proteinmodifikationen sowohl zu einer positiven als auch einer negativen Beeinflussung von nachgeschalteten Signalwegen führen. Beispielsweise kann eine Phosphorylierung als ein Signal für das Erzeugen oder Entfernen einer weiteren posttranslationalen Proteinmodifikation dienen oder aber als Bindeplattform für weitere Proteine wirken, welche dann wiederum weitere posttranslationale Proteinmodifikation hervorrufen können. Somit würde eine positive Wechselwirkung von der posttranslationalen Proteinmodifikation ausgehen. Im Fall einer negativen Wechselwirkung könnte die Proteinmodifikation aber zum Beispiel die Erkennungsstelle für eine weitere Proteinmodifikation blockieren und diese zweite posttranslationale Proteinmodifikation verhindern (Hunter, 2007).

Ein weiterer möglicher Mechanismus, durch welchen TNIK in der Aktivierung von TRAF6 beteiligt sein könnte, ist die durch TNIK induzierte Phosphorylierung von TRAF6 an T463 und S507. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in *in vitro* Ubiquitinierungsexperimenten eine verstärkte Ubiquitinierung der Phosphorylierungsmutanten von TRAF6 (T463A und S507A) im Vergleich zu Wildtyp-TRAF6 nach Induktion durch LMP1 auftrat. Dieser inhibitorische Effekt der durch TNIK induzierten Phosphorylierungen von TRAF6 auf die Autoubiquitinierung könnte auf eine negative Rückkopplungsschleife hindeuten. Möglicherweise führen die durch die Kinaseaktivität von TNIK induzierten Phosphorylierungen an TRAF6 zu einem Abschalten der laufenden Signalkaskaden. Diese Annahme würde auch erklären, warum die durch TNIK induzierten Phosphorylierungen von TRAF6 nicht ohne Calyculin A-Behandlung nachgewiesen werden konnte. Die Phosphorylierung von Serin 507 tritt möglicherweise nicht beim Anschalten der Signalwege auf, sondern wird nach und nach zum langsamen Abschalten der Signaltransduktion in der Zelle benötigt. Da das Abschalten sukzessive passiert, könnte die S507-Phosphorylierung stets auf einem niedrigen Level gehalten werden, was die schlechte Nachweisbarkeit erklären könnte. Diese Hypothese müsste in zukünftigen Experimenten näher untersucht werden. Insgesamt deuten die Experimente der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die Phosphorylierung von TRAF6 durch TNIK negative Wechselwirkungen auf die Ubiquitinierung von TRAF6 hat. Eventuell könnte die Phosphorylierung die Oligomerisation der TRAF6-Proteine beeinflussen oder aber auch die Interaktion mit weiteren Signalproteinen senken und somit einen negativen Einfluss auf die K63-verknüpfte Ubiquitinierung von TRAF6 haben. Die Phosphorylierung von TRAF6 könnte auch die E3-Ligase-Aktivität von TRAF6 negativ beeinflussen und somit eine Senkung der Autoubiquitinierung von TRAF6 hervorrufen (*cis*-Ubiquitinierung). Auch wäre es denkbar, dass die Phosphorylierung die Erkennung durch andere E3-Ligasen senkt und somit zur reduzierten Ubiquitinierung von TRAF6 führt (*trans*-Ubiquitinierung). Die beiden durch TNIK induzierten Phosphorylierungsstellen befinden sich in der TRAF-Domäne von TRAF6, welche als wichtige Domäne für das Vermitteln der Oligomerisierung beschrieben wurde (Ha et al, 2009; Pullen et al, 1998). Die Phosphorylierung von T463 und S507 könnten somit die Oligomerisierung inhibieren und dadurch verhindern, dass die TRAF6-Proteine in räumliche Nähe gelangen. Somit ist die

Dimerisierung der RING-Domänen von TRAF6 blockiert, was zur verminderten Ubiquitinierung von TRAF6 führen könnte.

Ein weiterer Punkt, den es in weiterführenden Experimenten also zu klären gilt, ist, ob zunächst die Phosphorylierungen an TRAF6 durch TNIK induziert werden und diese wiederum die Ubiquitinierung beeinflussen oder ob die Prozesse doch in umgekehrter Reihenfolge ablaufen. Es könnte auch zuerst im Rahmen der Aktivierung der Signaltransduktion unter LMP1 eine Autoubiquitinierung von TRAF6 stattfinden, welche wiederum eine Phosphorylierung von TRAF6 begünstigt, weil beispielsweise über die Ubiquitinketten bestimmte Signalmoleküle mit TRAF6 interagieren können. Diese räumliche Nähe verschiedener Signalmoleküle ermöglicht es TNIK sein Substrat TRAF6 zu phosphorylieren. In welcher Abfolge also Ubiquitinierung und Phosphorylierung von TRAF6 auftreten, sollte in weiteren Studien geklärt werden.

Eine weitere Rolle der Phosphorylierung von TRAF6 an T463 und S507 könnte auch in einer inhibitorischen Funktion in Signalwegen liegen. Für MST4, eine weitere Keimzentrumskinase, konnte in Mäusen nachgewiesen werden, dass die durch MST4 induzierte Phosphorylierung von TRAF6 an T463 und T486 die Homooligomerisierung von TRAF6 und somit die Bildung des TRAF6-Signalkomplexes stört (Jiao et al, 2015). MST4 erwies sich als Regulator der inflammatorischen Antworten über die Phosphorylierung von TRAF6 im TLR-Signalweg in Mäusen. In weiterführenden Experimenten sollte auch für die Phosphorylierung von TRAF6 an T463 und S507 getestet werden, ob eine Beeinträchtigung der Oligomerisierung der TRAF-Moleküle stattfindet und dadurch eine Regulation von LMP1 oder anderen Signalwegen stattfinden kann.

Insgesamt konnten TNIK und MINK1 als Kinasen identifiziert werden, die bisher zum Teil unbekannt sekundäre Modifikationen an dem wichtigen Signalmolekül TRAF6 im LMP1-Signalweg induzieren.

5.6 Die Rolle von TNIK in Brustkrebs

Die Keimzentrumskinase TNIK wird in verschiedenen Studien mit der Tumorigenese unterschiedlicher Karzinome in Verbindung gebracht. Deshalb

wurde in der vorliegenden Arbeit ein initiales *Screening* durchgeführt, in welchem in Zelllinien verschiedener Tumorentitäten der Einfluss von TNIK auf das Wachstum und die Migration der Tumorzellen untersucht wurde. Dazu wurde ein Knockdown von TNIK mittels eines *short hairpin*-Systems in allen ausgewählten Zelllinien generiert und anschließend die Zellen auf Apoptose, Proliferation, Soft-Agar-Wachstum und Migrationsverhalten getestet. Keine der getesteten Zelllinien wies dabei in Abwesenheit von TNIK eine Beeinträchtigung in der Proliferation und dem Überleben auf. Allerdings konnte vor allem in der triple-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 eine signifikante Beeinträchtigung des Soft-Agar-Wachstums und der Wundheilungskapazität festgestellt werden, wenn ein Knockdown von TNIK vorlag. Brustkrebs wird klinisch in verschiedene Untergruppen unterteilt. Dabei wird die Expression des Östrogenrezeptors (ER), des Progesteronrezeptors (PR) und die Amplifikation von HER-2/Neu beurteilt. Aufgrund dieser Eigenschaften können Brusttumore als Hormonrezeptor-positive Tumore, HER-2/Neu-amplifizierte Tumore und in Tumore, die keine der Eigenschaften aufweisen, klassifiziert werden (Chavez et al, 2010). Die Tumore, welche keinen der Marker aufweisen, werden als triple-negative Brustkrebszellen (TNBC) bezeichnet. Hormonrezeptor-exprimierende Tumore weisen in der Therapie eine bessere Prognose im Vergleich zu HER-2/Neu-positiven und triple-negativen Tumoren auf (Chavez et al, 2010). Während ER- und PR-positive Tumore zusätzlich zur Chemotherapie mit Medikamenten, welche mit der Hormonproduktion oder Hormonwirkung interferieren und HER-2/Neu-positive Tumore mit Medikamenten, welche HER-2/Neu inhibieren, behandelt werden, ist bei TNBC allein eine Chemotherapie möglich (Chavez et al, 2010). Somit weisen Patienten mit TNBC Tumoren ein erhöhtes Risiko für einen schlechten Ausgang nach der Krebstherapie auf und haben oft einen aggressiveren Verlauf in der Tumorprogression (Chavez et al, 2010).

Interessanterweise wiesen genau diese hoch aggressiven, triple-negativen Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und BT20 im Vergleich zu den weniger aggressiven, luminalen ER- und PR-positiven, HER-2/Neu-negativen Brustkrebszelllinien T47D und MCF-7 eine starke Abhängigkeit der Migrationsfähigkeit und des Soft-Agar-Wachstums von TNIK auf. Die Proliferation und Apoptoserate der Zellen war jedoch durch einen Knockdown von TNIK nicht

beeinflusst. Da der generierte Knockdown von TNIK in MDA-MB-231 Zellen jedoch signifikante Effekte in den durchgeführten Migrationsexperimenten zeigte, ist davon auszugehen, dass die verschlechterte Migrationsfähigkeit und das reduzierte Soft-Agar-Wachstum seine Ursache unabhängig von Proliferation und Apoptose hat. Um die Beobachtungen der verminderten Migration zu bestätigen, wurden mittels der CRISPR/Cas9-Technologie TNIK-Knockout-Klone in den MDA-MB-231 Zellen generiert. Auch der komplette Knockout von TNIK zeigte Defekte in der Migrationsfähigkeit und dem Soft-Agar-Wachstum der Zellen, was die Hypothese einer Abhängigkeit der Tumorzellmigration von TNIK bestätigt. In der vorliegenden Arbeit sind die Ergebnisse für einen auf DNA- und Proteinebene bestätigten kompletten TNIK-Knockout (Klon 5) zu sehen, sowie für einen Knockout-Klon, welcher laut Sequenzierung keinen vollständigen Knockout aufweist (Klon 1). Dieser MDA-MB-231 TNIK-KO cl.1 weist eine Deletion von acht Aminosäuren in der Kinasedomäne von TNIK auf. Allerdings konnte TNIK auf Proteinebene in Klon 1 nicht mehr nachgewiesen werden. Deshalb ist davon auszugehen, dass die generierte Deletion zu einem dysfunktionalen Protein führt, was möglicherweise sofort in der Zelle degradiert wird. Auch die durchgeführten Experimente mit diesem Klon bestätigen diese Annahme, da er sich wie der komplette TNIK-KO cl.5 verhält und klare Defekte im Migrationsverhalten der Zellen aufweist. Andererseits wäre es auch möglich, dass die Deletion der Kinasedomäne zu einem TNIK-Protein führt, welches keine intakte Kinaseaktivität mehr aufweist. Wäre dies der Fall, müsste die Kinaseaktivität von TNIK essenziell für die Wundheilungskapazität der MDA-MB-231 Zellen sein. Um dies zu testen, wurde der TNIK-Inhibitor KY-05009 in Wundheilungsexperimenten eingesetzt. KY 05009 blockiert die Kinaseaktivität von TNIK und wurde bereits in Studien an Lungenkarzinomzellen eingesetzt (Kim et al, 2014). Eine Inhibition von TNIK in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 führte zu keiner Beeinträchtigung der Proliferation und des Überlebens der Zellen, aber interessanterweise zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Wundheilungskapazität und des Soft-Agar-Wachstums. Somit bestätigt der Einsatz des TNIK-Inhibitors KY-05009 die Hypothese, dass die Kinaseaktivität von TNIK für die Migration der Brustkrebszellen notwendig ist.

Für die Kinaseaktivität von TNIK wurde bereits eine Funktion in der Aktivierung des Wnt-Signalweges beschrieben. Es wurde gezeigt, dass die Kinaseaktivität von TNIK

für die transkriptionelle Aktivierung von TCF/LEF im Wnt-Signalweg essenziell ist (Mahmoudi et al, 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte also eine weitere Funktion der Kinasedomäne von TNIK neu identifiziert werden, welche die Beteiligung an der Migrationsfähigkeit von Brustkrebszellen darstellt. Neben dem TNIK-Inhibitor KY-05009 ist noch ein weiterer Inhibitor für TNIK beschrieben. Dabei handelt es sich um den Inhibitor NCB-0846, welcher die ATP-Bindestelle blockiert und an die Gelenkregion der Kinasedomäne von TNIK bindet (Masuda et al, 2016). NCB-0846 führt damit zu einer Inhibition des Wnt-Signalweges und blockiert die Stammzeleigenschaften von kolorektal Tumoren (Masuda et al, 2016). Wenn es sich bei den Migrationseffekten des KY-05009 Inhibitors auf MDA-MB-231 Zellen tatsächlich um einen TNIK-abhängigen Effekt handelt, müssten durch Einsatz von NCB-0846 in den Migrationsexperimenten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. In weiterführenden Experimenten sollte also der Inhibitor NCB-0846 in Soft-Agar-Experimenten und Migrationsassays getestet werden.

Ein weiterer Ansatzpunkt, um zu bestätigen, dass TNIK an der Migration von Brustkrebszellen beteiligt ist, wäre es, Brustkrebszelllinien, welche im Migrationsassay nur schlechte Migrationseigenschaften besitzen, durch eine Überexpression von TNIK zu beschleunigen. Das heißt, besitzt TNIK tatsächlich eine Rolle in der Migration von Tumorzellen, wäre zu erwarten, dass eine sehr hohe Expression von TNIK die Migrationsfähigkeit von langsam migrierenden Zelllinien wie z.B. MCF7 oder T47D Zellen erhöhen kann.

Auf der Suche nach einem möglichen Signalweg, in welchen TNIK während der Migration und Metastasierung eingreifen kann, kommt der TGF β /Smad-Signalweg in Frage. Für die Tumorprogression und die Metastasierung von Brustkrebs spielt die EMT (epitheliale- mesenchymale Transition) eine entscheidende Rolle (Ye et al, 2017). Ein wichtiger Signalweg in der EMT ist der TGF β /Smad-Signalweg (Gupta & Maitra, 2016; Strzyz, 2016). Da auch im TGF β -Signalweg verschiedene Phosphorylierungsprozesse, wie beispielsweise die Phosphorylierung der verschiedenen Smad-Proteine essenziell ist, bestand die Möglichkeit, dass die Keimzentrumskinasen TNIK in diesen Prozess involviert sein könnte (Verrecchia & Mauviel, 2002). Tatsächlich zeigten die triple-negativen Brustkrebszelllinien BT20 und MDA-MB-231 nach Knockdown und nach Knockout von TNIK eine Senkung der Phosphorylierung von Smad2. Die weniger aggressive Brustkrebszelllinie MCF7

zeigte hingegen keine Beeinflussung der Phosphorylierung von Smad2 in Abwesenheit von TNIK. Dies weist darauf hin, dass TNIK vor allem in stark metastasierenden und invasiven Tumoren eine Rolle im Smad-Signalweg zu spielen scheint. Außerdem führte der TNIK-Inhibitor KY-05009 bereits nach drei Stunden Inkubation in den MDA-MB-231 Zellen zu einer signifikanten Senkung der Phosphorylierung von Smad2. Somit scheint die Kinaseaktivität entweder direkt oder indirekt in die Phosphorylierung von Smad2 im TGF β -Signalweg einzugreifen. In verschiedenen Studien wurde beschrieben, dass der TGF β -Typ I-Rezeptor für die Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 verantwortlich ist (Abdollah et al, 1997; Liu et al, 1997; Souchelnytskyi et al, 1997). Somit ist es eher unwahrscheinlich, dass TNIK direkt an der Phosphorylierung von Smad2 beteiligt ist. Möglicherweise könnte TNIK als eine Art Gerüstprotein dienen und somit indirekt an der Bildung eines Signalkomplexes am TGF β -Rezeptor involviert sein. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Kinasefunktion von TNIK gebraucht wird, um weitere Signalkomponenten neben den Smads zu modifizieren und so zu aktivieren. In diesem Fall würde TNIK indirekt auf die Smad-Phosphorylierung im TGF β -Signalweg wirken. Außerdem wäre es möglich, dass eine durch TNIK induzierte Phosphorylierung des TGF β -Rezeptors für die Regulation des TGF β -Signalweges wichtig ist. Es wurde beispielsweise eine Phosphorylierung von TGF β -Typ I-Rezeptor an Serin 165 beschrieben, welche für eine Modulation der TGF β -induzierten zellulären Prozesse notwendig ist (Souchelnytskyi et al, 1996). Eine durch TNIK induzierte Phosphorylierung könnte am TGF β -Rezeptor oder auch an anderen betroffenen Signalproteinen eine Konformationsänderung hervorrufen, welche dann wiederum auf die Aktivierung nachgeschalteter Signalkomponenten wie Smad2 einwirkt.

Eine weitere Hypothese könnte in Bezug auf das Signalprotein TRAF4 aufgestellt werden. Madlen Kunke konnte während ihrer Masterarbeit TRAF4 als ein Substrat der Kinaseaktivität von TNIK identifizieren (Kunke, 2014). Da TRAF4 schon mehrfach mit Brustkrebs in Verbindung gebracht wurde, wäre es denkbar, dass TNIK die Phosphorylierung von TRAF4 induziert und deshalb wichtig für die Tumorigenese der Brustkrebszellen ist. In einer Publikation von 2014 wurde gezeigt, dass TRAF4 in humanem Brustkrebs überexprimiert vorliegt (Zhang et al, 2014b). In Überexpressionsexperimenten mit einem TRAF4-Expressionsvektor und

in Experimenten mit einem durch siRNA vermittelten Knockdown von TRAF4 wurde bestätigt, dass TRAF4 für die Invasion und Migration von Brustkrebszellen eine Rolle spielt (Zhang et al, 2014b). Dabei wurde festgestellt, dass TRAF4 an der Aktivierung des Akt-Signalweges beteiligt ist und über Akt die Zellproliferation fördert (Zhang et al, 2014b). TNIK könnte also in der Aktivierung und Phosphorylierung von TRAF4 beteiligt sein, was wiederum für eine durch Akt induzierte Zellproliferation und somit eventuell auch Migration und Invasivität der Brustkrebszellen notwendig ist. Die gesenkte Wundheilungskapazität der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231, welche in der vorliegenden Arbeit nach Knockdown und Knockout von TNIK beobachtet werden konnte, könnte sich also über diese potenzielle TNIK/TRAF4/Akt-Achse erklären lassen.

Außerdem wurde TRAF4 von Zhang et al. als ein Aktivator des TGF β -Signalweges identifiziert (Zhang et al, 2013). Dabei soll TRAF4 als E3-Ligase für SMURF2, einer wichtigen Ubiquitin-Ligase, die z.B. Smad-Proteine mit Ubiquitin versieht, dienen und führt zur Polyubiquitinierung und anschließender Degradation von SMURF2 (Zhang et al, 2013). Außerdem führte eine TGF β -Stimulation zu einer induzierten K63-verknüpften Ubiquitinierung von TRAF4, was eine Interaktion mit der Signalkomponente TAK1 zur Folge hat (Zhang et al, 2013). TRAF4 konnte als wichtige Komponente für die TGF β -induzierte EMT sowie die Metastasierung von Brusttumoren beschrieben werden (Zhang et al, 2013). Geht man also davon aus, dass TNIK für eine Phosphorylierung von TRAF4 und die damit verbundene Ubiquitinierung und Aktivierung von TRAF4 verantwortlich ist, lässt sich erklären, warum in Abwesenheit von TNIK die Migration und das Soft-Agar-Wachstum von Brustkrebszellen deutlich reduziert ist. In weiterführenden Experimenten könnte der Akt-Signalweg in Bezug auf TNIK sowie der mögliche Bezug zwischen TNIK und TRAF4 im Fokus weiterer Untersuchungen stehen, um die aufgestellten Hypothesen zu testen.

Um weitere Hinweise auf die Auswirkungen eines Knockouts von TNIK in MDA-MB-231 Zellen zu erhalten, wurde eine RNASeq-Analyse angeschlossen. Diese Analyse ermöglicht es, alle signifikant hoch- bzw. herunterregulierten Gene nach einem Knockout von TNIK im Vergleich zu Wildtyp-Zellen zu analysieren. Außerdem können mit Hilfe der durchgeführten IPA (*Ingenuity pathway analysis*) aufwärtsgelegene Regulatoren, molekulare und chemische Interaktionen sowie

zelluläre Phänotypen beobachtet werden und ein Einblick in bestimmte Krankheitsprozesse gewonnen werden.

Unter den am stärksten durch den Knockout von TNIK regulierten kanonischen Signalwegen aus der IPA befinden sich „Granulozyten Adhäsion und Diapedese“ sowie „Agranulozyten Adhäsion und Diapedese“. Die Diapedese stellt einen wichtigen Prozess während der Metastasierung von Tumoren dar. Während des Prozesses der Metastasierung binden die Tumorzellen an das Endothel und können es durchqueren, um den Blutkreislauf zu erreichen (Woodward, 2008). Um das Durchqueren des Endothels zu ermöglichen, sind spezifische Adhäsionsmoleküle, welche durch den Tumor sowie die Endothelzellen exprimiert werden, unerlässlich. In der IPA-Analyse der TNIK-Knockout Zellen sind einige dieser Adhäsionsmoleküle, sowie einige Chemokine durch die Abwesenheit von TNIK signifikant reguliert. Der Vorgang der Diapedese stellt sich somit als hoch signifikant verändert durch die Abwesenheit von TNIK dar. Beispielsweise ist die Expression der MMP2 (*matrix metalloprotease 2*) durch einen Knockout von TNIK signifikant gesenkt. MMP2 ist ein Enzym, welches Komponenten der extrazellulären Matrix degradieren kann und spielt dabei in zellulären Prozessen wie der embryonalen Entwicklung, der Reproduktion, aber auch in krankhaften Prozessen wie der Zellmigration während der Metastasierung von Tumoren eine Rolle (Jeziarska & Motyl, 2009). Für Hormon-Rezeptor-negative Tumore wie die MDA-MB-231 Zellen wird postuliert, dass ein niedriges Level an MMP2 zu einer verbesserten Prognose für das Überleben der Patienten führt und die Blockierung der Sekretion und Aktivierung von MMP2 die Metastasierung von Brusttumoren senken könnte (Jeziarska & Motyl, 2009). Wenn TNIK auch an dem Prozess der Expression von MMP2 beteiligt ist, würde TNIK ein interessantes Ziel für Krebstherapien darstellen, zumal ein Knockout von TNIK in Mäusen zu keiner Beeinträchtigung des Überlebens der Tiere führt (Coba et al, 2012).

Ein anderer Kandidat, der durch einen Knockout von TNIK stark herunterreguliert in den MDA-MB-231 Zellen vorliegt, ist das intrazelluläre Zelloberflächenmolekül 1 (ICAM1). Auch ICAM1 wurde bereits mehrmals in Bezug auf Brustkrebs publiziert und macht TNIK somit zu einem interessanten Ziel für die Entwicklung neuer Therapieansätze gegen Brusttumore. In einer Studie konnte in der hochinvasiven Brustkrebszelllinie MDA-MB-435 gezeigt werden, dass der Knockdown von ICAM1

mittels siRNA zu einer signifikanten Reduktion der *in vitro* Invasion in *Boyden Chamber*-Experimenten führt, während die Zellproliferation unbeeinflusst bleibt (Rosette et al, 2005). Roland et al. stellten eine Hypothese auf, wie ICAM1 in die Migration von Tumorzellen eingreifen könnte. Solide Tumore können über MUC-1 an ICAM1 von Endothelzellen binden, was zu einer Hochregulation von ICAM1 im Tumorgewebe führt (Roland et al, 2007). Dies hat die Freisetzung von chemischen Signalstoffen und Chemokinen zur Folge, welche Makrophagen und Neutrophile rekrutieren (Roland et al, 2007). Die Neutrophilen können degranulieren und Elastasen freisetzen, welche durch das Aufbrechen von endovaskulären und endolymphatischen Gewebe die Zellmigration unterstützen (Roland et al, 2007). Wenn ein Knockout von TNIK also, wie in unserer RNASeq-Analyse identifiziert, eine signifikante Senkung von ICAM1 zur Folge hat, könnte man in einem therapeutischen Ansatz versuchen, über TNIK die Expression ICAM1 und somit die Metastasierung von Tumorzellen gezielt zu senken.

Auch in der Kategorie „Krankheit und Funktion“ der IPA-Analyse gehören zu den signifikantesten Gruppen einige, welche unsere Hypothese, dass TNIK an der Migration und Metastasierung von Brustkrebszellen beteiligt ist, bestätigen. Beispielsweise ist die am stärksten regulierte Gruppe die „zelluläre Bewegung“, aber auch „Krebs“, „Tumormorphologie“ und „zelluläres Wachstum und Proliferation“ zählen zu den hoch signifikanten Treffern. Die RNASeq-Analyse bestätigte somit insgesamt unsere experimentelle These, dass TNIK in der Migration von Brustkrebszellen beteiligt ist. In der Zukunft kann über die Ergebnisse der RNASeq-Analyse der genaue Mechanismus, über welchen TNIK einen Einfluss auf die Tumorigenese hat, identifiziert und untersucht werden. Es könnten verschiedene signifikant veränderte Signalwege auf ihre Abhängigkeit von TNIK in der Karzinogenese von Brusttumoren getestet werden.

Um die durchgeführte RNASeq-Analyse zu bestätigen, wurde in den MDA-MB-231 Wildtyp-Zellen und den Knockout-Zellen eine PCR-Analyse auf ausgewählte Zielgene angeschlossen. Zwei unterschiedliche RNA-Präparationen konnten dabei bestätigen, dass der Knockout von TNIK alle bis auf ein getestetes Gen herunterreguliert. Nur FGFR2 (*fibroblast growth factor receptor 2*) wurde in der qPCR nicht signifikant durch einen Knockout von TNIK beeinflusst, obwohl dies in der RNASeq-Analyse der Fall war.

Insgesamt war es in der vorliegenden Arbeit möglich, TNIK als potenzielles Ziel für einen therapeutischen Ansatz zur Behandlung von triple-negativen Brusttumoren zu identifizieren. In weiteren Experimenten soll nun an diese initialen Erkenntnisse angeknüpft werden, um die genauen molekularen Mechanismen von TNIK in der Karzinogenese von Brusttumoren zu entschlüsseln.

5.7 Ausblick

Die Aktivierung von JNK im LMP1-Signalweg konnte erstmals als abhängig von IKK2 und TPL2 beschrieben werden. Außerdem scheint TAK1 unabhängig von seiner Kinaseaktivität für eine Aktivierung von NF- κ B in der LMP1-Signalkaskade verantwortlich zu sein. Wie aber nun unabhängig von TAK1 IKK2 im LMP1-Signalweg aktiviert wird, um den kanonischen NF- κ B anzuschalten und wie im Detail TAK1 in einer Aktivierung von JNK beteiligt ist, muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden, um die molekularen Mechanismen der LMP1-Signalkaskade endgültig zu entschlüsseln.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Phosphorylierung von TRAF6 an Serin 507 zum ersten Mal durch LMP1 induziert und als abhängig von TNIK und MINK1 beschrieben werden. Bisher konnte jedoch die molekulare Funktion dieser durch TNIK und MINK1 vermittelten Phosphorylierung noch nicht aufgeklärt werden, was es in zukünftigen Experimenten zu adressieren gilt.

Fasst man die bisher verfügbaren Daten über den Einfluss von TNIK und MINK1 in verschiedenen Signalwegen zusammen, lassen sich viele Parallelen erkennen. Ob diese Parallelen auch auf molekularer Ebene erhalten bleiben oder sich zusätzlich abweichende Mechanismen in der Signaltransduktion von TNIK und MINK1 ergeben, gilt es in Zukunft näher zu analysieren. In zukünftigen Untersuchungen sollte in jedem Fall in der Versuchsplanung die möglicherweise überlappende Funktion der beiden Keimzentrumskinasen bedacht werden. Somit sollte die Migration von Brustkrebszellen auch auf eine Abhängigkeit von MINK1 getestet werden. Möglicherweise führt ein Doppelknockout von TNIK und MINK1 zu einer Verstärkung der beobachteten, migratorischen Effekte.

Die durchgeführte Transkriptom-Analyse der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 gibt weitere wichtige Ansatzpunkte, um die genaue Funktion von TNIK in der Migration und Metastasierung von Brustkrebszellen zu identifizieren. In der Zukunft soll der

Diskussion

zugrunde liegende molekulare Mechanismus untersucht werden, um potenzielle Angriffspunkte in der Behandlung von triple-negativen Brusttumoren zu erhalten.

Literaturverzeichnis

Abdollah S, Macias-Silva M, Tsukazaki T, Hayashi H, Attisano L, Wrana JL (1997) TbetaRI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 27678-27685

Amon W, Farrell PJ (2005) Reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *Reviews in Medical Virology* **15**: 149-156

Andrieu G, Tran AH, Strissel KJ, Denis GV (2016) BRD4 Regulates Breast Cancer Dissemination through Jagged1/Notch1 Signaling. *Cancer Research* **76**: 6555-6567

Aoki M, Hamada F, Sugimoto T, Sumida S, Akiyama T, Toyoshima K (1993) The human cot proto-oncogene encodes two protein serine/threonine kinases with different transforming activities by alternative initiation of translation. *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 22723-22732

Arcipowski KM, Stunz LL, Graham JP, Kraus ZJ, Vanden Bush TJ, Bishop GA (2011) Molecular mechanisms of TNFR-associated factor 6 (TRAF6) utilization by the oncogenic viral mimic of CD40, latent membrane protein 1 (LMP1). *The Journal of Biological Chemistry* **286**: 9948-9955

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. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 51134-51142

Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA (1998) EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* **9**: 395-404

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

Beinke S, Deka J, Lang V, Belich MP, Walker PA, Howell S, Smerdon SJ, Gamblin SJ, Ley SC (2003) NF- κ B1 p105 Negatively Regulates TPL-2 MEK Kinase Activity. *Molecular and Cellular Biology* **23**: 4739-4752

Boehm D, Gewurz BE, Kieff E, Cahir-McFarland E (2010) Epstein-Barr latent membrane protein 1 transformation site 2 activates NF-kappaB in the absence of NF-kappaB essential modifier residues 133-224 or 373-419. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 18103-18108

Borowicz S, Van Scoyk M, Avasarala S, Karuppusamy Rathinam MK, Tauler J, Bikkavilli RK, Winn RA (2014) The soft agar colony formation assay. *Journal of Visualized Experiments* **92**: e51998

Bradley JR, Pober JS (2001) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* **20**: 6482-6491

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. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 19777-19784

Cahir-McFarland ED, Carter K, Rosenwald A, Giltane 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. *Journal of Virology* **78**: 4108-4119

Campbell TM, Castro MAA, de Santiago I, Fletcher MNC, Halim S, Prathalingam R, Ponder BAJ, Meyer KB (2016) FGFR2 risk SNPs confer breast cancer risk by augmenting oestrogen responsiveness. *Carcinogenesis* **37**: 741-750

Ceci JD, Patriotis CP, Tsatsanis C, Makris AM, Kovatch R, Swing DA, Jenkins NA, Tschlis PN, Copeland NG (1997) Tpl-2 is an oncogenic kinase that is activated by carboxy-terminal truncation. *Genes & Development* **11**: 688-700

Chan H, Reed JC (2005) TRAF-dependent association of protein kinase Tpl2/COT1 (MAP3K8) with CD40. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **328**: 198-205

Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S (2010) Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Disease* **32**: 35-48

Chen ZJ (2005) Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nature Cell Biology* **7**: 758-765

Cho H, Lim SJ, Won KY, Bae GE, Kim GY, Min JW, Noh BJ (2016) Eosinophils in Colorectal Neoplasms Associated with Expression of CCL11 and CCL24. *Journal of Pathology and Translational Medicine* **50**: 45-51

Cho J, Melnick M, Solidakis GP, Tschlis PN (2005) Tpl2 (tumor progression locus 2) phosphorylation at Thr290 is induced by lipopolysaccharide via an Ikappa-B Kinase-beta-dependent pathway and is required for Tpl2 activation by external signals. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 20442-20448

Chod J, Zavadova E, Halaska MJ, Strnad P, Fucikova T, Rob L (2008) Preoperative transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) plasma levels in operable breast cancer patients. *European Journal of Gynaecological Oncology* **29**: 613-616

Chon HJ, Lee Y, Bae KJ, Byun BJ, Kim SA, Kim J (2016) Traf2- and Nck-interacting kinase (TNIK) is involved in the anti-cancer mechanism of dovitinib in human multiple myeloma IM-9 cells. *Amino Acids* **48**: 1591-1599

Chowdhury FZ, Estrada LD, Murray S, Forman J, Farrar JD (2014) Pharmacological inhibition of TPL2/MAP3K8 blocks human cytotoxic T lymphocyte effector functions. *PloS one* **9**: e92187

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. *Journal of Cell Science* **115**: 679-688

Coba MP, Komiyama NH, Nithianantharajah J, Kopanitsa MV, Indersmitten T, Skene NG, Tuck EJ, Fricker DG, Elsegood KA, Stanford LE, Afinowi NO, Saksida LM, Bussey TJ, O'Dell TJ, Grant SG (2012) TNiK is required for postsynaptic and nuclear signaling pathways and cognitive function. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **32**: 13987-13999

Dalal BI, Keown PA, Greenberg AH (1993) Immunocytochemical localization of secreted transforming growth factor-beta 1 to the advancing edges of primary tumors and to lymph node metastases of human mammary carcinoma. *The American Journal of Pathology* **143**: 381-389

Dan I, Watanabe NM, Kusumi A (2001) The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends in Cell Biology* **11**: 220-230

Das S, Cho J, Lambertz I, Kelliher MA, Eliopoulos AG, Du K, Tsihchlis PN (2005) Tpl2/cot signals activate ERK, JNK, and NF-kappaB in a cell-type and stimulus-specific manner. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 23748-23757

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. *Journal of Virology* **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. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 3694-3704

Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, Karin M (1999) Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* **284**: 309-313

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. *Molecular and Cellular Biology* **16**: 7098-7108

Diehl V, Henle G, Henle W, Kohn G (1968) Demonstration of a herpes group virus in cultures of peripheral leukocytes from patients with infectious mononucleosis. *Journal of Virology* **2**: 663-669

Ding W, Fan XL, Xu X, Huang JZ, Xu SH, Geng Q, Li R, Chen D, Yan GR (2015) Epigenetic silencing of ITGA2 by MiR-373 promotes cell migration in breast cancer. *PloS one* **10**: e0135128

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 Research* **63**: 2982-2989

Dudziak D, Kieser A, Dirmeier U, Nimmerjahn F, Berchtold S, Steinkasserer A, Marschall G, Hammerschmidt W, Laux G, Bornkamm GW (2003) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus induces CD83 by the NF-kappaB signaling pathway. *Journal of Virology* **77**: 8290-8298

Dumitru CD, Ceci JD, Tsatsanis C, Kontoyiannis D, Stamatakis K, Lin JH, Patriotis C, Jenkins NA, Copeland NG, Kollias G, Tschlis PN (2000) TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* **103**: 1071-1083

Ea CK, Sun L, Inoue J, Chen ZJ (2004) TIFA activates IkappaB kinase (IKK) by promoting oligomerization and ubiquitination of TRAF6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 15318-15323

Eliopoulos AG, Davies C, Blake SSM, Murray P, Najafipour S, Tschlis PN, Young LS (2002) The Oncogenic Protein Kinase Tpl-2/Cot Contributes to Epstein-Barr Virus-Encoded Latent Infection Membrane Protein 1-Induced NF-kB Signaling Downstream of TRAF2. *Journal of Virology* **76**: 4567-4579

Eliopoulos AG, Rickinson AB (1998) Epstein-Barr virus: LMP1 masquerades as an active receptor. *Current Biology : CB* **8**: R196-198

Eliopoulos AG, Wang CC, Dumitru CD, Tschlis PN (2003) Tpl2 transduces CD40 and TNF signals that activate ERK and regulates IgE induction by CD40. *The EMBO Journal* **22**: 3855-3864

Eliopoulos AG, Young LS (1998) Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene* **16**: 1731-1742

Epstein MA, Achong BG, Barr YM (1964) Virus Particles in cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* **1**: 702-703

Ermolaeva MA, Michallet MC, Papadopoulou N, Utermohlen O, Kranidioti K, Kollias G, Tschopp J, Pasparakis M (2008) Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nature Immunology* **9**: 1037-1046

Evans AS (1972) Clinical syndromes associated with EB virus infection. *Advances in Internal Medicine* **18**: 77-93

Fan Y, Yu Y, Shi Y, Sun W, Xie M, Ge N, Mao R, Chang A, Xu G, Schneider MD, Zhang H, Fu S, Qin J, Yang J (2010) Lysine 63-linked Polyubiquitination of TAK1 at Lysine 158 Is Required for Tumor Necrosis Factor α - and Interleukin-1 β -induced IKK/NF- κ B and JNK/AP-1 Activation. *The Journal of Biological Chemistry* **285**: 5347-5360

Fleming Y, Armstrong CG, Morrice N, Paterson A, Goedert M, Cohen P (2000) Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7. *The Biochemical Journal* **352 Pt 1**: 145-154

Fletcher MN, Castro MA, Wang X, de Santiago I, O'Reilly M, Chin SF, Rueda OM, Caldas C, Ponder BA, Markowitz F, Meyer KB (2013) Master regulators of FGFR2 signalling and breast cancer risk. *Nature Communications* **4**: 2464

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- κ B activation. *Oncogene* **15**: 1851-1858

Fu CA, Shen M, Huang BC, Lasaga J, Payan DG, Luo Y (1999) TNIK, a novel member of the germinal center kinase family that activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and regulates the cytoskeleton. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 30729-30737

Ganapathy V, Ge R, Grazioli A, Xie W, Banach-Petrosky W, Kang Y, Lonning S, McPherson J, Yingling JM, Biswas S, Mundy GR, Reiss M (2010) Targeting the Transforming Growth Factor-beta pathway inhibits human basal-like breast cancer metastasis. *Molecular Cancer* **9**: 122

Gantke T, Sriskantharajah S, Ley SC (2011a) Regulation and function of TPL-2, an IkappaB kinase-regulated MAP kinase kinase kinase. *Cell Research* **21**: 131-145

Gantke T, Sriskantharajah S, Ley SC (2011b) Regulation and function of TPL-2, an IkB kinase-regulated MAP kinase kinase kinase. *Cell Research* **21**: 131-145

Gantke T, Sriskantharajah S, Sadowski M, Ley SC (2012) IkappaB kinase regulation of the TPL-2/ERK MAPK pathway. *Immunological Reviews* **246**: 168-182

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- κ B activation is essential for Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 TES2/CTAR2 gene regulation. *Journal of Virology* **85**: 6764-6773

Gewurz BE, Towfic F, Mar JC, Shinnars NP, Takasaki K, Zhao B, Cahir-McFarland ED, Quackenbush J, Xavier RJ, Kieff E (2012) Genome-wide siRNA screen for mediators of NF- κ B activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 2467-2472

Giannakis M, Hodis E, Jasmine Mu X, Yamauchi M, Rosenbluh J, Cibulskis K, Saksena G, Lawrence MS, Qian ZR, Nishihara R, Van Allen EM, Hahn WC, Gabriel SB, Lander ES, Getz G, Ogino S, Fuchs CS, Garraway LA (2014) RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers. *Nature Genetics* **46**: 1264-1266

Giehler F (2012) Etablierung der Interaktion des viralen Onkoproteins LMP1 mit den zellulären Signalproteinen der TRAF- Proteinfamilie als Zielstruktur für Inhibitoren. Doktorarbeit Thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München

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. *The EMBO Journal* **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. *The EMBO Journal* **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. *The Journal of General Virology* **36**: 59-74

Greenfeld H, Takasaki K, Walsh MJ, Ersing I, Bernhardt K, Ma Y, Fu B, Ashbaugh CW, Cabo J, Mollo SB, Zhou H, Li S, Gewurz BE (2015) TRAF1 Coordinates Polyubiquitin Signaling to Enhance Epstein-Barr Virus LMP1-Mediated Growth and Survival Pathway Activation. *PLoS Pathogens* **11**: e1004890

Gupta S, Maitra A (2016) EMT: Matter of Life or Death? *Cell* **164**: 840-842

Ha H, Han D, Choi Y (2009) TRAF-mediated TNFR-family signaling. *Current Protocols in Immunology* **Chapter 11**: 11.19D.11-11.19D.19

Hadian K, Griesbach RA, Dornauer S, Wanger TM, Nagel D, Metlitzky M, Beisker W, Schmidt-Supprian M, Krappmann D (2011) NF-kappaB essential modulator (NEMO) interaction with linear and lys-63 ubiquitin chains contributes to NF-kappaB activation. *The Journal of Biological Chemistry* **286**: 26107-26117

Hamidi A, von Bulow V, Hamidi R, Winssinger N, Barluenga S, Heldin CH, Landstrom M (2012) Polyubiquitination of transforming growth factor beta (TGFbeta)-associated kinase 1 mediates nuclear factor-kappaB activation in response to different inflammatory stimuli. *The Journal of Biological Chemistry* **287**: 123-133

Handoyo H, Stafford MJ, McManus E, Baltzis D, Peggie M, Cohen P (2009) IRAK1-independent pathways required for the interleukin-1-stimulated activation of the Tpl2 catalytic subunit and its dissociation from ABIN2. *The Biochemical Journal* **424**: 109-118

Hannigan A, Wilson JB (2010) Evaluation of LMP1 of Epstein-Barr virus as a therapeutic target by its inhibition. *Molecular Cancer* **9**: 184

Hatziapostolou M, Polytaichou C, Panutsopoulos D, Covic L, Tsihliis PN (2008) Proteinase-activated receptor-1-triggered activation of tumor progression locus-2 promotes actin cytoskeleton reorganization and cell migration. *Cancer Research* **68**: 1851-1861

Hatzivassiliou E, Miller WE, Raab-Traub N, Kieff E, Mosialos G (1998) A fusion of the EBV latent membrane protein-1 (LMP1) transmembrane domains to the CD40 cytoplasmic domain is similar to LMP1 in constitutive activation of epidermal growth factor receptor expression, nuclear factor-kappa B, and stress-activated protein kinase. *Journal of Immunology* **160**: 1116-1121

Hayden MS, Ghosh S (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**: 344-362

Heissmeyer V, Krappmann D, Wulczyn FG, Scheidereit C (1999) NF-kappaB p105 is a target of IkappaB kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes. *The EMBO Journal* **18**: 4766-4778

Hinz M, Scheidereit C (2014) The I κ B kinase complex in NF- κ B regulation and beyond. *EMBO Reports* **15**: 46-61

Hirata K, Taki H, Shinoda K, Hounoki H, Miyahara T, Tobe K, Ogawa H, Mori H, Sugiyama E (2010) Inhibition of tumor progression locus 2 protein kinase suppresses receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-induced osteoclastogenesis through down-regulation of the c-Fos and nuclear factor of activated T cells c1 genes. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **33**: 133-137

Hirata Y, Takahashi M, Morishita T, Noguchi T, Matsuzawa A (2017) Post-Translational Modifications of the TAK1-TAB Complex. *International Journal of Molecular Sciences* **18**: E205

Holliday DL, Speirs V (2011) Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research : BCR* **13**: 215

Horbelt D, Denkis A, Knaus P (2012) A portrait of Transforming Growth Factor beta superfamily signalling: Background matters. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **44**: 469-474

Hostager BS, Haxhinasto SA, Rowland SL, Bishop GA (2003) Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2)-deficient B lymphocytes reveal novel roles for TRAF2 in CD40 signaling. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 45382-45390

Huang G, Shi LZ, Chi H (2009) Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: signal integration, propagation and termination. *Cytokine* **48**: 161-169

Huang Q, Yang J, Lin Y, Walker C, Cheng J, Liu ZG, Su B (2004) Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3. *Nature Immunology* **5**: 98-103

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

Hunter T (2007) The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Molecular Cell* **28**: 730-738

Hussain NK, Hsin H, Haganir RL, Sheng M (2010) MINK and TNIK differentially act on Rap2-mediated signal transduction to regulate neuronal structure and AMPA receptor function. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* **30**: 14786-14794

Ishigami T, Uzawa K, Fushimi K, Saito K, Kato Y, Nakashima D, Higo M, Kouzu Y, Bukawa H, Kawata T, Ito H, Tanzawa H (2008) Inhibition of ICAM2 induces radiosensitization in oral squamous cell carcinoma cells. *British Journal of Cancer* **98**: 1357-1365

Ishihara H, Martin BL, Brautigan DL, Karaki H, Ozaki H, Kato Y, Fusetani N, Watabe S, Hashimoto K, Uemura D, et al. (1989) Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **159**: 871-877

Israel A (2010) The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**: a000158

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 12592-12597

Jeziarska A, Motyl T (2009) Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* **15**: Ra32-40

Jiao S, Zhang Z, Li C, Huang M, Shi Z (2015) The kinase MST4 limits inflammatory responses through direct phosphorylation of the adaptor TRAF6. *Nature Immunology* **16**: 246-257

Jin J, Jung HY, Wang Y, Xie J, Yeom YI, Jang JJ, Lee KB (2014) Nuclear expression of phosphorylated TRAF2- and NCK-interacting kinase in hepatocellular carcinoma is associated with poor prognosis. *Pathology, Research and Practice* **210**: 621-627

Jing Y, Jia D, Wong CM, Oi-Lin Ng I, Zhang Z, Liu L, Wang Q, Zhao F, Li J, Yao M, Wu X, He X (2014) SERPINA5 inhibits tumor cell migration by modulating the fibronectin-integrin beta1 signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Molecular Oncology* **8**: 366-377

Kanayama A, Seth RB, Sun L, Ea CK, Hong M, Shaito A, Chiu YH, Deng L, Chen ZJ (2004) TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Molecular Cell* **15**: 535-548

Kang Y, He W, Tulley S, Gupta GP, Serganova I, Chen CR, Manova-Todorova K, Blasberg R, Gerald WL, Massague J (2005) Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 13909-13914

Karin M, Gallagher E (2009) TNFR signaling: ubiquitin-conjugated TRAF6 signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes. *Immunological Reviews* **228**: 225-240

Kavathas P, Bach FH, DeMars R (1980) Gamma ray-induced loss of expression of HLA and glyoxalase I alleles in lymphoblastoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**: 4251-4255

Kawabe H, Neeb A, Dimova K, Young SM, Jr., Takeda M, Katsurabayashi S, Mitkovski M, Malakhova OA, Zhang DE, Umikawa M, Kariya K, Goebbels S, Nave KA, Rosenmund C, Jahn O, Rhee J, Brose N (2010) Regulation of Rap2A by the ubiquitin ligase Nedd4-1 controls neurite development. *Neuron* **65**: 358-372

Kaye KM, Izumi KM, Kieff E (1993) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 9150-9154

Kemp BE, Pearson RB (1990) Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends in Biochemical Sciences* **15**: 342-346

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. *The EMBO Journal* **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. *The EMBO Journal* **16**: 6478-6485

Kieser A, Sterz KR (2015) The Latent Membrane Protein 1 (LMP1). *Current Topics in Microbiology and Immunology* **391**: 119-149

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. *The EMBO Journal* **17**: 1700-1709

Kim J, Moon SH, Kim BT, Chae CH, Lee JY, Kim SH (2014) A novel aminothiazole KY-05009 with potential to inhibit Traf2- and Nck-interacting kinase (TNIK) attenuates TGF-beta1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in human lung adenocarcinoma A549 cells. *PLoS one* **9**: e110180

Klein G, Klein E, Kashuba E (2010) Interaction of Epstein-Barr virus (EBV) with human B-lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **396**: 67-73

Kostler WJ, Tomek S, Brodowicz T, Budinsky AC, Flamm M, Hejna M, Krainer M, Wiltschke C, Zielinski CC (2001) Soluble ICAM-1 in breast cancer: clinical significance and biological implications. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII* **50**: 483-490

Krappmann D, Scheidereit C (2005) A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of I kappa B kinase pathways. *EMBO Reports* **6**: 321-326

Krcova Z, Ehrmann J, Krejci V, Eliopoulos A, Kolar Z (2008) Tpl-2/Cot and COX-2 in breast cancer. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* **152**: 21-25

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 11963-11968

Kunke M (2014) Molekulare Funktionen der Enzymaktivität der Keimzentrumskinasen TNIK bei der Signaltransduktion im TRAF6/TAK1/IKK-Komplex. Masterarbeit Thesis, Technische Universität Dresden

Kuppers R (2003) B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nature Reviews Immunology* **3**: 801-812

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

Lamothe B, Besse A, Campos AD, Webster WK, Wu H, Darnay BG (2007) Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I kappa B kinase activation. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 4102-4112

Lang DJ, Garruto RM, Gajdusek DC (1977) Early acquisition of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus antibody in several isolated Melanesian populations. *American Journal of Epidemiology* **105**: 480-487

Lang V, Symons A, Watton SJ, Janzen J, Soneji Y, Beinke S, Howell S, Ley SC (2004) ABIN-2 Forms a Ternary Complex with TPL-2 and NF- κ B1 p105 and Is Essential for TPL-2 Protein Stability. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 5235-5248

Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Eder T, Wascher TC, Paulweber B, Clar H, Hofmann G, Samonigg H, Krippel P (2006) Integrin alpha-2 and beta-3 gene polymorphisms and breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment* **97**: 67-72

Larhammar M, Huntwork-Rodriguez S, Rudhard Y, Sengupta-Ghosh A, Lewcock JW (2017) The Ste20 family kinases MAP4K4, MINK1 and TNIK, converge to regulate stress induced JNK signaling in neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **37**: 11074-11084

Lee HW, Choi HY, Joo KM, Nam DH (2015) Tumor progression locus 2 (Tpl2) kinase as a novel therapeutic target for cancer: double-sided effects of Tpl2 on cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **16**: 4471-4491

Lee Y, Jung JI, Park KY, Kim SA, Kim J (2017) Synergistic inhibition effect of TNIK inhibitor KY-05009 and receptor tyrosine kinase inhibitor dovitinib on IL-6-induced proliferation and Wnt signaling pathway in human multiple myeloma cells. *Oncotarget* **8**: 41091-41101

Li J, Zhang M, He T, Li H, Cao T, Zheng L, Guo M (2017) Methylation of DACT2 promotes breast cancer development by activating Wnt signaling. *Scientific Reports* **7**: 3325

Liang K, Liu T, Chu N, Kang J, Zhang R, Yu Y, Li D, Lu D (2015) KLF8 is required for bladder cancer cell proliferation and migration. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **62**: 628-633

Liebowitz D, Wang D, Kieff E (1986) Orientation and patching of the latent infection membrane protein encoded by Epstein-Barr virus. *Journal of Virology* **58**: 233-237

Lim KL, Chew KC, Tan JM, Wang C, Chung KK, Zhang Y, Tanaka Y, Smith W, Engelender S, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM (2005) Parkin mediates nonclassical, proteasomal-independent ubiquitination of synphilin-1: implications for Lewy body formation. *The Journal of neuroscience : The official Journal of the Society for Neuroscience* **25**: 2002-2009

Liu F, Xia Y, Parker AS, Verma IM (2012) IKK Biology. *Immunological Reviews* **246**: 239-253

Liu X, Sun Y, Constantinescu SN, Karam E, Weinberg RA, Lodish HF (1997) Transforming growth factor beta-induced phosphorylation of Smad3 is required for growth inhibition and transcriptional induction in epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 10669-10674

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408

Lu Y, Wang L, Li H, Li Y, Ruan Y, Lin D, Yang M, Jin X, Guo Y, Zhang X, Quan C (2017) SMAD2 Inactivation Inhibits CLDN6 Methylation to Suppress Migration and Invasion of Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* **18**: E1863

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 141-146

Mahmoudi T, Li VS, Ng SS, Taouatas N, Vries RG, Mohammed S, Heck AJ, Clevers H (2009) The kinase TNIK is an essential activator of Wnt target genes. *The EMBO Journal* **28**: 3329-3340

Marchini A, Longnecker R, Kieff E (1992) Epstein-Barr virus (EBV)-negative B-lymphoma cell lines for clonal isolation and replication of EBV recombinants. *Journal of Virology* **66**: 4972-4981

Masuda M, Uno Y, Ohbayashi N, Ohata H, Mimata A, Kukimoto-Niino M, Moriyama H, Kashimoto S, Inoue T, Goto N, Okamoto K, Shirouzu M, Sawa M (2016) TNIK inhibition abrogates colorectal cancer stemness. *Nature Communications* **7**: 12586

Megas C, Hatzivassiliou EG, Yin Q, Marinopoulou E, Hadweh P, Vignali DA, Mosialos G (2011) Mutational analysis of TRAF6 reveals a conserved functional role of the RING dimerization interface and a potentially necessary but insufficient role of RING-dependent TRAF6 polyubiquitination towards NF-kappaB activation. *Cellular Signalling* **23**: 772-777

Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A (1997) IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* **278**: 860-866

Meulmeester E, Ten Dijke P (2011) The dynamic roles of TGF-beta in cancer. *The Journal of Pathology* **223**: 205-218

Mikryukov A, Moss T (2012) Agonistic and antagonistic roles for TNIK and MINK in non-canonical and canonical Wnt signalling. *PloS one* **7**: e43330

Mitchell T, Sugden B (1995) Stimulation of NF-kappa B-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus. *Journal of Virology* **69**: 2968-2976

Moorthy RK, Thorley-Lawson DA (1993) All three domains of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein LMP-1 are required for transformation of rat-1 fibroblasts. *Journal of Virology* **67**: 1638-1646

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**: 55-63

Moustakas A, Heldin CH (2013) Coordination of TGF-beta signaling by ubiquitylation. *Molecular Cell* **51**: 555-556

Niedobitek G (1999) The Epstein-Barr virus: a group 1 carcinogen? *Virchows Archiv : An International Journal of Pathology* **435**: 79-86

Niedobitek G, Meru N, Delecluse HJ (2001) Epstein-Barr virus infection and human malignancies. *International Journal of Experimental Pathology* **82**: 149-170

Nimmerjahn F, Dudziak D, Dirmeier U, Hobom G, Riedel A, Schlee M, Staudt LM, Rosenwald A, Behrens U, Bornkamm GW, Mautner J (2004) Active NF-kappaB signalling is a prerequisite for influenza virus infection. *The Journal of General Virology* **85**: 2347-2356

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. *Molecular and Cellular Biology* **28**: 6536-6546

Obermeier A (2012) Secondary modifications in LMP1 signal transduction mediated by the germinal center kinase TNIK. Masterarbeit Thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München

Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S (2011) Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nature Immunology* **12**: 695-708

Ohara R, Hirota S, Onoue H, Nomura S, Kitamura Y, Toyoshima K (1995) Identification of the cells expressing cot proto-oncogene mRNA. *Journal of Cell Science* **108 (Pt 1)**: 97-103

Pang MF, Georgoudaki AM, Lambut L, Johansson J, Tabor V, Hagikura K, Jin Y, Jansson M, Alexander JS, Nelson CM, Jakobsson L, Betsholtz C, Sund M (2016) TGF-beta1-induced EMT promotes targeted migration of breast cancer cells through the lymphatic system by the activation of CCR7/CCL21-mediated chemotaxis. *Oncogene* **35**: 748-760

Papageorgis P, Lambert AW, Ozturk S, Gao F, Pan H, Manne U, Alekseyev YO, Thiagalingam A, Abdolmaleky HM, Lenburg M, Thiagalingam S (2010) Smad signaling is required to maintain epigenetic silencing during breast cancer progression. *Cancer Research* **70**: 968-978

Papoutsopoulou S, Symons A, Tharmalingham T, Belich MP, Kaiser F, Kioussis D, O'Garra A, Tybulewicz V, Ley SC (2006) ABIN-2 is required for optimal activation of Erk MAP kinase in innate immune responses. *Nature Immunology* **7**: 606-615

Park MH, Hong JT (2016) Roles of NF-kappaB in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells* **5**: 15

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

Pasqualucci L, Khiabani H, Fangazio M, Vasishtha M, Messina M, Holmes AB, Ouillette P, Trifonov V, Rossi D, Tabbo F, Ponzoni M, Chadburn A, Murty VV, Bhagat G, Gaidano G, Inghirami G, Malek SN, Rabadan R, Dalla-Favera R (2014) Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell Reports* **6**: 130-140

Petersen M, Pardali E, van der Horst G, Cheung H, van den Hoogen C, van der Pluijm G, Ten Dijke P (2010) Smad2 and Smad3 have opposing roles in breast cancer bone metastasis by differentially affecting tumor angiogenesis. *Oncogene* **29**: 1351-1361

Polakis P (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes & Development* **14**: 1837-1851

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

Rincon M, Davis RJ (2009) Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. *Immunological Reviews* **228**: 212-224

Robinson MJ, Beinke S, Kouroumalis A, Tsihchlis PN, Ley SC (2007) Phosphorylation of TPL-2 on serine 400 is essential for lipopolysaccharide activation of extracellular signal-regulated kinase in macrophages. *Molecular and Cellular Biology* **27**: 7355-7364

Roget K, Ben-Addi A, Mambole-Dema A, Gantke T, Yang HT, Janzen J, Morrice N, Abbott D, Ley SC (2012) Ikb Kinase 2 Regulates TPL-2 Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2 by Direct Phosphorylation of TPL-2 Serine 400. *Molecular and Cellular Biology* **32**: 4684-4690

Roland CL, Harken AH, Sarr MG, Barnett CC, Jr. (2007) ICAM-1 expression determines malignant potential of cancer. *Surgery* **141**: 705-707

Romagnoli M, Belguise K, Yu Z, Wang X, Landesman-Bollag E, Seldin DC, Chalbos D, Barille-Nion S, Jezequel P, Seldin ML, Sonenshein GE (2012) Epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF-beta1 is mediated by Blimp-1-dependent repression of BMP-5. *Cancer Research* **72**: 6268-6278

Rosette C, Roth RB, Oeth P, Braun A, Kammerer S, Ekblom J, Denissenko MF (2005) Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* **26**: 943-950

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

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. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 46565-46575

Salmeron A, Ahmad TB, Carlile GW, Pappin D, Narsimhan RP, Ley SC (1996) Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase kinase. *The EMBO Journal* **15**: 817-826

Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, Matsumoto K, Takeuchi O, Akira S (2005) Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nature Immunology* **6**: 1087-1095

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

Schmidt-Supprian M, Bloch W, Courtois G, Addicks K, Israel A, Rajewsky K, Pasparakis M (2000) NEMO/IKK gamma-deficient mice model incontinentia pigmenti. *Molecular Cell* **5**: 981-992

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 Biology* **6**: e8

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. *The EMBO Journal* **20**: 5678-5691

Schurch C, Riether C, Matter MS, Tzankov A, Ochsenbein AF (2012) CD27 signaling on chronic myelogenous leukemia stem cells activates Wnt target genes and promotes disease progression. *The Journal of Clinical Investigation* **122**: 624-638

Shah FD, Shukla SN, Shah PM, Shukla HK, Patel PS (2009) Clinical significance of matrix metalloproteinase 2 and 9 in breast cancer. *Indian Journal of Cancer* **46**: 194-202

Shim JH, Xiao C, Paschal AE, Bailey ST, Rao P, Hayden MS, Lee KY, Bussey C, Steckel M, Tanaka N, Yamada G, Akira S, Matsumoto K, Ghosh S (2005) TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes & Development* **19**: 2668-2681

Shitashige M, Satow R, Jigami T, Aoki K, Honda K, Shibata T, Ono M, Hirohashi S, Yamada T (2010) Traf2- and Nck-interacting kinase is essential for Wnt signaling and colorectal cancer growth. *Cancer research* **70**: 5024-5033

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 Biology* **10**: e1001376

Skaug B, Jiang X, Chen ZJ (2009) The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annual Review of Biochemistry* **78**: 769-796

Solt LA, Madge LA, Orange JS, May MJ (2007) Interleukin-1-induced NF-kB Activation Is NEMO-dependent but Does Not Require IKK β . *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 8724-8733

Song YJ, Jen KY, Soni V, Kieff E, Cahir-McFarland E (2006) IL-1 receptor-associated kinase 1 is critical for latent membrane protein 1-induced p65/RelA serine 536 phosphorylation and NF-kappaB activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 2689-2694

Soni V, Cahir-McFarland E, Kieff E (2007) LMP1 TRAFficking activates growth and survival pathways. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **597**: 173-187

Souchelnytskyi S, Tamaki K, Engstrom U, Wernstedt C, ten Dijke P, Heldin CH (1997) Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 28107-28115

Souchelnytskyi S, ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH (1996) Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type I receptor modulates TGF-beta1-induced cellular responses. *The EMBO Journal* **15**: 6231-6240

Sourvinos G, Tsatsanis C, Spandidos DA (1999) Overexpression of the Tpl-2/Cot oncogene in human breast cancer. *Oncogene* **18**: 4968-4973

Stafford MJ, Morrice NA, Peggie MW, Cohen P (2006) Interleukin-1 stimulated activation of the COT catalytic subunit through the phosphorylation of Thr290 and Ser62. *FEBS letters* **580**: 4010-4014

Sterz K (2013) A Systematical Analysis of the Signal Transduction Pathways Induced by the Latent Membrane Protein 1 (LMP1) of Epstein-Barr Virus. Doktorarbeit Thesis, Technische Universität München

Strzyz P (2016) TGF β and EMT as double agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **17**: 202-203

Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, Xing L, Hung MC, Bonfiglio T, Hicks DG, Tang P (2010) The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer : Basic and Clinical Research* **4**: 35-41

Sun L, Deng L, Ea CK, Xia ZP, Chen ZJ (2004) The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Molecular Cell* **14**: 289-301

Taira K, Umikawa M, Takei K, Myagmar BE, Shinzato M, Machida N, Uezato H, Nonaka S, Kariya K (2004) The Traf2- and Nck-interacting kinase as a putative effector of Rap2 to regulate actin cytoskeleton. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 49488-49496

Takahashi H, Ishikawa T, Ishiguro M, Okazaki S, Mogushi K, Kobayashi H, Iida S, Mizushima H, Tanaka H, Uetake H, Sugihara K (2015) Prognostic significance of Traf2- and Nck- interacting kinase (TNIK) in colorectal cancer. *BMC Cancer* **15**: 794

Takatsuna H, Kato H, Gohda J, Akiyama T, Moriya A, Okamoto Y, Yamagata Y, Otsuka M, Umezawa K, Semba K, Inoue J (2003) Identification of TIFA as an adapter protein that links tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) to interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-1 (IRAK-1) in IL-1 receptor signaling. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 12144-12150

Tardaguila M, Mira E, Garcia-Cabezas MA, Feijoo AM, Quintela-Fandino M, Azcoitia I, Lira SA, Manes S (2013) CX3CL1 promotes breast cancer via transactivation of the EGF pathway. *Cancer Research* **73**: 4461-4473

Town J (2012) Functions of the germinal center kinase TNIK in signal transduction of the viral oncoprotein LMP1 and the related CD40 receptor. Doktorarbeit Thesis, Technische Universität München

Tsang JY, Ni YB, Chan SK, Shao MM, Kwok YK, Chan KW, Tan PH, Tse GM (2013) CX3CL1 expression is associated with poor outcome in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* **140**: 495-504

Tsatsanis C, Patriotis C, Bear SE, Tschlis PN (1998) The Tpl-2 protooncoprotein activates the nuclear factor of activated T cells and induces interleukin 2 expression in T cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 3827-3832

Uemura N, Kajino T, Sanjo H, Sato S, Akira S, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J (2006) TAK1 is a component of the Epstein-Barr virus LMP1 complex and is essential for activation of JNK but not of NF-kappaB. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 7863-7872

Vallabhapurapu S, Karin M (2009) Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual Review of Immunology* **27**: 693-733

Verrecchia F, Mauviel A (2002) Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *The Journal of Investigative Dermatology* **118**: 211-215

Vougioukalaki M, Kanellis DC, Gkouskou K, Eliopoulos AG (2011) Tpl2 kinase signal transduction in inflammation and cancer. *Cancer Letters* **304**: 80-89

Walsh MC, Kim GK, Maurizio PL, Molnar EE, Choi Y (2008) TRAF6 autoubiquitination-independent activation of the NFkappaB and MAPK pathways in response to IL-1 and RANKL. *PloS one* **3**: e4064

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. *Molecular and Cellular Biology* **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. *Molecular and Cellular Biology* **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

Wang D, Liebowitz D, Wang F, Gregory C, Rickinson A, Larson R, Springer T, Kieff E (1988) Epstein-Barr virus latent infection membrane protein alters the human B-lymphocyte phenotype: deletion of the amino terminus abolishes activity. *Journal of Virology* **62**: 4173-4184

Wang L, Wang Y, Zhao J, Ren J, Hall KH, Moorman JP, Yao ZQ, Ning S (2017) The Linear Ubiquitin Assembly Complex Modulates Latent Membrane Protein 1 Activation of NF-kappaB and Interferon Regulatory Factor 7. *Journal of Virology* **91**: e01138-16

Wang X, Lu H, Urvalek AM, Li T, Yu L, Lamar J, DiPersio CM, Feustel PJ, Zhao J (2011) KLF8 promotes human breast cancer cell invasion and metastasis by transcriptional activation of MMP9. *Oncogene* **30**: 1901-1911

- Waterfield M, Jin W, Reiley W, Zhang M, Sun SC (2004) I κ B kinase is an essential component of the Tpl2 signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 6040-6048
- Waterfield MR, Zhang M, Norman LP, Sun SC (2003) NF- κ B1/p105 regulates lipopolysaccharide-stimulated MAP kinase signaling by governing the stability and function of the Tpl2 kinase. *Molecular Cell* **11**: 685-694
- Watford WT, Wang CC, Tsatsanis C, Mielke LA, Eliopoulos AG, Daskalakis C, Charles N, Odom S, Rivera J, O'Shea J, Tsichlis PN (2010) Ablation of tumor progression locus 2 promotes a type 2 Th cell response in Ovalbumin-immunized mice. *Journal of Immunology* **184**: 105-113
- Weiss A, Attisano L (2013) The TGF β superfamily signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews Developmental Biology* **2**: 47-63
- Wiercinska E, Naber HP, Pardali E, van der Pluijm G, van Dam H, ten Dijke P (2011) The TGF- β /Smad pathway induces breast cancer cell invasion through the up-regulation of matrix metalloproteinase 2 and 9 in a spheroid invasion model system. *Breast Cancer Research and Treatment* **128**: 657-666
- Wilson JB, Weinberg W, Johnson R, Yuspa S, Levine AJ (1990) Expression of the BNLF-1 oncogene of Epstein-Barr virus in the skin of transgenic mice induces hyperplasia and aberrant expression of keratin 6. *Cell* **61**: 1315-1327
- Woodward J (2008) Crossing the endothelium: E-selectin regulates tumor cell migration under flow conditions. *Cell Adhesion & Migration* **2**: 151-152
- Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF, Massague J (1992) TGF β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* **71**: 1003-1014
- Wu CJ, Conze DB, Li T, Srinivasula SM, Ashwell JD (2006a) Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF- κ B activation [corrected]. *Nature Cell Biology* **8**: 398-406
- Wu L, Nakano H, Wu Z (2006b) The C-terminal activating region 2 of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates NF- κ B through TRAF6 and TAK1. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 2162-2169
- Xia ZP, Sun L, Chen X, Pineda G, Jiang X, Adhikari A, Zeng W, Chen ZJ (2009) Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. *Nature* **461**: 114-119
- Xiang T, Fan Y, Li C, Li L, Ying Y, Mu J, Peng W, Feng Y, Oberst M, Kelly K, Ren G, Tao Q (2016) DACT2 silencing by promoter CpG methylation disrupts its regulation of epithelial-to-mesenchymal transition and cytoskeleton reorganization in breast cancer cells. *Oncotarget* **7**: 70924-70935

Xie P (2013) TRAF molecules in cell signaling and in human diseases. *Journal of Molecular Signaling* **8**: 7

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. *Journal of Immunology* **173**: 5546-5555

Xu D, Matsumoto ML, McKenzie BS, Zarrin AA (2018) TPL2 kinase action and control of inflammation. *Pharmacological Research* **129**: 188-193

Yan Q, Zhang W, Wu Y, Wu M, Zhang M, Shi X, Zhao J, Nan Q, Chen Y, Wang L, Cheng T, Li J, Bai Y, Liu S, Wang J (2015) KLF8 promotes tumorigenesis, invasion and metastasis of colorectal cancer cells by transcriptional activation of FHL2. *Oncotarget* **6**: 25402-25417

Yang J, Lin Y, Guo Z, Cheng J, Huang J, Deng L, Liao W, Chen Z, Liu Z, Su B (2001) The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nature Immunology* **2**: 620-624

Yao K, Lee SY, Peng C, Lim DY, Yamamoto H, Ryu J, Lim TG, Chen H, Jin G, Zhao Z, Han Y, Ma WY, Bode AM, Dong Z (2018) RSK2 is required for TRAF6 phosphorylation-mediated colon inflammation. *Oncogene* **37**: 3501-3513

Ye X, Brabletz T, Kang Y, Longmore GD, Nieto MA, Stanger BZ, Yang J, Weinberg RA (2017) Upholding a role for EMT in breast cancer metastasis. *Nature* **547**: E1-E3

Ying Z, Duvic M, Shiue L, Langridge T, Goswami M, Ni X (2015) Blood Transcriptional Profiling in Patients with Leukemic Cutaneous T-Cell Lymphoma on Extracorporeal Photopheresis Reveals the Integrin Signaling As the Top Pathway Associated with Clinical Response. *Blood* **126**: 3981

Young LS, Rickinson AB (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nature Reviews Cancer* **4**: 757-768

Yu DH, Zhang X, Wang H, Zhang L, Chen H, Hu M, Dong Z, Zhu G, Qian Z, Fan J, Su X, Xu Y, Zheng L, Dong H, Yin X, Ji Q, Ji J (2014) The essential role of TNIK gene amplification in gastric cancer growth. *Oncogenesis* **3**: e93

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 J, Clark K, Lawrence T, Peggie MW, Cohen P (2014a) An unexpected twist to the activation of IKK β : TAK1 primes IKK β for activation by autophosphorylation. *The Biochemical Journal* **461**: 531-537

Zhang J, Li X, Yang W, Jiang X, Li N (2014) TRAF4 promotes tumorigenesis of breast cancer through activation of Akt. *Oncology Reports* **32**: 1312-1318

Zhang J, Zhang X, Xie F, Zhang Z, van Dam H, Zhang L, Zhou F (2014) The regulation of TGF-beta/SMAD signaling by protein deubiquitination. *Protein & Cell* **5**: 503-517

Zhang L, Zhou F, Garcia de Vinuesa A, de Kruijf EM, Mesker WE, Hui L, Drabsch Y, Li Y, Bauer A, Rousseau A, Sheppard KA, Mickanin C, Kuppen PJ, Lu CX, Ten Dijke P (2013) TRAF4 promotes TGF-beta receptor signaling and drives breast cancer metastasis. *Molecular Cell* **51**: 559-572

Zhang Y, Jiang H, Qin M, Su X, Cao Z, Wang J (2016) TNIK serves as a novel biomarker associated with poor prognosis in patients with pancreatic cancer. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **37**: 1035-1040

Zhang YE (2009) Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Research* **19**: 128-139

Zhao Y, Ma J, Fan Y, Wang Z, Tian R, Ji W, Zhang F, Niu R (2018) TGF-beta transactivates EGFR and facilitates breast cancer migration and invasion through canonical Smad3 and ERK/Sp1 signaling pathways. *Molecular Oncology* **12**: 305-321

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bei *Nature Communications* unter folgendem Titel eingereicht:

„A central role of IKK2 and TPL2 in JNK activation and viral B-cell transformation.“

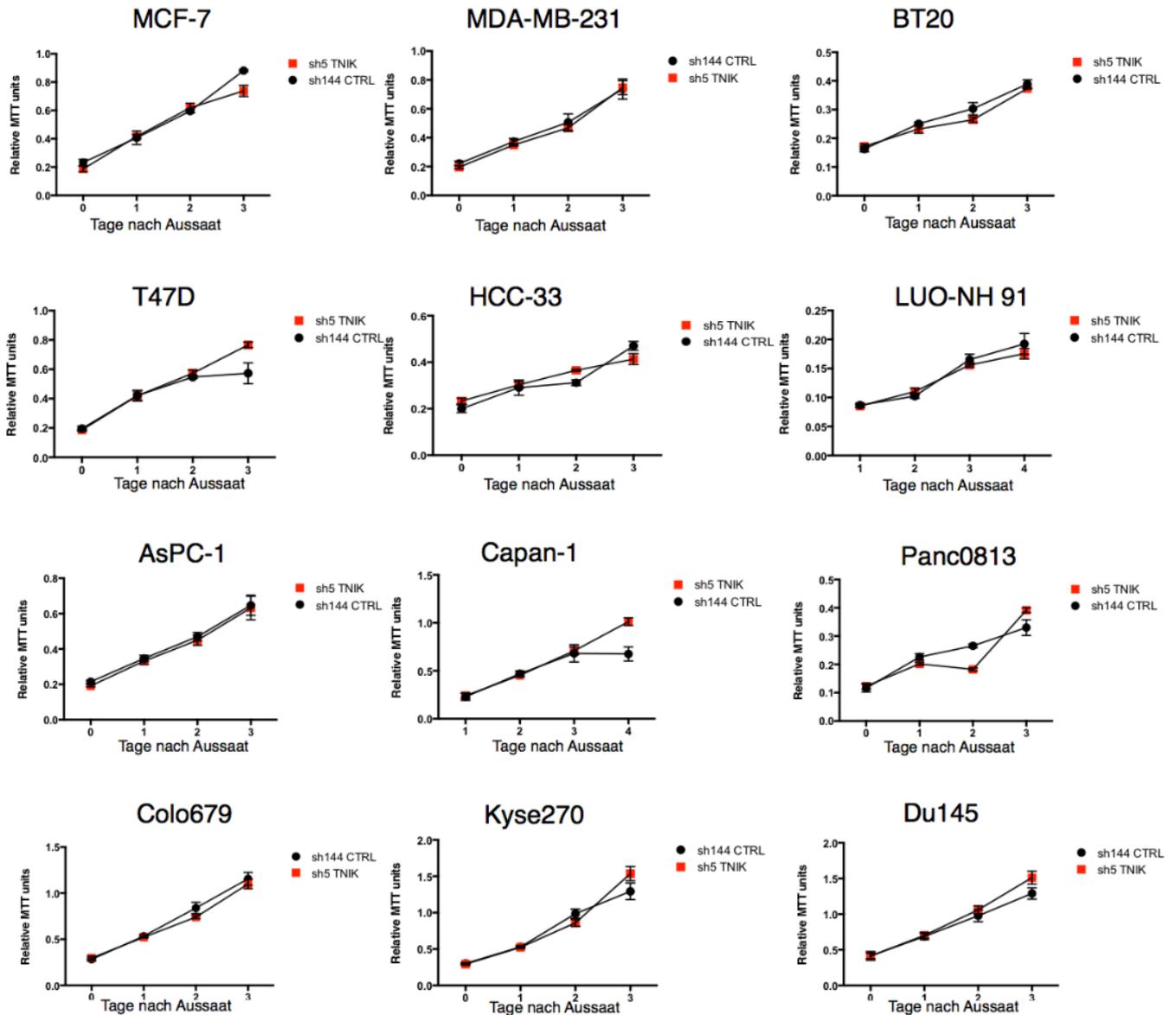
Stefanie Voigt, Kai R. Sterz, Fabian Gehler, Anne-Wiebe Mohr, Joanna B. Wilson, Andreas Moosmann, Arnd Kieser

Konferenzen

17th International Symposium on EBV and associated diseases, Zürich

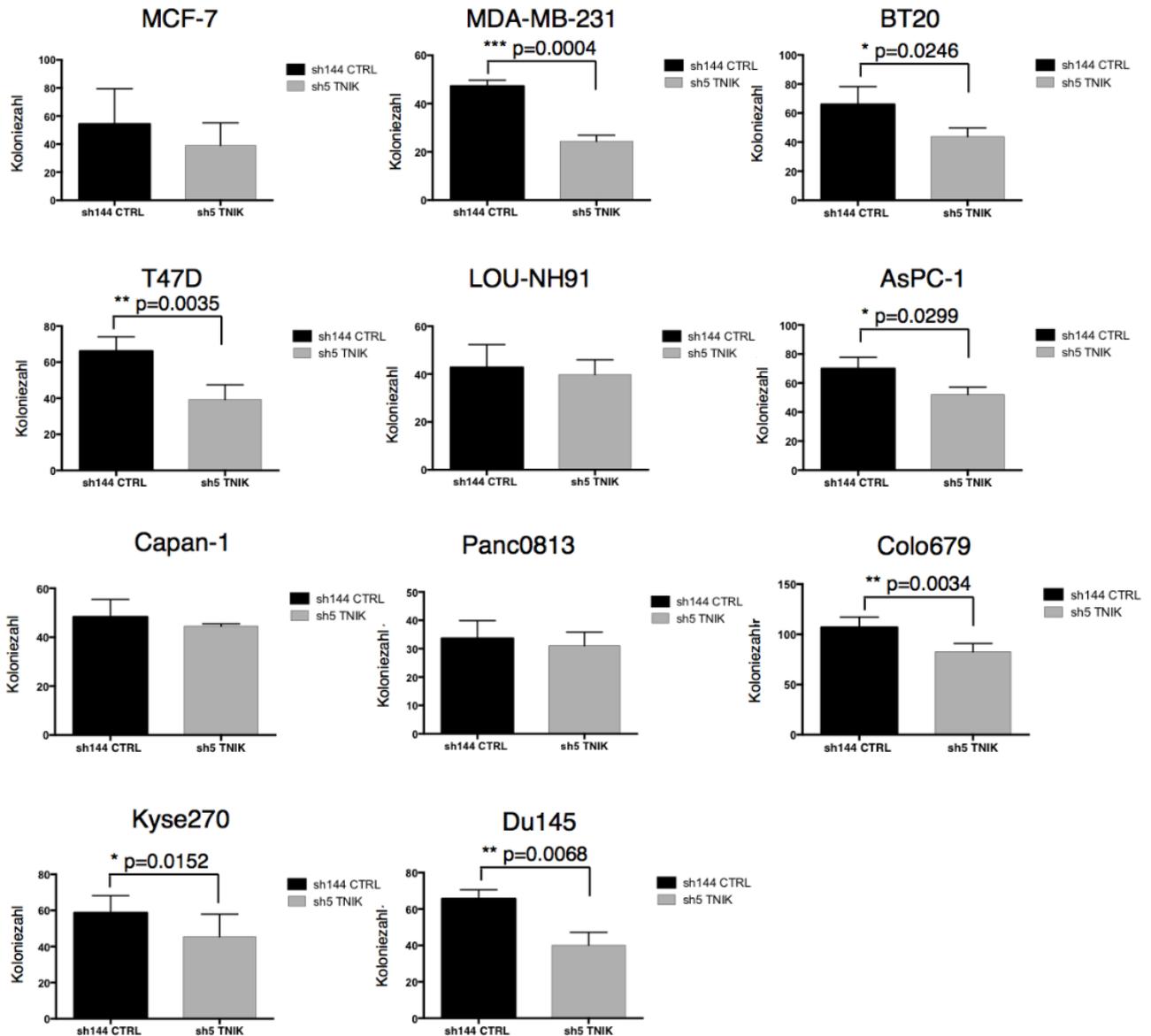
Vortrag: „LMP1 specifically activates MAPKinases through IkappaB kinase 2 (IKK2) and the oncogenic serine/threonine kinase Tpl2“

Anhang



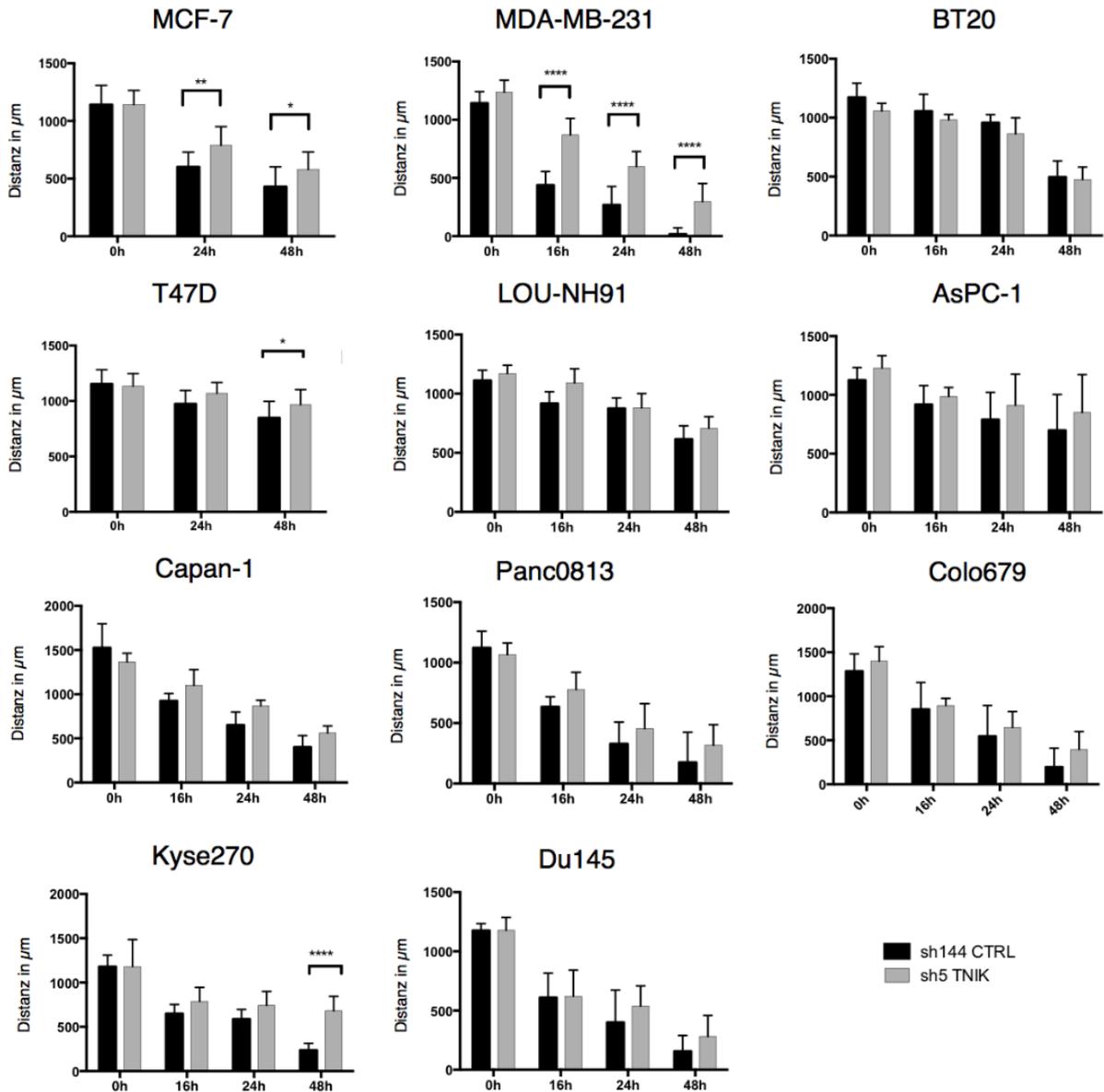
Anhang Abb. 1: Der Knockdown von TNiK führt zu keiner Beeinträchtigung der Proliferation und der Viabilität verschiedener Tumorzelllinien. Die verschiedenen Tumorzelllinien wurden jeweils mit TNiK-Knockdown (sh5 TNiK) und als Kontrollzelllinie (sh144 Ctrl) in 96-Well-Platten kultiviert und nach 0, 1, 2 und 3 Tagen der Umsatz an MTT als Maß für die Viabilität der Zellen gemessen. Dargestellt sind pro Zeitpunkt Triplikate zusammengefasst aus einem Experiment mit Standardabweichungen. Die Kurve welche mit den schwarzen Kreisen markiert ist steht für die Kontrollzellen sh144 Ctrl und die Kurve welche mit den roten Vierecken markiert ist für die TNiK-Knockdown-Zellen sh5 TNiK.

Anhang



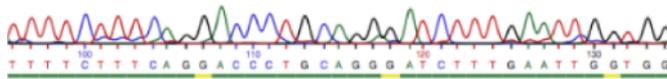
Anhang Abb. 2: Die Koloniebildung im Soft-Agar nach Knockdown von TNIK in verschiedenen Tumorzelllinien. Koloniaezahl (colony number) nach 14-21 Tagen Wachstum der verschiedenen Zelllinien mit TNIK-Knockdown (sh5 TNIK) oder der Kontrollzelllinie (sh144 Ctrl) in Soft-Agar. Dargestellt sind jeweils fünf verschiedene ausgezählte Gesichtsfelder aus den Experimenten mit Standardabweichung. Anzahl der ausgewerteten Experimente pro Graph: MCF-7 n=3, MDA-MB-231 n=3, BT20 n=3, T47D n=4, LOU-NH91 n=1, AsPC-1 n=3, Capan-1 n=2, Panc0813 n=3, Colo679 n=1, Kyse270 n=2, Du145 n=3. Zweiseitiger, ungepaarter t-Test p-values: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. grau: TNIK-Knockdown Zellen sh5 TNIK, schwarz: Kontrollzellen sh144 Ctrl.

Anhang

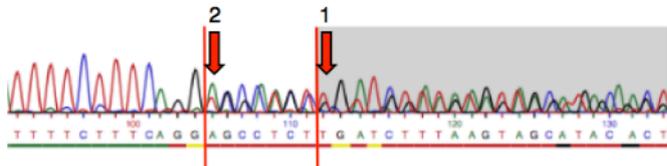


Anhang Abb. 3: Die Migrationsfähigkeit verschiedener Tumorzelllinien nach Knockdown von TNIK im Wundheilungsexperiment. A) Die Wundheilungskapazität der verschiedenen Zelllinien mit TNIK-Knockdown (sh5 TNIK) oder der Kontrollzelllinien (sh144 Ctrl) ist als Distanz in µm für die Zeitpunkte 0, 16, 24 und 48 h angegeben. Dargestellt sind jeweils fünf verschiedene, ausgewertete Gesichtsfelder aus den Experimenten mit Standardabweichung. Anzahl der ausgewerteten Experimente pro Graph: : MCF-7 n=4, MDA-MB-231 n=4, BT20 n=1, T47D n=4, LOU-NH91 n=2, AsPC-1 n=3, Capan-1 n=1, Panc0813 n=2, Colo679 n=4, Kyse270 n=2, Du145 n=2. Two-way ANOVA, p-values: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001. schwarz: Kontrollzellen sh144 Ctrl, grau: TNIK-Knockdown-Zellen sh5 TNIK.

Anhang

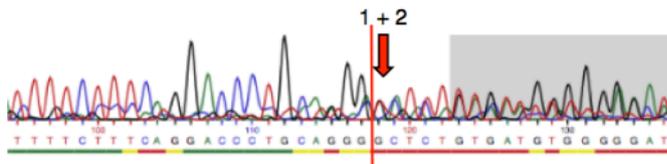


MDA-MB-231 WT



MDA-MB-231 TNIK KO cl.1

1. Allel: Deletion von AG, indel, *frameshift* (STOPP ab AA24)
2. Allel: Deletion von ACCCTGCAGGGATCTTTGAATTGG, indel, *in frame* Deletion von 8 AA in der Kinasedomäne

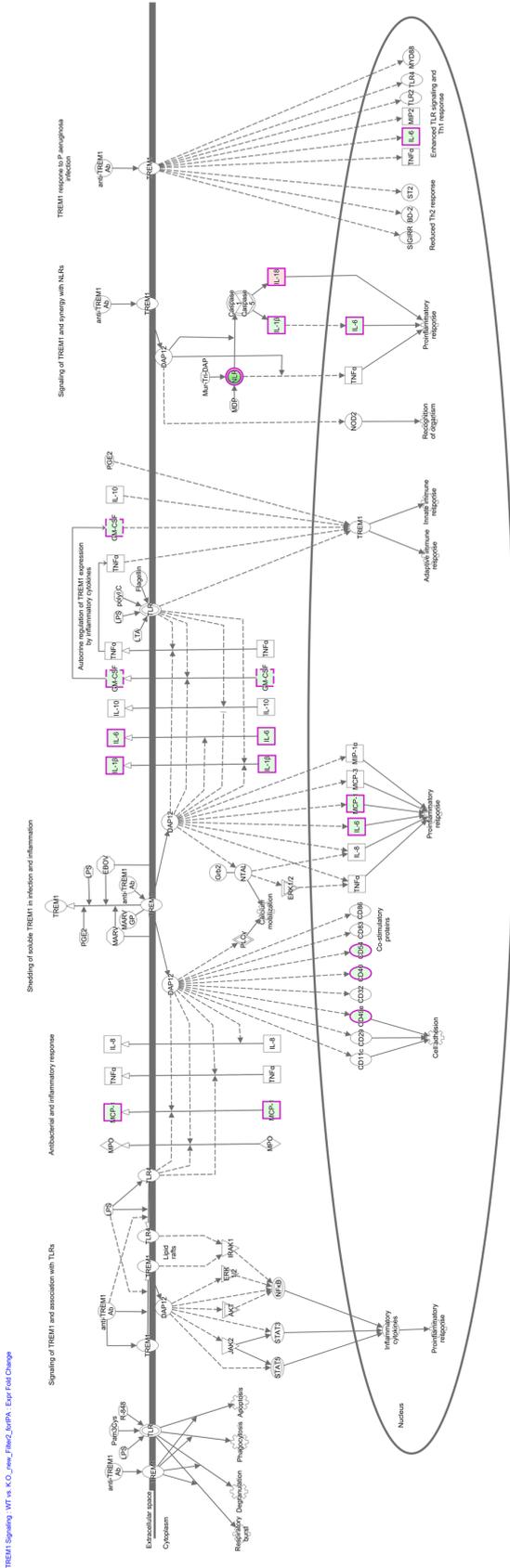


MDA-MB-231 TNIK KO cl.5

1. Allel: Insertion von G, indel, *frameshift* (STOPP ab AA25)
2. Allel: Deletion von A, indel, *frameshift* (STOPP ab AA74)

Anhang Abb. 4: Sequenzierung der MDA-MB-231 TNIK-Knockout Zellklone. Dargestellt sind Teilsequenzen der Sequenzierung von TNIK in MDA-MB-231 WT Zellen und den MDA-MB-231 TNIK KO cl.1 und cl.5. Die roten Pfeile markieren die Position, an welcher eine Änderung der DNA-Sequenz stattgefunden hat.

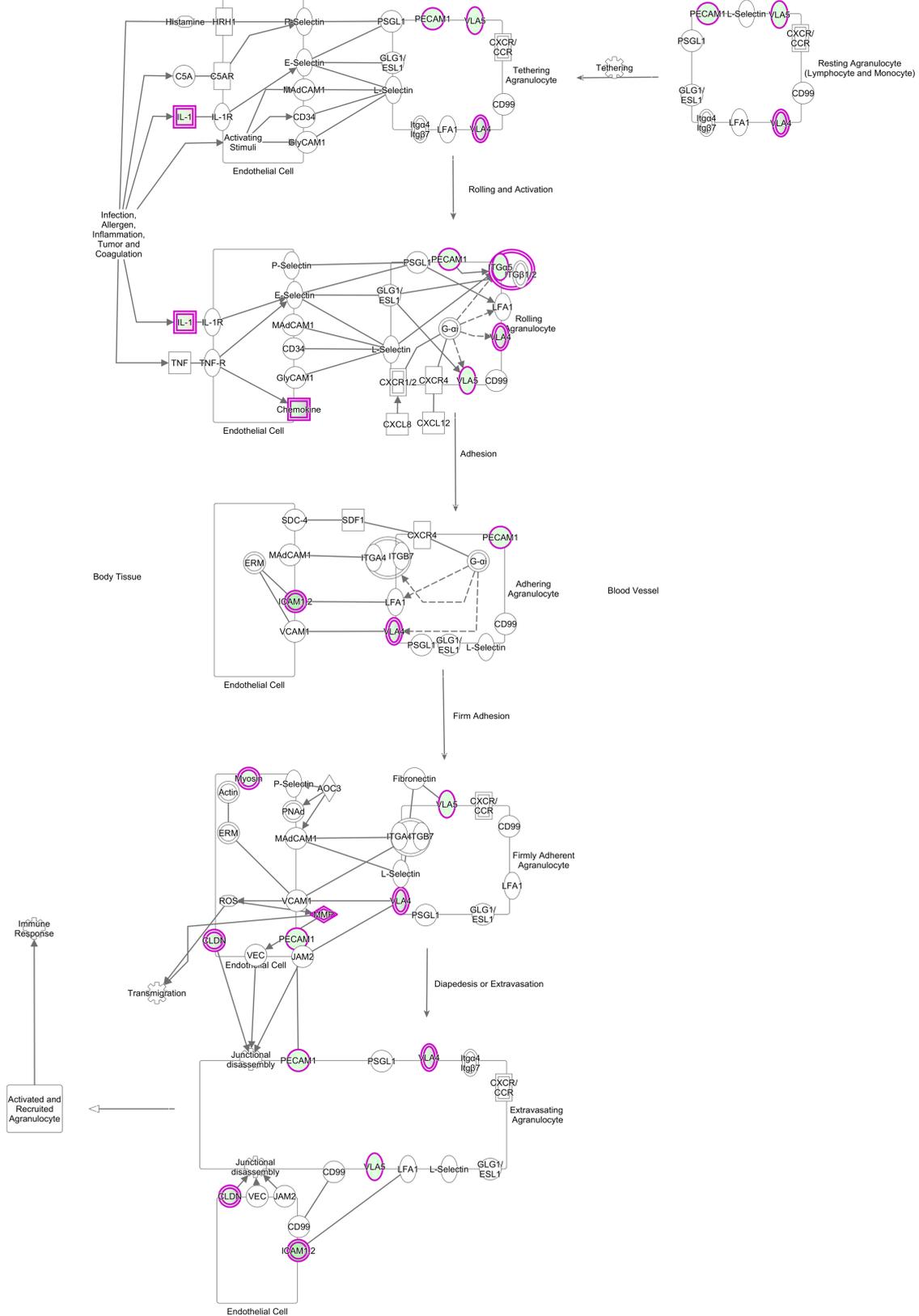
Anhang Abb. 5: Heatmaps der 157 am stärksten hochregulierten Gene (links) und der 200 am stärksten herunterregulierten Gene (rechts) in MDA-MB-231 Zellen nach Knockdown von TNIK. Dargestellt sind Triplikate der WT-Zellen vergleichen mit Triplikaten der Knockout-Zellklone 1 und 5. Blau: Herunterregulation, rot: Hochregulation.



Anhang Abb. 6: *TREM1* Signaling Signalweg-Grafik generiert aus IPA. Die farblich markierten Gene sind durch TNIK-KO betroffen. Quadrate: Cytokine, Rechtecke: G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Ellipsen: Transmembran-Rezeptoren, Kreise: andere. Abbildung von IMGM Laboratories erstellt.

Anhang

Agranulocyte Adhesion and Diapedesis : WT vs. K.O._new_Filter2_forIPA : Expr Fold Change



© 2000-2017 QIAGEN. All rights reserved.

Anhang Abb. 7: Agranulocyte Adhesion and Diapedesis Signalweg-Grafik generiert aus IPA. Die farblich markierten Gene sind durch TNIK-KO betroffen. Quadrate: Cytokine, Rechtecke: G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Ellipsen: Transmembran-Rezeptoren, Kreise: andere. Abbildung von IMG M Laboratories erstellt.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich bei der promotionsführenden Einrichtung Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Molekulare Funktionen der Komponenten des IKK2/TAK1/TNIK-Komplexes im Signalweg des LMP1-Onkoproteins des Epstein-Barr-Virus und weiteren onkogenen Signalwegen

selbstständig und nur mit den erlaubten Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Quellenangaben und Hilfsmittel wurden deutlich gekennzeichnet. Weiterhin ist diese Dissertation weder als Teilstück noch in der vorliegenden vollständigen Version einer weiteren Prüfungskommission vorgelegt worden.

München, den 24.05.2019

Stefanie Voigt

Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die mich während der Zeit der Durchführung und Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Arnd Kieser, der es mir ermöglicht hat in seiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit zu diesem interessanten Thema anzufertigen. Ich möchte mich für die tolle Betreuung, die Unterstützung und die zahlreichen Ratschläge und Anregungen während der gesamten Zeit bedanken.

Weiterhin gilt ein großer Dank Herrn Prof. Dr. Dirk Haller für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Außerdem möchte ich mich bei Frau PD Dr. Ursula Zimmer-Strobl und Herrn Prof. Dr. Daniel Krappmann als Mitglieder meines Dissertationskomitees für die wertvollen Ideen und Diskussionen bedanken.

Ebenso gilt mein Dank der gesamten AGV und besonders meiner Arbeitsgruppe „Signaltransduktion“ für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die praktischen Ratschläge und die Hilfe bei diversen Laborarbeiten und technischen Problemen. Im Einzelnen danke ich Fabian und Kai für ihre fachliche Hilfe und Unterstützung bei allen wissenschaftlichen Fragen. Außerdem danke ich Helmut für die fast tägliche Ablenkung und Unterhaltungen beim Mittagessen und die Hilfsbereitschaft im Labor.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester und Johannes, die mich in jeder Lebenslage unterstützt haben und mir zur Seite standen. Vielen Dank dafür!